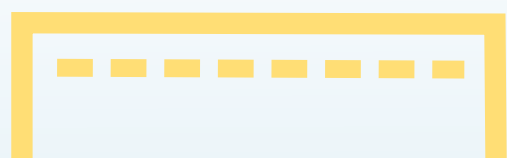




**21° Verano de la Ciencia de la
Región Centro**



CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

Vol. 5, No. 4



ISBN 978-607-9453-38-1

Comité Organizador

Coordinación general

Dr. Manuel Reta Hernández

Dra. Laura Hernández Martínez

Dr. Luis Alejandro Aguilera Galaviz

Universidad Autónoma de Zacatecas

Institución participante	Coordinadores
Centro de Investigación en Matemáticas, Unidad Guanajuato	Dr. Arturo Hernández Aguirre
Centro de Investigaciones en Óptica A.C.	Lic. Luz Adriana Gutiérrez Guerra Lic. Sarahí Hernández Lugo
Centro de Investigación en Química Aplicada	Dr. Antonio Cárdenas Flores Dra. Leticia Larios López
Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato	Dr. Reynaldo Ariel Álvarez Morales Ing. Jesús Vega Medina
Centro Regional de Educación Normal Profra. Amina Madera Lauterio, Cedral S.L.P.	Dr. Juan Manuel Rodríguez Tello
Escuela Nacional de Estudios Superiores UNAM, Unidad León	Dra. Harumi Shimada Beltrán
Escuela Normal de Estudios Superiores del Magisterio Potosino	Mtro. Luís Daniel García García
Instituto de Neurobiología, UNAM Campus Juriquilla	Dra. Nuri Aranda López
Instituto Estatal de Investigación y Posgrado en Educación	Dr. Rafael Benjamín Culebro Tello
Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica	Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Instituto Tecnológico de Aguascalientes	Lic. Yusahara Vázquez Ochoa
Instituto Tecnológico de Celaya	M.G.A. Esperanza Peña Morales
Instituto Tecnológico de Querétaro	Dr. José Arturo Toscano Giles
Instituto Tecnológico de San Luis Potosí	Dr. Pedro de Jesús García Zugasti, Dr. Ariel Benjamín de la Rosa Zapata
Instituto Tecnológico Superior de Abasolo	Dr. César Álvarez Mejía Dr. Eusebio Orozco Medel,
Instituto Tecnológico Superior de Irapuato	M.C. Akira Torreblanca Ponce M.C. José Manuel Aguilera López
Instituto Tecnológico Superior de Monclova	Mtra. Verónica Martínez Vela Ing. Guillermo Riojas Rodríguez
Instituto Tecnológico Superior de Purísima del Rincón	Mtro. Luis Fernando Villanueva Jiménez Lic. Valente Serrano Gervacio,
Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro	Mtro. Jerónimo Landeros Flores, Ing. Víctor Manuel Villa Coronado, Dr. Armando Espinoza Banda
Universidad Autónoma de Aguascalientes	Dr. Marcelo de Jesús Pérez Ramos, Lic. Laura Olivia Ortega Calderón Mtra. Yazmin Ramírez Rodríguez
Universidad Autónoma de Coahuila	Lic. Alejandro Herrera Hernández M. A. María Concepción Esparza Castro Lic. Dora Elia Cárdenas Elizondo
Universidad Autónoma de Querétaro	Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña M. en GIC. Karina Villarauz Camargo
Universidad Autónoma de San Luis Potosí	ME Ma. Guadalupe Alejo González Ing. Laura Elena Ochoa Leija
Universidad Autónoma de Zacatecas	Dr. Manuel Reta Hernández Dra. Laura Hernández Martínez Dr. Alejandro Aguilera Galaviz
Universidad de Guanajuato	MDG. Emma Reséndiz Ramírez M. en C. Jenaro Daniel Jaime González
Universidad del Centro de México	Mtra. Alicia Villagómez Carvajal Mtra. Yuritzi Sofía López Hernández
Universidad Pedagógica Nacional - Unidad 241	Dr. Andrés Vázquez Faustino
Universidad Politécnica de Querétaro	Dra. Alondra Anahí Ortiz Verdín
Universidad Politécnica de San Luis Potosí	Dr. Martín Hernández Sustaita
Universidad Politécnica del Bicentenario, Silao	Mtra. Dafne Flores Rodríguez Dr. Javier Cruz Salgado

CONTENIDO

1	Actividad lítica y efecto antagónico de rizobacterias contra hongos fitopatógenos <i>Diana Laura Pescador Tovar, Blanca Estela Gómez Luna (Asesora)</i>	1
2	Adsorción y degradación de contaminantes usando lirio acuático (<i>Eichhornia crassipes</i>) <i>Flor Berenice Conejo Moreno, Divanery Rodríguez Gómez (Asesora)</i>	7
3	Aislamiento y caracterización de hongos con importancia biotecnológica <i>Juan Manuel Fierro Triana, Juan Gualberto Colli Mull (Asesora)</i>	13
4	Aleaciones con memoria Heusler Ni50Mn35In15 y Ni50Mn37Sn13 para ser aplicadas en la refrigeración magnética <i>Gabriela Elizabeth Ríos Rodríguez, José Luis Sánchez Llamazares (Asesor)</i>	19
5	Análisis cromatográfico de los extractos de plantas presentes en el Estado de Guanajuato para el control de la Hiperglucemia <i>Edgar Ulises González López, Alejandra Sarahí Ramírez Segovia (Asesor)</i>	25
6	Análisis de modelos cosmológicos como sistemas dinámicos <i>Mariana del Rocío Segura, Alberto Hernández Almada (Asesor)</i>	30
7	Análisis de secuencias multilocus para la identificación de hongos endófitos (A) <i>Katia Nazaret Reyes Carrizalez, Jesús Israel Morales Jiménez (Asesor)</i>	37
8	Análisis de secuencias multilocus para la identificación molecular de hongos endófitos de plantas (B) <i>Hilda Cristal Guerrero Silva, Jesús Israel Morales Jiménez (Asesor)</i>	43
9	Análisis de secuencias multilocus para la identificación molecular de hongos endófitos en plantas (C) <i>Ma. Eugenia López Ruiz, Jesús Israel Morales Jiménez (Asesor)</i>	48
10	Análisis del modelo ω CDM como sistema dinámico <i>Leopoldo Herrera Zamorano, Alberto Hernández Almada (Asesor)</i>	53
11	Análisis espectroscópico de melanina y su respuesta a la radiación UV (A) <i>Sidharta Denise Gutiérrez Hernández, Mariana Alfaro Gómez (Asesor)</i>	61
12	Análisis espectroscópico de melanina y su respuesta a la radiación UV (B) <i>Ivonne Abigail Hernández Guadarrama, Mariana Alfaro Gómez (Asesor)</i>	67
13	Aplicación de métodos geofísicos para diferentes tareas geológicas <i>Balandra Melibheé Luna Rodríguez, Vsevolod Yutis Von Brincken (Asesor)</i>	72
14	Astroquímica. La Química del espacio <i>Brenda Maricela Aguilar Banda, Miguel Ángel Trinidad Hernández (Asesor)</i>	77
15	Bioprospección de microalgas del Eje Neovolcánico <i>Sergio Rodrigo Muñoz Carranza, Alberto Ayala Islas (Asesor)</i>	83
16	Bioprospección de microalgas nativas del Eje Neovolcánico para determinar su potencial biotecnológico (A) <i>Aldo García Carrillo, Alberto Ayala Islas (Asesor)</i>	89
17	Bioprospección de microalgas nativas del Eje Neovolcánico para determinar su potencial biotecnológico (B) <i>Lesly Noemi Flores Briano, Alberto Ayala Islas (Asesor)</i>	94
18	Búsqueda de cepas sexualmente compatibles de <i>Ustilago maydis</i> con potencial para la producción de huitlacoche (A) <i>Alan Daniel Tovar Chávez, José Antonio Cervantes Chávez (Asesor)</i>	100
19	Búsqueda de cepas sexualmente compatibles de <i>Ustilago maydis</i> con potencial para la producción de huitlacoche (B) <i>Alejandro Javier Maciel Carrera, José Antonio Cervantes Chávez (Asesor)</i>	106
20	Cambios morfológicos en embriones de <i>Echinocactus platyacanthus</i> bajo diferentes tratamientos germinativos <i>José Emmanuel Martínez Cortés, Francisco Alejo Iturvide (Asesor)</i>	111

21	Cambios neurogénicos inducidos por el acetato de leuprolida, un agonista de la GnRH, en ratas con isquemia cerebral <i>Luis Omar Hernández Ocegueda, José Luis Quintanar Stephano (Asesor)</i>	117
22	Caracterización de lipasas producidas por hongos aislados de México <i>Cecilia Villarreal Reyes, Divanery Rodríguez Gómez (Asesor)</i>	122
23	Caracterización de microorganismos tolerantes y/o resistentes a manganeso <i>Ana Brenda Ramírez Corona, María Azucena Márquez Lucio (Asesor)</i>	128
24	Caracterización de mutantes de dimorfismo de M102, M104 y M114 <i>Sporothrix schenckii</i> , generadas por mutagénesis insercional <i>Marianzazu Olivo Guerra, Gustavo A. Niño Vega (Asesor)</i>	134
25	Caracterización de mutantes de dimorfismo M107, M111 y M116 de <i>Sporothrix schenckii</i> , generadas por mutagénesis insercional <i>Juan Manuel Rangel Pérez, Gustavo A. Niño Vega (Asesor)</i>	141
26	Caracterización molecular y virulencia de hongos entomopatógenos aislados en sierra gorda de Guanajuato (A) <i>Isis Pérez Hernández, Juan Gualberto Colli Mull (Asesor)</i>	148
27	Caracterización molecular y virulencia de hongos entomopatógenos aislados en Sierra Gorda de Guanajuato (B) <i>Dámaris Juárez Ledezma, Juan Gualberto Colli Mull (Asesor)</i>	154
28	Citocinas (TNF alfa, IL-2, MCP-1 e INF gamma) y marcadores bioquímicos implicados en la desregulación mediada por proteínas cinasas C, PKC en un modelo de obesidad y diabetes mellitus tipo 2 <i>Karen Almendra Arguijo Vielma, Patricia Monserrat Rodríguez, y Santiago Marisela Ahumada Solórzano (Asesor)</i>	160
29	Comportamiento del ácido hipúrico ante la determinación de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) <i>María Fernanda Delgado Díaz, Aída Jimena Velarde Salcedo (Asesor)</i>	166
30	Comunidades de macroinvertebrados en manantiales áridos y templados de Querétaro <i>Lendy Yustin García Miranda, Raúl Francisco Pineda López (Asesor)</i>	174
31	Construcción de la mutante en el factor de transcripción Msn4 de <i>Cándida glabrata</i> , un patógeno oportunista <i>Diana Laura Vázquez Durán, Alejandro de Las Peñas Nava (Asesor)</i>	180
32	Construcción de una celda con carbón activado para la electrosorción de Cr (III) (Parte I) <i>Alma Cristina Gaytán Lara, Lucía Guadalupe Alvarado Montalvo (Asesor)</i>	186
33	Construcción de una celda con carbón activado para la electrosorción de cromo trivalente (Parte II) <i>Alondra Ramírez Padilla, Lucía Guadalupe Alvarado Montalvo (Asesor)</i>	193
34	Cuantificación de contaminantes en cultivos comestibles (<i>Chenopodium ambrosioides</i> y <i>Petroselinum crispum</i>) expuestos a aguas residuales <i>Andrea Anahi Parra Piñón, Candy Carranza Álvarez (Asesor)</i>	199
35	Desarrollo de un inmunoensayo para detectar el contaminante emergente Amoxicilina en aguas residuales <i>Jesús Emmanuel Alvarado Negrete, Norma Angélica Chávez Vela (Asesor)</i>	205
36	Determinación de compuestos fenólicos en cultivos in vitro de <i>Pereskia sacharosa</i> <i>Aime Alejandra Romo Bautista, Yenny Adriana Gómez Aguirre (Asesor)</i>	212
37	Determinación de la presencia de <i>Salmonella</i> en la biota del cuerpo hídrico del área natural protegida "Las Musas" en Manuel Doblado, Guanajuato <i>Marcela Prieto Guerra, María Azucena Márquez Lucio (Asesor)</i>	218
38	Determinación del efecto antioxidante de los extractos de <i>Heliopsis longipes</i> <i>Marcos Fidel Arévalo González, Aída Jimena Velarde Salcedo (asesora)</i>	223
39	Determinación del efecto de compuestos volátiles sintetizados por <i>Pseudomonas rhodesiae</i> GRC 140 en <i>Arabidopsis Thaliana</i> <i>Pamela Carolina González Rodríguez, Alejandro Hernández Morales (Asesor)</i>	235

40	Determinar la concentración máxima en ppm a la que crecen los microorganismos tolerantes y/o resistentes a manganeso aislados de sedimentos provenientes de La presa de La Purísima, Guanajuato <i>Jorge Alberto Negrete Ortiz, María Azucena Márquez Lucio (Asesor)</i>	241
41	Diseño de hidrogeles basados en colágeno/quitosano/poliuretano para aplicación en la remoción de iones Pb (II) <i>María Teresa Banda del Bosque, Lucía Fabiola Cano Salazar (Asesor)</i>	247
42	Diseño de hidrogeles de colágeno para aplicación en la remoción de iones Pb (II) <i>Carlos Alejandro González Carbajal, Lucía Fabiola Cano Salazar (Asesor)</i>	253
43	Diseño de hidrogeles de colágeno y quitosano para aplicación en la remoción de iones Pb (II) <i>Grecia Daniela Ortiz Hernández, Lucía Fabiola Cano Salazar (Asesor)</i>	260
44	Diversidad de arañas sinantrópicas en la zona de Guadalupe-Zacatecas, Zacatecas, México <i>Fernández Domínguez Jessica, Martínez Salazar Elizabeth Aurelia (Asesor)</i>	267
45	Efecto alelopático de <i>Cyperus rotundus</i> L. (Cyperaceae) sobre plantas arvenses <i>María del Rocío Martínez Miranda, Victoria Hernández Hernández (Asesor)</i>	272
46	Efecto de la estimulación con campos magnéticos sobre la polimerización in vitro del péptido β amiloide <i>Iván Andrés Lara Ibarra, Gustavo Basurto Islas (Asesor)</i>	279
47	Efecto de la hiperglucemia sobre la expresión de proteínas de estrés del retículo endoplásmico y migración de células de músculo liso vascular obtenidas de ratas diabéticas <i>Enelu Monsserrat Nava Velasco, Ricardo Espinosa Tanguma (Asesor)</i>	285
48	Efecto de la inflamación intestinal sobre los receptores p2x3 en neuronas del ganglio de la raíz dorsal <i>María Fernanda Durán Vázquez, Raquel Guerrero Alba (Asesor)</i>	292
49	Efecto de solventes sobre la producción y separación de la mezcla ABE producida por <i>Clostridium acetobutylicum</i> (A) <i>María Fernanda Cano Aguilera, Ricardo Morales Rodríguez (Asesor)</i>	300
50	Efecto de solventes sobre la producción y separación de la mezcla de ABE producida por <i>Clostridium acetobutylicum</i> (B) <i>María Fernanda Pulido López, Ricardo Morales Rodríguez (Asesor)</i>	305
51	Efecto promotor de crecimiento en plantas de huizache (<i>Acacia farnesiana</i>) y lenteja (<i>Lens culinaris</i>) con uso de rizobacterias <i>Daniela Galindo Rocha, Blanca Estela Gómez Luna (Asesor)</i>	311
52	El DNA exógeno afecta la regeneración y la conidiación de <i>Trichoderma atroviride</i> <i>Mariana Fernanda Pimentel González, Alfredo Heriberto Herrera Estrella (Asesor)</i>	316
53	Electrofitorremediación de suelos a escala laboratorio para la remoción de Cr(VI) <i>María Isabel Romero Cervantes, Erick Rodolfo López Almanza (Asesor)</i>	323
54	Estado de conservación de manantiales en el sur de Querétaro <i>Andrea Guadalupe Celestino Hernández, Raúl Francisco Pineda López (Asesor)</i>	333
55	Estandarización del cultivo in vitro de <i>Asphodelus fistulosus</i> de interés en el ámbito de la fitoestabilización de suelos mineros de Zacatecas, México <i>Juan Alberto Ríos Castro, Juan Armando Flores de la Torre (Asesor)</i>	339
56	Estandarización del cultivo in vitro de <i>Sporobolus airoides</i> de interés en el ámbito de la fitoestabilización de suelos mineros de Zacatecas, México <i>Jaime Alberto Solís Ojeda, Juan Armando Flores de la Torre (Asesor)</i>	345
57	Estimación de la recurrencia de cáncer del sistema respiratorio de 1975 a 2016 en los Estados Unidos de América <i>Jonathan Dazaeth Delgado Sánchez, Angélica Hernández Quintero (Asesor)</i>	351
58	Estimación de la remoción de Cr(VI) en agua empleando biomasa de <i>Sargassum</i> sp Rodrigo Merino Lubetzky, Edgar Vázquez Núñez (Asesor)	357
59	Estudio de biomateriales a base de cerámicos y polímeros bio-degradables y su aplicación en la dosificación de sustancias activas (A) <i>Ana Sofía Torres García, María Cristina Ibarra Alonso (Asesor)</i>	363

60	Estudio de biomateriales a base de cerámicos y polímeros bio-degradables y su aplicación en la dosificación de sustancias activas (B) <i>Andrea Concepción Segovia García, María Cristina Ibarra Alonso (Asesor)</i>	370
61	Estudio de la asociación simbiótica Trichoderma-planta <i>Sofía Abigail Valero Rodríguez, Alfredo H. Herrera Estrella (Asesor)</i>	376
62	Estudio de la regeneración de resinas in situ en una celda de electrodeionización <i>Claudia Zúñiga Chacón, Lucía Guadalupe Alvarado Montalvo (Asesor)</i>	383
63	Estudio de las especies moleculares presentes en el disco L1551 IRS 5 <i>Citlalli Gabriela Vidales Hernández, Miguel Ángel Trinidad Hernández (Asesor)</i>	390
64	Estudio de reactividad de derivados de piridinas para generar moléculas con propiedades de óptica no lineal <i>Lucero Alejandra Vela López, Miguel Ángel Vázquez Guevara (Asesor)</i>	396
65	Estudio de relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) de moléculas afines a la proteína de vesículas sinápticas 2A (SV2A) y con actividad anticonvulsiva <i>Estefano Michelle Buenfil Valdovino, Rubén Antonio Romo Mancillas (Asesor)</i>	402
66	Estudio del origen del agua subterráneas utilizando hidrogeoquímica <i>Dayanne Araceli Vázquez Contreras, José Alfredo Ramos Leal (Asesor)</i>	409
67	Estudio etnobotánico en comunidades rurales de Dolores Hidalgo, Guanajuato Elsa Guadalupe Hernández Valadez, Rubí Luévano Rodríguez, Luis David Vargas López, y Ángel Josabad Alonso Castro (Asesor)	415
68	Etnografía y muestreo poblacional de comunidades nativas del Bajío. Caso La Cruz del Palmar, San Miguel de Allende <i>Diana Paola Morales Martínez, Karla Sandoval Mendoza (Asesor)</i>	424
69	Evaluación de la capacidad extractiva del aceite de soya para llevar a cabo la recuperación de naproxeno mediante la técnica de extracción líquido-líquido <i>Diana Laura González Cervantes, Teresa Alejandra Razo Lazcano (Asesor)</i>	431
70	Evaluación de la promoción del crecimiento de Sorghum bicolor en asociación con el hongo Metarhizium brunneum <i>María Guadalupe Mendoza Cervantes, Israel Enrique Padilla Guerrero (Asesor)</i>	436
71	Evaluación de la promoción del crecimiento de Sorghum bicolor en asociación con el hongo Metarhizium robertsii <i>Sara Paulina López López, Israel Enrique Padilla Guerrero (Asesor)</i>	442
72	Evaluación de la sensibilidad de tres especies de microalgas expuestas ante contaminantes emergentes <i>Antonio Sebastián Monroy Castillo, Gustavo Emilio Santos Medrano (Asesor)</i>	447
73	Evaluación del efecto antifúngico de nanopartículas de oro (AuNPs) y plata (AgNPs) de origen biogénico sobre los fitopatógenos Alternaria alternata y Fusarium oxysporum <i>Ana Cristina Morales Moreno, Luz Elena Vidales Rodríguez (Asesor)</i>	451
74	Evaluación prospectiva de materiales no convencional (vegetales y bacterianos) para la elaboración de biocompositos con aplicaciones industriales <i>Samantha María Calvillo Fuentes, Edgar Vázquez Núñez (Asesor)</i>	458
75	Extracción de compuestos polifenólicos asistida por microondas y ultrasonido de Crataegus mexicana (tejocote) (A) <i>Laura Angélica García Ruiz, Lluvia López López (Asesor)</i>	464
76	Extracción de compuestos polifenólicos asistida por microondas y ultrasonido de Crataegus Mexinaca (Tejocote) (B) <i>Lessli Aneth Guerrero Dimas, Lluvia Itzel López López (Asesor)</i>	470
77	Extracción y caracterización de mucílago de linaza para la protección solar de la piel <i>Alma Marina Silos Vega, Juan Carlos Ramírez Granados (Asesor)</i>	477
78	Fabricación de celdas solares basadas en películas nanométricas de GaAs <i>Lendy Marisol Hernández Gaytán, Irving Eduardo Cortes Mestizo (Asesor)</i>	483
79	Filogenia molecular de las Arseniato reductasas (ACR2) en plantas y hongos <i>Eduardo Torres Martínez, César Díaz Pérez (Asesor)</i>	490

80	Generación de líneas transgénicas de pez cebra que contengan el sensor de la actividad de calcio GCaMP6 <i>Karla Nalini Albor Martínez, Luis Roberto Rodríguez Ortiz (Asesor)</i>	496
81	Generación de mutantes de los factores de transcripción que regulan la filamentación en <i>Candida dubliniensis</i> <i>Rubí Durán Ramírez, Eugenio Mancera Ramos (Asesor)</i>	503
82	Generación de mutantes en el hongo patógeno <i>Sporothrix schenckii</i> (A) <i>Ángela Paola González Jorge, Héctor Manuel Mora Montes (Asesor)</i>	508
83	Generación de mutantes en el hongo patógeno <i>Sporothrix schenckii</i> (B) <i>Perla Botello Rosales, Héctor Manuel Mora Montes (Asesor)</i>	514
84	Generación de mutantes en el hongo patógeno <i>Sporothrix schenckii</i> (C) <i>César Augusto Zúñiga Venegas, Héctor Manuel Mora Montes (Asesor)</i>	520
85	Hidrólisis enzimática de residuos agroindustriales de la región de Guanajuato <i>María José Martínez Pauli, Ricardo Morales Rodríguez (Asesor)</i>	526
86	Identificación de bacterias ácido lácticas <i>Emmanuel Armando Mata Coria, Guicela Ramírez Bernal (Asesora)</i>	531
87	Identificación molecular de aislados clínicos del hongo patógeno oportunista <i>Candida glabrata</i> y de otras tres especies principales causantes de candidemia <i>Alexia Banda Gutiérrez, Irene Beatriz Castaño Navarro (Asesor)</i>	535
88	Identificación y caracterización de genes involucrados en la respuesta al estrés por frío para generar plantas tolerantes al cambio climático (A) <i>Diana Pérez Alegría, Juan Francisco Jiménez Bremont (Asesor)</i>	542
89	Identificación y caracterización de genes involucrados en la respuesta al estrés por frío para generar plantas tolerantes al cambio climático (B) <i>Luz Jannine de la Peña Hernández, Juan Francisco Jiménez Bremont (Asesor)</i>	548
90	Implementación de sensores de fibra óptica por medio de fuentes de luz de amplio espectro <i>Adalberto Pérez Guzmán, Julián Moisés Estudillo Ayala (Asesor)</i>	555
91	Monitoreo de calidad del agua en algunos manantiales de Querétaro <i>Jesús Palafox García, Raúl Francisco Pineda López (Asesor)</i>	562
92	Mucilago de sábila para fotoprotección <i>Sara Andrea Álvarez Alvarado, Juan Carlos Ramírez Granados (Asesor)</i>	566
93	Nanopartículas para SERS Raman para detectar biomoléculas <i>Gabriel Rodríguez Guijarro, Hugo Ricardo Navarro Contreras (Asesor)</i>	571
94	Obtención de proteínas recombinantes a partir de genes derivados de <i>Moringa oleifera</i> <i>Karen Covarrubias Flores, Francisco Morales Domínguez (Asesor)</i>	578
95	Papel de los canales BkCa del músculo liso en la contracción de la arteria mesentérica en ratas con síndrome metabólico. Estudio piloto <i>Ashley Michelle García Luis, Ricardo Espinosa Tanguma (Asesor)</i>	584
96	Polinomios Cromáticos <i>Ángel Alexis Barrera Vega, Fidel González Gutiérrez (Asesor)</i>	591
97	Predicción de zonas codificantes de miRNAs con Rstudio <i>Sara Lucía Toscano Alaniz, Cesaré Ovando Vázquez (Asesor)</i>	599
98	Preparación de microemulsiones (MEs) de transanetol (TANE) y aceite esencial de menta (MEN) para la encapsulación de curcumina (CUR) <i>Liliana Sofía Farias Vázquez, René Darío Peralta Rodríguez (Asesor)</i>	604
99	Producción de proteínas de fusión hIL-2 e hIFN- γ en <i>E. coli</i> <i>Montserrat Estefanía Marmolejo Sánchez, Antonio de León Rodríguez (Asesor)</i>	610
100	Producción de proteínas recombinantes antimicrobianas <i>Julio Ruiz Pérez, José Francisco Morales Domínguez (Asesor)</i>	616
101	Purificación de proteínas recombinantes <i>Ulrik Avilix Oliva Jara, Luis Gabriel Briebe de Castro (Asesor)</i>	624
102	Radio-optical alignment of radio galaxies <i>Lizbeth Alejandra Vázquez Nájar, Heinz Andernach (Asesor)</i>	629

103	Reacción acrosomal en el espermatozoide de rata Wistar <i>Mayra Alejandra García Zamaro, Esmeralda Rodríguez Miranda (Asesor)</i>	635
104	Reconocimiento de acordes por clasificación <i>Leonardo Joel Cruz López, José Antonio Guerrero Díaz de León (Asesor)</i>	641
105	Remoción de cationes As ³⁺ , utilizando un polisacárido producido por Ustilago maydis <i>José Luis Castro Martínez, José Antonio Cervantes Chávez (Asesor)</i>	647
106	Representaciones de grupos continuos <i>Daniel Arturo Morales Tovar, Oscar Jasel Berra Montiel (Asesor)</i>	651
107	Síntesis de bio-coloides formados con dobles cadenas de ADN <i>Diana Lizbeth Quiroz Palos, Marco Laurati (Asesor)</i>	659
108	Síntesis de materiales magnéticos, compósitos cristalinos y nanocristalinos <i>Brian Zamora Martínez, José Luis Sánchez Llamazares (Asesor)</i>	666
109	Síntesis de nanocompositos de poliéster-uretanos reforzados con nanotubos de carbono funcionalizados <i>Teresa Verónica Ruíz Reyes, Antonio Martínez Richa (Asesor)</i>	672
110	Síntesis de nanopartículas para encapsular fármacos <i>Roberto Fernando Barbosa Gutiérrez, René Darío Peralta Rodríguez (Asesor)</i>	678
111	Síntesis de tensioactivos gemini <i>Leonardo Daniel Ojeda Villa, René Darío Peralta Rodríguez (Asesor)</i>	683
112	Síntesis de α -aminonitrilos para la obtención de derivados del pirrol propuestos en tratamiento de tuberculosis <i>Elvia Estrella Cabrera Castro, Miguel Ángel Vázquez (Asesor)</i>	690
113	Síntesis y caracterización de nanoestructuras de ZnFeO-C utilizando arco eléctrico inmerso en líquidos <i>María Guadalupe Olmos Andrade, Bernabé Rebollo Plata (Asesor)</i>	697
114	Síntesis y caracterización de puntos cuánticos de In/As mediante la técnica MBE <i>Jesús Hernández Medina, Víctor Hugo Méndez García (Asesor)</i>	703
115	Síntesis y caracterización de recubrimientos de ZnS químicamente depositados <i>Diana Laura García Antonio, Mónica Balvanera Ortuño López (Asesor)</i>	709
116	Síntesis y caracterización estructural de benzoazolipirrolidonas <i>Etna Abigail López García, Rubén Antonio Romo Mancillas (Asesor)</i>	715
117	Síntesis y caracterización estructural de benzoazolipirrolidonas con actividad anticonvulsiva <i>Ivonne Acosta Buitrón, Rubén Antonio Romo Mancillas (Asesor)</i>	721
118	Síntesis y evaluación de fotocatalizadores con base en perovskitas <i>Auria Sarai Porras Zapien, Vladimir Alonso Escobar Barrios (Asesor)</i>	726
119	Solución numérica del sistema de ecuaciones diferenciales péndulo resorte en R <i>Kort Gerardo Rodríguez Beck, Alberto Hernández Almada (Asesor)</i>	733
120	Statistics of Hotspots in Radio Galaxies <i>Pedro Abel de la Rosa Valdés, Heinz Andernach (Asesor)</i>	743
121	Subgrupos finitos del grupo especial de rotaciones en tres dimensiones <i>Alejandra de la O Delgado, Ricardo Francisco Vila Freyer (Asesor)</i>	749
122	Taxonomía y biodiversidad de Aranea en Valparaíso, Zacatecas, México <i>Lidia Ávila Robles, Elizabeth A. Martínez Salazar (Asesor)</i>	756
123	Taxonomía y biodiversidad odonata en Genaro Codina, Zacatecas <i>Dai Yael Esparza Rosales, Elizabeth Aurelia Martínez Salazar (Asesor)</i>	762
124	Tunelaje cuántico anómalo en materiales 2D <i>Amanda Contreras Hernández, Isaac Rodríguez Vargas (Asesor)</i>	768

Actividad lítica y efecto antagónico de rizobacterias contra hongos fitopatógenos

Diana Laura Pescador Tovar

Universidad de Guanajuato
Departamento de Biología Experimental Noria
Alta s/n, Col. Noria Alta, C. P. 36050
Guanajuato, Gto.
dl.pescadortovar@ugto.mx

Asesora: Blanca Estela Gómez Luna

Universidad de Guanajuato
Departamento de Ingeniería Agroindustrial
Prolongación Río Lerma s/n Celaya, Guanajuato.
C.P. 38060
be.gomez@ugto.mx

Resumen — Las rizobacterias son microorganismos que habitan en la rizosfera y son capaces de establecer una relación mutualista con una planta mediante la colonización de las raíces, pudiendo así ambos organismos obtener beneficios el uno del otro. En total, 38 cepas bacterianas fueron empleadas para esta experimentación, poniendo a prueba su capacidad de degradación de celulosa y quitina, así como realizando pruebas de confrontación con algunos de los hongos de efecto fitopatógeno. De este modo es posible estructurar una idea más clara de un posible efecto antagónico brindando por las rizobacterias al encontrarse en condiciones en las cuales la planta se encuentre con algún organismo fitopatógeno como lo son los hongos.

Palabras clave — rizobacterias 1, cepa 2, micelio 3, confrontación 4

Abstract — Rhizobacteria are microorganisms that inhabit the rhizosphere and are able to establish a mutualistic relationship with a plant by colonizing the roots, thus allowing both organisms to obtain benefits from each other. In total, 38 bacterial strains were used for this experimentation, testing their ability to break down cellulose and chitin, as well as testing confrontation with some of the fungi of phytopathogenic effect. In this way, it is possible to structure a clearer idea of a possible antagonistic effect offered by the rhizobacteria to be in conditions in which the plant is with a phytopathogenic organism such as fungi.

Keywords — Rhizobacteria 1, bacterial strain 2, mycelium 3, confrontation 4

I. INTRODUCCIÓN

El término “rizobacteria” hace referencia a aquellos microorganismos capaces de establecer una relación mutualista con una planta mediante la colonización de las raíces, pudiendo así ambos organismos obtener beneficios el uno del otro¹. A estas asociaciones se les han atribuido beneficios como favorecer un mejor desarrollo, crecimiento y producción de biomasa en algunas especies de plantas, esto debido a que las rizobacterias son capaces de afectar la disponibilidad de nutrientes por la intervención directa en los ciclos biogeoquímicos².

Es posible especular que el desarrollo de las plantas es determinado, en parte, por la disponibilidad de nutrientes minerales presentes en el suelo en que se encuentren y, entre ellos, el nitrógeno es uno de los más representativos en la agricultura ya que se ha demostrado que en suelos carentes nitrógeno se presenta un bajo rendimiento en la producción del cultivo. Algunas bacterias que se encuentran asociadas a la raíz parecen brindar una buena solución y alternativa contra el uso de agroquímicos, al poseer la capacidad de fijar nitrógeno, tanto nitratos como amonio, facilitando así la disponibilidad del nutriente necesario para la planta asociada³. Este es solo uno de los múltiples beneficios que proporcionan las rizobacterias a las plantas, puesto que los mecanismos que estas emplean en asociación son muy diversos pudiendo afectar procesos como la producción

de sustancias orgánicas como consecuencia del metabolismo secundario de las bacterias, siendo capaces de llevar a cabo la promoción de respuestas fisiológicas específicas en células vegetales.

La variedad de bacterias con características que favorecen el desarrollo de las plantas, han sido denominadas PGPR, que, por sus siglas en inglés (plant growth promoting rhizobacteria), se traduce como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Davison, 1988). El estudio de las PGPR resulta de gran importancia para la industria agrícola, pues al obtener una mejor técnica de manejo es posible generar alternativas que mejoren la calidad de los cultivos empleados para el comercio local, así como proveer mejores condiciones de suelo. De manera intrínseca, se debe tener en cuenta que las condiciones en las cuales se realizan las prácticas de agricultura son al aire libre y bajo condiciones menormente reguladas y, por tanto, las PGPR se encuentran en contacto tanto con la planta como con otros microorganismos e invertebrados que también interfieren en su desarrollo⁴.

En el presente trabajo se pretende realizar la observación de la interacción de un grupo de PGPR aislado de muestras de suelo tomadas del Área Natural Protegida Cerro de Culiacán y la Gavia contra cinco hongos fitopatógenos con el objetivo de visualizar cuales son los efectos benéficos pueden brindar a la planta contra estos.

II. MARCO TEÓRICO

Los hongos son organismos eucariontes capaces de desarrollarse en ambientes húmedos y con poca luz formando agrupaciones de filamentos que en conjunto reciben el nombre de micelio⁵. Estos organismos pueden producir esporas microscópicas que son fácilmente transportadas por múltiples vectores; es así que, su propagación resulta ser bastante sencilla asegurando así el éxito de infección de algún otro organismo.

Aquellos agentes capaces de provocar enfermedades en vegetales son denominados fitopatógenos, y, por tal motivo, estos organismos son llamados hongos fitopatógenos, ya que producen sintomatologías características de enfermedad en diversas especies vegetales, resultando ser especies de gran importancia al afectar cultivos de interés comercial⁶.

Para afrontar a estos microorganismos, se proponen alternativas que involucran una gran cantidad de químicos que, eventualmente, perjudican además del hongo, al suelo, agua, aire e incluso a la misma planta de interés. Como mejor opción, al conocer a profundidad el organismo enfrentar se puede proponer la mejor alternativa para atacarlo; de este modo, los hongos cuentan con una pared celular, la cual es su principal barrera de protección contra todo lo que se encuentra a su alrededor. Esta barrera es una estructura de gran plasticidad que protege a la célula de diferentes tipos de estrés ambiental; principalmente se encuentra constituida por glucanos (60-50% en peso seco), quitina (10-20% en peso seco) y glicoproteínas (20-30% en peso seco)⁷.

Algunas de las rizobacterias que se encuentran en plantas son capaces de secretar enzimas líticas específicas contra componentes que se encuentran presentes en la pared celular de hongos fitopatógenos, lo cual indica que son capaces de atacar al patógeno y

brindar protección a la planta, estableciendo así un control en la enfermedad y una alternativa viable contra el uso de sustancias contaminantes⁸.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon bacterias de una colección previa, para resiembra se utilizó el medio PDA (Agar Papa Dextrosa).

A. Pruebas de actividad lítica para quitina y celulosa.

En el análisis de actividad lítica de las bacterias, se utilizó medio mínimo de sales inorgánicas con quitina, para pruebas de quitinasas, y celulosa para realizar pruebas de celulasas. Se utilizaron 38 cepas, se sembraron por picadura, se dejaron en incubación a 28°C por 5 días, hasta observar un halo de degradación **Cuadro 1**.

B. Efectos contra hongos fitopatógenos.

Los hongos fitopatógenos utilizados para pruebas de antagonismo fueron *Fusarium oxysporum*, *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Alternaria* sp. y *Helminthosporium* sp.

Para esta prueba, se seleccionaron 12 bacterias de la colección y se colocó una muestra de micelio de cada hongo en el centro de la placa y dejándola en incubación durante 24 horas; posterior a este tiempo se inocularon 4 bacterias por placa con estriado sencillo sin tocar el hongo formando cuatro lados a manera de cuerdas en la placa. Las placas se colocaron en incubación a 28°C durante 7 días aproximadamente.

Cuadro 1. Cepas bacterianas aisladas de muestras de suelo del Área Natural Protegida (ANP) Cerros El Culiacán y La Gavia

106	208	263	302	102
113	210	264	304	111
114	213	264.1	305	112
116	214	265	306	123
117	221	265-B	308	275
202	253	265-B-2	313	109
203	256	270	317	
205	258	301	318	

IV. RESULTADOS

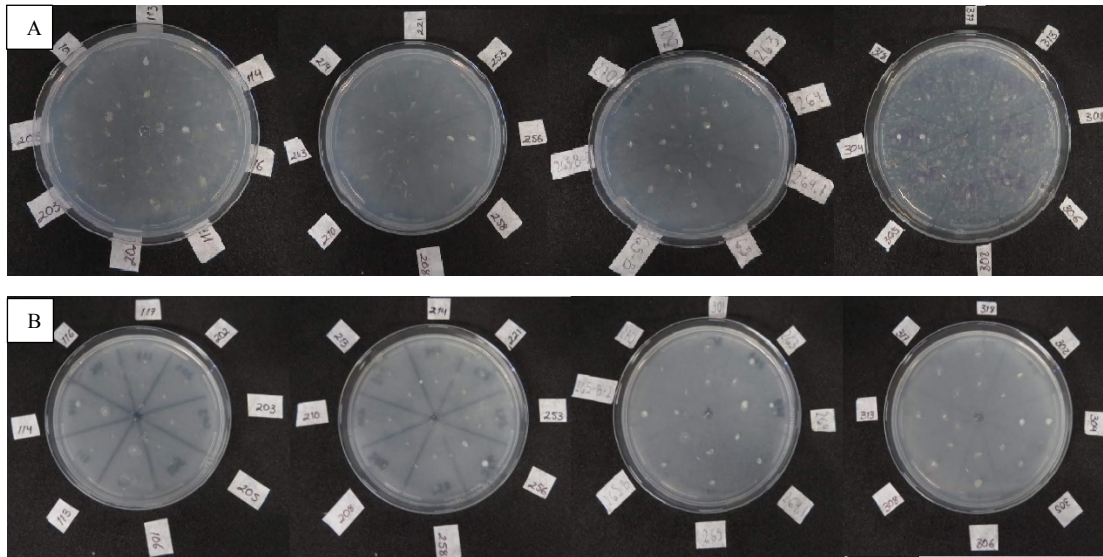


Fig. 1 Resultados de pruebas de actividad de celulasas y quitinasas. (A) Placas adicionadas con quitina. (B) Placas adicionadas con celulosa.

Todas las bacterias empleadas en experimentación presentaron resultados positivos para las pruebas de actividad lítica para celulasas y quitinasas. Se presento de manera visible un halo de degradación justo en los bordes de la picadura de inoculación para ambas pruebas **Fig. 1**.

Al haber colocado a los distintos hongos en confrontación con las bacterias, se observaron distintos grados de alteración en el crecimiento radial de micelio por la liberación de posibles metabolitos en el medio por parte de las bacterias. De este modo se observó desde una inhibición completa hasta ciertos grados de ralentización de crecimiento. De igual manera, el hongo presentó respuestas de nula afectación por las bacterias, llegando a cubrir las parcial o totalmente con micelio **Fig. 2**. De este modo se pudieron identificar las bacterias con mayor eficiencia al detener el crecimiento de micelio **Tabla 1**.

Tabla 1. Bacterias inhibidoras de crecimiento de micelio.

Hongos	Bacterias que presentaron inhibición		
<i>Fusarium oxysporum</i>	102	208	264
<i>Fusarium sp.</i>	117	112	202
<i>Rhizoctonia sp.</i>	306	117	264
<i>Alternaria sp.</i>	264	202	117
<i>Helminthosporium sp.</i>	117	264	102

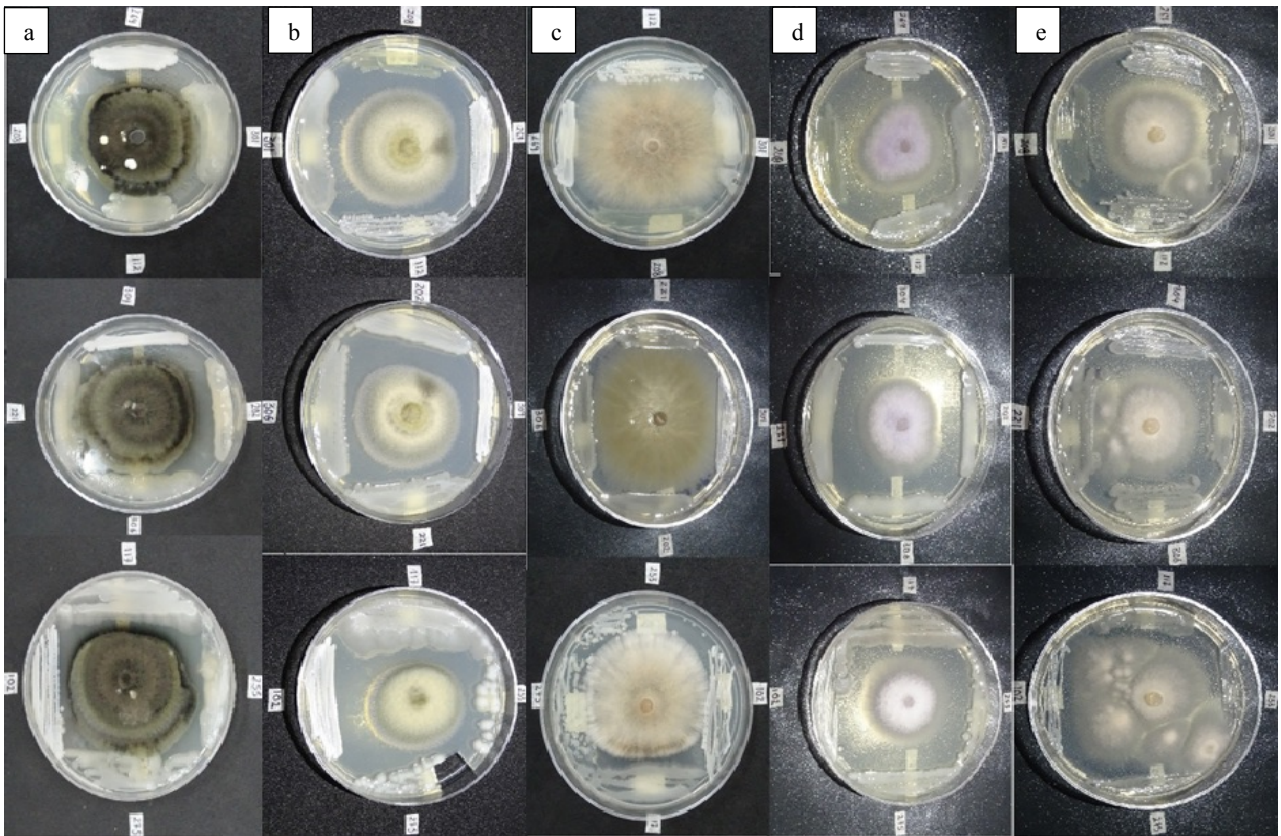


Fig. 2 Confrontaciones realizadas con bacterias. (a) Confrontaciones con *Helminthosporium* sp. (b) Confrontaciones con *Alternaria* sp. (c) Confrontaciones con *Rhizoctonia* sp. (d) Confrontaciones con *Fusarium* sp. (e) Confrontaciones con *Fusarium oxysporum*.

V. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Con los resultados obtenidos en la experimentación es claro que las bacterias empleadas muestran actividad lítica en las pruebas de quitina y celulosa, y es posible especular que al presentar esta actividad, en mayor o menor grado, estas bacterias podrían ser capaces de degradar componentes presentes en la pared celular de los hongos empleados, lo cual podría indicar que tienen la capacidad de interferir en el desarrollo de dichos organismos; sin embargo, como resultado de las pruebas de confrontación se observó solo un número reducido de las bacterias con una marcada actividad en el control de desarrollo de micelio, lo cual indica que aunque la actividad de degradación de quitina y celulosa se encuentra presente en la bacteria, solo algunas presentan una verdadera habilidad para poder interferir en el crecimiento del hongo.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se ha podido comprobar uno de los efectos antagónicos que presentan estas rizobacterias con los hongos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Alternaria* sp. y *Helminthosporium* sp., sin embargo, cada hongo presenta una respuesta diferente dependiendo el tipo de bacteria con la cual interaccione; por tal motivo, el generalizar que una bacteria haya obtenido un mejor efecto en la inhibición de desarrollo de miselio y que

podría ser empleada como biocontrol sería una afirmación errónea, ya que para poder establecer esto se requiere de más pruebas que logren verificar que la capacidad de la bacteria o bacterias son adecuadas para poder llevar a cabo una acción de tal tipo.

VII. AGRADECIMIENTOS

Principalmente quisiera agradecer a la doctora Blanca Estela Gómez Luna por brindar el apoyo y unirse como guía para poder realizar este proyecto, así como a todos los integrantes del equipo multidisciplinario con quienes pude convivir de la mejor manera en un ambiente saludable de colaboración. De igual manera agradezco a la Universidad de Guanajuato por proveer de las instalaciones y equipo del Departamento de Ingeniería Agroindustrial para la realización de este proyecto. Por último, agradecer al programa Verano de la Ciencia de la Región Centro en su edición número 21 por brindar la oportunidad de participar en este tipo de proyectos.

REFERENCIAS

- [1] C. Soliveres (2019/julio/15) Rizobacteria (1ra ed.) [Online]. Available: <https://cyt-ar.com.ar/cyt-ar/index.php/Rizobacteria>
- [2] Camelo R., M., Vera M., S. P., & Bonilla B., R. R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 12(2), 159-166. https://doi.org/10.21930/rcta.vol12_num2_art:227
- [3] S. Calvo García. "Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno" pp. 174-175. CT 3 (2011).
- [4] Esquivel Cote R., Gavilanes Ruiz M., Cruz Ortega R., Huante P. Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias, una revisión. *Rev. fitotec. mex* [online]. 2013, vol.36, n.3, pp.251-258. ISSN 0187-7380. Available: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802013000300010
- [5] Peña Sánchez R. R., Páez Mendieta J. E., (2019/julio/18) *Fitopatología*, 2da edición [Online]. Available: <https://virtual.uptc.edu.co/ova/fito/archivo/HONGOS.pdf>
- [6] Juárez Becerra G. P., Sosa Morales M. E., López Malo A. Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 4-2 (2010): 14-23 [Online] Available: [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-2/Tsia-4\(2\)-Juarez-Becerra-et-al-2010.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-2/Tsia-4(2)-Juarez-Becerra-et-al-2010.pdf)
- [7] Pontón J., La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Rev Iberoam Micol* 2008; 25: 78-82 [Online] Available: <http://www.reviberoammicol.com/2008-25/078082.pdf>
- [8] Serrano Carreón L., Galindo Fentanes E. (2007). Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia*. [Online]. Available: <http://www.ibt.unam.mx/Geg/lineas/Control%20Biologico%20Ciencia.pdf>

Adsorción y degradación de contaminantes usando lirio acuático (*Eichhornia crassipes*)

Flor Berenice Conejo Moreno

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Facultad de Bioquímica
Carretera Irapuato - Silao km 12.5 Colonia El
Copal. Irapuato, Guanajuato.
FlorB.ConejoM@gmail.com

Asesor: Divanery Rodríguez Gómez

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Facultad de Bioquímica
Carretera Irapuato - Silao km 12.5 Colonia El
Copal. Irapuato, Guanajuato.
divanery.rodriguez@itesi.edu.mx

Resumen — En este trabajo se presenta la implementación de un sistema de adsorción y degradación de dos colorantes textiles de la marca “Mariposa”, y posterior cultivo en estado sólido del aislado SE40 (aún sin identificar molecularmente) y la planta Pontederiaceae, *Eichhornia crassipes*, mejor conocida como Lirio acuático. Con esto se pretende biorremediar los ecosistemas acuáticos que se contaminan por efluentes de las industrias textiles puesto que poseen una alta concentración de colorantes, comúnmente del tipo Azo, que impactan negativamente al ambiente y a la salud humana. El sistema de adsorción usando lirio acuático resultó ser conveniente, ya que los resultados obtenidos mostraron un 99% y 96% de adsorción para los colorantes rojo carmesí y azul mezclilla respectivamente.

Palabras clave — Biorremediación, contaminación, colorantes textiles, lirio acuático, degradación.

Abstract — This paper presents the implementation of a system of adsorption and degradation of textile dyes of the brand "Mariposa", later on, solid state culture is carried out using the isolated SE40 (not identified) and the Pontederiaceae plant, *Eichhornia crassipes*, also known as Water hyacinth. This is intended to bioremediate aquatic ecosystems that are contaminated with effluents from textile industries which contains high concentrations of dyes in the water, affecting the environment and human health. The system of adsorption using the water hyacinth becomes convenient, since the results evidenced 99% and 96% adsorption for the red and blue denim dyes respectively.

Keywords — Bioremediation, pollution, textile dyes, water hyacinth, degradation.

I. INTRODUCCIÓN

En el mundo se producen más de 700,000 toneladas de colorantes al año y de los cuales se fabrica cerca de 10,000 tipos diferentes [1]. En la industria textil, los más utilizados son de origen sintético con una compleja estructura aromática que los hace muy estables y recalcitrantes [2], algunos ejemplos son: los colorantes azoicos, antraquinónicos, y derivados de trifenilmetano o de ftalocianina [3]. Desafortunadamente, alrededor del 10 al 15% del total de colorantes producidos, se liberan directamente a los ecosistemas acuáticos generando así un grave daño ya que inhibe los procesos fotosintéticos y del oxígeno disponible en la biota acuática [2]. Un ejemplo de ello es el colorante Azul Reactivo 4 (RB4), un colorante de actual importancia comercial y que a una concentración letal media (CL₅₀) de 1500 mg/L se convierte en un componente letal por su alta toxicidad en los peces [3]. Conforme a eso, la NOM-065-ECOL-1994 habla que el límite máximo permisible de pigmentos y colorantes en las descargas industriales de aguas residuales es de 200 mg/L para sólidos suspendidos totales de colorantes [3].

A partir de la década de los 80's se propuso el empleo de hongos de pudrición blanca, como alternativa para realizar la decoloración de efluentes y la degradación de compuestos

xenobióticos y recalcitrantes [2] ya que son excelente respuesta a la problemática de la contaminación de cuerpos de agua puesto que poseen la capacidad de excretar un grupo de oxidasas no específicas como la magnesio peroxidasa, lignino peroxidasa y lacasa que ayudan a la remoción de colorantes en el tratamiento de aguas residuales. Para tratamiento de dichos contaminantes se destaca el uso de residuos lignocelulósicos que fungen como adsorbentes de los colorantes, seguida de un proceso de degradación por hongos Basidiomicetos [3]. Debido a esto, el presente trabajo tiene como objetivo implementar un sistema de adsorción y degradación de colorantes haciendo uso de aislados fúngicos del Estado de México como potencial degradador de colorantes industriales en cultivo en estado sólido empleando lirio acuático deshidratado como una fuente de lignina.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Selección, reactivación y conservación de las cepas

Se seleccionaron cuatro aislados (7BM, 18 Mymt, 41X y SE40) del reservorio de aislados del Laboratorio de Interacción Microbiana del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato (ITESI). La conservación de estas cepas se hizo a 4°C. Se inocularon en medio PDA cada una de las cepas seleccionadas para los experimentos y se incubaron a temperatura ambiente (25°C-28°C) durante 7 días, realizando observaciones macroscópicas para constatar que eran cultivos axénicos.

B. Selección y tratamiento de los colorantes

Se emplearon 2 colorantes de la marca "Mariposa[®]" en colores 655 Azul Mezclilla y 604 Rojo Escarlata, para cada uno de los casos se molieron las pastillas de colorante con ayuda de un mortero y pistilo hasta una consistencia granulada fina.

C. Recolecta y tratamiento del lirio acuático

El lirio acuático se recolectó del Río Balsas en el municipio de Salamanca, Guanajuato, México (20° 36' 27" N 101° 13' 24" W), posteriormente se cortaron las raíces, las cuales se descartaron; y se lavó con agua de grifo para eliminar los rastros subsecuentes del lodo residual. Por último, se secó al sol hasta que se observó completamente deshidratado, esto en un periodo de 5 días aproximadamente, y se trituro el material hasta un tamaño considerable de por lo menos 2 cm³.

D. Degradación de colorantes en sistema líquido

Para la degradación de colorante en medio líquido se evaluaron tres concentraciones de colorante (500 ppm, 1000 ppm y 1500 ppm) en medio extracto de malta (EM), el cual sigue la formulación (g/L): Extracto de malta, 2; (NH₄)₂SO₄, 3.5; K₂HPO₄, 3; MgSO₄, 0.5; CaCl₂, 0.5; MnSO₄, 0.5. Se le ajustó el pH a 5.5 a cada una de las soluciones y se esterilizaron por autoclave. Los cultivos líquidos se llevaron a cabo en tubos de 50ml conteniendo 30 mL de medio y se inocularon con 2 círculos de micelio de 0.6 mm de diámetro de los aislados crecidos en PDA durante 7 días.

La incubación se realizó durante 20 días a temperatura ambiente (25-28°C). Al final se evaluó biomasa por peso seco y concentración del colorante en el medio por espectrofotometría a 540 nm usando una curva de calibración.

E. Degradación de colorantes en sistema superficial

Para el medio AEM se hizo la formulación anterior y se le agregó 20 g/L de Agar Bacteriológico, se le ajustó el pH a 5.5 y se esterilizó en autoclave. Después se vertió en cajas Petri estériles en campana de flujo laminar y se inocularon con un círculo de micelio de 0.9 mm de diámetro de los aislados seleccionados, esto se hizo por duplicado y en condiciones de esterilidad. Se midió el crecimiento micelar cada 24 horas.

F. Adsorción de colorantes en el lirio acuático

Se trabajaron 2 sistemas de lirio acuático por cada una de las concentraciones de cada colorante, a cada estudio se la adicionaron 5 g de materia sólida y 100 ml de cada una de las soluciones a las diferentes concentraciones. Los sistemas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 72 h a una velocidad de agitación de 100 rpm. El monitoreo de adsorción se realizó tomando alícuotas de 200 µL a 1, 2, 3 y 72 h, estas fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 2 minutos, posteriormente se midió su absorbancia en el espectro UV visible a 540 nm y se determinó el porcentaje de adsorción con la fórmula (1).

$$\% \text{ Adsorción} = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100 \quad (1)$$

donde C_i : concentración inicial, C_f : concentración final.

G. Degradación de colorantes por fermentación sólida (FES) empleando lirio acuático

Los ensayos de adsorción del colorante en el lirio acuático fueron filtrados para retirar el sobrenadante del colorante no absorbido, el material recolectado se sometió a una temperatura de 60 °C durante 24 h en el horno para retirar el exceso de agua, cumplido el tiempo fue enriquecido con medio EM para obtener la humedad de 80 %. Los ensayos fueron inoculados con dos círculos de micelio de 0.6 mm de diámetro del aislado SE40 de 6 días de crecimiento en medio PDA.

III. RESULTADOS

A. Evaluación de la tasa de crecimiento de los aislados en cultivo superficial

La velocidad de crecimiento de los aislados 7BM y 18 Mymt tuvieron valores menores a 2 µm/d, mientras que los aislados 41X y SE40, obtuvieron valores mayores de 0.25 µm/d y 0.35 µm/d respectivamente, esto para todas las concentraciones. El aislado SE40 también mostró decoloración del medio al cuarto día para todas las concentraciones (Figura 1).

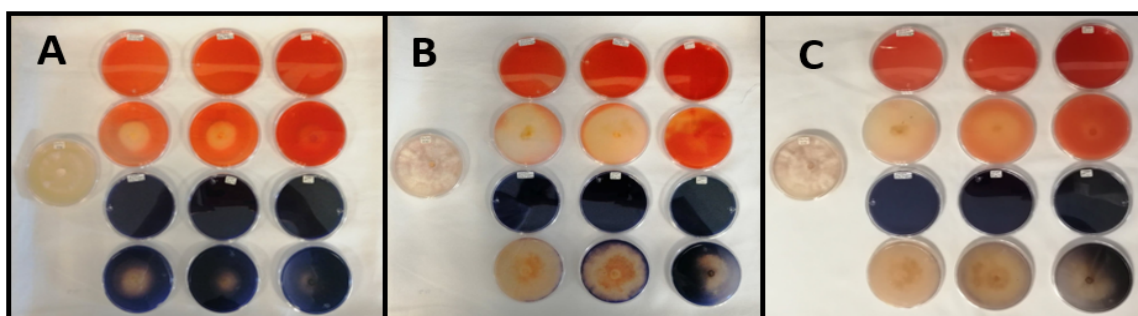


Figura 1. Evaluación de la decoloración en los medios en placa con AEM a diferentes concentraciones de colorantes. A) Vista frontal de las placas a los 4 días de cultivo, B) Vista frontal de las placas a los 7 días de cultivo, C) Vista frontal de las placas a los 16 días de cultivo. Para cada cuadro se muestra: de izquierda a derecha, 500, 1000 y 1500 ppm, respectivamente. Control sin colorante, del lado izquierdo. Control sin inocular en las filas 1 y 3 de cada imagen.

B. Evaluación de la degradación de colorantes en cultivo líquido

Todos los aislados presentaron decoloración del medio por arriba del 95% para el caso del colorante 604 Rojo Escarlata a sus diferentes concentraciones (Figura 2a). Los aislados 18 Mymt y 41X produjeron menos micelio, alcanzando valores menores a 0.06 g/L, esto indica que hubo inhibición en el crecimiento de éstos aislados, pero no afectó su eficiencia en la decoloración (Figura 3).

Para el caso del colorante 655 Azul Mezclilla se presentó una baja decoloración sólo en el caso del aislado 41X ya que como se puede corroborar en la Figura 2b, alcanzó valores menores al 95% de decoloración en comparación a los demás ensayos. Se puede observar en la Figura 3 como fue el proceso de decoloración de los colorantes empleados.

Los mejores resultados de decoloración durante 15 días de evaluación se obtuvieron con ambos colorantes por medio de los aislados 7BM y SE40, ya que estos al cuarto día comenzaron la decoloración del medio a las diferentes concentraciones. Con esto, se seleccionó el aislado SE40 para la fermentación en estado sólido (FES) puesto que presenta una mejor velocidad de crecimiento y degradación en ambos colorantes tanto en placa como en medio líquido.

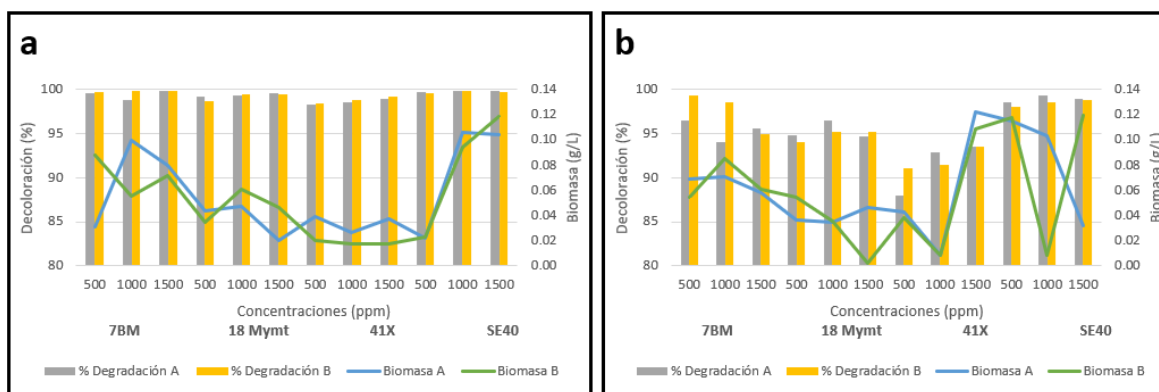


Figura 2. Evaluación de la decoloración de colorantes 604 Rojo Escarlata y 655 Azul Mezclilla en medio líquido de extracto de malta a diferentes concentraciones y medición de la biomasa de los aislados. a) colorante 604 Rojo Escarlata, b) colorante 655 Azul Mezclilla. A y B corresponde a duplicado por unidades independientes.

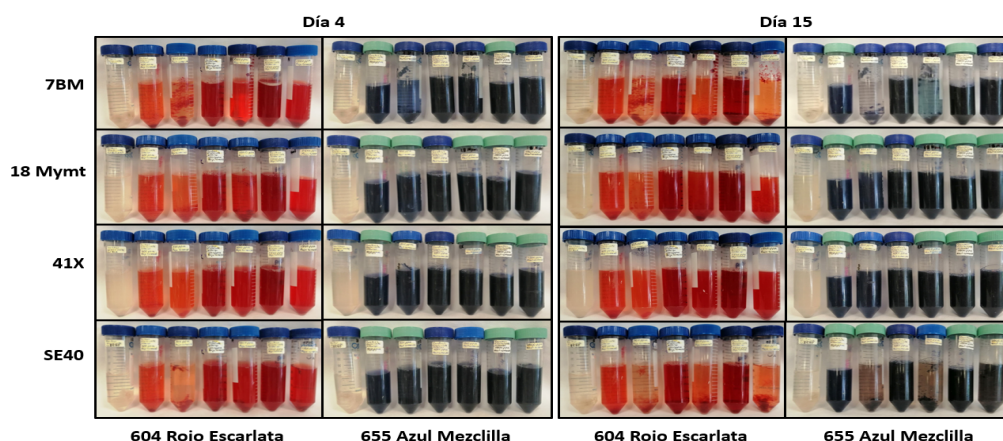


Figura 3. Decoloración de los colorantes 604 Rojo Escarlata y 655 Azul Mezclilla en medio líquido extracto de malta (EM). Se muestra el avance de la decoloración en el día 4 y 15. El orden para todos los ensayos de izquierda a derecha es: control con aislado sin colorante, control con colorante (500 ppm), prueba con colorante (500 ppm) y aislado, control con colorante (1000 ppm), prueba con colorante (1000 ppm) y aislado, control con colorante (1500 ppm), prueba con colorante (1500 ppm) y aislado.

C. Adsorción y degradación de los colorantes sobre lirio acuático (*Eichhornia crassipes*)

Tras transcurrir el tiempo de contacto (72 horas), el porcentaje de adsorción de ambos colorantes en el lirio acuático deshidratado (biomasa seca) fue mayor al 90% (Tabla 1). En la degradación de los contaminantes no se observó crecimiento del aislado SE40 en un tiempo de 31 días.

Tabla 1. Adsorción de los colorantes textiles 604 Rojo Escarlata y 655 Azul Mezclilla sobre lirio acuático a diferentes concentraciones de estos.

CONCENTRACIONES DE COLORANTES ARTIFICIALES TEXTILES						TIEMPO DE CONTACTO (h)
500 PPM		1000 PPM		1500 PPM		
604 Rojo Escarlata	655 Azul Mezclilla	604 Rojo Escarlata	655 Azul Mezclilla	604 Rojo Escarlata	655 Azul Mezclilla	
99.00	91.05	99.10	90.25	99.31	91.22	1
99.09	91.89	99.30	91.41	99.38	91.31	2
99.08	92.73	99.43	93.39	99.51	92.76	3
98.51	94.34	98.50	94.92	99.31	96.66	72

IV. DISCUSIÓN

Según Cano & col. (2012) la degradación o decoloración de los colorantes sintéticos se debe a la expresión de las enzimas extracelulares MnP y lacasas presentes que son inducidas por el extracto de malta en el medio ya que este actúa como sustrato del aislado. Con respecto a los aislados que no lograron una decoloración en ambos medios con colorante sintético, Jiménez & col. (2003) manifiestan que esto se debe a que algunos hongos de podredumbre blanca producen exoenzimas que pueden o no actuar sobre los colorantes artificiales dependiendo de su naturaleza antraquinónica o azóica y esto les permite ser capaces de degradar solo uno de los colorantes, dos o más colorantes o puede presentarse el caso de no decolorar ninguno de éstos.

Con respecto a la disminución del porcentaje de adsorción en el tiempo de contacto de 72 horas a las diferentes concentraciones en el colorante 604 Rojo Escarlata, según Lara (2017) se debe a una saturación del colorante en el lirio acuático ya que el porcentaje de remoción se ve influenciado por la concentración del colorante, toxicidad y el tiempo de contacto.

No se presentó degradación de los contaminantes sobre lirio acuático debido a que se pudo no haber contado con las condiciones óptimas para el crecimiento del aislado SE40, los factores que intervienen según Sosa (2012) en el óptimo desarrollo de hongos basidiomicetos son: humedad relativa de 82 a 86%, temperatura del sustrato de 27.7 a 30°C, pH de 6 a 6.5 y nutrientes para desarrollarse sobre una matriz sólida.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se logró llevar a cabo un sistema de adsorción de contaminantes usando lirio acuático como matriz sólida adsorbente, sin embargo, no se obtuvieron resultados favorables en la degradación de los mismos con el aislado SE40. Se recomienda hacer una posterior experimentación disminuyendo el contenido de humedad de la biomasa seca para posiblemente obtener un mejor crecimiento de este aislado.

VI. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Expreso mi agradecimiento al Instituto Tecnológico Superior de Irapuato y a su docente, la Dra. Divanery Rodríguez Gómez, por las facilidades y el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano.

REFERENCIAS

- [1] Moeller Chávez, Sandoval Yoal Luciano, Nacheva Petia Mijaylova. (2012). *Evaluación de diferentes procesos de tratamiento para la remoción de colorantes sintéticos utilizados en la industria textil*. Reporte SEMARNAT. México.
- [2] Jaramillo A., Jiménez S., Merino A. & Hormaza A. (2014). *Obtención de un inóculo fúngico para la degradación de un colorante azo por fermentación en estado sólido*. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 17(2), 577-585.
- [3] Ramírez Llamas, L. A., Jacobo Azuara, A. & Martínez Rosales, J. M. (2015). Adsorción del naranja de metilo en solución acuosa sobre hidróxidos dobles laminares. *Acta Universitaria*, 25(3), 25-34. doi: 10.15174/au.2015.778.
- [4] Cano M., Solíz M., Solís A., Loera O., Pérez H., Teutli M. (2012). *Decoloración de CD2 (café directo 2) por enzimas intracelulares y extracelulares de Trametes versicolor*. Rev. Interciencia, vol. 37, núm. 4, abril, 2012, pp. 294-298.
- [5] Jiménez T. & Pennicx M. (2003). *Nuevo proceso de biodegradación de colorantes, utilizando hongos de la podredumbre blanca de la madera*. Rev. Vitae, vol. 10, núm. 2, 2003, pp. 52-59.
- [6] Lara, L. (2017). *Fitorremediación para la extracción del colorante "azul de metileno" mediante el uso de Eichhornia crassipes* (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma del Estado de México. Estado de México.
- [7] Sosa, O. (2012). *Evaluación de cuatro sustratos para la producción artesanal del hongo ostra (Pleurotus ostreatus), bajo condiciones controladas, en el municipio de la Unión, Zacapa*. (Tesis de pregrado). Universidad Rafael Landívar. Zacapa, República de Guatemala.

Aislamiento y caracterización de hongos con importancia biotecnológica

Juan Manuel Fierro Triana
Universidad Autónoma de Coahuila
Facultad De Ciencias Biológicas
Carr. Torreon Matamoros Km 7.5
Ejido El Aguila, Torreon, Coah.
Juanmf.6422@Gmail.Com

Asesor: Juan Gualberto Colli Mull
Instituto Tecnológico Superior De Irapuato.
C. Silao Irapuato Km 12.5, El Copal,
Irapuato, Gto.
jcolli@esitesiedu.mx

Resumen – En este trabajo se realizó bioprospección en la reserva de la biosfera sierra gorda de Guanajuato con la búsqueda de hongos que sean importantes para el carácter biotecnológico, se utilizaron técnicas de aislamiento por dilución, se aisló el DNA de cada cepa obtenida y se usó la técnica de PCR para amplificar el gen ITS. Se hizo una restricción para comparar el tamaño de pares de bases de cada hongo y ver si eran diferentes o pertenecían a la misma especie. Por último se hizo la prueba bioquímica de la celulosa.

Palabras Clave: bioprospección, extracción, PCR, prueba bioquímica.

Abstract - In this work bioprospección was performed in the highlands of Guanajuato with the search of fungi that are important for the biotechnological character, using techniques of isolation using pbs and sowing in plates by dilution, the DNA of each obtained strain was extracted and the PCR technique was used to amplify its DNA. In addition to this, a restriction was made to compare the size of base pairs of each fungus and see if they were different or belonged to the same species. Finally, the cellulose biochemical test was carried out.

Key Words: bioprospecting, extraction, PCR, biochemical test.

I. INTRODUCCIÓN

Los hongos del suelo conforman una importante fracción de la biomasa total microbiana del suelo. Crecen en forma de red extendiéndose como micelio hasta su estado reproductivo donde dan origen a esporas sexuales o asexuales. Son importantes degradadores aerobios de material vegetal en descomposición en suelos ácidos. Producen enzimas y metabolitos que contribuyen al ablandamiento y a la transformación de sustancias orgánicas. Los hongos metabolizan compuestos carbonados de muy difícil degradación como las celulosas, las hemicelulosas y las ligninas. También degradan azúcares simples, alcoholes, aminoácidos y ácidos nucleicos. Las raíces de las plantas están pobladas de hongos que aprovechan las exudaciones radiculares constituidas por azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, nucleótidos, enzimas, vitaminas y sustancias promotoras de crecimiento. Los géneros de hongos más importantes asociados a las raíces de las plantas son *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Trichoderma*. El *Aspergillus* y el *Penicillium* movilizan el fósforo y el nitrógeno del suelo. El *Trichoderma* sostiene la humedad en las raíces en condiciones de sequía. (LIZARAZO and RESTREPO, 2019).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. *Recolección de suelo*

Se seleccionaron 3 árboles diferentes (mezquite, encino y cactus). Se tomaron 5 muestras de suelo de cada árbol escarbando alrededor de 10 cm de profundidad alrededor del árbol. En total se tenían 15 muestras.

B. *Preparación de medios*

Se preparó PBS, Agar PGA Y Agar Sabouraud.

C. *Siembra de suelo en los medios*

Se tomaron 10 g de cada bolsa y se homogenizaron por árbol, en total se tenían 3 muestras con 50 g de suelo de cada árbol. Se prepararon 3 tubos con 1 g de suelo en 10 ml de PBS, después de esto se hicieron dos diluciones de cada una, para que quedara 10^1 , 10^2 y 10^3 . Se hicieron duplicado de cada una de estas diluciones, en total se tenían 18 tubos. De cada uno de los tubos se tomó 1 mL y se sembró en Agar PGA y en Agar Sabouraud, también se hizo por duplicado, en total se tenían 72 plazas (36 PGA y 36 Sabouraud). Se dejaron crecer a los microorganismos por una semana.

D. *Aislamiento de hongos*

De los hongos obtenidos se empezaron a aislar, cada uno en el Agar donde crecieron, sembrándose por estriado y picadura. Nuevamente se dejaron crecer por una semana más.

E. *Extracción de DNA de las cepas obtenidas*

En un micro tubo de 1.5 mL se añadió 200 μ L de PBS, con un asa calibrada se tomó suficiente micelio de cada cepa y se puso en el micro tubo.

Se trituro el micelio con homogeneizadores para micro tubo, después de esto se agregó 300 μ L de buffer de extracción y se volvió a triturar el micelio con los homogeneizadores, se agregó nuevamente 200 μ L de buffer de extracción y se agregaron unas perlititas pequeñas para que ayuden con la lisis de las células. Se puso en el Vortex por 10 minutos a velocidad media y cuando termino se dejó reposar por 5 minutos. Se incubo en el baño térmico por 20 minutos a 72 °C, cuando termino se dejó reposar hasta que se enfriara. Se volvió a poner en el Vortex por 5 minutos a velocidad media. Se centrifugo por 5 minutos a 11, 000 RPM, cuando finaliza se cambia el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 mL. Se agregaron 500 μ L de acetado de sodio al 3 M (mezclar por inmersión) y nuevamente se centrifuga 10, 000 RPM por 5 minutos. Terminando el centrifugado se tomó el sobrenadante que fueron alrededor de 800 μ L y se puso en un tubo nuevo de 2 mL. Se agregó un volumen de Fenol puro (800 μ L) y se puso en el Vortex por un minuto y se metió a la centrifuga por 10 minutos a 10,000 RPM. Se tomó el sobrenadante (800 μ L) y se pasó a un tubo nuevo de 2 mL, se agregó 1 mL de Isopropanol absoluto y se centrifugo por 20 minutos a 12,000 RPM. Cuando terminaron de la centrifuga se decantaron todos los tubos y se lavaron con 1 mL de etanol al 70% y se centrifugo por 10 minutos a 12,000 RPM. Nuevamente se decantaron los tubos y se sacó el exceso con micro pipetas. Se dejaron

secar en el Shaker por 10 minutos. Se agregaron 25 μL de agua mQ a cada tubo. Tomar 5 μL de cada tubo y mezclarlo con el colorante azul y poner cada una de las muestras de DNA en los orificios del gel ya hecho previamente con agarosa y TAE. Correr electroforesis a 80 volts por 30 minutos. Leer los resultados con el programa.

F. Amplificación del DNA por medio de PCR

Se hizo la súper mix que consta de 250 μL de Dream Taq, 20 μL de ITS1, 20 MI de ITS4 y 190 μL de agua mQ. Se agregó a cada tubo para PCR 24 μL de súper mix y 1 μL de DNA obtenido de cada cepa y se metió al equipo de PCR. Luego se hizo electroforesis a 80 V por 30 minutos y se leyó en el programa.

G. Restricción de DNA

Se hizo la súper mix que consta de 36 μL de buffer, 5.4 μL de ENZ Hinf1, 5.4 μL ENZ Alu1 y 223.2 μL de agua mQ. Se agregó 15 μL de súper mix y 5 μL de DNA obtenido de PCR, se incubo en el baño térmico por 3 horas a 37 °C y luego se generó un choque térmico por 30 minutos a 60 °C, luego se hizo electroforesis por 10 minutos a 80 V y se leyó en el programa.

H. Prueba bioquímica de la celulosa

Se preparó el medio que contenía m9 mínimo, agar bacteriológico y carboximetil celulosa. Se dejó crecer en la incubadora a 37 °C por 10 días para ver su crecimiento.

III. RESULTADOS

Tabla 1. Resultados de extracción, amplificación y restricción de DNA de los hongos aislados de suelo de sierra gorda de Guanajuato y resultados de prueba bioquímica de la celulosa.

ID	CEPA OBTENIDA	EXTRACCION DE DNA	PCR	RESTRICCION	PRUEBA BQ DE CELULOSA
1	PGA M3.1 10 ² X2 B	-	-	-	+
2	PGA M1.1 10 ¹ B	+	+	+	+
3	SAB M1.1 10 ³ X2 A	+	+	-	
4	PGA M1.1 10 ³ X2 A	+	+	+	+
5	PGA M3.1 10 ¹ X2 B	+	+	+	+
6	PGA M3.1 10 ² X2 A	+	+	+	+
7	PGA M3 10 ¹ A	+	+	+	+
8	SAB M3.1 10 ¹ A	+	+	-	
9	SAB M1 10 ² X2 A	+	-	-	+
10	SAB M1 10 ² A	-	-	-	+
11	SAB M1.1 10 ² X2 C	+	+	-	+
12	SAB M1.1 10 ² B	-	-	-	+
13	SAB M3.1 10 ² A	+	+	+	

14	SAB M 3.1 10 ² A	+	+	-	
15	SAB M1.1 10 ² X2 B	-	-	-	+
16	SAB M3.1 10 ¹ X2 A	+	+	-	
17	SAB M 1.1 10 ² A	+	+	-	
18	SAB M1 10 ¹ A	-	-	-	
19	PGA M1 10 ¹ A	+	+	+	-
20	PGA M1 10 ² X2 A	+	+	+	
21	SAB M1.1 10 ¹ A	+	+	+	+
22	SAB 3 10 ¹ A	+	-	-	
23	PGA M3.1 10 ¹ X2 A	+	-	-	
	TOTAL	18	15	9	12



Fig. 1. Hongos aislados de suelo de la reserva de sierra gorda de Guanajuato.

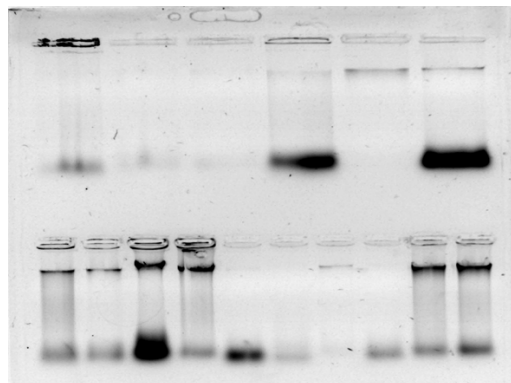


Fig. 2. Aislamiento de DNA de 18 cepas de hongos tomados de suelo.



Fig. 3. DNA amplificado por PCR de los hongos aislados de suelo

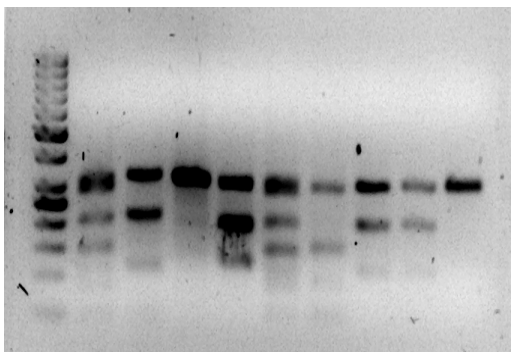


Fig. 4. Diferenciación de especies por medio de tamaño de pares de bases nitrogenadas.

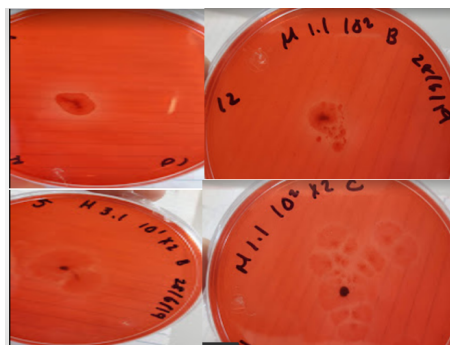


Fig. 5. Resultados de prueba bioquímica de celulosa en los hongos aislados

IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En la tabla 1 podemos ver un resumen de las cepas que se logró aislar el DNA mediante el método tradicional, también observamos que la mayoría de las cepas se lograron amplificar por medio de PCR usando el gen ITS, después de esto se hizo una restricción con enzimas Hinf1 y Alu1. La restricción solo se hizo con 9 cepas, y todas dieron positivas. Por último se hizo una prueba bioquímica de la celulosa con las mejores 13 cepas y 12 salieron positivas, lo cual significa que son degradadoras de materia orgánica.

En la figura 1 podemos observar algunos de los hongos que se aislaron y crecieron. En la figura 2 y 3 se observa la extracción de DNA de los Hongos y el DNA amplificado por PCR respectivamente, en la figura 4 se observan las distintas pares de bases que se obtuvieron por medio de la restricción. En la figura 5 podemos notar el halo alrededor del hongo, lo cual significa que degradaron la celulosa del agar para tomarla como fuente de carbono.

V. CONCLUSIÓN

La mayoría de los hongos aislados son degradadores de celulosa, lo cual significa que son degradadores de desechos orgánicos y que según la literatura corresponden a especies como penicillium y aspergillus pertenecientes a micorrizas.

Se conoció que los hongos tienen una gran importancia biotecnológica en la actualidad ya que a partir de estos se producen muchas enzimas y metabolitos que son usados para la medicina y alimentos, etc.

VI. AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento al Dr. Juan Collí por el conocimiento brindado este verano y a la Dra. Agustina Ramírez quien nos motivó a ir al verano de la ciencia. De igual manera agradezco a la Universidad Autónoma de Coahuila por el apoyo para la realización de esta estancia.

REFERENCIAS

- LIZARAZO, C. and RESTREPO, J. (2019). *HONGOS DEL SUELO*. [online] Biología de suelos. Available at: <https://biologiadecesuelos2014.wordpress.com/organismos-del-suelo-2/microbiologia-del-suelo/hongos-del-suelo/> [Accessed 7 Jul. 2019].

Aleaciones con memoria Heusler $\text{Ni}_{50}\text{Mn}_{35}\text{In}_{15}$ y $\text{Ni}_{50}\text{Mn}_{37}\text{Sn}_{13}$ para ser aplicadas en la refrigeración magnética

Gabriela Elizabeth Ríos Rodríguez
Facultad de Metalurgia, Universidad Autónoma
de Coahuila.
Carretera 57 km5, Los Bosques, 25710
Monclova, Coah.
gabriela02@outlook.es

Asesor: José Luis Sánchez Llamazares
Instituto Potosino de Investigación Científica y
Tecnológica (IPICYT).
Camino a la Presa de San José 2055, Lomas 4ta
Secc. 78216 San Luis, S.L.P.
jose.sanchez@ipicyt.edu.mx

Resumen — Se realizó un estudio en las aleaciones con memoria Heusler $\text{Ni}_{50}\text{Mn}_{35}\text{In}_{15}$ y $\text{Ni}_{50}\text{Mn}_{37}\text{Sn}_{13}$ para ser aplicadas en la refrigeración magnética. Gracias a los previos estudios se fabricó la aleación $\text{Ni}_{50}\text{Mn}_{35}\text{In}_{15}$ primero cortando los elementos con 99.9999% de pureza y fueron pesados en una balanza analítica y se fundieron en el horno de arco eléctrico. También se fabricó un bulto de la aleación $\text{Ni}_{50}\text{Mn}_{37}\text{Sn}_{13}$ por medio de sinterización SPS con cintas obtenidas por el método melt-spinning, se analizó en el microscopio metalográfico y se obtuvieron resultados como se esperaban ya que se observó un acomodamiento uniforme de las cintas el cual se seguirá trabajando y analizando para su aplicación en la refrigeración magnética.

Palabras clave — Refrigeración magnética, melt-spinning, cintas, sinterización SPS,

Abstract — A study was made in the alloys with memory Heusler $\text{Ni}_{50}\text{Mn}_{35}\text{In}_{15}$ and $\text{Ni}_{50}\text{Mn}_{37}\text{Sn}_{13}$ to be applied in the magnetic refrigeration. Thanks to the previous studies, the $\text{Ni}_{50}\text{Mn}_{35}\text{In}_{15}$ alloy is fabric first cutting the elements with 99.9999% heavy purity and fuel in an analytical balance and melted in the bowl of electric arch. It also became a bullet of the allocation $\text{Ni}_{50}\text{Mn}_{37}\text{Sn}_{13}$ by means of spin sinterization SPS with tapes obtained by the melt-spinning method, it was analyzed in the metallogus microscope and results were obtained as they were expected since an uniform accommodation of the tapes was observed which is beased on and analyzing for its application in the magnetic cooling.

Keywords — Magnetic refrigeration, melt-spinning, tapes, sinterization SPS.

I. INTRODUCCIÓN

La Refrigeración magnética (MR), es una tecnología en estado sólido basado en el efecto magnetocalórico (MCE), ha atraído gran interés por varias ventajas medioambientales [1]. El MCE es considerado como un efecto físico, fenómeno que es fundamental para el desarrollo de la tecnología de refrigeración magnética. La existencia de materiales magnéticos que muestran una gran variación de la entropía magnética impulsada por la temperatura y (o) el campo magnético es esencial para refrigeradores magnéticos. El máximo cambio en la magnetización, y por lo tanto en la entropía magnética, se atribuye a un cambio en orden magnético en las transiciones de fase [2].

La familia de las aleaciones Heusler temarias de los sistemas Ni-Mn-X, exhiben propiedades diferentes e interesantes dependiendo del elemento X; unos de los sistemas más estudiados es el Ni-Mn-Ga, pero existen otras posibilidades como sustituir X por In [3] o Sn [4].

En particular, las aleaciones con Sn exhiben un gran potencial para aplicaciones ingenieriles a gran escala, ya que su costo sería menor al asociado con elementos costosos como el Ga. Para el sistema Ni-Mn-Sn, T. Krenke y colaboradores [5]. reportaron en 2005,

que la temperatura de la transformación martensítica depende fuertemente de la composición del Sn; esto coincide con lo reportado por Zheng et al [6]. Se encontró que la temperatura de Curie y la temperatura de inicio martensítica casi coinciden en una Composición de $Ni_{50}Mn_{37}Sn_{13}$. La aleación con $x = 0.13$ es martensítica, y la transformación de martensita-austenita ocurre alrededor de la temperatura ambiente [7]. Con la fase de transición estructural alrededor de 300 K se observa una transición ferromagnética en la austenita. La fase alrededor de 320 K, una transición estructural desde austenita ferromagnética A (F) a martensita paramagnética M (P) a 300 K, y una transición ferromagnética en la fase de martensita a 233 K. La histéresis asociada claramente y la magnetización de la alta temperatura. La fase austenita es más que un orden de magnitud más grande que la fase de martensita a baja temperatura en el rango de temperatura de transición [8].

También se ha demostrado que las aleaciones $Ni_{50}Mn_{35}In_{15}$ son candidatos atractivos para tanto la investigación fundamental como la aplicación. Exhiben diversas propiedades funcionales tales como memoria de forma [9] [10], superelasticidad magnética [11], efectos magnetocalóricos [12], y barocalóricos [13], que se originan a partir de acoplamientos magnetoelásticos. Exhibe sobre el enfriamiento de una transición paramagnética a ferromagnética alrededor de 315 K, seguida de una transición estructural de primer orden de una fase cúbica de alta temperatura a una fase monoclinica de baja temperatura alrededor de 246 K, la llamada transición martensítica. En un MCE convencional se observa en torno a la transición ferromagnética en la fase austenítica [14].

En este trabajo se ha caracterizado el efecto memoria de forma y la estabilidad térmica de la transformación martensítica ante varios tratamientos térmicos en las aleaciones $Ni_{50}Mn_{37}Sn_{13}$ y $Ni_{50}Mn_{35}In_{15}$ fabricadas mediante melt-spinning, un método de solidificación rápida de reciente aplicación en aleaciones con memoria de forma. Asimismo, el sinterizado final llevado a cabo mediante la técnica SPS.

II. MATERIALES Y MÉTODO

Se fabricó una aleación con una masa de 4 gramos. La preparación del material previo a su fundición inicio con el corte de los elementos puros y así determinar su masa en una balanza analítica (fig. 1)

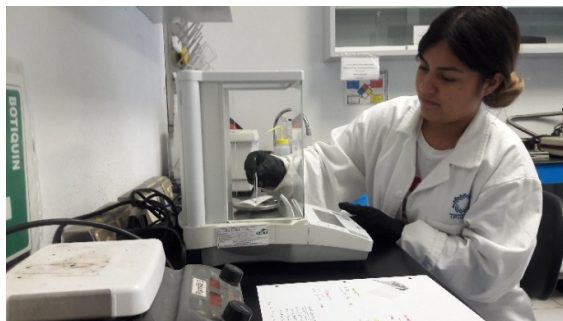


Fig.1 Preparación de los elementos, corte y pesaje en la balanza analítica.

A. *Fundición en el horno de arco eléctrico*

La aleación fue fabricada en el horno de arco eléctrico (fig. 2). El horno cuenta con una cámara en la cual se le aplica un vacío y una atmosfera de gas inerte (argón).

La fuente del horno es de corriente variable, misma que se ajusta para evitar pérdidas por sublimación de reactivos, la corriente necesaria es función del sistema de aleación con la que se trabaja y la composición de cada una de las aleaciones. La cámara de vacío está conectada a una bomba cuya función es hacer el vacío a la cámara. Previo a la fundición se realizan 3 purgas procedimiento que permite reducir la cantidad de oxígeno y residuos de la cámara.

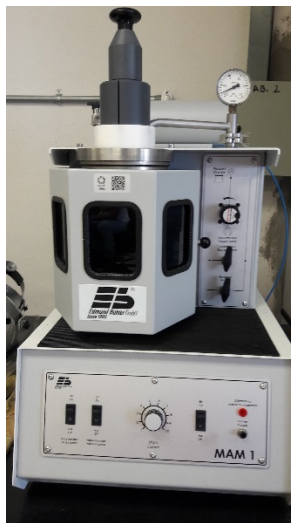


Fig. 2 Horno de arco eléctrico.

Dentro de la cámara de fundición se coloca un crisol de cobre en el cual se colocan los elementos puros (99.999 de pureza) en una de las cavidades del crisol, en otra se le añade titanio con la finalidad de inducir la oxidación de este y consumir el oxígeno restante en la cámara al momento de la fundición.

El horno cuenta con un sistema de refrigeración encargado de extraer el calor generado por el horno y a su vez solidificar la aleación en cuestión de segundos. La cámara cuenta con un electrodo de Tungsteno. Para iniciar el arco eléctrico se desactiva el seguro, ya desactivado se manipula manualmente el electrodo y así se enciende el arco fundiendo primero el titanio en seguida de los elementos puros terminando con el titanio. Se deja enfriar. Se abre la cámara y se saca el crisol para ser tallado con lija 2400 y agua, limpiando con etanol entre cada fundición, se realizaron 3 fundiciones seguido de un quebrado de la aleación y así pesarlo en la báscula para ir midiendo el porcentaje de pérdida, en total se realizaron 10 fundiciones para así asegurar la homogeneidad de la aleación.

B. *Tratamiento térmico*

Posterior a la fundición la aleación fue encapsulada en un tubo de cuarzo con purga de aire e inyectando una atmosfera de argón. A la aleación se le hace un tratamiento térmico (temple) en una temperatura de 1200 K con un tiempo de 24 horas seguido de un enfriamiento de agua con hielo (fig. 3).

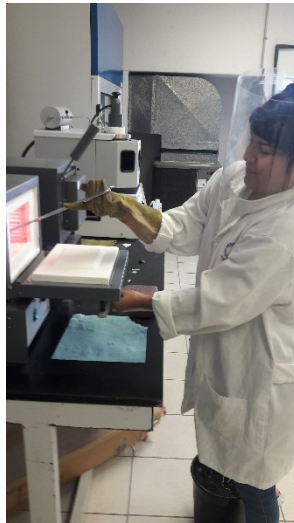


Fig. 3 Se introdujo el material al horno para su tratamiento térmico.

C. Método *melt-spinning*

La aleación obtenida en forma de bulto se introdujo en un tubo de cuarzo (fig. 4) en cuyo extremo cónico se realizó un orificio o ranura de dimensiones determinadas. La abertura está localizada justo sobre una rueda metálica de radio conocido a una distancia establecida.

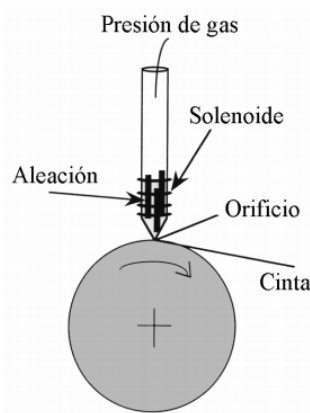


Fig. 4 Esquema del dispositivo de fabricación de cintas mediante solidificación rápida conocida como *melt-spinning*.

La aleación se funde mediante inducción de alta frecuencia por medio de un solenoide que envuelve al tubo de cuarzo. Una vez fundida la aleación y alcanzada la temperatura deseada, la mezcla es expulsada a través de la boquilla gracias a la presión ejercida por un gas inerte. El contacto con la rueda en rotación provoca la solidificación casi instantánea del metal fundido, así como importantes esfuerzos de cizalla.

D. Sinterizado SPS

Los polvos se introdujeron en un molde conductor y se prensaron por unos pistones igualmente conductores de grafito, que permiten aplicar presiones de hasta 100Mpa aproximadamente, relacionadas con la resistencia mecánica de los moldes empleados. Una corriente pulsada que atraviesa el conjunto de moldes y pistones calienta (por efecto Joule) y permite sinterizar los polvos.

III. CARACTERIZACIÓN

Las técnicas de caracterización utilizadas permiten analizar la composición final además de características térmicas y estructurales de las aleaciones.

A. *Microscopio metalográfico*

En el microscopio metalográfico se montó la pieza en la porta muestras, se enfocó y se visualizó el campo mediante varios lentes.

IV. RESULTADOS

Se analizó las cintas en bulto obtenido por medio de la técnica SPS de la aleación $\text{Ni}_{50}\text{Mn}_{37}\text{Sn}_{13}$ obteniendo como resultados cintas uniformes (fig. 5).

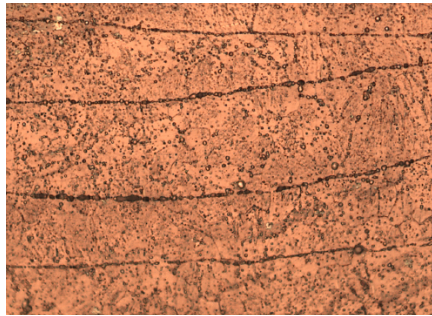


Fig. 5 Cintas en bulto obtenido por medio de la técnica SPS observado en el microscopio metalográfico.

V. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se observa que las cintas están uniformes y tienen un buen acomodamiento, lo que puede resultar favorable para la refrigeración magnética.

VI. CONCLUSIONES

La aleación $\text{Ni}_{50}\text{Mn}_{37}\text{Sn}_{13}$ que fue fabricada en el SPS obtuvo los resultados como se esperaban, se observó un acomodamiento uniforme de las cintas lo cual seguirá en estudio para ser aplicada en la refrigeración magnética.

VII. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres tanto como a mis hermanos por el apoyo incondicional que me brindaron y por la confianza al dejarme ir a otra ciudad a realizar la estancia, también agradezco al estudiante de doctorado Daniel Sánchez por el apoyo en el manejo de los equipos explicándome a detalle y al estar pendiente en los avances y resultados que iba obteniendo.

REFERENCIAS

- [1] J. B. B. I. y. A. C. V. Franco, "The Magnetocaloric Effect and Magnetic Refrigeration Near Room Temperature: Materials and Models," 2012.
- [2] I. D. S. S. a. N. A. A. Kumar-Pathak, "The effect of partial substitution of In by Si on the phase transitions and respective," *IOP*, 2008.
- [3] M. A. E. W. X. M. L. M. A. P. T. Krenke, "ferromagnetism in the austenitic and martensitic states of Ni-Mn-In alloys," *Phys. Rev.*, vol. B 76, no. 174413, 2006.
- [4] V. S.-A. V. R. J. I. P.-L. N. Z. J. A. G. a. F. P. I. Unzueta, "Identification of a Ni-vacancy defect in Ni-Mn-," *Phys. Rev.*, vol. B. 99, no. 064108, 2019.
- [5] M. A. E. W. X. M. L. M. A. P. T. Krenke, "ferromagnetism in the austenitic and martensitic states of NiMnSn," *Phys. Rev.*, 2005.
- [6] e. a. H. Zheng, "composition-dependent crystal structure and martensitic transformation in Heusler Ni-Mn-Sn alloys," *Acta Materialia*, vol. 61, pp. 4648-4656, 2013.
- [7] T. S. P. A. M. L. S. J. L. S. L. a. B. H. J. D. Santosa), "Microstructure and magnetic properties of Ni₅₀Mn₃₇Sn₁₃ Heusler alloy ribbons," *Journal of Applied Physics*, no. 07B326, 2008.
- [8] W. K. R. T. D.L.Schlagel, "Temperature dependence of the field-induced phase transformation in Ni₅₀Mn₃₇Sn₁₃," *Science Direct*, 2008.
- [9] L. M. a. M. A. J. P. 4A. Planes, "Magnetocaloric effect and its relation to shape-memory properties in ferromagnetic Heusler alloys," *Journal of Physics: Condensed Matter*, vol. 21, no. 23, 2009.
- [10] Y. I. W. I. Y. S. H. M. S. O. R. Kainuma, "Magnetic-field-induced shape recovery by reverse phase transformation.," *Nature*, 2006.
- [11] E. D. M. A. E. F. W. X. M. L. M. A. P. E. S. a. B. O. T. Krenke, "Magnetic superelasticity and inverse magnetocaloric effect in Ni-Mn-In," *PHYSICAL REVIEW B*, 2007.
- [12] T. G. K. P. S. J. D. M. a. O. G. J. Liu, "Giant magnetocaloric effect driven by structural transitions," *Nat Mater*, 2012.
- [13] D. G.-A. A. P. E. B. M. B. L. Mañonosa, "Giant solid-state barocaloric effect in the Ni-Mn-In magnetic shape-memory alloy," *Nat Mater*, 2010.
- [14] C. S. M. A. K. N. Y. S. J. W. C. F. a. M. Ghorbani Zavareh, "Direct measurements of the magnetocaloric effect in pulsed magnetic fields," 2018.
- [15] e. a. H. Zheng.

Análisis cromatográfico de los extractos de plantas presentes en el Estado de Guanajuato para el control de la Hiperglucemia

Edgar Ulises González López

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Carr. Silao-Irapuato km 12.5 El Copal, 36821
Irapuato, Gto.

IS14110132@es.itesi.edu.mx

Asesora: Alejandra Sarahí Ramírez Segovia

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Carr. Silao-Irapuato km 12.5 El Copal, 36821
Irapuato, Gto.

sarahi.ramirez@itesi.edu.mx

Resumen. En este trabajo se determinaron los diferentes tipos de metabolitos secundarios presentes en extracciones etanólicas, metanólicas y acuosas de muestras vegetales de chaya, níspero y mezquite; así como el análisis cromatográfico mediante HPLC-DAD de los extractos. Los resultados mostraron que cada una de estas infusiones presentan al menos dos tipos de extractos de la familia de los antioxidantes presentes en flores y hojas tales como flavonoides y flavonas, mismos que se espera puedan ser utilizados como sustitutos de los medicamentos comúnmente utilizados para controlar la glucosa en la sangre y con efecto antioxidante y se establecieron parámetros de análisis para la cuantificación de extractos por la técnica cromatográfica utilizada.

Palabras clave. Extractos, flavonoides e hiperglucemia.

Abstract. In this work the different types of secondary metabolites present in ethanolic, methanolic and aqueous extractions of plant samples of chaya, loquat and mesquite were determined; as well as chromatographic analysis by HPLC-DAD of the extracts. The results showed that each of these infusions present at least two types of extracts from the family of antioxidants present in flowers and leaves such as flavonoids and flavones, which are expected to be used as substitutes for the medications commonly used to control the blood glucose and antioxidant effect and analysis parameters were established for the quantification of extracts by the chromatographic technique used.

Keywords. Extracts, flavonoids and hyperglucemia.

I. INTRODUCCIÓN

Nuestros ancestros utilizaban diversos ingredientes de origen natural para el cuidado de la salud, principalmente por la alta eficiencia que pueden presentar diversas plantas. La mayoría de las propiedades medicinales de las plantas (antiinflamatorias, anticancerígenas, antioxidantes, entre otras) se debe a unos compuestos denominados fitoquímicos entre los que se encuentran los flavonoides. Los flavonoides son compuestos químicos que se ha descubierto que poseen una actividad antioxidante, es decir, neutralizan los radicales libres generados por el cuerpo o factores externos como puede ser la exposición a la luz solar, principalmente los rayos ultravioletas, debido a que pueden atravesar la capa de ozono y las capas profundas de la piel. La producción no equilibrada de radicales libres en el organismo puede conducir al daño en moléculas como ADN y ARN, de igual manera, contribuye a la generación de complejos inestables que pueden producir daños en el organismo. Asimismo, se ha descubierto que las plantas medicinales que contienen antioxidantes, como es el caso del té verde, pueden tratar complicaciones crónicas como es el caso de la diabetes. En diversos estudios se ha investigado la relación que existe entre el consumo de té verde y la disminución en los niveles de glucosa en la sangre. De manera que, en la presente investigación se planea realizar la extracción de flavonoides a

partir de muestras vegetales de chaya, níspero y mezquite, con el objetivo de identificar los tipos de flavonoides presentes por medio de técnicas analíticas y determinar el porcentaje de humedad presente en las plantas. Para ello se utilizará un estándar de té verde y cafeína, respectivamente, mismos que permitirán identificar los extractos. La finalidad de utilizar extractos de dichas especies es implementar el uso de plantas que no tienen uso comercial ni agroindustrial.

II. MARCO TEÓRICO

México ocupa el primer lugar a nivel mundial de obesidad infantil y el segundo en adultos; debido al sedentarismo y los malos hábitos alimenticios. Por lo que, es considerada como una nueva pandemia ya que se presenta con un alto impacto en la sociedad por la explosión demográfica y el peculiar estilo de vida actual.

Uno de los riesgos más frecuentes a los que los pacientes hiperglucémicos están expuestos es al desarrollo de condiciones secundarias derivadas de un mal tratamiento del padecimiento, las llamadas complicaciones diabéticas; se pueden clasificar como microvasculares como neuropatía; nefropatía; pie diabético; glaucoma; cataratas; retinopatía y macrovasculares tales como enfermedades cerebrovasculares y ataques cardíacos. Tales complicaciones tienen en común patrones de desarrollo derivado de reacciones de oxidación de moléculas de glucosa en el organismo que daña las funciones primordiales de las proteínas; conocido como estrés oxidativo es uno de los causales de mayor número de complicaciones no solo en pacientes diabéticos sino de diversas enfermedades crónico-degenerativas como el Alzheimer, mal de Parkinson, cáncer y esclerosis múltiple, por mencionar algunas.

A. Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos que han ganado importancia en los últimos años debido a su capacidad para neutralizar los radicales libres. Se sabe que los antioxidantes previenen el daño oxidativo causado por los radicales libres. Pueden interferir con el proceso de oxidación al reaccionar con los radicales libres, quelar metales con actividad Fenton y también como eliminadores de especies reactivas de oxígeno [1]. Otro rasgo de los compuestos antioxidantes presentes en las plantas comestibles es que se han promovido recientemente como aditivos alimentarios ya que muestran pocos o ningún efecto secundario tóxico [1].

B. Metabolitos secundarios

Los fitoquímicos o metabolitos secundarios pueden ser compuestos bioactivos, con peso molecular bajo, que generalmente protegen a la planta contra plagas, bacterias, estrés ambiental, radiación UV u otros factores. Asimismo, gran parte del contenido fitoquímico ha sido identificado en plantas con propiedades medicinales, como alcaloides, flavonoides, fenantrenos, antocianinas, esteroides, terpenoides, etc., los cuales se encuentran principalmente en los extractos de las flores y hojas [2].

C. Flavonoides

Los flavonoides son casi omnipresentes en las plantas y se reconocen como los pigmentos responsables del color de las hojas. Las semillas, frutas críticas, aceite de oliva, té y vino tinto [3]. Son compuestos de bajo peso molecular que cuentan con una estructura de tres anillos (C6-C3-C6), con varias sustituciones [3].

Los flavonoides tienen propiedades biológicas tales como, actividad antimicrobiana, antiulcerosa, antiinflamatoria, antioxidante, antitumoral, antiespasmódica, antidiabética, entre otras [4]. Hay que mencionar, además que los flavonoides presentan una gran variedad de propiedades entre las que se destacan el impacto sobre la regulación del crecimiento celular y la inducción de enzimas de detoxificación como las monooxigenasas dependientes del citocromo P-450 [5].

III. METODOLOGÍA

Reactivos	Equipos
- Agua desionizada	- Balanza analítica Bel Engeniering d= 0.1 mg
- Agua grado HPLC (Marca)	
- Metanol	
- Etanol (70 %)	- Centrifuga Hettich
- Quercetina (marca)	Zentrifugen Universal 320
- Ácido sulfúrico grado analítico	
- Hidróxido de amonio grado analítico	
- Hidróxido de sodio grado analítico	

A. Prueba de porcentaje de humedad

Las muestras vegetales de mezquite, chaya y níspero fueron recolectadas entre enero-junio en la ciudad de Guanajuato, posteriormente fueron lavadas con agua destilada, secadas, pesadas y etiquetadas. Se almacenaron a temperatura ambiente en recipientes, después, en un intervalo de días se verificó el estado de cada una de las muestras. Finalmente, las hojas de las plantas se pesaron nuevamente y mediante Ecuación 1 se calculó el porcentaje de humedad para cada una de las muestras.

$$\% \text{ humedad} = 100 - \left(\frac{\text{masa final} \times 100}{\text{masa inicial}} \right) \quad (1)$$

B. Preparación de extractos vegetales

Se preparó una solución de estándar interno (quercetina) con una concentración de 200 ppm utilizando como solvente metanol. De manera semejante, se prepararon infusiones acuosas metanólicas y etanólicas de té verde, café, mezquite, níspero y chaya con una concentración de 5 mg/mL. Las muestras acuosas se dejaron reposar por 10 min y se procedió a su decantación y almacenaje en tubos de fondo cónico mantenidos en

congelación para evitar la degradación del producto natural bioactivo. Por otro lado, las muestras metanólicas y etanólicas se dejaron macerar por 24 h en refrigeración y se procedió a su almacenamiento.

C. Identificación de tipos de flavonoides

Para la identificación se utilizaron tres reactivos: ácido sulfúrico [5 M], hidróxido de amonio (28 % V/V) e hidróxido de sodio [5 M]. Se tomó 1 mL de extracto (mezquite, chaya y níspero) y se adicionaron 2 gotas de reactivo (H_2SO_4 , NH_4OH e $NaOH$, según fuera el caso) de modo que se obtuvo una coloración característica acorde al tipo de antioxidantes presentes, de la manera en la que se presenta en las Tabla 1, 2 y 3.

Tabla 1. Tipo de flavonoides utilizando H_2SO_4 .

Color	Tipo de flavonoide
Amarillo	Flavonas y flavonoides
Anaranjado	Flavonas
Rojo	Chalconas

Tabla 2. Tipo de flavonoide utilizando NH_4OH .

Color	Tipo de flavonoide
Amarillo	Flavonas, flavonoides, xantonas
Rojo	Chalconas
Anaranjado	Dihidroflavonas
Azul	Antocianinas

Tabla 3. Tipo de flavonoide utilizando $NaOH$.

Color	Tipo de flavonoide
Amarillo	Flavonas y flavonoides
Rojo	Flavonas e isoflavonas
Purpura	Chalconas
Café	Flavonoles
Azul	Antocianidinas

D. Cromatografía de extractos

Se tomaron 100 μ L de cada extracto y se pararon por un acrodisco de celulosa con poros de 0.2 μ m, el filtrado se diluye 5 veces con una mezcla de agua: meOH en relación 25:75. En un cromatógrafo 1515 isocratic pump de Waters con detector DAD se inyectan 10 μ L de cada muestra con los siguientes parámetros cromatográficos:

Tabla 4. Parámetros Cromatográficos

Columna	Symmetry C-18; 4.6x75mm, 3.5 μ m
Fase móvil	agua: meOH en relación 25:75
Flujo	1 mL/min
Longitud de onda	280 nm

IV. RESULTADOS

Los resultados de los tipos de flavonoides presentes en los extractos con las diferentes pruebas realizadas se resumen en la Tabla 4 que se presenta a continuación.

Tabla 5. Resultados de las pruebas del tipo de antioxidantes presentes en los extractos. + (positivo), - (negativo) al tipo de antioxidante.

Prueba	H ₂ SO ₄	NH ₄ OH	NaOH
Flavonas	+	+	+
Flavonoides	+	+	+
Chalconas	-	-	-
Dihidroflavonas	-	-	-
Antocianinas	-	-	-
Antocianidinas	-	-	-

La Tabla 5 indica los pesos iniciales y finales de cada una de las muestras, además del porcentaje de humedad de estas.

Tabla 6. Porcentaje de humedad de cada muestra vegetal.

Muestra	Masa inicial (g)	Masa final (g)	% de humedad
Níspero	7.27	3.98	45.23
Chaya	5.10	0.77	84.92

V. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los tipos de flavonoides que predominaron en los extractos de mezquite, chaya y níspero fueron flavonas y flavonoides. Por otro lado, la prueba de porcentaje de humedad indica que la chaya tiene alrededor de 85% de humedad, mientras que el níspero un aproximado de 45%.

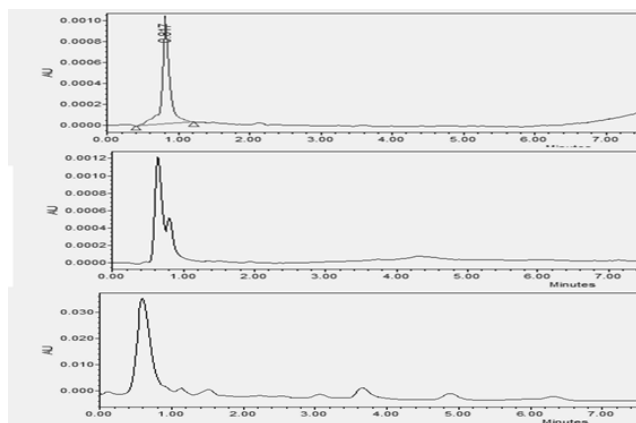


Figura 1. Cromatogramas obtenidos para mezquite (superior), té verde (medio) y chaya (inferior)

Los parámetros cromatográficos permiten observar la presencia de flavonoides y/o flavonas a 280 nm alrededor de 1 minuto de corrida cromatográfica como se observa en la figura 1 para las especies vegetales analizadas; sin embargo, es posible mejorar tales parámetros de modo que, sea eficiente la separación de dichas especies.

VI. CONCLUSIÓN

Las técnicas empleadas permitieron conocer los primeros objetivos expuestos para la presente investigación: extraer eficazmente y determinar el porcentaje de humedad de las muestras vegetales, así como conocer el tipo de flavonoides presentes en los extractos. Todavía se continúa trabajando en la segunda parte de la investigación, en la cual se propone el uso de otras técnicas de caracterización como es la cromatografía de gases para permitir una óptima caracterización como sustituto de medicamentos para el control de la hiperglucemia. Se recomienda que los parámetros cromatográficos permitan la diferenciación de los extractos en las dos especies identificadas como flavonoides y flavonas.

VII. RECONOCIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento al Tecnológico Superior de Irapuato, al Tecnológico Nacional de México en el programa de apoyo a la investigación científica y tecnológica 2019 para los institutos tecnológicos federales y descentralizados con el proyecto 5938.19-P y al CONACyT por las facilidades y el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano.

REFERENCIAS

- [1] A. V. G. Roberto Lemus Mondaca, "Stevia rebaudiana Bertoni, source of high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects," *Elsevier*, pp. 1121-1132, 2012.
- [2] A. D. B. E. H. M. L. A. L. C. Guadalupe Andrade, "Variación de compuestos fenólicos totales, flavonoides y taninos en "Vanilla planifolia" Jacks. ex Andrews de la Huasteca Hidalguense, México," *Dialnet*, pp. 55-66, 2018.
- [3] E. Middleton, "The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer," *Pharmacological*, pp. 673-751, 2000.
- [4] N. G. Cruz, "Evaluación de la actividad antidiabética y antioxidante in vitro de extractos polares de Justicia spicigera y elucidación estructural de los compuestos fenólicos mayoritarios," *Universidad Tecnológica de la Mixteca*, pp. 9-14, 2013.
- [5] Á. C. W. V. A. A. E. H. N. R. O. A. Avel González Sánchez, "Citroflavonoides como posible alternativa en el tratamiento de la diabetes y sus complicaciones," *Revista mexicana de ciencias farmaceuticas*, pp. 17-18, 2011.

Análisis de modelos cosmológicos como sistemas dinámicos

Mariana del Rocío Segura Rosales
Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Ciencias
Av. Parque Chapultepec No. 1570
C.P. 78260, San Luis Potosí, S.L.P.
mariana.rociousegura@gmail.com

Asesor: Alberto Hernández Almada
Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Cerro de las Campanas S/N Centro Universitario,
C.P. 76010, Querétaro, Qro.
ahalmada@uaq.mx

Resumen — En el presente proyecto se propone un sistema generado por ciertas ecuaciones diferenciales que nos ayudan a estudiar cómo se está comportando nuestro universo, la materia y energía oscura que lo integra. Al aplicarle los valores obtenidos mediante la resolución de las ecuaciones diferenciales a las densidades de materia oscura, energía oscura y radiación construimos y graficamos el espacio fase que nos permite representar el conjunto de posiciones y momentos de un sistema dinámico. Tal que cada punto representa un estado de este sistema. Con este espacio fase podemos ver si este sistema dinámico sirve para describir la aceleración del universo y también observamos que es lo que sucede si se cambian las condiciones iniciales de nuestro sistema, que espacio fase nos da y el porqué de ese gráfico [1].

Palabras clave — Sistema Dinámico, Espacio Fase, Universo.

Abstract — In the present project there is proposed a system generated by certain distinguishing equations that help us to study how there is behaving our universe, the matter and dark energy that integrates it. By applying the values obtained by solving the differential equations to the densities of dark matter, dark energy and radiation we build and plot the phase space that allows us to represent the set of positions and moments of a dynamic system. Such that each point represents a state of this system. With this space phase we can see if this dynamic system serves to describe the acceleration of the universe and we observe what happens if we change the initial conditions of our system, what phase space gives us and the reason of this graph [1].

Keywords – dynamic systems, phase space, universe

I. INTRODUCCIÓN

La cosmología es un área amplia y prometedora de investigación en Matemáticas y Física. Es la ciencia que estudia el origen y la evolución del universo. El universo comenzó con el Big Bang, la cual tiene la singularidad de que todas las leyes de la física fueron violadas. Hoy en día lo que sabemos es que hay dos grandes teorías como la Mecánica Cuántica y la Relatividad General no funciona en todos los casos sobre todo en el tema del Big Bang. Y por esta singularidad hay algo faltante. Recientemente se han estado usando modelos de Sistemas dinámicos para poder resolver esa singularidad del universo en el Big Bang.

Nuestro universo en largas escalas basándonos en uno de las últimas mediciones del Satélite de observación Planck de microondas cósmicas y de otras observaciones cosmológicas nos dicen que el universo es antiguo, parece ser consistente con el principio de cosmología y que actualmente está pasando por un proceso de expansión acelerada. Los componentes de la materia estándar como lo es la radiación solo puede proporcionar

una dinámica desacelerada. Para poder explicar la expansión acelerada del universo introduciremos el concepto de energía oscura que se define como un componente de materia caracterizado por una presión negativa tal que $\rho_{de} < -\rho_{de}/3$ que es equivalente a $\omega_{de} < -1/3$.

Las últimas observaciones astronómicas sugieren que al menos el 70% de la energía del universo está compuesta por energía oscura [2].

II. MARCO TEÓRICO

A. *Sistemas Dinámicos*

Los sistemas dinámicos son sistemas cuyos estados evolucionan con el tiempo. Los sistemas dinámicos se pueden clasificar en:

Discretos: los sistemas se describen por medio de ecuaciones de diferencias también conocidas como mapas iterados.

Continuos: se expresan los sistemas con ecuaciones diferenciales ordinarias, ecuaciones diferenciales en derivadas parciales y ecuaciones diferenciales con retrasos.

Un sistema dinámico continuo n- dimensional se puede representar por la ecuación

$$\frac{dx}{dt} = \dot{x} = F(x) \quad (1)$$

La forma de visualizar el comportamiento de las variables de estado de un sistema dinámico puede ser en forma de serie de tiempo es decir la gráfica de una variable de estado contra tiempo o en un espacio fase. El espacio fase de un sistema n-dimensional $\dot{x} = F(x)$ es el espacio donde todos los posibles estados de un sistema son representados, cada parámetro del sistema se representa con un eje de un espacio multidimensional y cada punto del espacio representa cada posible estado de las variables de sistema. En este tipo de representación el tiempo se vuelve un parámetro implícito.

El espacio fase está descrito por un campo vectorial \mathbf{F} que rige el recorrido de las variables del sistema $x(t)$ en el tiempo, el recorrido de estas variables recibe el nombre de trayectoria.

Se dice que una singularidad del espacio fase es estable si toda trayectoria que comienza cerca de ella se aproxima a ella conforme el tiempo transcurre. En sistemas lineales las singularidades solo pueden ser puntos, los cuales se conocen como puntos fijos [4].

B. *Puntos fijos*

Las singularidades \mathbf{x}^* para las cuales $\mathbf{x}^* = \mathbf{F}(\mathbf{x}^*) = \mathbf{0}$ son llamadas puntos fijos o puntos críticos; en estos puntos el campo vectorial que determina la dirección de las trayectorias en el espacio fase es nulo. En base al comportamiento de las trayectorias alrededor de los puntos fijos, estos pueden ser:

Nodo: es un punto tal que en sus proximidades todas las orbitas entran a él.

Nodo estrella: es un nodo en el que la tasa de rapidez con que todas las trayectorias convergen o divergen es igual.

Foco: Este punto es asintóticamente estable cuando todas las orbitas en sus proximidades tienden a él pero no entran en él.

Centro: es tal que en sus proximidades todas sus orbitas son cerradas. Ninguna orbita entra y ninguna sale.

Punto Silla: las trayectorias inicialmente tienden al punto pero después divergen de él [3,4].

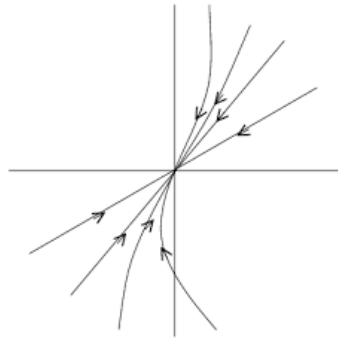


Fig. 1. Nodo estable.

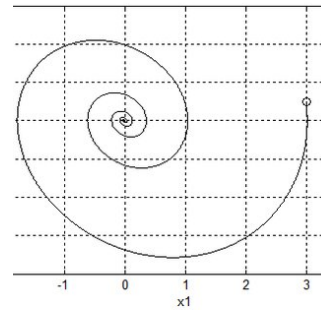


Fig. 2. Foco inestable.

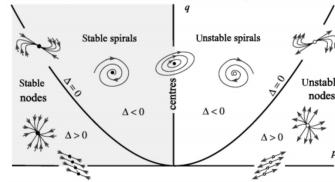


Fig. 3. Comportamientos de las trayectorias.

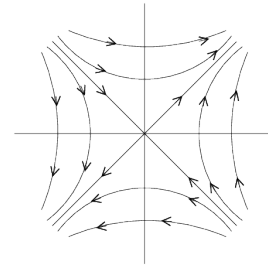


Fig. 4. Punto silla.

III. METODOLOGIA

Para iniciar con nuestra investigación creamos un sistema dinámico tomando estas ecuaciones

$$3H^2 = \rho_{dm} + \rho_r + \rho_{de} \quad (2)$$

$$\dot{\rho}_{dm} = -3H\rho_{dm} \quad (3)$$

$$\dot{\rho}_r = -4H\rho_r \quad (4)$$

$$\dot{\rho}_{De} = -3H(1 + \omega)\rho_{de} \quad (5)$$

donde ρ_{de} es la densidad de la energía oscura (Dark Energy), ρ_{dm} es la densidad de la materia oscura (Dark Matter) y ρ_r es la densidad de radiación.

Igualamos la ecuación (2) a la unidad.

$$1 = \frac{\rho_{dm}}{3H^2} + \frac{\rho_r}{3H^2} + \frac{\rho_{de}}{3H^2} \quad (6)$$

Ahora renombramos las variables

$$y = \frac{\rho_{dm}}{3H^2}; \quad \Omega = \frac{\rho_r}{3H^2}; \quad x = \frac{\rho_{de}}{3H^2} \quad (7)$$

Entonces la ecuación (6) nos queda:

$$1 = y + \Omega + x \quad (8)$$

Ahora proponemos que

$$H = \frac{\dot{a}}{a} = \frac{d \ln a}{dt} \quad (9)$$

$$\dot{N} = \frac{d \ln a}{dt} = \frac{da}{a} \quad (10)$$

Ahora teniendo en cuenta que

$$\dot{\rho} = \frac{d\rho}{dt} = \frac{d\rho}{da} \dot{a} \quad (11)$$

donde $\dot{a} = a * H$ obtenemos que

$$\dot{\rho} = H \frac{d\rho}{dN} \quad (12)$$

Una vez que obtuvimos estos datos proseguimos por sacar las derivadas con respecto a N de la variable x y de la variable y que se encuentran en la ecuación (7) y utilizando las ecuaciones anteriores simplificamos las derivadas y obtenemos que:

$$\frac{dx}{dN} = x' = x(x(3\omega - 1) - 3\omega - y + 1) \quad (13)$$

$$\frac{dy}{dN} = y' = y(x(3\omega - 1) - y + 1) \quad (14)$$

Utilizando las derivadas calculamos los puntos de equilibrio del sistema igualando a cero (13) y (14) y resolviendo el sistema de ecuaciones obtenemos que los puntos están en (0,1); (1,0); (0,0) y podemos concluir que en el punto (0,0) tenemos la radiación [5].

IV. RESULTADOS

```

Archivo Editar Ver Buscar Terminal Ayuda
from pylab import *
w=1
xvalues, yvalues = meshgrid(arange(0,1,0.1), arange(0,1,0.1))
xdot= xvalues * (xvalues + (3*w-1)*yvalues - 3*w+1)
ydot= yvalues * (xvalues + (3*w-1)*yvalues+1)
streamplot(xvalues, yvalues, xdot, ydot)
xlim([0,1.01])
ylim([0,1.01])
show()

```

Fig. 4. Programa para graficar el espacio fase.

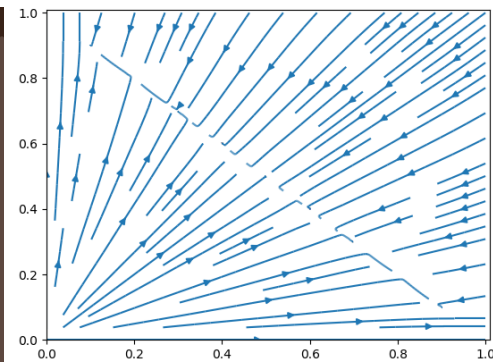


Fig. 5. Espacio fase con $\omega = 0$

En base a las ecuaciones (13) y (14) graficamos el espacio fase utilizando un programa en Python (Figura 4) que solo funciona para Sistemas Dinámicos continuos en el tiempo como es el caso de nuestro sistema.

En este caso optamos por usar 0.1 para determinar la resolución del espacio, en el apartado x dot y y dot usamos las ecuaciones (13) y (14).

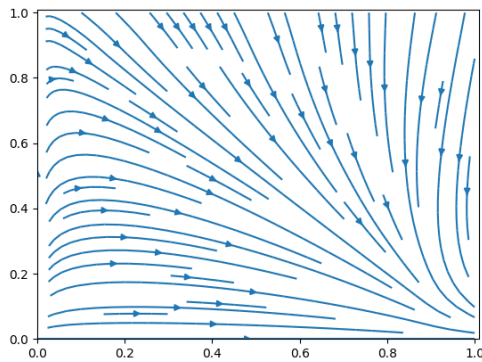


Fig. 6. Espacio fase con la constante $\omega = -1$.

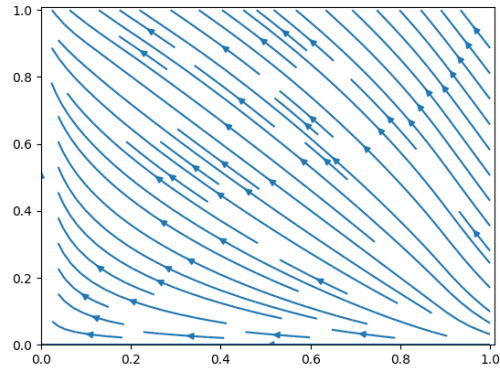


Fig. 7. Espacio fase con la constante $\omega=1$

Comparando podemos notar que el universo sigue una forma de expansión acelerada muy parecida a la de la Figura 6 ya que se ve como salen o radian todos los puntos a partir del punto (0,0) como lo habíamos predicho matemáticamente cuando buscamos los puntos de equilibrio. Otra cosa que podemos notar es que en la coordenada (0,1) inicia una recta diagonal que llega casi hasta el punto o coordenada (1,0) y ninguna de las líneas que lo rodean la cruzan y mantienen cierta distancia. Esa línea en diagonal podríamos decir que en un inicio cuando se creó el universo por el Big Bang había más materia oscura y conforme ha pasado el tiempo de evolución en la expansión está se ha ido convirtiendo en energía oscura como lo predicen las ecuaciones de Einstein en la relatividad.

Si analizamos la Figura 7. Vemos que no tiene sentido que el universo se expandiera de esta forma está ya que podemos ver en el punto con coordenadas (1,0) es de donde comienza la radiación o expansión y va hacia el pasado que sería el punto (0,0).

Y para finalizar la figura 5 yo creo que es la forma más simétrica en la que nosotros podríamos describir el movimiento de expansión del universo sin embargo no es la más correcta ni más precisa para estudiar e investigar porque aunque si comienza a radiar desde el punto (0,0) se pierde la información de la materia oscura y de la energía oscura que en si es lo que nos interesaba en este proyecto.

V. CONCLUSIÓN

En este trabajo de investigación se estudió el comportamiento que toma la expansión acelerada del universo haciendo uso unas ecuaciones de densidad de la masa y energía oscura creando un sistema dinámico a partir de estas y mediante el uso de la programación se hicieron unas propuestas de cómo era el espacio fase del movimiento de expansión cambiando solo el valor de la variable ω . Y se analizó concretamente si

tenían sentido o no los gráficos y comparamos los resultados con los valores obtenidos matemáticamente.

VI. RECONOCIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Querétaro, a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y a todo el comité organizador del verano regional por darme las facilidades y el apoyo que me otorgaron para poder realizar esta estancia de verano.

REFERENCIAS

- [1] BAHAMONDE, S., BÖHMER, C., CARLONI S., COPELAND, E., TAMANINIK, N. (2017). Dynamical systems applied to cosmology: dark energy and modified gravity, *Physics Reports* Vol. 775-777 (2018) 1-122.
- [2] ÖVGÜN, A., LEON, G., MAGAÑA, J., JUSUFI, K., (2018). Falsifying cosmological models based on a non-linear electrodynamics, *Eur. Phys. J. C* (2018).
- [3] LOAIZA M. (2006). Diseño y simulación de un criptosistema caótico para comunicaciones seguras, 3, 1-19.
- [4] TERMAN, D., IZHIKEVICK, E., *State space* (2008) scholarpedia, 3(3):1924.
- [5] SAMAYA, H, (2015), Introduction to the modeling and analysis of complex systems, 99-112.

Análisis de secuencias multilocus para la identificación de hongos endófitos (A)

Katia Nazaret Reyes Carrizalez
 Universidad Autónoma de Coahuila
 Ing. J. Cardenas Valdez S/N, República,
 25280 Saltillo, Coah.
katia.carrizalez@uadec.edu.mx

Asesor: Jesús Israel Morales Jiménez
 Instituto Potosino de Investigación Científica
 y Tecnológica
 Camino a la Presa San José 2055, Lomas 4a secc.
 San Luis Potosí, 78216
jesus.morales@ipicyt.edu.mx

Resumen — En este trabajo se utilizó el análisis de secuencias multilocus (MLSA, por sus siglas en inglés) para la identificación de cepas de hongos endófitos aislados de diferentes plantas. El MLSA es usado para obtener una mejor resolución de las relaciones filogenéticas de especies dentro de un género o géneros dentro de una familia. Los hongos endófitos son organismos que habitan en los tallos, hojas o flores de las plantas llevando una mutua convivencia, el hospedero proporciona nutrientes necesarios para el desarrollo de los hongos y estos, en algunos casos, son capaces de mejorar los mecanismos de defensa de la planta.

Palabras clave — análisis de secuencias multilocus, hongos endófitos, identificación.

Abstract — This work used multilocus sequence analysis (MLSA) for the identification of various plants-isolated endophyte fungi. MLSA is used to obtain better resolution of the phylogenetic relationships of species within a genus or genera within a family. Endophyte fungi are organisms that inhabit the stems, leaves or flowers of plants carrying a mutual coexistence, the host provides nutrients necessary for the development of fungi and these, in some cases, are able to improve the mechanisms of defense of the plant.

Keywords — multilocus sequence analysis, endophyte fungi, identification.

I. INTRODUCCIÓN

El análisis/tipado de secuencias multilocus (MLSA/MLST) es un enfoque basado en secuencias de nucleótidos para la caracterización inequívoca de procariontes y eucariontes a través de Internet, que caracteriza directamente las variaciones de la secuencia de ADN en un conjunto de genes constitutivos y evalúa relaciones entre cepas basadas en sus perfiles o secuencias alélicas únicas (Maiden, 2006). El método ha sido ampliamente utilizado en la clasificación e identificación de diversas bacterias, para determinar el alcance del intercambio de genes dentro y entre especies y para establecer la importancia relativa de la recombinación en la genética poblacional (Doroghazi & Buckley, 2010; Alvarez-Perez, de Vega, & Herrera, 2013; Freel, Millan-Aguinaga, y Jensen, 2013). MLSA está proporcionando nuevas oportunidades para evaluar el estado de los taxones bacterianos utilizando patrones de variación genética. [1] MLSA fue desarrollado a partir de la aplicación del método MLST con el fin de reconstruir las relaciones evolutivas entre los prokaryotes (Sawabe, Kita-Tsukamoto, & Thompson, 2007; Vinuesa et al., 2008; Wagner, Varghese, Hemme y Wiegel, 2013). El MLST comparado se basa en la secuenciación de fragmentos de 450-500 bp de cinco a siete genes constitutivos que proporcionan información sobre la propagación de la divergencia de nucleótidos entre los cromosomas de las poblaciones muestreadas. Las secuencias que difieren incluso por un solo nucleótido para cada gen se asignan como diferentes alelos, por lo que la MLSA es muy adecuada para detectar cambios genéticos dentro y entre especies.

II. MARCO TEÓRICO

El uso de MultiLocus Sequence Analysis(MLSA), un método conocido por ser potente y reproducible, aborda la mayoría de las caídas cortas de los métodos anteriores. Se sabe que la MLSA diferencia la cepa siete en aquellas especies bacterianas con transferencia de genes laterales frecuentes y recombinaciones homólogas(Papkeetal.,2011), así como en aquellas con poca o ninguna divergencia de secuencia de genes rRNA 16S (Papkeetal.,2004).[2]

El análisis filogenético mediante secuencias multilocus implica varios pasos:

- (1) selección de cepas y genes constitutivos.
- (2) generación de secuencias (amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación del ADN)
- (3) análisis de datos para identificar sitios homólogos dentro de cada gen
- (4) MLSA utilizando secuencias concatenadas o perfiles alélicos (estos últimos se utilizan generalmente para la genética de la población)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Extracción de ADN y Generación de secuencias

Se seleccionó material vegetal sano y se lavó con jabón, en condiciones asépticas se desinfectó el material vegetal con etanol 70% durante 1 minuto y después se enjuagó con agua estéril 3 veces por 1 minuto. El material vegetal se cortó en cuadros de 1mm² aproximadamente y se procedió sembrar en cajas con PDA. Se realizó la extracción de ADN con la técnica de fenol caliente.

2. Selección de cepas

Las secuencias de los genes constitutivos de las cepas para identificar se les realizó un análisis BLAST y se obtuvieron las siguientes secuencias de las especies relacionados con nuestros hongos a identificar las familias de la (Tabla 1).

3. Análisis de datos

Se alinearon y ensamblaron los datos en CLUSTALX, se recortaron manualmente en el programa SEAVIEW para alinearse nuevamente. Los arboles filogenéticos se contruyeron por máxima verosimilitud en PhyML.

Tabla 1. Cepas

Especie	Cepa	ITS	LRSU	Especie	Cepa	ITS	LRSU
<i>Pestalotia bicolor</i>	PSHI2004Endo143	DQ789380	DQ657858	<i>Pestalotiopsis maculans</i>	AB1	MK402072	AF382354
<i>Pestalotia cinchonae</i>	PSHI2004Endo165	DQ789385	DQ657861	<i>Pestalotiopsis maculiformans</i>	CBS 433.65	MH858655	MH870296
<i>Pestalotia elasticae</i>	CBS 524.70	MH859831	MH871607	<i>Pestalotiopsis malayana</i>	CBS 102220	NR 147550	KM116238
<i>Pestalotia eugeniae</i>	CBS 349.52	MH857078	MH868614	<i>Pestalotiopsis mangifolia</i>	580825	MK387970	DQ534029
<i>Pestalotia lambertiae</i>	PSHI2004Endo86	DQ813422	DQ657869	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	AP5	MH707065	MH868906
<i>Pestalotia pampeana</i>	PSHI2004Endo94	DQ813428	DQ657876	<i>Pestalotiopsis milletiae</i>	PSHI2004Endo127	DQ813425	DQ657871
<i>Pestalotia pitospora</i>	CBS 650.66	MH858904	MH870577	<i>Pestalotiopsis monochaeta</i>	CBS 144.97	NR 147554	KM116229
<i>Pestalotia populi-nigrae</i>	CBS 353.51	MH856897	MH868419	<i>Pestalotiopsis monochaetioides</i>	CBS 366.54	MH857365	MH868908
<i>Pestalotia rhododendri</i>	CBS 262.55	MH857478	MH869020	<i>Pestalotiopsis neglecta</i>	CBS 357.71	MH860161	MH871930
<i>Pestalotia subcuticularis</i>	CBS 509.65	MH858690	MH870331	<i>Pestalotiopsis novae-hollandiae</i>	CBS 130973	NR 147557	KM116232
<i>Pestalotia thujae</i>	CBS 303.75	MH860920	MH872658	<i>Pestalotiopsis olivacea</i>	PSHI2002Endo696	AY687883	DQ534032
<i>Pestalotia torrendii</i>	CBS 184.71	MH860057	MH871838	<i>Pestalotiopsis oryzae</i>	CBS 353.69	NR 147547	KM116221
<i>Pestalotia vaccinii</i>	CBS 352.71	MH860159	MH871927	<i>Pestalotiopsis osyridis</i>	PSHI2002Endo643	AY687311	DQ657874
<i>Pestalotiopsis adusta</i>	3.9103	JN943637	JN940828	<i>Pestalotiopsis paeoniae</i>	PSHI2002Endo8801	AY687311	DQ534033
<i>Pestalotiopsis aggestorum</i>	LC6301	KX895015	KX895129	<i>Pestalotiopsis paeonicola</i>	PSHI2002Endo3502	EU400221	DQ657875
<i>Pestalotiopsis aloes</i>	PSHI2004Endo149	DQ789379	DQ657857	<i>Pestalotiopsis palmarum</i>	HHL51	KX631719	MH877703
<i>Pestalotiopsis arceuthobii</i>	CBS 434.65	NR 147561	MH870297	<i>Pestalotiopsis aff. palmarum</i>	PP99	FJ884145	FJ890415
<i>Pestalotiopsis arengae</i>	CBS 331.92	NR 147560	KM116207	<i>Pestalotiopsis papuana</i>	CBS 331.96	NR 147553	KM116240
<i>Pestalotiopsis australasiae</i>	CBS 114126	NR 147546	KM116218	<i>Pestalotiopsis parva</i>	CBS 278.35	NR 145237	KM116205
<i>Pestalotiopsis australis</i>	CBS 114193	NR 145239	KM116197	<i>Pestalotiopsis photinae</i>	HHL79	KX631720	AF382363
<i>Pestalotiopsis besseyi</i>	CK51	MH474343	MH483589	<i>Pestalotiopsis portugallica</i>	CBS 393.48	NR 147556	KM116233
<i>Pestalotiopsis biciliata</i>	HKUCC 7983	AF409973	AF382356	<i>Pestalotiopsis scoparia</i>	CBS 176.25	NR 145238	MH866338
<i>Pestalotiopsis biciliata</i>	CBS 790.68	MH859228	MH870953	<i>Pestalotiopsis sequoiae</i>	MFLUCC 13-0399	NR 153271	KX572344
<i>Pestalotiopsis brassicae</i>	CBS 170.26	NR 147562	MH866373	<i>Pestalotiopsis sorbi</i>	PSHI2004Endo40	DQ813431	DQ657878
<i>Pestalotiopsis camelliae</i>	MFLUCC 12-0277	NR 120188	KM116284	<i>Pestalotiopsis spathulata</i>	CBS 356.86	NR 147558	KM116236
<i>Pestalotiopsis carveri</i>	PSHI2004Endo42	DQ789384	DQ657860	<i>Pestalotiopsis spathulata</i>	CBS 144035	MH554172	MH554366
<i>Pestalotiopsis chamaeropsis</i>	CBS 186.71	MH860058	MH871839	<i>Pestalotiopsis telopeae</i>	CBS 114161	NR 147545	KM116202
<i>Pestalotiopsis citrina</i>	PSHI2003Endo1010	DQ078308	DQ534041	<i>Pestalotiopsis versicolor</i>	CBS 303.49	MH856535	MH871111
<i>Pestalotiopsis coffeae</i>	PSHI2004Endo108	DQ789387	DQ657863	<i>Pestalotiopsis westerdijkii</i>	PSHI2004Endo98	DQ137856	DQ534038
<i>Pestalotiopsis colombiensis</i>	CBS 118553	NR 147551	KM116222	<i>Pestalotiopsis yanglingensis</i>	LC3412	KX894980	KX895108
<i>Pestalotiopsis conigena</i>	QQ-AZ	HM535733	DQ534026	<i>Pestalotiopsis yunnanensis</i>	PSHI2002Endo8171	AY526872	DQ657883
<i>Pestalotiopsis crassiuscula</i>	PSHI2002Endo356	AY687868	DQ534028	<i>Neopestalotiopsis aotearoa</i>	CBS 367.54	NR 163673	MH868909
<i>Pestalotiopsis dianellae</i>	CBS:143421	NR 156664	MG386104	<i>Neopestalotiopsis australis</i>	CBS 114159	KM199348	KM116252
<i>Pestalotiopsis diplocisiae</i>	CBS 115587	NR 147552	KM116242	<i>Neopestalotiopsis clavispora</i>	CBS 447.73	MH860736	MH872448
<i>Pestalotiopsis disseminata</i>	CPC 10950	DQ195782	DQ195794	<i>Neopestalotiopsis cocoes</i>	MFLU 15-0220	NR 156312	KX789688
<i>Pestalotiopsis distincta</i>	LC3232	KX894961	KX895092	<i>Neopestalotiopsis cubana</i>	CBS 600.96	KM199347	KM116253
<i>Pestalotiopsis funerea var. d</i>	CBS 365.54	MH857364	MH868907	<i>Neopestalotiopsis egyptiaca</i>	RM3.18A.03	MH397087	MH878152
<i>Pestalotiopsis funereoides</i>	CBS 415.50	MH856695	MH868211	<i>Neopestalotiopsis ellipsospora</i>	CBS 115113	KM199343	KM116269
<i>Pestalotiopsis furcata</i>	MFLUCC 12-0054	NR_120087	KM116283	<i>Neopestalotiopsis eucalypticola</i>	CBS 264.37	NR_163670	KM116256
<i>Pestalotiopsis grevilleae</i>	CBS 114127	NR 147548	KM116212	<i>Neopestalotiopsis foedans</i>	CGMCC 3.9123	NR 111785	KF590164
<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	CBS 399.71	MH860183	MH871953	<i>Neopestalotiopsis fomicarum</i>	CBS 362.72	NR 145242	KM116248
<i>Pestalotiopsis hangzhouensis</i>	PSHI2002Endo390	AY526870	DQ657865	<i>Neopestalotiopsis honoluluana</i>	CBS 114495	NR 145245	KM116263
<i>Pestalotiopsis hawaiiensis</i>	CBS 114491	NR_147559	KM116239	<i>Neopestalotiopsis mesopotamica</i>	CBS 336.86	NR_145244	KM116271
<i>Pestalotiopsis heterocornis</i>	3.9158	JN943627	JN940835	<i>Neopestalotiopsis musae</i>	MFLU 16-1279	NR 156311	KX789684
<i>Pestalotiopsis hollandica</i>	CBS 265.33	NR 147555	KM116228	<i>Neopestalotiopsis natalensis</i>	CBS 138.41	NR 156288	KM116279
<i>Pestalotiopsis humus</i>	CBS 336.97	KM199317	KM116230	<i>Neopestalotiopsis pandanicola</i>	KUMCC 17-0175	MH388321	MH376727
<i>Pestalotiopsis jesteri</i>	Stroble 6T-L-3	NR_119447	KM116281	<i>Neopestalotiopsis phangngaensis</i>	MFLUCC 18-0119	MH388354	MH376728
<i>Pestalotiopsis jiangxiensis</i>	LC4399	KX895009	KX895128	<i>Neopestalotiopsis piceana</i>	CBS 394.48	NR 163671	MH867963
<i>Pestalotiopsis jinchanghensis</i>	LC6636	KX895028	KX895135	<i>Pestalotiopsis protearum</i>	CPC 1779	JX556232	JX556250
<i>Pestalotiopsis kenyana</i>	CBS 442.67	NR 147549	MH870724	<i>Neopestalotiopsis rosae</i>	CBS 101057	NR 145243	KM116245
<i>Pestalotiopsis knightiae</i>	CBS 114138	KM199310	KM116227	<i>Neopestalotiopsis saprophytica</i>	MFLUCC 12-0282	NR 120180	KM116251
<i>Pestalotiopsis krabiensis</i>	MFLUCC 16-0260	MH388360	MH376734	<i>Neopestalotiopsis steyaertii</i>	IMI 192475	NR 156270	KM116285
<i>Pestalotiopsis kunmingensis</i>	PSHI2002Endo766	AY373376	DQ657868	<i>Neopestalotiopsis surinamensis</i>	CBS 450.74	NR_145240	KM116258
<i>Pestalotiopsis lijiangensis</i>	CNUZ118	KU860520	KU860521				

IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se analizaron cinco hongos aislados, los cuales podían pertenecer a los géneros *Trichoderma*, *Neopestalotiopsis*, *Pestalotiopsis* y *Pestalotia* según los resultados del BLAST

En las figuras 1,2,3,4,5 se pueden observar los resultados del análisis. El hongo IQ038 se agrupó con *Neopestalotiopsis saprophytica*.

Los hongos IQ039 e IQ040 se agruparon con diferentes secuencias de los géneros *Neopestalotiopsis*, *Pestalotiopsis* y *Pestalotia*. Con los genes utilizados no se obtuvo el suficiente poder de resolución para asignarlo a un género en específico.

El hongo IQ041 se agrupó con *Neopestalotiopsis clavispora* tuvo un porcentaje de identidad del 83.6%

El hongo IQ048 se identificó como *Trichoderma ghanese*.

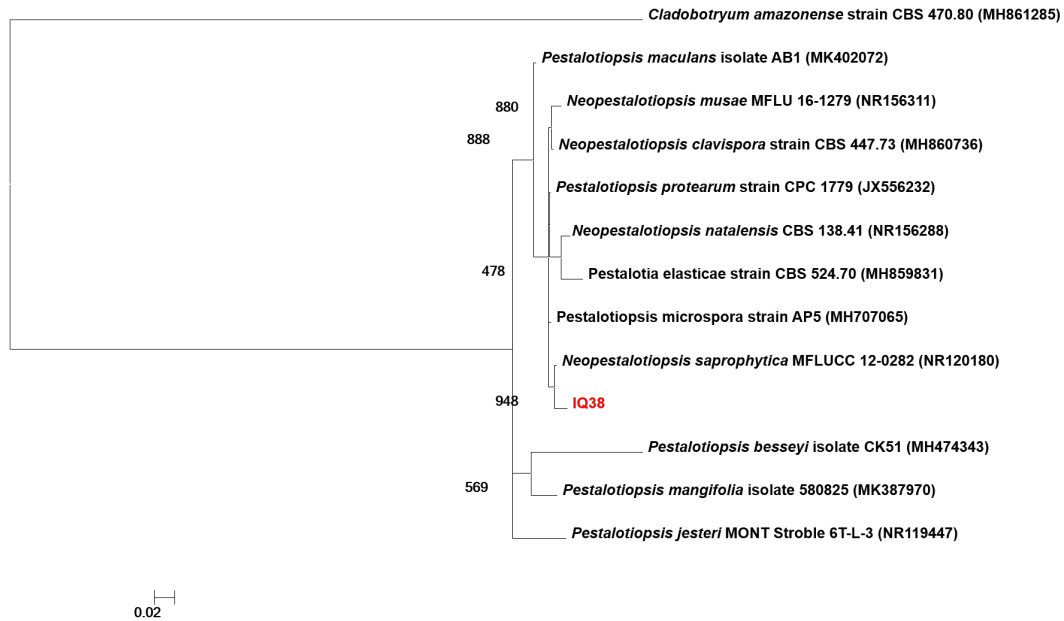


Fig. 1. Árbol filogenético del hongo IQ038

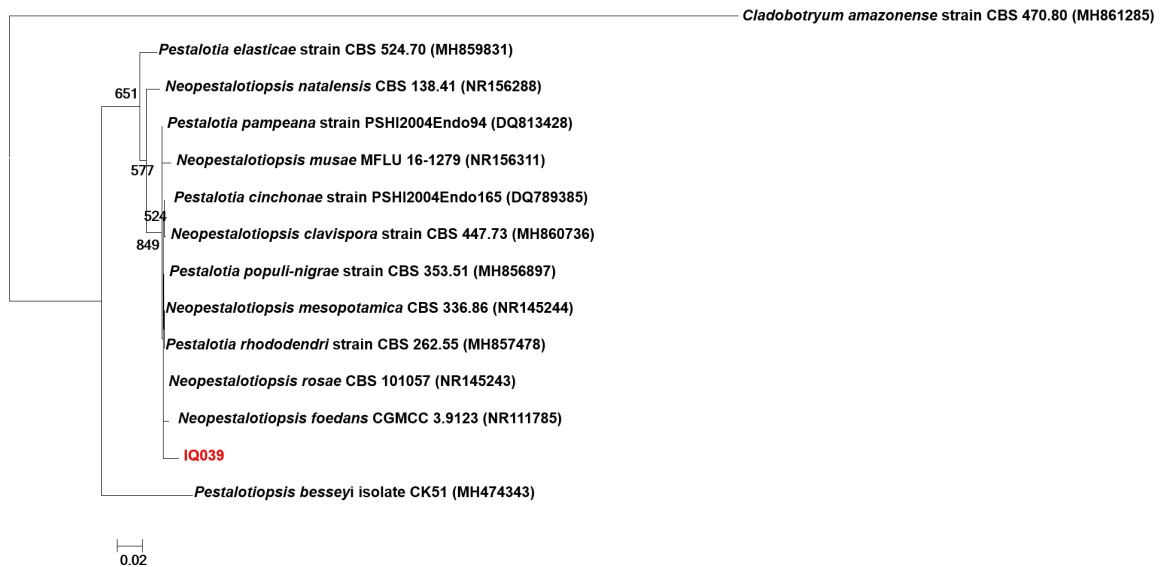


Fig. 2. Árbol filogenético del hongo IQ039

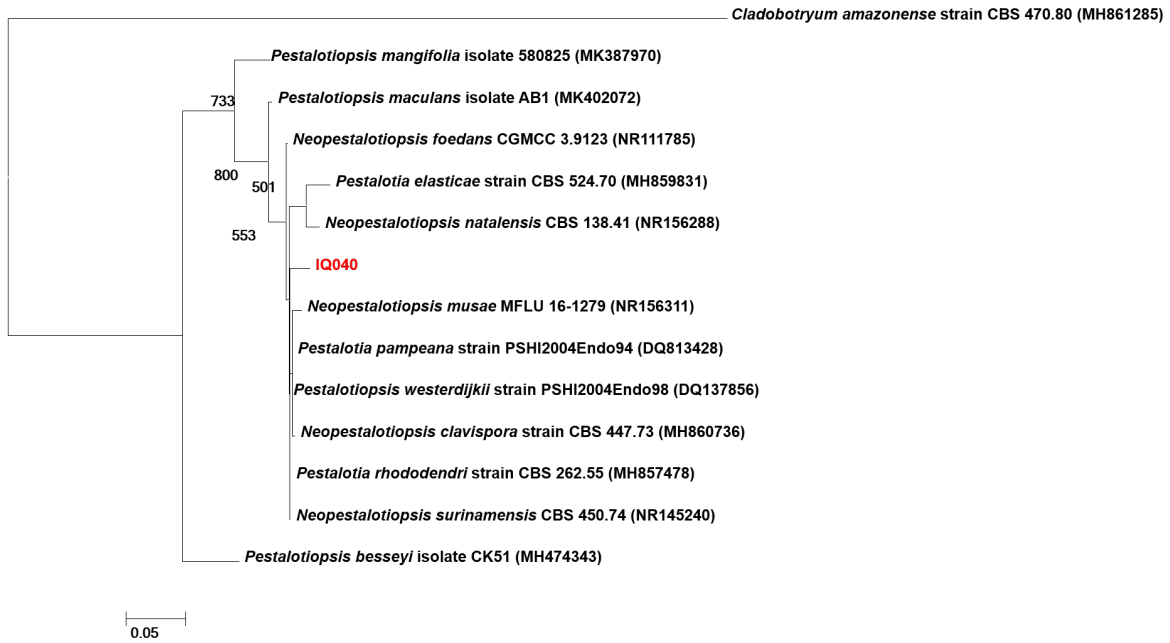


Fig. 3. Árbol filogenético del hongo IQ040

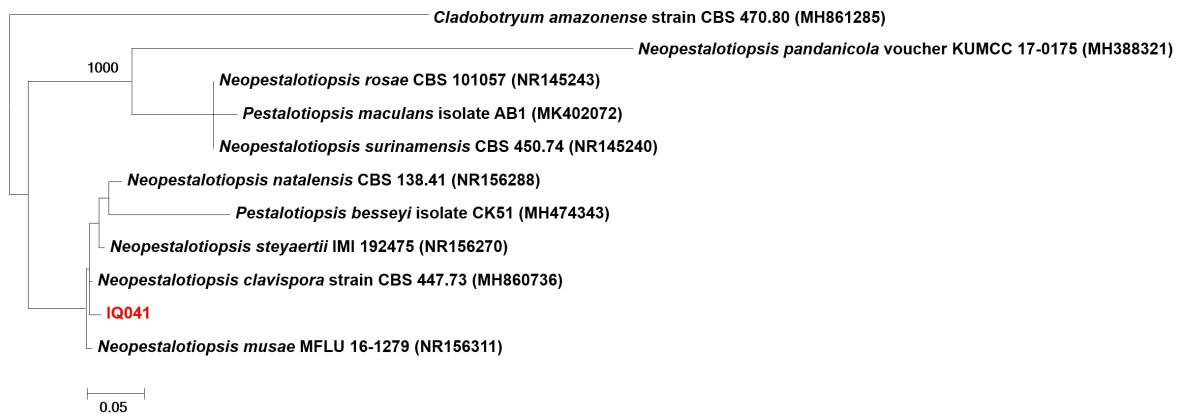


Fig. 4. Árbol filogenético del hongo IQ041

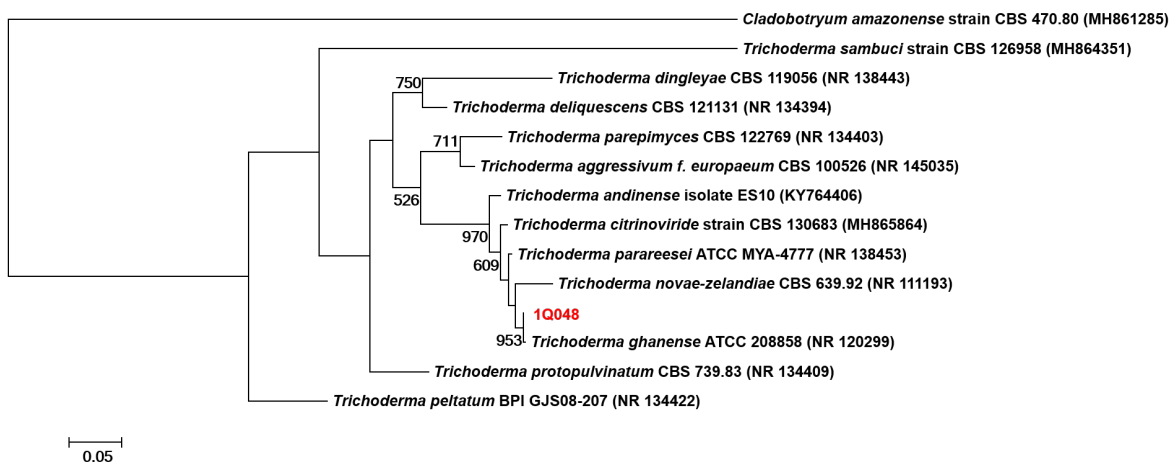


Fig. 5. Árbol filogenético del hongo IQ048

V. CONCLUSIONES

Los hongos IQ038, IQ041 e IQ048 se identificaron por MLSA como *Neopestalotiopsis saprophytica*, *Neopestalotiopsis clavispora* *Trichoderma ghanese* respectivamente.

VI. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Expreso mi agradecimiento al Instituto Potosino de investigación científica y tecnológica y al CONACyT por las facilidades y el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano.

REFERENCIAS

- [1] Xiaoying Rong, Ying Huang, Chapter 11 - Multi-locus Sequence Analysis: Taking Prokaryotic Systematics to the Next Level, Editor(s): Michael Goodfellow, Iain Sutcliffe, Jongsik Chun, *Methods in Microbiology*, Academic Press, Volume 41, 2014, Pages 221-251
- [2] T. Abayneh, D.J. Colquhoun, H. Sørum, Multi-locus Sequence Analysis (MLSA) of *Edwardsiella tarda* isolates from fish, *Veterinary Microbiology*, Volume 158, Issues 3–4, 2012, Pages 367-375,
- [3] Xiaoying Rong, James R. Doroghazi, Kun Cheng, Limin Zhang, Daniel H. Buckley, Ying Huang, Classification of *Streptomyces* phylogroup *pratensis* (Doroghazi and Buckley, 2010) based on genetic and phenotypic evidence, and proposal of *Streptomyces pratensis* sp. nov., *Systematic and Applied Microbiology*, Volume 36, Issue 6, 2013, Pages 401-407.

Análisis de secuencias multilocus para la identificación molecular de hongos endófitos de plantas (B)

Hilda Cristal Guerrero Silva
Universidad Autónoma de Coahuila
Facultad de Ciencias Químicas
Ing J. Cardenas Valdez S/N, República, 25280
Saltillo, Coah.
hildaguerrerosilva@uadec.edu.mx

Asesor: Jesús Israel Morales Jiménez
Instituto Potosino de Investigación Científica
y Tecnológica
Camino a la Presa San José 2055
Lomas 4a Secc.
San Luis Potosí, 78216, México
jesus.morales@ipicyt.edu.mx

Resumen —Este proyecto busca el análisis y la obtención de DNA en diferentes especies de material vegetal, para esto, se realizó la extracción de las especies aisladas de diferentes plantas, algunas no presentaron crecimiento, la gobernadora y el cenizo tuvieron un gran crecimiento. Ya que el proceso para las plantas es extenso no se pudo concluir, por esto se trabajó con datos de diferentes tipos de suelo para posteriormente secuenciar los diferentes hongos que coexistían en el mismo, usando la misma metodología que se usa con las plantas. En este caso, se encontraron en su mayoría *Trichodermas*. Finalmente se analizaron estos datos en diferentes programas y llegamos a la conclusión de que en distintas especies hay una gran variedad de DNA.

Palabras clave —DNA, *Trichodermas*, Hongos.

Abstract — This project seeks the analysis and obtaining of DNA in different species of plant material, for this, the extraction of isolated species from different plants was carried out, some did not show growth, the governor and the ash had a great growth. Since the process for the plants is extensive, it could not be concluded, so we worked with data from different types of soil to subsequently sequence the different fungi that coexisted in it, using the same methodology used with the plants. In this case, mostly *Trichodermas* were found. Finally, this data was analyzed in different programs and we conclude that in different species there is a great variety of DNA.

Keywords —DNA, *Trichoderma*, fungi.

I. INTRODUCCIÓN

En primera instancia se busca identificar molecularmente distintos tipos de hongos, se tiene ya conocimiento de algunos estudios anteriores que hay un sinnúmero de estos ya registrados, por lo que fue sencillo encontrar diferentes tipos en las plantas a analizar. Se desea obtener resultados favorables de una forma precisa y clara, para poder hacer un análisis de esta variedad de hongos y así proceder a analizar los mismos en diferentes sistemas operativos. Las pruebas basadas en la amplificación de estas especies (o pruebas moleculares) detectan secuencias genómicas específicas de *Trichodermas* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). En general se amplifican los genes que codifican RNAs ribosomales (18S y 28S) altamente conservados, o secuencias específicas para cada especie localizadas en la región ITS (internally transcribed spacer, large subunit ribosomal, simultáneamente). Para así poder identificar la

especie de hongo analizada mediante su respectiva secuencia, así también buscando la extracción de su DNA.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. *Análisis de las muestras del IPICYT*

- 1) Aislamiento del material vegetal; Pinzas, mechero, vaso de precipitado (100ml), cajas PDA, caja vacía, puntas bacteriológicas, micropipeta, Isopropanol, Etanol al 70%, agua estéril, material vegetal.
- 2) Se lava el material vegetal, todo se esteriliza antes y después de usarse, con las pinzas se toma la planta y se coloca en un vaso de precipitado seguido de esto se vierte etanol en el vaso hasta que cubra la muestra, se agita por un minuto y se quita el exceso de etanol. Posteriormente se agrega el agua estéril y se hace un lavado, esto se repite tres veces, se toman 100 ml del agua estéril contenida en el vaso con la muestra y se pasan a una caja PDA, tratando de que cubra toda la superficie de esta, esto con ayuda de un asa. Finalmente se toma una hoja de la muestra y se corta en pequeños trozos con el bisturí previamente esterilizado, se colocan alrededor de 10 trozos en una caja nueva PDA y se cierra, solo queda esperar crecimiento de hongos.
- 3) Conservar; Tubos (1.5), gradilla, pinzas, bisturí, etiquetas, mechero, micropipeta (P1000), puntas bacteriológicas, agua estéril, muestras, etanol.
- 4) Con el bisturí se cortan cuatro líneas de forma horizontal y de igual forma verticales, esto para formar cuadros en la colonia de nuestra caja PDA, con las pinzas estériles se toman alrededor de 8 trozos y se colocan en los tubos que contienen 600ml de agua estéril, se rotulan y se guardan, esto se repite con cada una de nuestras muestras que mostraron crecimiento.
- 5) Extracción de DNA Tubos estériles de 1.5 ml, puntas bacteriológicas, micropipetas, perlas de vidrio (200ml), Biomasa (200mg), Fenol-cloroformo-alcohol-isoamílico (200ml), isopropanol(500ml), Etanol 70%.
- 6) PCR; Agua estéril, amortiguador, MgCl₂, Act F, Act R, DNTP'S, TAQ, DNA, tubos estériles 0.2, 0.5, 1.5 (ml), puntas bacteriológicas, micropipeta (P1000, P200, P20, P10).
- 7) El procedimiento es el usual para PCR, se agregan las diluciones a los tubos correspondientes, seguido de esto la mezcla de reacción en un tubo de 1.5 ml, se reparte la mezcla en tubos de 0.2 ml y se agrega el ADN (2ml) para tener un total de 25 ml, se rotulan, agitan un minuto a 1300 revoluciones a una temperatura de 4°C, se pasan al termociclador 2 horas 40 minutos y en seguida sigue la electroforesis.
- 8) Electroforesis; Preparar Gel: Agua 55ml, Agarosa 1.7% (0.93g), mezclar, calentar hasta que empiece a hervir, agitar hasta que se vea cristalino el líquido, vaciar y dejar secar en la cámara de electroforesis, se prepara el TAE 1X 950ml agua destilada, 20 ml de TAE 50X, mezclar, vaciar en la cámara de electroforesis.
- 9) Limpiar los pocillos con puntas bacteriológicas, después se coloca el marcador en el primer pocillo, se vacían las muestras anotando el orden de c/u con el buffer de carga

ya mezclado, esperar un lapso de 30 minutos a que corran las muestras. Al paso de este tiempo, cortar el gel con cuidado y usando guantes para llevar a revelar. Finalmente se vacía el gel en el recipiente con bromuro, esperar aproximadamente 20 minutos, llevar a revelar, guardar la imagen y anotar que muestras amplificaron para después mandar a secuenciar y meterlas al software.

B. Secuencia del suelo tomada de la base de datos anteriormente extraída

- 1) BIOEDIT: Abrir el archivo de la muestra a analizar, copiar el código de secuencia en una nota.
- 2) Entrar la página NCBI > BLAST >NUCLEOTIDE BLAST > Pegar el código > click "BLAST".
- 3) Después de esto la página va arrojar una base de dato, se tomaran todas las secuencias de ambos genes ITS y LSRU que aparezcan de cada especie, y se irán pegando simultáneamente en dos notas diferentes para poder correrlas en el programa CLUSTAL. Cuando se abre el archivo en el programa primero se realiza un alineamiento de cada gen, después se guarda c/u en formato FASTA, seguido se guardan en uno solo seleccionando todos los GAPS.
- 4) Abrir SEAVIEW y el archivo que contiene ambos genes, recortando inicio, centro y el final para poder tener una secuencia viable, abrir nuevamente el archivo nuevo y recortado en CLUSTAL, seleccionar las secuencias y remover todos los GAPS, alinear y guardar, esto se repite cinco veces.
- 5) Abrir en MEGA 4.1 el archivo final de CLUSTAL y guardarlo con la extensión (.meg) y cerrar.
- 6) MEGA 4.1>File> seleccionar el archivo>Nucleotide sequence>cuando aparezca el siguiente argumento "proteine-coding nucleoting sequence data" seleccionar "NO">cerrar.
- 7) En el mismo programa click en PHYLOGENY>Construct phylogeny>Neighbor-joining (NJ)>En la ventana que se abre click en Phylogeny test and options>BOOTSTRAP a 500>Compute.
- 8) Eliminar las secuencias que sean más cortas y preferentemente conservar las "NR", volver a alinear y repetir los pasos 5, 6 y 7, hasta que nuestro árbol quede con especies diferenciadas entre sí, guardar el archivo y abrirlo en CLUSTAL y convertirlo a formato phylip (.phy).
- 9) En la página de internet PhymI-atgc seleccionar el archivo en formato phylip>Branch support>perform Bootstrap, seleccionar "yess" y colocar un valor de 1000>Escribir tu correo electrónico y click en EXECUTE & EMAIL RESULTS>Esperar los resultados.
- 10) En el archivo comprimido abrir el que tiene el formato TREE en MEGA 4.1>Seleccionar phylogeny>Display Newick Tress form files> En la parte izquierda seleccionar "PLACE ROOT ON BRANCH" y en la línea de la especie más diferente del árbol click para que se enrice>Posteriormente en la barra seleccionar IMAGE>Copy to clipboard>Copiar en power point>Buscar cada especie en el BLAST NUCLEOTIDE de NCBI, copiar la

especie y la sepa>Poner todo en negritas, la especie va en cursiva y el número entre paréntesis>Guardar para finalizar la secuenciación.

III. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

A. Muestra analizada tomada del suelo: *Clostridiales bacterium canine oral taxon 028 (IQ049)*.

Se tomaron diferentes muestras de la base de datos de registro anteriormente analizado, en este caso la IQ049, está arrojando resultados de la especie *Trichoderma*, al secuenciar estos datos, y hacer lo debido, nos arrojó distintos hongos, los cuales tuvieron gran variedad de DNA, lo que nos dijo que se encontraron una gran infinidad de especies *Trichoderma* en el suelo de muestra. De la muestra analizada, pudimos obtener catorce distintas especies de hongos *Trichoderma*, las cuales fueron las que mostraron mayor distinción de DNA en su composición, estos hongos fueron los que quedaron según el criterio que se ordenó, el cual constaba en dejar las especies que tuvieran diferencia entre sí, para poder tener un análisis más específico y preciso.

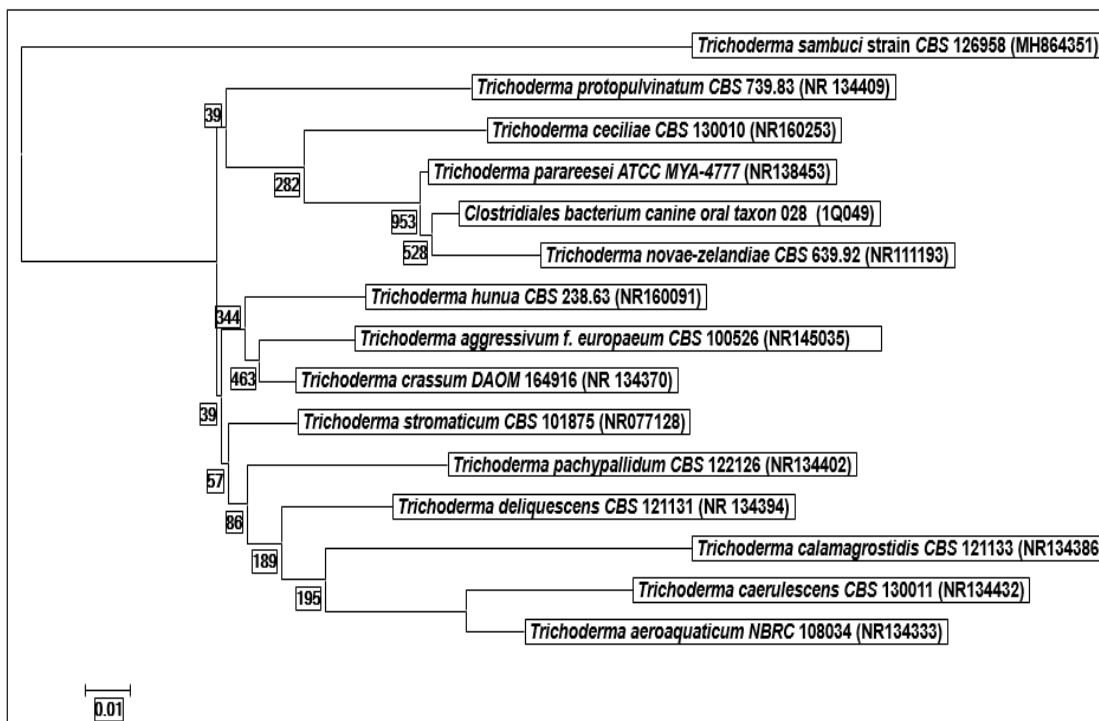


Figura 1. Árbol filogenético de las distintas especies *Trichoderma* encontradas en diferentes tipos de suelo.

IV. CONCLUSIONES

Se puede obtener un sinnúmero de tipos de hongos u especies de cada muestra tomada en los suelos u plantas, esto es de gran importancia ya que al obtener estos se puede avanzar en el área microbiológica encontrando así especies de hongos de los que aun no se tiene registro en la base de datos.

En un futuro se buscará extraer DNA de las muestras que se aislaron en este verano de la ciencia, las cuales son el cenizo y la gobernadora, ya que en la segunda no había crecimiento por lo tanto no se ha podido extraer favorablemente.

V. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Quiero agradecer primeramente al personal de trabajo del laboratorio de microbiología en procesos naturales con el que estuve en mi estancia, por ser pacientes y comprensivos con todos los nuevos integrantes de trabajo, al Dr. Jesús Israel por estar siempre que teníamos alguna duda sin importar el horario en el que se le cuestionara, en general al IPICYT por abrirnos las puertas de sus instalaciones, a coordinación por estar al pendiente de nuestras quejas o sugerencias para realizar nuestras actividades más fácilmente, quiero recalcar mi agradecimiento a uno de mis compañeros Fernando, que incluso ya no estando en la ciudad de San Luis estuvo al pendiente desde el primer día que llegué y sin duda a todo el equipo de trabajo que está a cargo del verano de la ciencia por la organización y la oportunidad de darme esta experiencia que con ella me llevo mucho conocimiento, amigos y aprendí a ser más responsable y tolerante con las situaciones que se pudieran presentar en el área de trabajo.

REFERENCIAS

- [1]. Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", *J Comput Biol* 2000; 7(1-2):203-14. National Center for Biotechnology Information Sitio web: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Get&RID=MWS0GDW9014>
- [2]. Aleksandr Morgulis, George Coulouris, Yan Raytselis, Thomas L. Madden, Richa Agarwala, Alejandro A. Schäffer (2008), "Database Indexing for Production MegaBLAST Searches", *Bioinformatics* 24:1757-1764. National Center for Biotechnology Information Sitio web: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Get&RID=MWTRKRMW014>

Análisis de secuencias multilocus para la identificación molecular de hongos endófitos en plantas (C)

Ma. Eugenia López Ruiz

Universidad Autónoma de Querétaro
Centro Universitario, Cerro de las Campanas s/n
C.P. 76010, Cto Universitario, Centro
Universitario, 76010 Santiago de Querétaro, Qro.
maruk9708@hotmail.com

Asesor: Jesús Israel Morales Jiménez

Instituto Potosino de Investigación Científica
y Tecnológica A. C.
Camino a la Presa de San José 2055,
Lomas 4ta Secc, 78216 San Luis, S.L.P.
jesus.morales@ipicyt.edu.mx

Resumen — Los hongos endófitos son microorganismos que pasan la mayor parte de vida colonizando los tejidos de la planta hospedera con una relación de costo-beneficio no obstructiva, asintomática y transitoria. En la actualidad el interés por estos microorganismos ha aumentado debido a que son productores de metabolitos con diversa actividad biológica, como los son antibacterianas, antioxidantes, antiinflamatorias, antivirales, anti-cancerígenas o de insecticida. Se buscó identificar los tipos de hongos endófitos que se extrajeron de las plantas, por medio de programas bioinformáticos que ayudaron a saber la filogenia de éstos, con el uso de secuencias multilocus, como los son: internal transcribed spacer (ITS) y large subunit ribosomal (LSUR). Se identificaron los hongos *Pestalotiopsis clavispora*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus neoaffricanus*, *Westerdykella dispersa*.

Palabras clave — Hongos endófitos, secuencias multilocus, bioinformática, filogenia.

Abstract — Endophyte fungi are microorganism who pass the most part of your life colonizing the tissues of the host plants with a relation cost-benefit not obstructive, asymptomatic and transitory. At present, the interest of this microorganisms was increased because those are metabolic producers with diverse biologic activity as they are antibacterial, antioxidant, antiinflammatory, antiviral, anticancer or insecticide. It was search to indentify the types of endophyte fungi that were extracted of the plant through bioinformatics programs that helped to know their phylogeny, with the use of multilocus sequences, such as: Internal transcribed spacer (ITS) and Large subunit ribosomal (LSUR). Fungi were identified: *Pestalotiopsis clavispora*, *Trichoderma reesei*, *asperillus neoaffricanus*, *Westerdykella dispersa*.

Keywords — Endophyte fungi, multilocus sequences, bioinformatics, phylogeny.

I. INTRODUCCIÓN

Los hongos endófitos se definen como microorganismos que pasan la mayor parte de vida colonizando los tejidos de la planta hospedera, sin causar daño evidente. El 'endofitismo' se refiere a una asociación de costo-beneficio no obstructiva, asintomática y transitoria, definida por localización, y que se establece dentro de los tejidos vivos de la planta hospedera [1]. La relación entre los hongos endófitos y su planta hospedera puede ir desde el mutualismo hasta la patogénesis. para que ambos organismos coexistan se establece entre ellos una relación de antagonismo balanceado, que depende de la virulencia del hongo y de las defensas de la planta, las cuales varían y son influenciadas por los factores ambientales y por la etapa de desarrollo de ambos organismos. Cuando los factores de virulencia del hongo y las defensas de la planta están en equilibrio se establece una relación endofítica y, por el contrario, cuando se presenta la senescencia

del hospedero o se encuentra bajo estrés, el balance se torna a favor del hongo y éste se expresa como patógeno, presentándose los síntomas de enfermedad [2-5].

En la actualidad el interés por estos microorganismos ha aumentado enormemente debido a que son productores de metabolitos secundarios novedosos y con diversa actividad biológica [6-7]. Diversos compuestos aislados de hongos endófitos presentan actividades antibacterianas, antioxidantes, antiinflamatorias, antivirales, anti-cancerígenas o de insecticida [8]. Pero primero se debe ubicar el tipo de hongo que es para saber que tipo de metabolismo producen, para eso se usan programas que ayudan a saber la filogenia de éstos por medio de árboles filogenéticos, que son diagramas que representa las relaciones evolutivas entre organismos por medio de ramificaciones. En cada punto de ramificación se encuentra el ancestro común más reciente de todos los grupos que descienden de esa, el principio básico de esa comparación es que hay una forma ancestral de la secuencia de ADN o proteína y ha tenido cambios en ella a lo largo del tiempo evolutivo. [9].

En la actualidad, uno de los métodos más prometedores es la tipificación multilocus de secuencias [de sus siglas en inglés, Multi-locus Sequence Typing (MLST)]. Basada en la secuenciación de fragmentos de siete genes conservados “housekeeping” que no se encuentran sometidos a presión selectiva, donde las variaciones en los diferentes locus se detectan de forma directa mediante el análisis de las secuencias obtenidas, lo que permite la identificación de grupos de microorganismos con genotipos idénticos (clones) o altamente relacionados (líneas clonales) [10]. Un ejemplo es el espaciador transcrito interno del gen rRNA (ITS), gracias al motivo conservado dentro de ITS puede tener una función clave en el procesamiento de transcripciones de genes de rRNA. Además, la identificación de tal motivo conservado ayuda a facilitar la alineación de secuencias para el análisis filogenético [11], también se usan secuencias de ADN ribosómico de subunidades nucleares grandes [12].

Por lo que en este trabajo se buscó identificar conocer los tipos de hongos endófitos que se extrajeron de las planta, por medio de programas bioinformáticos que ayudaron a saber la filogenia de éstos.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento. Una vez recolectadas las plantas se llevaron al laboratorio, se tomaron hojas y lavaron con detergente en polvo. Se esterilizó todo el material a usar con isopropanol y fuego. Se tomó el material vegetal con pinzas se depositó en un vaso de precipitado y se agregó etanol al 70%, se dejó por 1 minuto sin dejar de mezclar. Se quitó el etanol, se agregó agua estéril, se dejó por 1 minuto y se vacía. Repetir dos veces más la parte del etanol y agua estéril. Se tomaron 100 µl de agua con material vegetal, se depositó en caja con Papa Dextrosa (PDA), se extendió el inóculo con asa hasta que se haya absorbido el líquido. A parte se tomó el material vegetal con pinzas, con el bisturí se cortó en pedazos muy pequeños y se colocaron en caja PDA con una punta bacteriológica para observar si posteriormente crece algo para la conservación y extracción de DNA.

Conservación. Se usó isopropanol para esterilizar las pinzas y el bisturí. De la caja petri con crecimiento se cortaron cuadros pequeños y se colocaron en un tubo con tapa que contenían 600 µl de agua estéril. Se mantuvieron en refrigeración (4°C) hasta su uso.

Extracción DNA. A un tubo de 1.5 µl se agregaron 200 µg de perlas, 200 µl de solución de lisis, 200 µg de biomasa del hongo que creció en la caja PDA, 200 µl de fenol-cloroformo alcohol isoamílico (25:24:1). Se hicieron 5 ciclos de 1 minuto en el vórtex, se congeló durante 30 minutos y se calentó en termoblock a 65°C por 20 minutos. Se repitió 5 veces estos últimos pasos y se centrifugó por 10 minutos (10°C a 13000 rpm). Se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 µl, se agregaron 200 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) se vortexó y centrifugó. De nuevo se pasó sobrenadante a tubo nuevo y se agregaron 500 µl de isopropanol, se vortexó y guardó a -20°C por 2 horas. Se centrifugó, quitó el sobrenadante con micropipeta P200 y se observó el pellet, se agregó 1 ml de etanol al 70%, se centrifugó, quitó el sobrenadante, se centrifugó por 2 minutos (4°C a 13000 rpm), se quitaron los excesos con micropipeta P10 y se dejó secar por 30 minutos. Para finalizar se agregaron 50 µl de aguas estéril, se dejó llevar en el termoblock a 65°C por 30 minutos y se almacenó a 4°C para posteriormente hacer electroforesis y confirmar la presencia del DNA.

Electroforesis. Agarosa al 1.7 % y TAE 1X, se usó el peine de P14, 1.5 µl de marcador de peso molecular de 100 pb, 1 µl de amortiguador de carga (azul de bromofenol, xilencianol y glicerol) para 3 µl de DNA muestra. Se corrió a 100 V por 40 minutos. Posteriormente se llevó a teñir con bromuro de etidio por 20 minutos. Se llevó al transiluminador y se verificaron los resultados.

Reacción en cadena de la polimerasa. Se hicieron diluciones de las muestras de DNA en tubos de 0.5 µl. Se hizo mezcla de reacción (agua estéril, cloruro de magnesio, buffer, primers dependiendo el gen, dNTP's, Taq polimerasa) en tubo de 1.5 µl y se centrifuga. Se reparte la mezcla de reacción a tubos 0.2 µl y se agregaron 2 µl de DNA (o 1 µl dependiendo las modificaciones). Se dejaron en el termociclador, con las condiciones adecuadas, por 2 horas. Las muestras que si amplificaron se mandaron a secuenciar.

Análisis de secuencias. Las muestras secuenciadas se abrieron en BIOEDIT para obtener el formato y después se hicieron alineaciones, por individual, en BLAST del NCBI para saber qué género eran los hongos endófitos con los que se estuvieron trabajando en el laboratorio. Una vez que se supo el género se descargaron las secuencias de los genes ITS y LSU de cada especie que perteneciente a éste, en formato .txt. Se hicieron dos archivos; uno del gen ITS y otro del gen LSU, se alinearon por separado, con CLUSTAL X 2.1. Posteriormente se pegaron en un solo archivo que incluía ambos genes de todas las especies manteniendo los gaps, se hizo otro alineamiento y se guardó en formato .fasta. Se instaló SEAVIEW para recortar las partes laterales y de en medio. Se hicieron 5 alineaciones completas con CLUSTAL X 2.1 removiendo todos los gaps, se guardó el último archivo y se pasó a formato .meg. Se abrió en MEGA 4.1, para construir árbol filogenético tipo Neighbor-Joining. Se hicieron depuraciones de las especies hasta obtener un árbol filogenético con especies diferenciadas y guardar. Se mandaron a la página PhyML-ATGC (www.atcg-montpellier.fr), los resultados se abrieron en MEGA 4.1

para enraizar la especie más diferente. Para finalizar se copia y edita en Power Point para nombrar y dar formato completo a las especies.

III. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Al término de todos los análisis y del análisis de secuencias con todas las bases de datos, se obtuvieron las filogenias de cada muestra, donde se pudo saber a qué género y especie de hongo endófitos pertenecen.

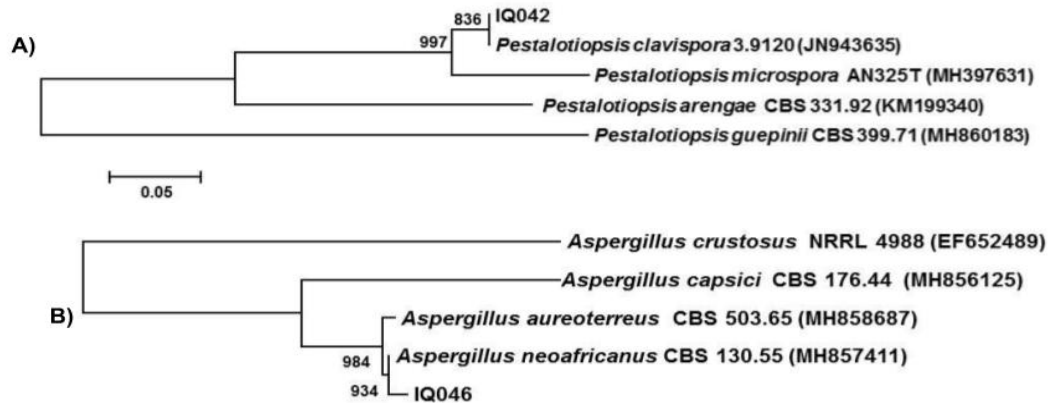


Fig. 1. Árboles filogenéticos. Muestra IQ042 e IQ046 [13-14].

En la Fig. 1 se muestra la muestra IQ042 e IQ046, donde se compararon con otras 50-60 especies, individualmente, extraídas de NCBI Taxonomy, sin embargo se fueron depurando para que quedaran las especies más similares para una mejor comparación. Se usó el método simple que es probar todas las combinaciones y seleccionar la mejor. Se describe la heurística para evitar extensos cálculos. El tiempo de ejecución se divide por ~2 con resultados que permanecen casi iguales, y el método funciona bien. El software, "Smart Model Selection" (SMS), se implementa en el entorno PhyML.

En la Fig. 1. A. Las especies *P. microspora*, *P. clavispora* e IQ042 comparten un ancestro en común, por lo que comparten características similares, sin embargo éstas últimas dos comparten un ancestro aún más en común, por lo que se dedujo que la muestra era la especie *P. clavispora*. y se usó como grupo externo *P. guepinii*.

En la Fig. 1. B. Las especies *A. capsici*, *A. aureoterrus*, *A. neoafricanus* e IQ046 muestran un ancestro común, sin embargo solo los últimos dos presentan un ancestro mutuo, estos datos arrojados muestran que hay una fuerte relación entre ellos, por lo que lo más cercano que se puede decir es que la muestra se identifica con *A. neoafricanus*. La especie *A. crustosus* se usa como grupo externo.

En la Fig. 2 se observan las muestra IQ045 e IQ050, donde se compararon con otras 50-60 especies, extraídas individualmente del NCBI Taxonomy, sin embargo se fue depurando para que quedaran las especies similares para una comparación selectiva. Se usó el mismo método que en los anteriores.

La Fig. 2 . A. muestra que *T. reesei* e IQ045 comparten un ancestro común, según las divergencias del árbol filogenético, por lo que se deduce que tienen características similares y puede ser la identidad de la muestra.

Mientras que la Fig. 2 . B. muestra las especies que tienen un ancestro en común, sin embargo la muestra IQ050 y *W. dispersa* muestran una similitud según las ramificaciones, esto significa que comparten rasgos característicos, por lo que se dedujo que esa es su identidad.

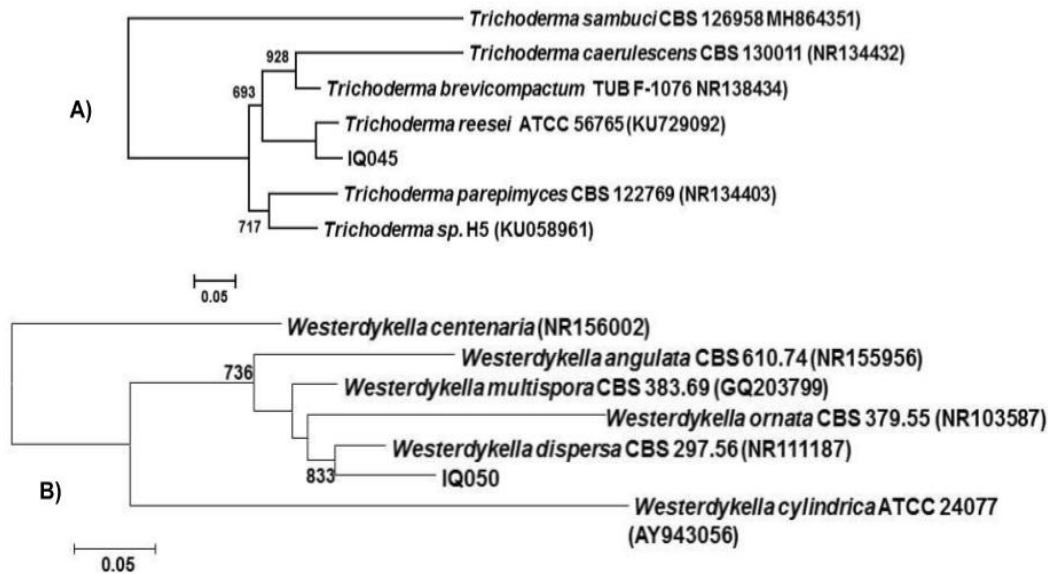


Fig. 2. Árbol filogenético de la muestra IQ045 [13-14].

IV. CONCLUSIONES

Se lograron identificar con éxito los hongos endófitos de las muestras, gracias a toda la bioinformática. Esta herramienta facilita el uso de secuencias multilocus al coincidir las partes conservadas de los microorganismos. Ahora solo queda investigar qué tipo de metabolitos producen estos hongos y si tienen alguna relación costo-beneficio con la planta, para que se pueden extraer y trabajar con ellos.

V. AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica por aceptarme y darme la oportunidad de hacer mi verano en sus instalaciones, al Dr. Jesús Israel Morales Jiménez y a todas las personas que trabajaban en su laboratorio de servicio social y prácticas, que tuvieron paciencia y me brindaron todo sus conocimientos. Así como a todos los colaboradores que hicieron posible que se llevara a cabo el 21° Verano de la Ciencia de la Región Centro.

REFERENCIAS

- [1] (2000). Body, L. *Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes*. FEMS Microb. Ecol. 31(3), pp 185-194. [Consultado el 02 de Agosto de 2019].
- [2] Rodríguez, R., White, J., Arnold, A.E. & Redman, R. (2009). *Fungal endophytes: Diversity and ecological roles*. New. Phytol. 182, pp 314-330. [Consultado el 02 de Agosto de 2019].
- [3] Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. & Harper, J. (2004). *Natural products from endophytic microorganisms*. J. Nat. Prod. 67, pp 257-268. [Consultado el 02 de Agosto de 2019].
- [4] Tan, R.X. & Zou, W.X. (2001). *Endophytes: A rich source of functional metabolites*. Nat. Prod. Rep. 18, pp 448-459. [Consultado el 02 de Agosto de 2019].
- [5] Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. & Harper, J. (2004). *Natural products from endophytic microorganisms*. J. Nat. Prod. 67, pp 257-268. [Consultado el 02 de Agosto de 2019].
- [6] Pinheiro, E.A. et al.(2012). *Antibacterial activity of alkaloids produced by endophytic fungus Aspergillus sp. EJC08 isolated from medical plant Bauhinia guianensis*. Nat. Prod. Res. DOI: 10.1080/14786419.2012.750316. [Consultado el 02 de Agosto de 2019].
- [7] Sánchez-Fernández, R. E., Sánchez-Ortiz, B. L., Sandoval-Espinosa, Y. K., Ulloa-Benítez, A., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M. C., & Macías-Rubalcava, M. L. (2013). *Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina*. TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas, 16(2), pp 132-146, http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2013000200006&lng=es&tlng=es [Consultado el 05 de Agosto de 2019].
- [8] Segaran, G., Sathiavelu, M., (2019). *Fungal endophytes: A potent biocontrol agent and a bioactive metabolites reservoir*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101284>. [Consultado el 05 de Agosto de 2019].
- [9] Baum, David. (2008). *Reading a Phylogenetic Tree: The Meaning of Monophyletic Groups*. Nature Education 1, no. 1: pp 190. <http://www.nature.com/scitable/topicpage/reading-a-phylogenetic-tree-the-meaning-of-41956>. [Consultado el 05 de Agosto de 2019].
- [10] Díaz-Sánchez, A., Martínez-Marrero, S., & Corona-González, B. (2018). *Tipificación multilocus de secuencias aplicada a la caracterización molecular de hemoparásitos en el ganado bovino*. Revista de Salud Animal, 40(1)., http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2018000100007&lng=es&tlng=es. [Consulta: 05 agosto de 2019].
- [11] Liu, JS. & Schardl, C.L. (1994). Plant Mol Biol 26: Kluwer Academic Publishers. pp 775-778. <https://doi.org/10.1007/BF00013763> [Consulta: 05 de agosto de 2019].
- [12] Jean-Marc M., François M. L., Stephen A. R., Jacqui Johnson, R.(2000). *Relaciones filogenéticas de hongos agáricos basados en secuencias de ADN ribosómico de subunidades nucleares grandes*. Biología sistemática , Volumen 49, Número 2, pp 278– 305, <https://doi.org/10.1093/sysbio/49.2.278> [Consulta: 05 de agosto de 2019].
- [13] Lefort, V., Longueville, J. E., Gascuel, O., (2017) SMS: Smart Model Selection in PhyML, *Molecular Biology and Evolution*, Volume 34, Issue 9, September 2017, pp 2422–2424, <https://doi.org/10.1093/molbev/msx149> [Consulta: 01 de agosto de 2019].
- [14] Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. (2010). *New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0*. Systematic Biology, 59(3): pp 307-21, [Consulta: 01 de agosto de 2019].

Análisis del modelo ω CDM como sistema dinámico

Leopoldo Herrera Zamorano

Universidad Autónoma de Querétaro
Centro Universitario Cerro de las Campanas,
76010, Santiago de Querétaro, México
polofi31@gmail.com

Asesor: Alberto Hernández Almada

Universidad Autónoma de Querétaro
Centro Universitario Cerro de las Campanas,
76010, Santiago de Querétaro, México
ahalmada@uaq.mx

Resumen — Con base en la teoría de sistemas dinámicos, estudiamos el modelo cosmológico ω Cold Dark Matter considerando cuatro componentes principales, la densidad de materia, radiación, energía oscura y curvatura del universo. Como resultados generales se encontraron cuatro puntos de equilibrio donde domina la materia, radiación, energía oscura y la curvatura, respectivamente. De estos cuatro puntos se encontró que en el pasado el universo estaba dominado por la radiación, mientras que en el futuro tiende a ser dominado por la energía oscura.

Palabras clave — Cosmología, Física Computacional, Sistemas Dinámicos.

Abstract — Based on the theory of dynamical systems, we study the cosmological model ω Cold Dark Matter considering four main components, the density of matter, radiation, dark energy and curvature of the universe. As general results, four equilibrium points were found where matter, radiation, dark energy and curvature dominate, respectively. From these four points it was found that in the past the universe was dominated by radiation, while in the future it tends to be dominated by dark energy.

Keywords — Cosmology, Computational Physics, Dynamical Systems.

I. INTRODUCCIÓN

Las observaciones cosmológicas a Supernovas del Tipo Ia (SNIa), mediciones directas al parámetro de Hubble (OHD), la radiación de fondo de microondas (CMB) y las oscilaciones acústicas de bariones (BAO) indican que el universo se encuentra expandiendo de manera acelerada, lo que quiere decir que las galaxias se alejan unas de otras con mayor rapidez conforme pasa el tiempo, teniendo su origen en una clase de energía desconocida, conocida como energía oscura; aunado a esto, las mediciones a la rotación de galaxias indican un exceso de materia, la cual solo interactúa de manera gravitacional, provocando que su observación directa no sea posible y sea conocida como materia oscura [1,2].

El modelo cosmológico más sencillo que explica la materia oscura y la energía oscura es conocido como Lambda Cold Dark Matter (Λ CDM). En este modelo, la energía oscura es tomada como una constante, conocida como la constante cosmológica (Λ). A pesar del éxito de Λ CDM a grandes escalas, presenta ciertos problemas a escalas galácticas (menores a 10^6 parsecs) cuestionando el origen de la constante cosmológica. Un ejemplo de dichos problemas es conocido como el de la concordancia, el cual radica en que existe una diferencia entre el valor de la constante cosmológica predicho por la teoría cuántica de campos (QFT) y el valor obtenido por Λ CDM. En QFT el valor de la constante cosmológica es dado por la energía cuántica de vacío, teniendo en este caso $\rho_\Lambda \simeq 10^{71} \text{ GeV}^4$, mientras que con

Λ CDM tenemos $\rho_\Lambda \simeq 10^{-47} GeV^4$, obteniendo una desviación de aproximadamente cien ordenes de magnitud [3].

Motivados por dicho problema, en este trabajo estudiamos la generalización más sencilla del modelo Λ CDM, en el cual la energía oscura no es modelada como una constante, este modelo es conocido como ω CDM. Para dicho estudio planteamos el modelo como un sistema dinámico con la finalidad de analizar el comportamiento de la radiación, materia, energía oscura y curvatura, siendo los compones del modelo.

II. MARCO TEÓRICO

A. Teoría sobre cosmología

La dinámica del universo es descrita por las siguientes ecuaciones

$$H^2 + \frac{k}{a} = \frac{\kappa}{3}\rho \quad (1)$$

$$2\dot{H} + 3H^2 + \frac{\dot{k}}{a} = -\kappa P \quad (2)$$

$$\dot{\rho} + 3H(\rho + P) = 0 \quad (3)$$

donde H es el parámetro de Hubble, ρ es la densidad total de universo, P es la presión total relacionada con la densidad por la ecuación de estado $P = \omega\rho$ y k es la curvatura. La Ec. (3) es conocida como la ecuación de continuidad, la cual es distinta para cada componente del universo (radiación, materia y energía oscura) y depende del parámetro ω . Para la materia $\omega = 0$, para radiación $\omega = 1/3$. Tomando dichos valores la ecuación de continuidad para la materia y radiación están dadas por Ec. (4) y Ec. (5) respectivamente.

$$\dot{\rho}_m + 3H\rho_m = 0 \quad (4)$$

$$\dot{\rho}_r + 4H\rho_r = 0 \quad (5)$$

$$\dot{\rho}_l + 3H\rho_l(1 + \omega) = 0 \quad (6)$$

En este trabajo consideramos una ecuación de estado generalizada (Ec.(6)) para la energía oscura, donde el valor de $\omega = \text{cte}$, siendo la ecuación del modelo ω CDM [4].

B. Teoría de sistema dinámicos

Los sistemas dinámicos son descritos por ecuaciones diferenciales. Para su análisis es necesario encontrar los puntos de equilibrio, los cuales son obtenidos mediante la igualación de las ecuaciones a cero y resolviendo los sistemas. Al obtener los puntos de equilibrio se debe entender su estabilidad.

La estabilidad de un sistema dinámico puede ser dada mediante el análisis de la matriz jacobina evaluada en los puntos de equilibrio, definida como

$$J = \begin{bmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial x_1} & \dots & \frac{\partial f_1}{\partial x_n} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \frac{\partial f_n}{\partial x_1} & \dots & \frac{\partial f_n}{\partial x_n} \end{bmatrix}_{\{eq\}} \quad (7)$$

Tabla 1. Criterios del valor propio dominante para cada componente del sistema.

$\text{Re}(\lambda) < 0$	El sistema es estable.
$\text{Re}(\lambda) > 0$	El sistema es inestable.
$\text{Re}(\lambda) = 0$	El sistema es estable y λ se conserva.

Los valores propios de la matriz J evaluada en los puntos de equilibrio x_{eq} nos dan información del sistema y la parte real del valor propio dominante λ_d de cada punto de equilibrio nos da información sobre la estabilidad del sistema (Tabla 1) [5].

III. METODOLOGIA

A. Construcción del sistema dinámico

Consideraremos la densidad total de universo dada por $\rho = \rho_m + \rho_r + \rho_\Lambda$ y la presión total $P = \omega_m \rho_m + \omega_r \rho_r + \omega_\Lambda \rho_\Lambda$, ambas ecuaciones contienen la densidad de la materia, radiación y energía oscura. Sustituyendo la densidad y presión total en las Ec. (1) y (2) respectivamente,

$$H^2 = \frac{\kappa \rho_m}{3} + \frac{\kappa \rho_r}{3} + \frac{\kappa \rho_\Lambda}{3} - \frac{\kappa k}{a^2} \quad (8)$$

$$-2\dot{H} = \frac{\kappa \rho_r}{3} + \omega_\Lambda \rho_\Lambda + 3H^2 + \frac{k}{a} \quad (9)$$

Dividiendo Ec. (8) por el factor H^2 se tiene,

$$\frac{\kappa \rho_m}{3H^2} + \frac{\kappa \rho_r}{3H^2} + \frac{\kappa \rho_\Lambda}{3H^2} - \frac{\kappa k}{a^2 H^2} = 1 \quad (10)$$

Definiendo como parámetros de densidad,

$$\Omega_m = \frac{\kappa \rho_m}{3H^2} \quad \Omega_r = \frac{\kappa \rho_r}{3H^2} \quad \Omega_\Lambda = \frac{\kappa \rho_\Lambda}{3H^2} \quad \Omega_k = -\frac{\kappa k}{a^2 H^2} \quad (11)$$

donde Ω denota la densidad de materia, radiación, energía oscura y curvatura, respectivamente. Usando los parámetros de densidad Ec. (10) toma la forma

$$\Omega_m + \Omega_r + \Omega_\Lambda + \Omega_k = 1 \quad (12)$$

siendo la restricción y es de utilidad para reducir el orden de los parámetros libres del sistema. Las ecuaciones dinámicas para los componentes Ω_m , Ω_r y Ω_Λ son dadas al diferenciar respecto al tiempo de la siguiente manera,

$$\frac{d\Omega_m}{dt} = \frac{d}{dt} \left(\frac{\kappa \rho_m}{3H^2} \right) = \frac{\kappa}{3H} \left(\frac{\dot{\rho}_m}{H} - 2\rho_m \frac{\dot{H}}{H^2} \right) \quad (13)$$

De la Ec.(4) tenemos el factor $\dot{\rho}_m/H$, de Ec. (9) tenemos $\dot{2H}/H$ y con Ec. (12) sustituimos Ω_k , reduciendo a tres los parámetros del sistema, teniendo

$$\frac{1}{H} \frac{d\Omega_m}{dt} = \Omega_m(\Omega_m + 2\Omega_r + \Omega_\Lambda(3\omega + 1) - 1) \quad (14)$$

Cabe notar que se puede relacionar H con el factor de escala a , de la forma $d \log a = \frac{\dot{a}}{a} dt = H dt$. Finalmente introduciendo este nuevo termino $N = \log(a)$ y diferenciando respecto a esta nueva variable tenemos que

$$\Omega'_m = \Omega_m(\Omega_m + 2\Omega_r + \Omega_\Lambda(3\omega + 1) - 1) \quad (15)$$

Siguiendo el mismo procedimiento para los componentes Ω_r y Ω_Λ , tenemos

$$\begin{aligned} \Omega'_r &= \Omega_r(\Omega_m + 2\Omega_r + \Omega_\Lambda(3\omega + 1) - 2) \\ \Omega'_\Lambda &= \Omega_\Lambda(\Omega_m + 2\Omega_r + \Omega_\Lambda(3\omega + 1) - 3(\omega + 1) + 2) \end{aligned} \quad (16)$$

La Ec. (12) junto con Ec. (15) y (16) componen el sistema dinámico para ω CDM [4].

B. Análisis del sistema

El sistema dinámico consta de tres ecuaciones diferenciales de primer orden y la constricción que depende del parámetro ω . En este trabajo estudiamos el sistema para los valores de $\omega = -0.4$ y $\omega = -4.0$. El análisis consta de dos etapas.

- El primer paso es encontrar los puntos de equilibrio, los cuales se obtienen al igualar el sistema de ecuaciones a cero y resolverlo, para posteriormente analizar la estabilidad del sistema, obteniendo los valores propios de la matriz Jacobiana (Ec. (7)) evaluada en los puntos de equilibrio y siguiendo los criterios explicados en la Tabla 1.
- Por último, se resuelve el sistema de ecuaciones numéricamente, desarrollando un algoritmo en Python del método Runge Kutta de orden 4 (RK4) con las condiciones iniciales $\Omega_\Lambda(0) = 0.70$, $\Omega_m(0) = 0.30$ y $\Omega_r(0) = 10^{-4}$ [6]. Lo que se plantea hacer es resolver el sistema al pasado (números negativos) y al futuro (números positivos) para obtener los espacios fases en ambas etapas.

IV. RESULTADOS

Después de seguir el procedimiento establecido en la sección anterior se encontraron los siguientes resultados. Se encontraron cuatro puntos de equilibrio (Tabla 2), P_k , P_m , P_r y P_l , estos puntos se interpretan como que en ellos domina la curvatura, la materia, la radiación y la energía oscura, respectivamente. El punto P_k es descartado, ya que un universo dominado por la curvatura no tiene sentido. Las Tablas 3 y 4 muestran los valores propios para ambos casos, el comportamiento es similar tanto para $\omega = -0.4$, como para $\omega = -4.0$. En el punto P_m los valores propios son distintos signos, con lo cual se afirma que es un punto silla (atrae y repele trayectorias), P_r es punto inestable, pero dado que todos los valores propios son positivos, se puede considerar un atractor en el pasado, por último P_l es punto estable en el futuro ya que todos los valores propios son negativos, estas conclusiones se pueden observar gráficamente en las Figuras 2 y 3.

Tabla 2. Puntos de equilibrio del sistema.

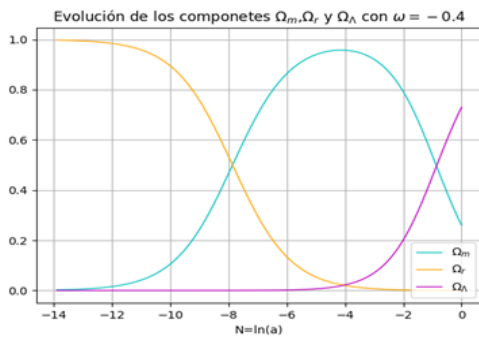
P_k	(0,0,0)	Domina la curvatura.
P_m	(1,0,0)	Domina la materia.
P_r	(0,1,0)	Domina la radiación.
P_l	(0,0,1)	Domina la energía oscura.

Tabla 3. Valores propios del sistema $\omega = -0.4$.

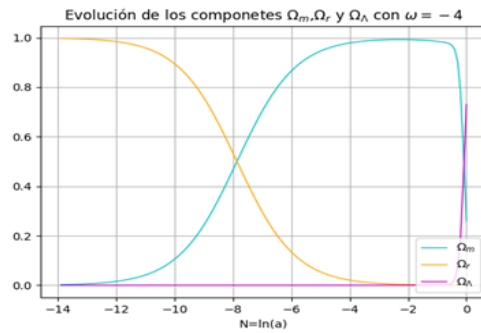
Punto	Coordenada	λ_1	λ_2	λ_3
P_k	(0,0,0)	-1.0	-2.0	0.2
P_m	(1,0,0)	1.0	-1.0	1.2
P_r	(0,1,0)	1.0	2.0	2.2
P_l	(0,0,1)	-1.2	-2.2	-0.2

Tabla 4. Valores propios del sistema $\omega = -4.0$.

Punto	Coordenada	λ_1	λ_2	λ_3
P_k	(0,0,0)	-1.0	-2.0	11.0
P_m	(1,0,0)	1.0	-1.0	-12.0
P_r	(0,1,0)	1.0	2.0	13.0
P_l	(0,0,1)	-12.0	-13.0	-11.0

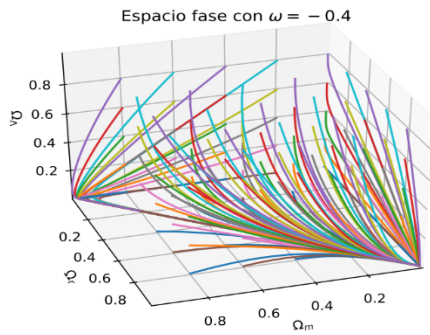


a)

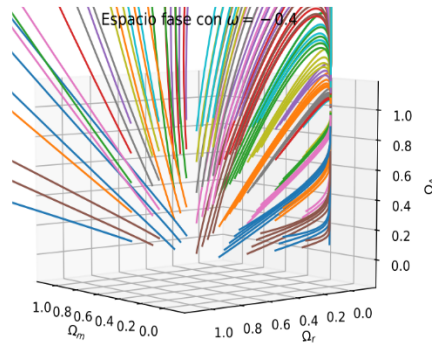


b)

Fig. 1 Solución por RK4 a) $\omega = -0.4$ y b) $\omega = -4.0$.



a)



b)

Fig. 2 Espacios fases del sistema a) pasado y b) futuro con $\omega = -0.4$.

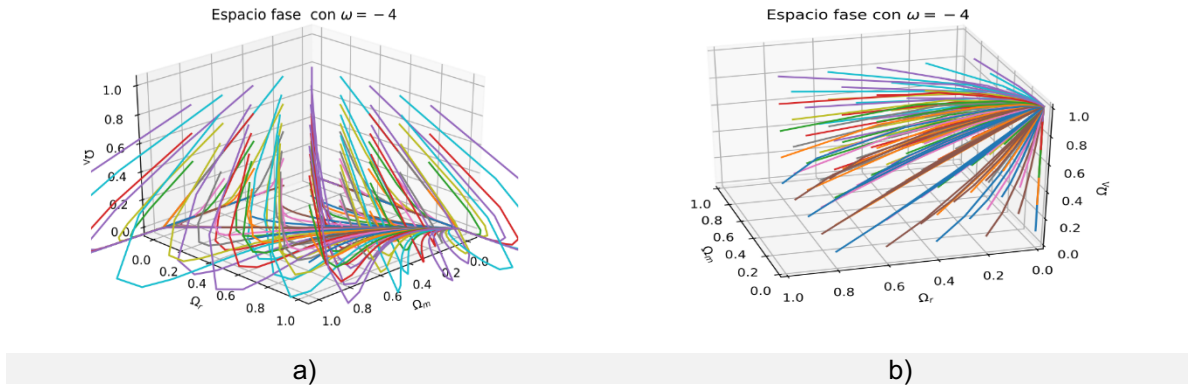


Fig. 3 Espacios fases del sistema a) pasado y b) futuro con $\omega = -4.0$.

La Figura 1 muestra la solución por RK4 del sistema dinámico en el pasado, en $N = 0$ es el presente, por lo que podemos observar que el universo inició siendo dominado por la radiación (línea amarilla), posteriormente la materia intentó dominar pero no lo logró, actualmente nos encontramos en una etapa de transición donde la energía oscura va a dominar. En las Figuras 2 y 3 a), se encuentran los espacios fases para las distintas ω en el pasado, en ellos se puede observar que todas las trayectorias se dirigen a P_r , cumpliendo con lo predicho con los valores propios, además ciertas trayectorias tienden al punto P_m y posteriormente son repelidas a P_r , ya que P_m es un punto silla. En las Figuras 2 y 3 b), se tiene el espacio fase al futuro, donde todas las trayectorias van al punto P_i .

V. CONCLUSIÓN

En este trabajo estudiamos el modelo cosmológico alternativo ω CDM, en donde el parámetro $\omega = cte$, siendo el caso más sencillo para una ecuación de estado dinámica para la energía oscura. Con la finalidad de estudiar los componentes del modelo ω CDM de manera individual y en conjunto, se planteó y estudió el modelo como un sistema dinámico a distintos valores de ω .

Los resultados obtenidos muestran la evolución del contenido del universo modelo por ω CDM. En un principio el universo comenzó siendo dominado por el componente de radiación, en la segunda etapa intentó ser dominado por la materia (donde se formaron las galaxias). Actualmente el universo se encuentra en una transición de fase para ser dominado por la energía oscura y la velocidad de dicha transición es dada por el valor de ω , entre menor sea dicho valor, mayor es la rapidez con la que la energía oscura dominará el universo.

VI. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro por la atención y el apoyo brindado en el 21° Verano de la Ciencia Región Centro y al Dr. Alberto Hernández Almada por su tutela y apoyo en la misma.

REFERENCIAS

- [1] A. R. Liddle, *An introduction to modern cosmology*, Edimburgo: John Wiley & Sons, 2015.
- [2] P. Jain, *An introduction to astronomy and astrophysics*, Boca Ratón: Prensa CRC, 2016.
- [3] S. Weinberg, «The cosmological constant problem,» *Rev. Mod. Phys.*, vol. 61, nº 1, pp. 1–23, 1989.
- [4] C. G. Böhm y N. Chan, «Dynamical systems in cosmology,» *World Scientific*, pp. 121-156, 2017.
- [5] H. Sayama, *Introduction to the modeling and analysis of complex systems*, Open SUNY Textbooks, 2015.
- [6] P. A. Ade, N. Aghanim, M. Arnaud, M. Ashdown, J. Aumont, C. Baccigalupi, A. Banday, R. Barreiro, J. a. B. N. Bartlett y others, «Planck 2015 results-xiii. cosmological parameters,» *Astronomy & Astrophysics*, vol. 594, p. A13, 2016.

Análisis espectroscópico de melanina y su respuesta a la radiación UV (A)

Sidharta Denise Gutiérrez Hernández

Universidad Autónoma de Aguascalientes
Avenida Universidad 940, C.U., 20130
Aguascalientes, Ags.

sidharta.gutierrez@hotmail.com

Asesora: Dra. Mariana Alfaro Gómez

Universidad Autónoma de Aguascalientes
Avenida Universidad 940, C.U., 20130
Aguascalientes, Ags.

malfaro@correo.uaa.mx

Resumen — Este proyecto consistió en observar a través de espectrometría el espectro de absorción de rayos UV de la melanina, sintetizada a través del método de Selvakumar para la extracción de melanina a partir de *Ustilago Maydis*. Se observó que entre más pura estaba la melanina, más aumentaba su absorción y se comprobó lo que se sabía teóricamente de la melanina, que tiene como función el absorber los rayos UV. Así como también, para la familiarización del programa, se hizo una comparación con espectrometría de la absorción de colorante vegetal verde con la clorofila, en el cual se observó una gran similitud entre el espectro de ambas sustancias, llegando a la conclusión de que ambas tenían un mismo espectro debido a la coloración que ambas sustancias presentaban.

Palabras clave — Melanina, Espectroscopia de absorción, Método de Selvakumar

Abstract — This project consisted of observing through spectrometry the UV absorption spectrum of melanin, synthesized through the Selvakumar method for the extraction of melanin from *Ustilago Maydis*. It was observed that the purer the melanin was, the more its absorption increased and the theoretically known of melanin, which has the function of absorbing UV rays, was checked. As well as, for the familiarization of the program, a comparison was made with spectrometry of the absorption of green vegetable dye with chlorophyll, in which a great similarity was observed between the spectrum of both substances, concluding both had the same spectrum because of the coloration that both substances presented.

Keywords — Melanin, Spectroscopy, Selvakumar's Method.

I. INTRODUCCIÓN

Esta investigación consistió en el análisis espectroscópico de la absorción de rayos UV de la melanina. La cual fue sintetizada a partir de *Ustilago maydis* utilizando el método de Selvakumar.

Este proyecto es el precursor de una investigación más profunda en la que se usará espectroscopia de terahertz para analizar la reacción de la melanina ante la radiación UV. El objetivo del proyecto se dirige a determinar a qué grado de exposición la melanina llega malignizarse y generar cáncer de piel.

Varios autores están de acuerdo con que la exposición a la luz solar es uno de los agentes etiológicos en el melanoma maligno de individuos de piel clara [2,3]. Sin embargo, las longitudes de onda responsables de la generación de los tumores se desconocen.

La espectroscopía fue el método de estudio que se utilizó en este trabajo, ya que esta es el estudio de la interacción de la luz con la materia. Hay dos aspectos distintos de esta interacción que se pueden utilizar para aprender acerca de los átomos y las moléculas. Una

es la identificación de las longitudes de onda específicas de la luz y la otra es la medición de la cantidad de luz absorbida o emitida en longitudes de onda específicas [1].

La luz solar es energía radiante electromagnética compuesta principalmente por el espectro de luz ultravioleta (100 a 400 nm), luz visible (400 a 760 nm) e infrarroja (760 a 1.800 nm). Observamos en el espectro de la luz visible que cada color tiene una longitud de onda: Morado 380-440 nm, Azul 440-485 nm, Cian 485-500 nm, Verde 500-565 nm, Amarillo 565-590 nm, Naranja 590-625 nm, Rojo 625-740 nm [2]. En el espectrómetro observamos como dependiendo del color de la sustancia analizada, veremos el espectro de longitudes de onda que estará absorbiendo. Se espera que, si pones dos sustancias del mismo color, observemos un espectro similar.

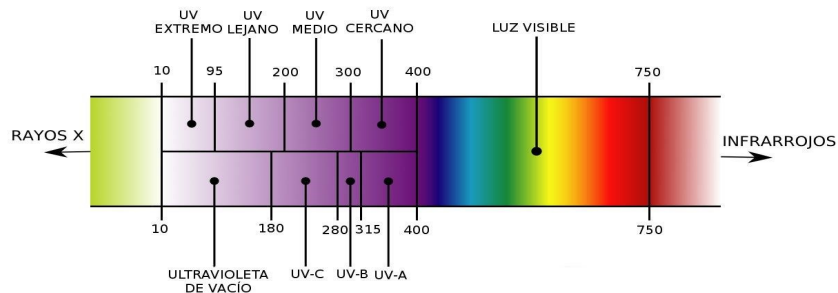


Fig 1. Espectroscopia UV-Visible

II. MARCO TEÓRICO

A través de este proyecto se manejaron conceptos que son importantes conocer para entender más sobre el trabajo, su base y su finalidad. A continuación, se dirá lo más importante de cada uno:

→Melanina:

Como su función principal en el ser humano, proporciona protección contra el efecto dañino de los rayos ultravioleta de la luz solar. Se sabe que tiene la capacidad de absorber un amplio rango de radiaciones electromagnéticas que incluyen desde la luz visible, pasando por la luz UV y llegando hasta los llamados rayos x. [3]

→Radiación Ultravioleta:

El espectro de la luz UV se encuentra entre los 100 y los 400 nm y se divide en tres bandas: UVA (320 a 400 nm), UVB (280 a 320), y la UVC (200 a 280 nm). La UVA no es filtrada por la capa de ozono en el mismo grado que la UVB y la UVC, y cantidades suficientes de la misma penetran a través de las nubes y de los vidrios.

La UVB comprende aproximadamente el 5% de la radiación UV, y la UVA el 95% restante. Sin embargo, la UVB es más responsable en producir daño biológico, ya que contribuye con cerca del 80% de los efectos dañinos que se asocian a la exposición solar. [2]

→Relación Cáncer de piel- Radiación UV

En los tumores de piel no-melanoma, la radiación ultravioleta es la responsable de la producción de mutaciones puntuales en genes relevantes como p53. Encontrándose la acumulación de mutaciones en el gen supresor de tumores p53 inducidas por la radiación UV en el inicio del proceso tumoral de piel.

En individuos de complejión delgada que se han expuesto repetidamente a la radiación ultravioleta de la luz solar, se llega a encontrar el carcinoma basocelular y el espinocelular [2].

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Los métodos utilizados en este proyecto tuvieron como objetivo el sintetizar la melanina para su posterior análisis, se escogió el método Selvakumar debido a que fue el más fácil de utilizar al ser rápido, accesible y el hongo que fue el material base, fue fácil de conseguir. Así como también se describirán los métodos utilizados para la familiarización del espectrómetro.

A continuación, se presentarán los métodos correspondientes:

A. Método Selvakumar

Se inició con el hongo ya existente omitiendo el paso de la incubación. Se recuperó el micelio mediante filtración por malla. Se homogenizó y se trató con solución de NaOH 2M, pH 10.5 por 36 a 48 hrs. Se centrifugó la muestra a 4000 x g por 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se trató con solución HCl 2M, pH 2.5 durante 2 horas. Se centrifugó a 4000 x g por 15 minutos. Se desechó el sobrenadante y se recuperó el precipitado suspendiéndolo en solución HCl 6M, se hirvió a 100 °C por 2 horas. Se enjuagó de manera sucesiva con cloroformo, acetato de etilo y etanol; centrifugando a 10,000 rpm por 15 minutos. Se secó al aire y se redisolvió el precipitado en solución NaOH 2M y se centrifugó a 4,000 x g por 15 minutos.

Para su observación en el espectrómetro se diluyó en ácido bórico en relación 10 a 1 con la solución de la melanina.

B. Espectroscopia

Se utilizó el espectrómetro *Red Tide USB 650*, analizando la información con el software *Ocean View*, de la marca Ocean Optics.

Primero se utilizó la fibra óptica para observar los espectros de diferentes fuentes de iluminación como: luz fluorescente, luz LED, luz incandescente, luces Led de diferentes colores y luz ultravioleta. Posteriormente, se realizó espectroscopia de absorción para la familiarización del equipo, su técnica de uso y su calibración. Trabajando con Clorofila y colorantes vegetales (Azul, amarillo y verde) para observar la similitud de su absorción.

Una vez conocida la técnica de espectrometría por emisión y de absorción. Se realizó la etapa final de nuestro proyecto. El cual consistió en ver como absorbió la luz UV, la melanina que se sintetizó previamente.

IV. RESULTADOS

En la primera parte del proyecto se compararon los espectros de diferentes colorantes (amarillo, azul y verde) los cuales pueden observarse en la Fig. 2.

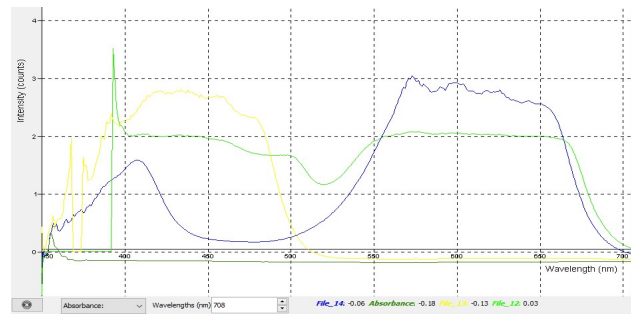


Fig. 2. Comparación de colorante azul y amarillo con el colorante verde

También se comparó el espectro del colorante verde con la clorofila. Y se observa en la Fig 3. como el colorante verde tuvo el mismo comportamiento que la clorofila por la similitud de su coloración

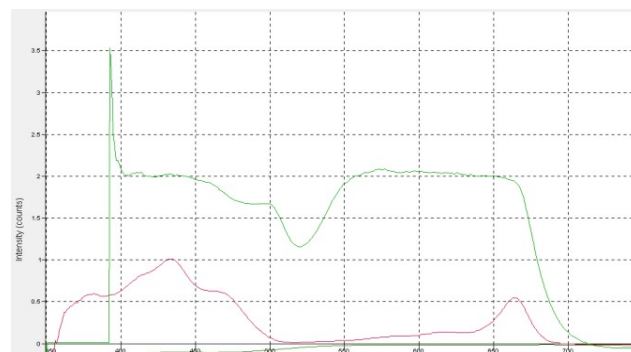


Fig. 3. Comparación del colorante verde (línea color rojo) y clorofila (línea color verde)

Para finalizar con el proyecto, se observó la absorción que tiene la melanina de los rayos UV. Se hicieron lecturas a la sustancia no tan pura con NaOH (Ver Fig. 4), con HCl (Ver Fig. 5) y al final con la Melanina ya pura diluida con ácido bórico. (Ver Fig. 6)

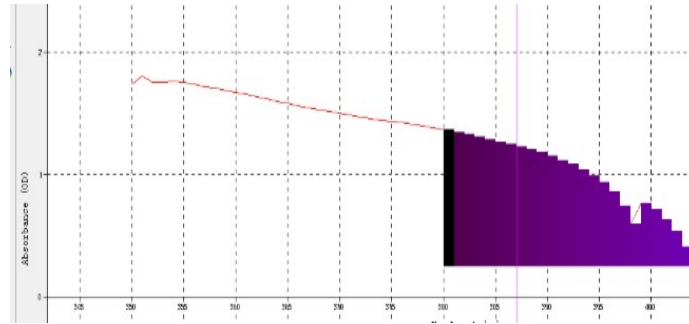


Fig 4. Absorción de la sustancia en el paso del primer lavado con NaOH

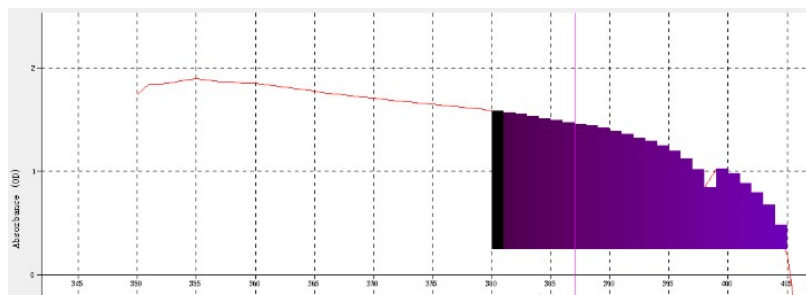


Fig 5. Absorción de la sustancia en el ultimo lavado con HCl

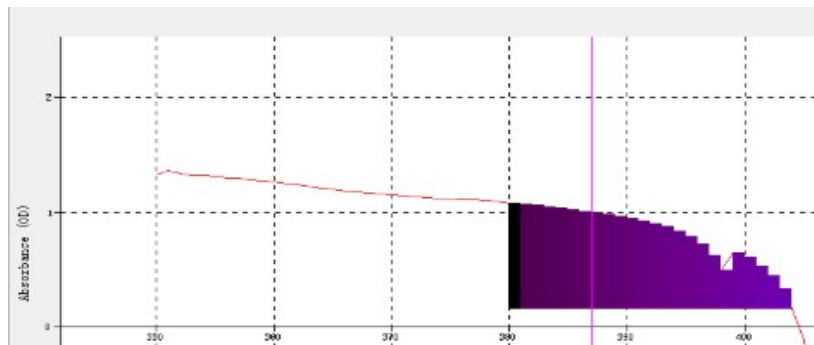


Fig 6. Absorción de la melanina diluida en ácido bórico.

V. DISCUSIÓN

Se observó el mismo espectro en el colorante verde que la suma de los espectros de los colorantes azul y amarillo. Debido a que sabemos que el color verde es la combinación de los colores amarillo y azul.

Así mismo, se observó la similitud de los espectros del colorante verde y de la clorofila. Ya que al ser ambos del mismo color, absorbieron de la misma forma la luz del espectrómetro, y aunque no fue exactamente igual debido a la diferencia de la sustancia

base (Propanolol en caso de la clorofila y agua en caso del colorante verde), podemos observar que si tiene un mismo patrón de absorción. Se ve una disminución de la transmisión entre 500-550 que es la onda de longitud del color verde, esto tiene mucho sentido debido a que eso significa que tuvo mayor absorción.

Para finalizar con este proyecto, observamos la última etapa que fue el análisis de la melanina sintetizada a través de *Ustilago Maydis*, el cual fue un proceso exitoso ya que la curva de absorción que esperábamos fue el resultado observado en el espectrómetro.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Al ser el color verde la suma de los colores amarillo y azul es lógico que presenten el mismo patrón de absorción. Donde el amarillo y el azul se ven que tienen mayor absorción, el color verde también lo demuestra.

Dos sustancias del mismo color tendrán el mismo espectro de absorción. Sólo diferenciando en la intensidad de la absorción debido a la sustancia base con la que están preparadas.

La síntesis de melanina fue exitosa y demostró el espectro de absorción que esperábamos.

VII. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Agradecemos al Dr. Martin Gerardo Rodríguez por su apoyo e instrucción en el proceso de síntesis de melanina.

Así como también a nuestra tutora la Dra. Mariana Alfaro Gómez por su gran disposición a trabajar con nosotras.

REFERENCIAS

- [1] Optics, O. (2015). *Spectroscopy Introduction and Applications*.
- [2] Morales, C. C. (2006). Efectos de la radiación ultravioleta (UV) en la inducción de mutaciones de p53 en tumores de piel. *Hospital Universitario Virgen de las Nieves Granada*, 291-298.
- [3] Lagarda, G. G. (2007). La melanina: un pigmento con múltiples aplicaciones. *ACADEMIA DE CIENCIAS DE MORELOS*, 43.
- [4] Tseng Min N, Chung Pei C., tzean Seahn S. (2011) Enhancing the stress tolerance and virulence of an Entomopathogen by engineering of dihydroxynaphtalene melanin Biosynthesis genes. *American society of Microbiology*, 4508-4519

Análisis espectroscópico de melanina y su respuesta a la radiación UV (B)

Ivonne Abigail Hernández Guadarrama

Instituto Tecnológico de Aguascalientes
Av. Adolfo López Mateos #1801 Ote.
Fracc. Bona Gens, C.P. 20256
Aguascalientes, Ags.
hdez_guadarrama@hotmail.com

Asesora: Dra. Mariana Alfaro Gómez

Universidad Autónoma de Aguascalientes
Avenida Universidad #940
Ciudad Universitaria C. P. 20130
Aguascalientes, Ags.
malfaro@correo.uaa.mx

Resumen — La espectrometría de absorción se basa en comparar la intensidad de un haz de luz medida antes y después de la interacción con una muestra. Las palabras transmisión y remisión se refieren a la dirección de viaje de los haces de luz medidos antes y después de la absorción. En primera instancia se realizaron mediciones básicas de colorantes vegetales comerciales así como un experimento de extracción, dilución y observación de clorofila natural obtenida de una planta común de jardín. Después se utilizó el método de Selvakumar para la extracción de melanina a partir de Ustilago Maydis siendo observada posteriormente a través de espectrometría su absorción de rayos ultravioleta.

Palabras clave — Melanina, Espectroscopia de absorción, Método de Selvakumar

Abstract — Absorption spectrometry is based on comparing the intensity of a beam of light measured before and after interaction with a sample. The words transmission and remission refer to the direction of travel of the light beams measured before and after absorption. In the first instance, basic measurements of commercial vegetable dyes were made as well as an experiment of extraction, dilution and observation of natural chlorophyll obtained from a common garden plant. The Selvakumar's method was then used for the extraction of melanin from Ustilago Maydis, and its absorption of ultraviolet rays was subsequently observed through spectrometry.

Keywords — Melanin, Spectroscopy, Selvakumar's Method.

I. INTRODUCCIÓN

Esta investigación buscó analizar la melanina obtenida experimentalmente por medio de absorción de luz UV y comparar con espectros existentes en bibliografía.

Este proyecto es precursor de una investigación más detallada en la que se usará espectroscopia de Tera Hertz para analizar la reacción de la melanina ante la radiación UV donde se buscará determinar a qué grado de exposición la melanina llega malignizarse y generar cáncer de piel.

La espectroscopia fue el método utilizado en este trabajo, ya que esta es el estudio de la interacción de la luz con la materia. Hay dos aspectos distintos de esta interacción que se pueden utilizar para aprender acerca de los átomos y las moléculas. Una es la identificación de las longitudes de onda específicas de la luz y la otra es la medición de la cantidad de luz absorbida o emitida en longitudes de onda específicas [1].

La luz solar es energía radiante electromagnética compuesta principalmente por el espectro de luz ultravioleta (100 a 400 nm), luz visible (400 a 760 nm) e infrarroja (760 a 1.800 nm) (Fig.1). En el espectrómetro observamos como dependiendo del color de la sustancia analizada, se aprecia el espectro de las longitudes de onda que absorbe.

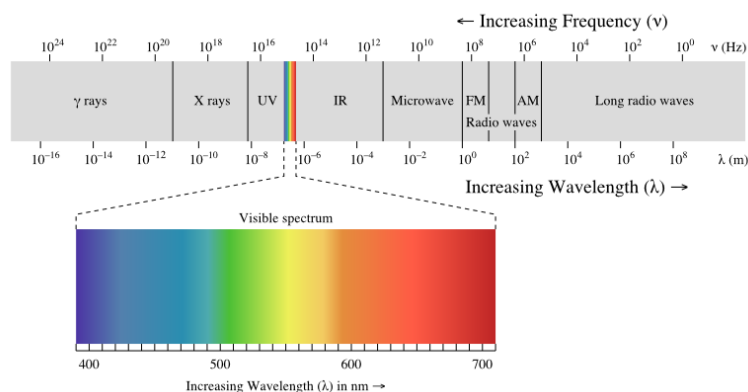


Fig. 1 Espectro de absorción

II. MARCO TEÓRICO

La melanina tiene como función principal en el ser humano proporcionar protección contra el efecto dañino de los rayos ultravioleta de la luz solar. Se sabe que tiene la capacidad de absorber un amplio rango de radiaciones electromagnéticas que incluyen desde la luz visible, pasando por la luz UV y llegando hasta los llamados rayos x. [4]

La melanina no es una sustancia única: se la considera como un amplio grupo de sustancias (pigmentos) que tienen propiedades similares. Son moléculas con alto peso molecular, muy estables, amorfas, cargadas negativamente, resistentes a la degradación con ácidos pero susceptibles a la degradación con bases fuertes, hidrofóbicas, insolubles en agua o solventes orgánicos, las cuales son formadas por la polimerización oxidativa de compuesto fenólicos o indólicos. [5]

La espectroscopia ultravioleta-visible (UV/VIS) está basada en la cantidad de energía que puede absorber o transmitir una muestra en función de la cantidad de sustancia presente. Las técnicas de absorción suponen que cuando una radiación incide sobre una muestra, se produce una absorción parcial de esta radiación, lo que produce una transformación entre los niveles energéticos de la sustancia, pasando ésta a un estado de excitación, y al regresar a su estado basal, emite una radiación de menor longitud de onda. [7]

El espectro de la luz UV se encuentra entre los 100 y los 400 nm y se divide en tres bandas: UVA (320 a 400 nm), UVB (280 a 320), y la UVC (200 a 280 nm). La UVA no es filtrada por la capa de ozono en el mismo grado que la UVB y la UVC, y cantidades suficientes de la misma penetran a través de las nubes y de los vidrios.

La UVB comprende aproximadamente el 5% de la radiación UV, y la UVA el 95% restante. Sin embargo, la UVB es más responsable en producir daño biológico, ya que contribuye con cerca del 80% de los efectos dañinos que se asocian a la exposición solar. [3]

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Se decidió proceder a la extracción de melanina mediante el método de Selvakumar debido a la facilidad de obtener la materia prima necesaria para llevarlo a cabo. Este método posee la ventaja de que puede realizarse con materiales y equipos básicos de laboratorio.

A. Método Selvakumar

Se inició con el hongo ya existente omitiendo el paso de la incubación. Se recuperó el micelio mediante filtración por malla. Se homogenizó y se trató con solución de NaOH 2M, pH 10.5 por 36 a 48 hrs. Se centrifugó la muestra a 4000 x g por 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se trató con solución HCl 2M, pH 2.5 durante 2 horas. Se centrifugó a 4000 x g por 15 minutos. Se desechó el sobrenadante y se recuperó el precipitado suspendiéndolo en solución HCl 6M, se hirvió a 100 °C por 2 horas. Se enjuagó de manera sucesiva con cloroformo, acetato de etilo y etanol; centrifugando a 10,000 rpm por 15 minutos. Se secó al aire y se redisolvió el precipitado en solución NaOH 2M y se centrifugó a 4,000 x g por 15 minutos. [6]

Para su observación en el espectrómetro se diluyó en ácido bórico en relación 1 a 1 con la solución de la melanina.

B. Espectroscopia

Se utilizó el espectrómetro *Red Tide USB 650*, procesando la información mediante el software *Ocean View*, de la marca Ocean Optics.

Se usó la fibra óptica para observar los espectros de diferentes fuentes de iluminación como luz fluorescente, luz LED, luz incandescente, luces LED de diferentes colores y luz ultravioleta. Posteriormente se realizó espectroscopia de absorción para la familiarización del equipo, su técnica de uso y su calibración trabajando con clorofila y colorantes vegetales sintéticos para observar la similitud con el espectro de absorción teórico. Una vez conocida la técnica de espectrometría por emisión y absorción se llevó a cabo la observación con espectroscopia de luz UV de la melanina previamente extraída.

IV. RESULTADOS

Se registraron de manera simultánea los espectros de los colorantes amarillo, azul y verde comparados entre sí como experimento de familiarización con el equipo utilizado como se muestra en la Fig.2.

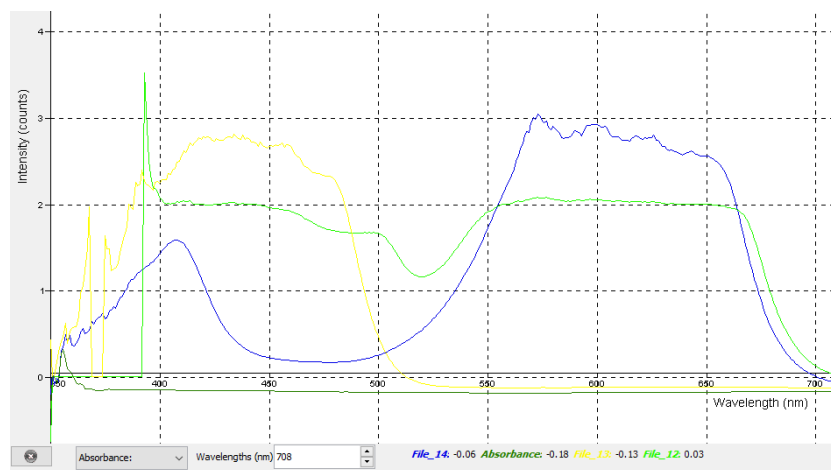


Fig. 2 Espectros de colorantes amarillo, azul y verde.

Se realizó también la comparación entre el colorante comercial verde y el colorante natural clorofila extraído directamente de una planta, encontrando una similitud entre ambos espectros debido a su semejanza de color (Fig.3).

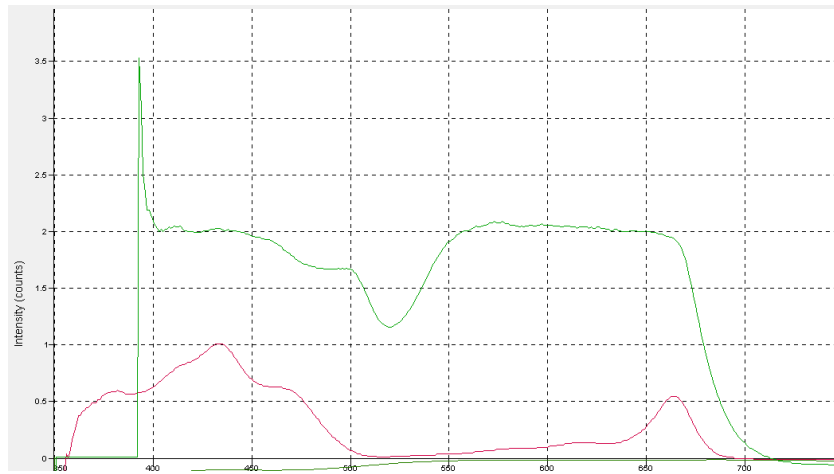


Fig. 3. Comparación del colorante verde (línea roja) y clorofila (línea verde)

Finalmente se obtuvo el espectro de la melanina extraída a través de la espectroscopia de luz UV (Fig. 4)

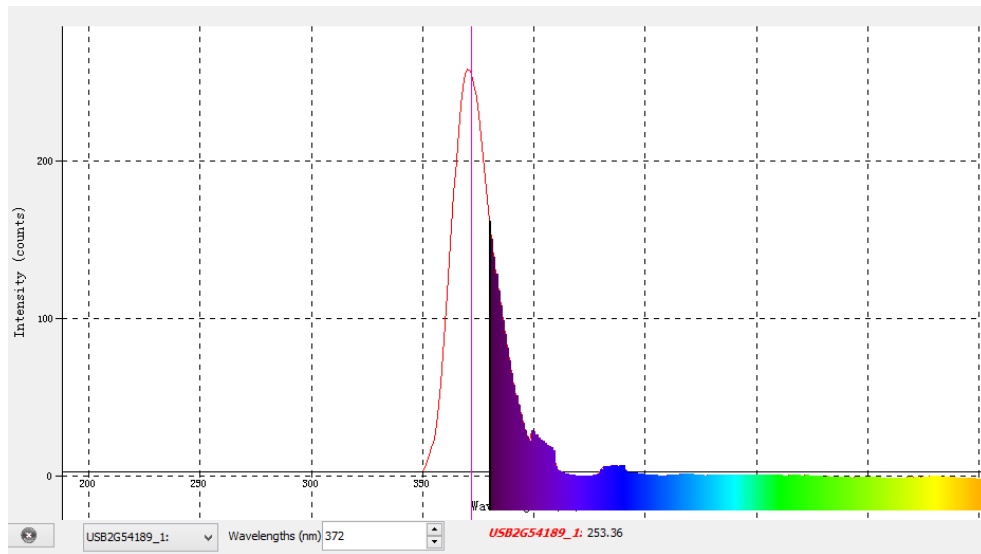


Fig. 4 Espectro de la melanina extraída experimentalmente

V. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En la primera experimentación se observa la complementación del espectro del colorante verde con los de los colorantes rojo y azul, esto puede explicarse claramente con el hecho de que la mezcla de estos 2 colores primarios da paso al color verde.

Los espectros obtenidos de la clorofila y el colorante artificial verde presentan similitud debido al parecido entre los colores de ambos y por ende a la longitud de onda a la cual ambos absorben el haz de luz.

Lo observado al analizar la melanina obtenida es lo que se esperaba puesto que la mayor intensidad de absorción se encuentra en una longitud de onda de 372 nm perteneciente a la región UV del espectro.

VI. CONCLUSIONES

Dos sustancias de color parecido tendrán espectros de absorción similares. Presentando diferencias en la intensidad de absorción debido a la sustancia base con la que están preparadas.

El método de extracción utilizado en este proyecto resultó eficaz para la obtención de la melanina que podrá ser analizada posteriormente y para otros fines.

La melanina absorbe de manera considerable la radiación UV, por ello su importancia en la protección que brinda a los seres humanos.

VII. AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Martín Gerardo Rodríguez por su apoyo e instrucción en el proceso de extracción de melanina, así como al laboratorio de morfología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes por permitirnos el uso del material y equipo de laboratorio.

De igual manera a la Dra. Mariana Alfaro Gómez por su gran disposición y asesoramiento.

REFERENCIAS

- [1] Optics, O. (2015). *Spectroscopy Introduction and Applications*.
- [2] Pablo Rodríguez. (2013). Experimento Naukas: Ver los infrarrojos. Sitio web: <https://naukas.com/2013/11/11/experimento-naukas-ver-los-infrarrojos/> (Consultado 23/07/2019)
- [3] Morales, C. C. (2006). Efectos de la radiación ultravioleta (UV) en la inducción de mutaciones de p53 en tumores de piel. *Hospital Universitario Virgen de las Nieves Granada* 291-298.
- [4] Lagarda, G. G. (2007). La melanina: un pigmento con múltiples aplicaciones. *ACADEMIA DE CIENCIAS DE MORELOS*, 43.
- [5] Martha Eugenia Urán, Luz Elena Cano. (2008). Melanina: implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero. *SciELO*, 12, 2-3
- [6] Min N. Tseng, Pei C. Chung and Shean S. Tzean. (2011). Enhancing the Stress Tolerance and Virulence of an Entomopathogen by Metabolic Engineering of Dihydroxynaphthalene Melanin Biosynthesis Genes. *American Society for Microbiology*, 77, 4510.
- [7] Marco Antonio González Cantellano, Luis Manuel Montaña Zetina. (2015). La espectroscopia y su tecnología: Un repaso histórico y su importancia para el siglo XXI. *Revista Latinoamericana de Física Educativa*, 9, 4603.

Aplicación de métodos geofísicos para diferentes tareas geológicas

Balandra Melibheé Luna Rodríguez
Universidad Autónoma de Zacatecas
Unidad Académica de Ciencias de la Tierra
Av. Universidad 108, Col. Progreso
C.P. 98050 Zacatecas, Zac.
melibhee@hotmail.com

Asesor: Vsevolod Yutsis Von Brincken
Instituto Potosino de Investigación
Científica y Tecnológica
Camino a la Presa de Sn. José 2055,
Lomas 4ta Secc., C.P 78216 San Luis, S.L.P.
vsevolod.yutsis@ipicyt.edu.mx

Resumen — Una de las complicaciones más importantes que se presentan en las zonas áridas de nuestro país, es lo relacionado con la exploración y aprovechamiento de agua subterránea. En este trabajo se apoyó a la tesis Anayeli Pineda Román en su proyecto "Determinación de Potencial de Agua Subterránea en la Localización de El Rodeo Mexquitic de Carmona SLP a partir del uso de Métodos Geofísicos". Se presentan el empleo de los métodos magnético aéreo y terrestre, como herramienta para la localización y posteriormente la interpretación de datos. Empleando así los métodos eléctricos por medio de secciones y sondeos eléctricos verticales.

Palabras clave — Geofísica, magnetometría terrestre, resistividad, agua subterránea.

Abstract — One of the most important complications that occur in arid areas of our country, is related to the exploration and use of groundwater. In this work, Anayeli Pineda Román, a thesis tester, was supported in her project "Determination of Potential of Underground Water in the Location of El Rodeo Mexquitic de Carmona SLP from the use of Geophysical Methods".

The use of the aerial and terrestrial magnetic methods is presented, as a tool for the location and later the interpretation of data. Using electrical methods by means of vertical electric sections and soundings

Keywords — Geophysics, terrestrial magnetometry, resistivity, groundwater.

I. INTRODUCCIÓN

La prospección geofísica consiste en parámetros físicos y matemáticos, los cuales son aplicados para la exploración del subsuelo en la búsqueda y estudio de yacimientos, los cuales tienen una acumulación significativa de materiales tales como minerales, carbón, aguas subterráneas, petróleo, entre otros. La búsqueda de aguas subterráneas es una de las actividades de gran importancia dentro de las ciencias de la tierra y es en lo que se basa este proyecto.

Llevando a cabo la estancia 21° Verano de la Ciencia de la Región Centro, en el periodo 10 de junio al 12 de julio del 2019, apoyado por el CONACYT y la Universidad Autónoma de Zacatecas, la estancia fue realizada en la División de Geociencias Aplicadas del IPICYT bajo de asesoría del Dr. Vsevolod Yutsis.

Como punto de partida, este se realiza en la localidad de El Rodeo, situado en el municipio de Mexquitic de Carmona en el Estado de San Luis Potosí. La problemática de esta comunidad, mencionada por los habitantes es que no tienen agua para abastecer sus necesidades y desafortunadamente tampoco lo hay para su agricultura, ganadería, y para otros fines.

Cabe mencionar que existe un pozo donde ellos pueden obtener este recurso pero, se encuentra muy retirado. A manera de solución, los pueblerinos de esa zona, tienen que

pagar por el servicio de distribución de agua por medio de pipas, aunque debido por motivos económicos, no todos los habitantes cuentan con el presupuesto suficiente para estar contratando ese servicio continuamente. Por necesidad, surgió la idea (la cual se llevó a cabo) de construir una presa para que llegada la temporada de lluvia, en los meses junio, julio y agosto, el agua se acumulara en el dique y así poder hacer uso del vital líquido. Esta complicación la vienen arrastrando aproximadamente 15 años. El objetivo de este proyecto, es realizar estudios correspondientes a la geología superficial, geofísica, estudio de las resistividades aparentes de las rocas en profundidad y de esta manera llegar a tener los conceptos e información necesaria para llevar a cabo la perforación de un pozo que se encuentre a disposición de todo el poblado.

II. MATERIALES Y MÉTODO

Este proyecto se maneja por etapas. La primera consiste en la magnetometría aérea, está consiste en la medición de la intensidad del campo magnético terrestre para mapear estructuras y cuerpos cuyas propiedades físicas estén relacionadas con el magnetismo, tal es el caso de las rocas ígneas, algunos cuerpos mineralizados o fallas y fracturas. Por disposición de tiempo, no me fue posible estar presente en la realización de este primer paso. Posteriormente, la segunda etapa trata de la magnetometría terrestre, en la cual fui partícipe. Ésta consiste en la medición de la intensidad del campo magnético terrestre para mapear estructuras y cuerpos, cuyas propiedades físicas estén relacionadas con el magnetismo [1].

Antes de ir a campo, las 3 brigadas recibimos información respecto a qué es y cómo saber utilizar los equipos de diferentes métodos geofísicos (ver figura 1). Estando en el área, se programaron 9 secciones magnéticas terrestres con estación de Campo Magnético Terrestre (CMT) cada 28 metros, utilizándose magnetómetros como: GEM – GSM- 19, y Geometrix G-856, estos equipos se muestran en la figura 2.



Fig 1. En el inciso a) tenemos los equipos utilizados por diferentes métodos geofísicos y en el b) un ejemplo de los accesorios que conforman a cada equipo.



Fig 2. a) Equipo GEM – GSM- 19 para la exploración del subsuelo y b) Geometrix G-856 equipo utilizado para estación base.

El primer equipo utilizado en campo es el *Geomatrix G-856* el cual tiene una resolución de 0.1 nT, puede ser empleado en modo gradiómetro, indicado para caracterización de estructuras someras de modo que, ahorra distintas correcciones externas. La toma de datos se realiza oprimiendo un botón, se puede realizar mediciones a intervalos de tiempo regulares lo cual permite medir las variaciones diurnas del campo magnético (uso como estación base) [2].

Se propone un punto de partida que esté lejos de lo que pueda hacer ruido (todo lo que tenga que ver con metal), los integrantes que participamos en dicha actividad nos dividimos en tres brigadas (A, B y C); la brigada A se hizo cargo de la estación base, la cual se usó de modo móvil. Se comenzó tomando los primeros datos y de esta manera, cada 10 minutos se procedía a revisar, como se muestra en los incisos a) y b) de la figura 3.

Por consiguiente, las brigadas B y C, usaron los equipos *GEM – GSM- 19* el cual es un instrumento con excelentes beneficios para la exploración del subsuelo, tomando los 3 primeros datos en el punto base y la hora, de esta manera dirigiéndose a las secciones (las cuales fueron divididas) y como herramienta auxiliar para la orientación y toma de puntos usamos los GPS.

Los datos que se fueron registrando por sección se anotaron por: punto, hora, medición, coordenadas en X y Y, metros recorridos y observaciones. Como punto de cierre, de igual forma se tomaron los últimos 3 datos y la hora en el punto base, esto se puede apreciar en la figura 3 en los incisos c) y d) [3].

Mientras tanto se tuvo otra capacitación de sondeos con teoría y por consiguiente práctica en el mismo sitio en la localidad *El Rodeo*, basándose en las mismas 9 secciones. Se empezó a aplicar el método de sondeos eléctricos verticales con el equipo de resistividad tipo *Syscal R2* que es un sistema de alta potencia, y es aplicado para la exploración de aguas subterráneas, estudios ambientales, ingeniería civil, investigación de geología estructural y exploración de minerales.



Fig 3. a) El equipo se comienza a preparar, en el inciso b) ya está localizado el punto de inicio, donde se comienza a tomar datos con el Geomatrix G-856 como estación base, por consiguiente los incisos c y d) son las brigadas B y C tomando sus datos con el equipo GEM – GSM- 1.

Los materiales que también ocupamos para llevar a cabo sondeos eléctricos verticales están conformados por: carretes azules banana-caimán, carretes banana- caimán MN con conectores, electrodos, cintas métricas de 100m, masos, GPS, walkie-talkie, bidones y agua con sal, baterías de 12 V y como material extra se llevó herramientas, multímetro, cinta aislante, banana y caimanes, libreta de campo, como se muestra en la figura 4.

El dispositivo geoelectrico que se está llevando a cabo es el tipo Schlumberger que consiste en cuatro electrodos de referencia, se hincan en el terreno formando una línea recta, cada par (potencial y corriente) se ubica de forma simétrica respecto al centro de medición escogido.

Los electrodos se separan a distancias relativamente grandes respecto a la profundidad de enterramiento, de modo que éstos funcionen como fuentes puntuales de corriente. En la imagen 5 se muestra la aplicación este método en campo [4].



Fig. 4 Equipo para llevar a cabo el método de sondeo eléctrico vertical.



Fig. 5 Aplicación del dispositivo geoelectrico tipo Schlumberger en campo.

Como dato extra, hago mención que este método aún no se ha terminado de realizar en campo ya que aún se siguen tomando muestras de este lugar.

III. RESULTADOS

Los datos obtenidos por el Método de Magnetometría, se acomodaron en hojas de Excel para que la tesista hiciera uso de éstos, usando el programa Oasis Montaj para proseguir a darles una interpretación. En cambio, por otro lado, el método Sondeos Eléctricos Verticales aún se sigue desarrollando en campo, por el cual, aún es fecha de que se siguen obteniendo datos, dejando en claro que se llevara el mismo procedimiento que el método anterior para la interpretación de resultados.

IV. CONCLUSIONES

Finalmente, los métodos empleados, se están inclinando a confirmar la hipótesis principal, respecto a que el agua que aún se sigue manteniendo en la presa, a pesar de que la localidad *El Rodeo* se encuentra en una zona árida, está mantenida por cuerpos de agua subterráneos. Resumiendo esto en términos concretos, se cree que la fuente principal de agua es un acuífero.

Tomando en cuenta lo que ya ha sido analizado y si los estudios continúan obteniendo resultados adecuadamente, se desea llevar acabo la colocación de un pozo en medio de esta localización sin que nadie se lo apropie de éste y todos puedan hacer uso de él.

V. RECONOCIMIENTOS

En primera instancia agradezco a la Universidad Autónoma de Zacatecas y al IPICYT por las facilidades y apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano. Al Doctor Vsevolod Yutsis por darme la oportunidad de apoyar y colaborar en un proyecto, a su vez, desarrollar tareas en el área de Geofísica. Dicen que “el alumno supera al maestro”, aún no puedo decir eso con referencia a usted M.C David Torres, le gratifico toda la enseñanza adquirida en el área de geofísica. Al Doctor Omar Delgado y a la tesista Anayeli Pineda por haberme permitido ser parte de su proyecto y prácticas en campo. Por último, a mis compañeros del Verano Delfín y a los chicos de Tamaulipas que están realizando su tesis de licenciatura, por hacerme ameno este tiempo y haber recibido apoyo y conocimiento de ellos en sus áreas.

REFERENCIAS

- [1] Blanco, A. M. (2015). Magnetómetro . *Hydro- Geophysics and MDT Modelling Unit*.
- [2] Ing, J. M. (2014). Magnetometría. *Geophysical Surveys S.A de C.V.*
- [3] López-Loera, H. (2014). Geofísica para la localización de Agua Subterránea en Ambientes Volcánicos Áridos de la Mesa Central. Caso La Dulcita, Villa de Ramos, San Luis Potosí, México. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 66 (1), 165-181.
- [4] Auge, D. G. (2008). Métodos Geoelectricos para la Prospeccion de Agua Subterránea. *Hidrored*, 24.

Astroquímica: La Química del espacio

Brenda Maricela Aguilar Banda
 Universidad Autónoma de Coahuila
 Facultad de Ciencias Físico Matemáticas
 Unidad Camporredondo, Edificio A.
 Saltillo, Coahuila. C. P. 25020
brendaaguilarbanda@uadec.edu.mx

Asesor: Miguel Ángel Trinidad Hernández
 Universidad de Guanajuato
 Departamento de astronomía
 Callejón de Jalisco, S/N, Colonia Valenciana.
 Guanajuato, Guanajuato. C. P. 36240
trinidad@astro.ugto.mx

Resumen — En este trabajo se presenta la descripción de la composición molecular del sistema binario de protoestrellas L1551-IRS 5. Se procesaron datos provenientes del radiotelescopio VLA, utilizando el software CASA. Con base a información obtenida de la literatura se creó una lista de moléculas, las cuales se ubicaron a lo largo del espacio de los discos en las imágenes obtenidas, tomando como referencia el núcleo de cada fuente.

Palabras clave — medio interestelar, disco protoplanetario, síntesis molecular.

Abstract — In this work the description of the molecular composition of a proto-star binary system, L1551-IRS 5, is presented. Using the software CASA, data from the VLA radio astronomical telescope was processed. Based on information extracted from literature, a list of molecules was made, which were located along the disks' space in the obtained images, taking the cores of each disk as a reference point.

Keywords — interstellar medium, protoplanetary disk, molecular synthesis.

I. INTRODUCCIÓN

No cabe duda de que el desarrollo del telescopio abrió un amplio panorama en la manera de estudiar los astros cercanos a nuestro planeta hogar, y posteriormente las regiones más allá del Sistema Solar. Sin embargo, mientras más se conoce más se es ignorante, y tras esto nos remontamos a una de las interrogantes más antiguas que el ser humano ha tenido, ¿de dónde proviene la vida? Y más aún, ¿cómo se abrió paso en la Tierra?

No toda la información que se recibe del espacio exterior llega en forma de luz visible. El espectro electromagnético está compuesto por una gran variedad de ondas, con longitudes y frecuencias variadas. La mayoría de éstas son invisibles a nuestros ojos, sin embargo, gracias a los radiotelescopios ahora se puede captar una gran variedad de señales, las cuales permiten determinar de qué fenómeno se trata de acuerdo a sus emisiones. Cada molécula cuenta con su propia firma espectral. Ésta, al igual que la huella dactilar en los seres humanos, es única; varía con los saltos cuánticos entre niveles de energía, los cuales generan cambios en las líneas de emisión, que posteriormente son detectados y analizados.

II. MARCO TEÓRICO

A. Química del medio interestelar y discos protoplanetarios

La astroquímica se define como el estudio y análisis de la abundancia de las moléculas y reacciones, tanto en el medio interestelar como en los cuerpos celestes y el material difuso, y su relación con las formas de energía como la radiación [1].

En el seno de las nubes moleculares tiene lugar el colapso de la materia para formar estrellas; este colapso convierte energía gravitacional en cinética. Las estrellas jóvenes se forman a partir de las nubes moleculares frías; generan mucha radiación UV que fotodisocia las moléculas, ioniza los átomos, evapora los mantos helados de los granos de polvo e incluso destruye parcialmente su núcleo, propiciando la formación sobre los granos de moléculas más complejas [2].

Los detalles sobre qué moléculas están presentes llegan en forma de señales espectroscópicas grabadas en varias porciones del espectro electromagnético para diferentes regiones del espacio. De los datos se obtienen, además de los tipos de moléculas, sus abundancias, su ubicación dentro del material que circunda a la estrella en formación y estrellas evolucionadas, y se deduce cómo evoluciona la complejidad química en las galaxias a las que pertenecen [3]. Los átomos y las moléculas son identificados a través de sus líneas de absorción y/o emisión a diferentes frecuencias, y cuantificados por su absorción o emisión de su intensidad [4].

Los discos protoplanetarios (DPPs) fueron descubiertos por interferometría a través de sus emisiones infrarrojas y (sub) milimétricas. Se forman a través del colapso gravitacional de los núcleos de nube molecular en un proceso regulado por el balance de sus fuerzas gravitacionales, magnéticas, rotacionales y la presión del gas. Se dividen en tres clases: discos alrededor de enanas marrones, alrededor de estrellas T Tauri, y alrededor de estrellas Herbig Ae/Be. Las enanas marrones son estrellas que no son lo suficientemente masivas para llevar a cabo la quema de hidrógeno; las T Tauri son jóvenes con masa similar a nuestro Sol; por último, las estrellas Herbig Ae/Be son más masivas ($\sim 2-8 M_{\text{Sol}}$), calientes y luminosas, contrario a las T Tauri [5].

Los DPPs se caracterizan por la variedad en los procesos de evolución del polvo: crecimiento, fragmentación, sedimentación vertical y deriva radial. La masa está dominada por hidrógeno molecular y helio en un radio de masa definido por la abundancia de estos elementos. Suele ser determinada a partir del CO. Todas las reacciones son procesos de dos cuerpos, y aproximadamente solo el 10% de las tasas de reacción han sido medidas de manera precisa en laboratorios o calculadas teóricamente [6].

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Para este trabajo se analizó el caso del sistema binario protoestelar IRS 5. Éste se encuentra localizado en el borde de una nube molecular densa, L1551. Ambas protoestrellas son del tipo T Tauri, y cuentan con discos protoplanetarios y flujos bipolares.

Se hizo uso del software CASA (*Common Astronomy Software Applications*), el cual ha sido desarrollado para ayudar en el procesamiento de datos de algunos radiotelescopios astronómicos [7]. En este caso, los datos analizados provienen del VLA (*Very Large Array*, por sus siglas en inglés), un conjunto de 27 radiotelescopios ubicado en las llanuras de San Agustín en Nuevo México. Se emplearon principalmente las tareas *tclean* e *imfit* y se hicieron nueve pruebas con este proceso.

Se desplegó el mapa limpio generado con *tclean* mediante la tarea *viewer*, donde se midió el ruido final que poseía la imagen, el cual nos sería de utilidad para determinar el

flujo de las fuentes y la posición de las moléculas. Posteriormente, con *imfit* se realizó un ajuste gaussiano, del cual se extrajo la posición de la fuente superior e inferior, al igual que sus densidades de flujo y flujos pico. Dicha posición se encuentra en unidades de segundos tiempo (ascensión recta) y arco segundos (declinación).

A partir de la literatura se generó un listado de los tipos de moléculas que se pueden encontrar en los DPPs [8-12], el cual se muestra en la Tabla 1. A partir de estas, se determinó cuáles se podrían encontrar en discos T Tauri; se ubicaron a partir de su distancia al núcleo. Dado que ésta distancia se encontraba en unidades astronómicas, se transformó a unidades ecuatoriales. Para esto se aplicó el teorema de Pitágoras; la ascensión recta se tomó constante y solo se varió la declinación. Por lo tanto, si una molécula estaba a 100 AU, considerando una distancia a la fuente de 140 pc, le corresponderían 0.66138 segundos de arco, los cuales se aumentaban a la coordenada del centro del disco.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se mencionó anteriormente, las propiedades y eventos en un disco protoplanetario varían de acuerdo al tipo de estrella central. Es por esto que no todas las moléculas enlistadas en la tabla pudieron ser localizadas; de acuerdo con la literatura estudiada, solamente algunas han sido encontradas o identificadas en discos de estrellas T Tauri, cuyas distancias y nombres se enlistan en la Tabla 2.

Tabla 1. Moléculas que se encuentran en discos protoplanetarios.

C-O	C-H-O	C-H-O-N	O-S	C-S	Deuteradas	Iones
CO	H ₂	HCN	O	CS	HD	H ₃ ⁺
¹² C ¹⁸ O	H ₂ O	N ₂	O ₂	C ₂ S	HDO	HCO ⁺
¹² CO	H ₂ CO	NH ₃	SO ₂	C ₃ S	DCN	C ⁺
C ¹⁸ O	C ₂ H	NH ₄			HDCO	CH ⁺
CO ₂	C ₃ H ₂	CN				C ₃ H ₄ ⁺
	CH ₄	HC ₃ N				N ₂ H ⁺
	HCOOH	OCN				He ⁺
	CH ₃ OH	NH ₂ CHO				DCO ⁺
	CH ₃ OCH ₃					H ₂ D ⁺
	CH ₃ CHO					
	CH ₃ CCH					
	CH ₂ CO					
	CH ₂ CO					
	PAHs					

Tabla 2. Moléculas identificadas en discos de estrellas T Tauri.

Molécula	Nombre	Distancia al núcleo (AU)
H ₂ O	Agua	10
H ₂ CO	Formaldehído	100
CH ₃ OH	Metanol	150
CS	Monosulfuro de carbono	200
HCO ⁺	Radical formilo	250
CO	Óxido de carbono	300-1000
N ₂ H ⁺	Diazenilio	400
C ₂ H	Radical etinilo	500

Tabla 3. Posición y flujo obtenidos para las fuentes de L1551-IRS 5.

Fuente	A	B
Posición		
Ascensión recta (s)	04:31:34.1428 +/- 0.0002	04:31:34.1418 +/- 0.0006
Declinación (arcsec)	+018.08.04.996 +/- 0.002	+018.08.04.678 +/- 0.006
Flujo		
Integrado (mJy)	6.56 +/- 0.33	4.30 +/- 0.63
Pico (mJy/beam)	5.00 +/- 0.16	3.08 +/- 0.29

Todas las moléculas, con excepción del agua, se ubicaron partiendo del centro promedio de las dos fuentes; esto se puede observar en la Figura 1. Tal como se aprecia, la molécula más cercana a los núcleos es el agua, seguida por el formaldehído, mientras que la más lejana es el radical etinilo, esto sin tomar en cuenta que el segundo límite del óxido de carbono llega aún más lejos, tanto que nuestro mapa no permitió localizarlo.

La posición y los flujos obtenidos mediante el ajuste gaussiano con CASA se muestran en la Tabla 3, donde 'A' es la fuente del norte y 'B' la del sur. Tanto el flujo integrado como el flujo pico son mayores en la fuente A, siendo la fuente B menos intensa. Además de los números, esto se intuye también de la imagen obtenida, gracias a que ambas fuentes están resueltas, lo cual se refiere a que se puede distinguir perfectamente entre una y otra después del procesamiento. Respecto a la ubicación de las moléculas, depende en gran medida a la tasa de reacciones que ocurren en el disco. Algunas se dan principalmente por radiación UV, que disocia las moléculas y calienta el gas. Como se mencionó anteriormente, esta disociación permite a ciertos elementos viajar aún más allá del núcleo donde, debido a las bajas temperaturas, llegan a asentarse sobre los granos de polvo.

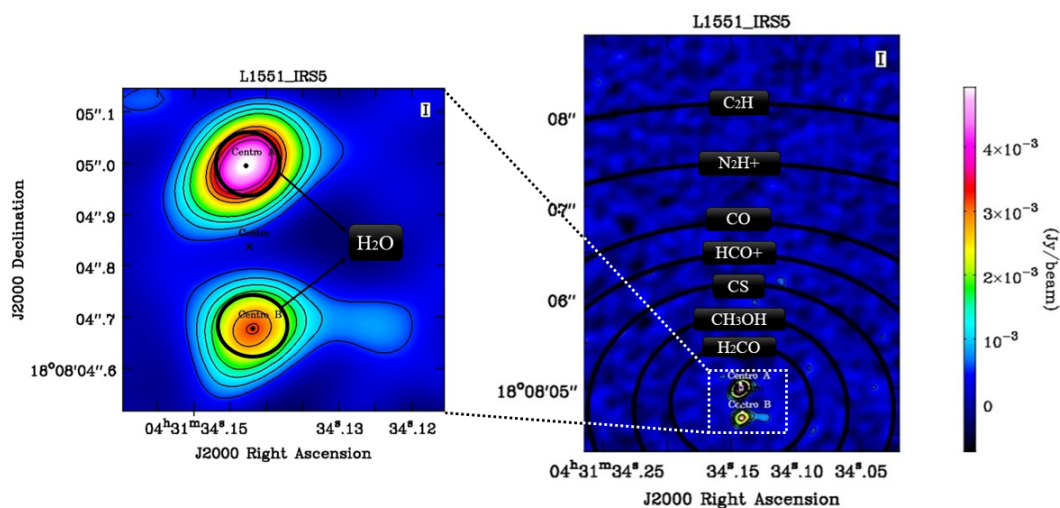


Fig 1. Ubicación de las moléculas en L1551-IRS 5; respecto al centro de cada fuente (izquierda) y respecto al centro promedio de ambas fuentes (derecha).

Es aquí donde la mayor parte de las reacciones tienen lugar; la destrucción de moléculas tales como el HCO⁺, el CO y los PAHs, propician el esparcimiento de elementos a través del plano ecuatorial del disco.

Los PAHs (*polycyclic aromatic hydrocarbons*) juegan un papel importante en estos procesos, pues poseen una cantidad importante del C elemental que se puede encontrar en los discos (~5%). La razón por la que no se incluyeron en la tabla y el mapa obtenido es su abundancia; se encuentran prácticamente en todas partes, lo que hace que su radio de ubicación sea impreciso.

Para que una reacción de formación molecular tenga lugar deben pasar algunos millones de años. La cantidad de polvo que hay en el medio interestelar por centímetro cúbico es algunos órdenes de magnitud menor a la que hay en la Tierra, por lo tanto, la probabilidad de que dos elementos colisionen, o más aún, que se creen las condiciones para la creación de elementos más pesados, es muy baja en corto tiempo.

Para visualizar mejor esto debemos situarnos en un grano de polvo esférico, donde una partícula se encuentra en el polo norte y otra en el polo sur; la cantidad de trayectorias posibles que pueden seguir para encontrarse una con la otra es prácticamente infinita. Aunque nosotros, observadores externos, sabemos cuál es la mejor ruta, las cosas no sucederán solo porque sí. Sabiendo que estos eventos llevan tiempo, las escalas del universo son distintas a las terrestres, por lo que su transporte hasta un pequeño planeta rocoso en formación puede ser más complicado.

V. CONCLUSIONES

Tras estudiar la posible ubicación de diversas moléculas en el sistema binario de protoestrellas L1551-IRS 5, se concluye que la detección de elementos en el medio interestelar actualmente ha abierto un amplio panorama de estudio, tanto a futuro como para la comprensión del surgimiento y desarrollo de la vida en el planeta Tierra. A pesar de que se ha detectado el espectro de diversos elementos, el nacimiento de aquellos esenciales para la vida (tales como las bases nitrogenadas del ADN) sigue siendo un misterio. Debido a que nuestro sol es de tipo T Tauri, el estudio de discos protoplanetarios pertenecientes a estas estrellas es muy importante.

Son diversas las teorías creadas respecto al surgimiento de la vida en el planeta Tierra, sin embargo, aún no existe una definitiva. Nuestro sol presentó un disco de acreción en sus inicios del cual surgió nuestro sistema solar. Por esto se puede hacer una analogía general; los eventos catastróficos que ocurrieron son similares a los que ocurren en los discos protoplanetarios que se estudian. De aquí surgen diversas suposiciones, tales como que las moléculas que permitieron la creación de la sopa prebiótica se encontraban en algunos cometas que posteriormente impactaron con nuestro planeta; aunque elementos han sido encontrados en ellos aún no se sabe con certeza que es lo correcto. Solo queda esperar a que nuevos estudios sean realizados, pues aunque se conozca más sobre el universo exterior, que nuestra existencia siga siendo un misterio no hablará bien de la humanidad en el futuro.

VI. AGRADECIMIENTOS

Agradezco al comité del Verano de la Ciencia de la Región Centro por fomentar y promover el interés en la investigación a los estudiantes de licenciatura en todas las áreas,

pues esto expande nuestra visión hacia nuevos horizontes y nos muestra un poco más de la cultura de nuestro país. De igual manera, agradezco al Departamento de Astronomía de la Universidad de Guanajuato por el cálido recibimiento, así como a la Facultad de Ciencias Físico Matemáticas de la Universidad Autónoma de Coahuila por los conocimientos que me ha otorgado y logré aplicar en esta estancia.

REFERENCIAS

- [1] D. J. Castillo-Pazos, "Astroquímica: Desarrollo y aplicaciones", NOTASde10, 2012.
- [2] J. Martín-Pintado, "La química del universo y el origen de la vida", Información y Actualidad Astronómica, Vol. 25, Instituto de Astrofísica de Andalucía (IAA-CSIC), 2008.
- [3] N. Ruiz-Zelmanovitch, "La química de espacio. Astronomía", II Época, Vol. 150, 2012.
- [4] C. Vallance, "Fundamentals of Atmospheric Chemistry and Astrochemistry", Lectures 1-3: an Introduction to Astrochemistry, 2014.
- [5] Th. Henning, and D. Semenov, "Chemistry in Protoplanetary Disks", Chemical Reviews, Vol. 113, pp. 9016-9042, ACS Publications, 2013.
- [6] D. Semenov, "Chemistry in Protoplanetary Disks", Max Planck Institute of Astronomy, 2010.
- [7] <https://casa.nrao.edu> [consultado en julio de 2019]
- [8] A. Dutrey, Th. Henning, St. Guilloteau, et al, "Chemistry in disks I. Deep search for N_2H^+ in the protoplanetary disks around LkCa 15, MWC 480, and DM Tauri", Astronomy & Astrophysics, Vol. 464, pp. 615-623, 2006.
- [9] Th. Henning, and D. Semenov, "The birth and death of organic molecules in protoplanetary disks", Organic Matter in Space, Proceedings IAU Symposium No. 251, International Astronomical Union, 2008.
- [10] Th. Henning, D. Semenov, St. Guilloteau, et al., "Chemistry in disks III. Photochemistry and X-ray driven chemistry probed by the ethynyl radical (CCH) in DM Tau, LkCa 15, and MWC 480", The Astrophysical Journal, Vol. 714, pp. 1511-1520, The American Astronomical Society, 2010.
- [11] K. Schreyer, St. Guilloteau, D. Semenov, et al., "Chemistry in disks II. Poor molecular content of the AB Aurigae disk", Astronomy & Astrophysics, Vol. 491, pp. 821-827, 2008.
- [12] D. A. Williams, and T. W. Hartquist, "The Chemistry of Star Forming Regions", Vol. 32, pp. 334-341, 1999.

Bioprospección de microalgas del Eje Neovolcánico

Sergio Rodrigo Muñoz Carranza

Universiada de Guanajuato: División de Ciencias
Naturales y Exactas
Noria Alta, 36050 Guanajuato, Gto.
2s5r6m9c6@gmail.com

Asesor: Alberto Ayala Islas

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Silao-Irapuato km 12.5 El Copal, 36821
Irapuato, Gto.
alayala@itesi.edu.mx

Resumen – En el proyecto realizado del verano de 2019 se recolectaron muestras de aguas y crecimiento de algas, en zonas pertenecientes a la región Neovolcánica del centro de México que presenta actividad geotérmica. Se realizó debido a la falta de información del potencial biotecnológico las posibles especies de microalgas que se encuentran en esta zona. De las muestras recolectadas en estas zonas dentro de la región Neovolcánica, se aislaron e identificaron algunas de las distintas especies de algas encontradas dentro de las muestras recolectadas. se procedió a la utilización de pequeños biorreactores conteniendo distintas especies de algas, donde a partir de estas se realizaron curvas de crecimiento y pruebas de inhibición del crecimiento y esporulación del hongo micotóxico *Aspergillus parasiticus*.

Palabras clave – microalgas, bioprospección, biorreactor.

Abstract – In the project carried out in the summer of 2019, water samples and algae growth were collected in areas belonging to the Neovolcanic region of central Mexico with geothermal activity. The possible species of microalgae found in this area were made due to the lack of information on the biotechnological potential. From the samples collected in these areas within the Neovolcanic region, some of the different species of algae found within the collected samples were isolated and identified. The use of small bioreactors containing different algae species was also carried out, where growth curves and growth inhibition tests and sporulation of the mycotoxic fungus *Aspergillus parasiticus* were performed from these.

Key words – microalgae, bioprospecting, bioreactor.

I. INTRODUCCIÓN

Las microalgas son microorganismos capaces de realizar la fotosíntesis liberando O₂ en la atmósfera lo cual es esencial para la vida sobre la tierra y bajo el agua. Además, tienen la habilidad de producir compuestos de valor económico, ya sea para la producción de biocombustibles o para su consumo por su gran valor nutritivo. Están consideradas como un grupo polifilético de organismos fotótrofos oxigénicos. En algunos casos han sido utilizadas para procesos de tratamiento de aguas residuales a pequeña escala, pero su valor radica mayormente en su uso para la producción de biomasa. Ya que estas contienen proteínas, lípidos esenciales, pigmentos, carbohidratos, minerales y vitaminas [1].

La bioprospección es la exploración de la vida o mejor dicho la búsqueda sistemática, clasificación e investigación de organismos vivos que pueden tener alguna característica que pueda llegar a ser de utilidad para el ser humano. Esto lo hace estudiando e investigando los productos biológicos que puedan llegar generar los organismos, estos productos biológicos pueden ser genes, compuestos químicos, proteínas, el mismo microorganismo [2].

II. MARCO TEÓRICO

Se realizó la determinación de nitrógeno total disuelto, se implementó el método del ácido cromatrópico, el cual está basado en la digestión de persulfato convirtiendo todas las formas de nitrógeno en nitrato, lo que origina una coloración amarilla en la muestra [3,4]. La determinación de nitrógeno fue realizada en un fotómetro especial para el análisis químico de agua.

El método de conteo celular usando cámara de Neubauer se basa en el conteo de forma visual del número de células encontradas dentro de una retícula grabada. La cual cuenta con distintos de distintos tamaños, los cuales pueden tener un uso distinto dependiendo del tipo de célula que se quiera contar [5].

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Kit de reactivos para determinación de nitrógeno total, fotómetro para examinación de agua, baño seco digital, medio BBM, medidor de oxígeno disuelto portátil, potenciómetro portátil, biorreactores, bomba de oxígeno, cajas Petri, medio PDA, medio PDB, microplaca de 96 pozos, cajas Petri.

Se realizaron dos excursiones para la recolección de muestras. La primera en las zonas de los azufres, lago de Cuitzeo y; lago de Yuriria: la segunda en el lago de Zacapu y ojo de mar en Los Espinos. En cada zona se tomaron varias muestras de agua y de crecimientos algales de interés, observados en distintos lugares de cada zona. En las zonas de los azufres, ojo de mar y el lago de Cuitzeo, se recolectaron muestras de crecimientos de algas dentro o en la superficie del agua y en algunos casos se recolectaron pequeñas colonias de algas, con formas características. Mientras que, en las zonas del lago de Yuriria y Cuitzeo, se recolectaron de muestras de agua.

Las muestras de algas recolectadas se colocaron en tubos de ensaye (esterilizados en autoclave), con 5 ml de medio BBM [6]. Esto para evitar la muerte progresiva de las algas recolectadas y mantener vivas las especies de algas recolectadas. Mientras que las muestras de agua se colocaron en frascos estériles sin medio, pero de un mayor volumen (500ml).

Para la realización del aislamiento de algas se tomó 1ml de cada muestra y se colocó en 9ml de medio BBM. Con esto se realizó 6 diluciones seriadas de cada muestra [7]. Los tubos de ensaye con las diluciones se colocaron en una incubadora a 35°C con luz artificial. Se revisó periódicamente el crecimiento y desarrollo de algas en cada serie de diluciones de cada muestra.

Para el montaje de los biorreactores, se tomaron cuatro muestras distintas de algas, previamente aisladas por el equipo de investigación. Se utilizaron 4 pequeños fotobiorreactores en frascos de vidrio de aproximadamente 1 litro, a los cuales se les colocó 700ml de medio BBM y se inoculó con 150ml de una muestra de alga [8]. A cada biorreactor se le colocó una manguera para la extracción de muestras y otras dos para salida y entrada de aire. La manguera con la función de entrada de aire se le colocó un pequeño filtro y se colocó a una bomba de aire para peceras. Mientras que la manguera con la función de salida de aire terminaba dentro de un matraz con agua, esto para evitar contaminaciones. Se selló cada fotobiorreactor y se marcaron como reactor 6 *Ocystis*, reactor 10 *Tetraspora*, 84

reactor 11 *Clorherium* y el reactor 12 *Chlorella vulgaris*, conforme al tipo de microalga que fue inoculada.

Una vez por semana se realizó una determinación de la cantidad de biomasa producida de cada fotobiorreactor, esto mediante la realización de peso seco. Con el agua resultante de cada filtración se realizaron dos determinaciones del contenido de nitrógeno disuelto dentro del medio de cada biorreactor. También cada día se realizó dos conteos celulares en cámaras de Neubauer de muestras recién extraídas.

Para la realización de la prueba de inhibición de *Aspergillus parasiticus*. En una microplaca se realizó una prueba cualitativa de inhibición del crecimiento de *Aspergillus parasiticus* por la adición de medio proveniente de los fotobiorreactores antes mencionados. A cada fotobiorreactor se añadió antes Estreptopen, el cual es un antibiótico de amplio espectro para bacterias, antes de ser agregados los pozos de la microplaca. La prueba se realizó en seis columnas de una microplaca donde cada columna tenía seis pozos, el contenido de cada columna de pozos se puede observar en la tabla 1.

Tabla 1. Número de columna v contenido de cada columna de la microplaca de 96 pozos

No. de columna	Contenido
1	200µl Medio PDB + inoculación de hongo
2	150µl de medio PDB + 50µl de medio BBM + inoculación de hongo
3	150µl de medio PDB + 50µl de medio proveniente de biorreactor 6 + inoculación de hongo
4	150µl de medio PDB + 50µl de medio proveniente de biorreactor 10 + inoculación de hongo
5	150µl de medio PDB + 50µl de medio proveniente de biorreactor 11 + inoculación de hongo
6	150µl de medio PDB + 50µl de medio proveniente de biorreactor 12 + inoculación de hongo

IV. RESULTADOS

Las algas identificadas dentro de las muestras recolectadas de géneros de cianobacterias fueron; *Oscillatoria*, *Anabaena*. Géneros de algas verdes como *Microcystis* y *Mougeotia* como se puede ver en la figura 1. Y también géneros de diatomeas como *Cymbella*, *Gomphonema* y *Sinedra* como se observa en la figura 2.

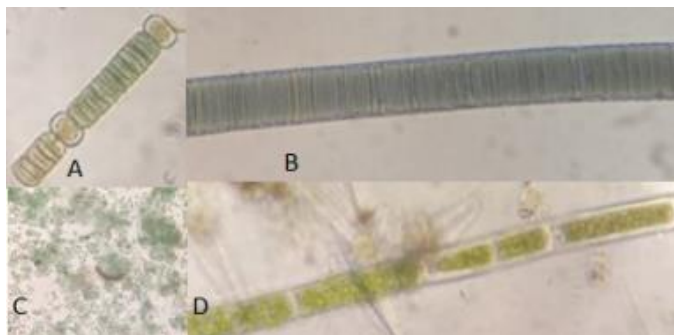


Figura 1. A) *Anabaena*, B) *Oscillatoria*, C) *Microcystis*, D) *Mougeotia*



Figura 2. 1) gomphonema, 2) cymbella, 3) synedra

Al graficar el crecimiento del número de células en el interior de cada fotobiorreactor, se observó la tendencia mostrada en la figura 3, este crecimiento se fue dando alrededor de tres semanas. La determinación del peso seco corroboró el aumento del número de células dentro de los biorreactores. Figura 4. Con el agua drenada del peso seco se midieron los niveles de nitrógeno. Figura 5. De los cuales se puede observar que la cantidad de nitrógeno en el medio del fotobiorreactor aumento, mientras que en el fotobiorreactor 6 el contenido de nitrógeno en un principio era mucho mayor, pero con el paso del tiempo disminuyó la cantidad de nitrógeno disuelto en el medio del fotobiorreactor.

Al observar los crecimientos de *Aspergillus parasiticus* en la microplaca se observó un menor crecimiento y esporulación del hongo en la columna de pozos conteniendo el medio del reactor 12. Mientras que en todas las demás columnas conteniendo medio de los demás fotobiorreactores, el crecimiento del hongo se vio muy beneficiado, como se puede observar en la figura 6.

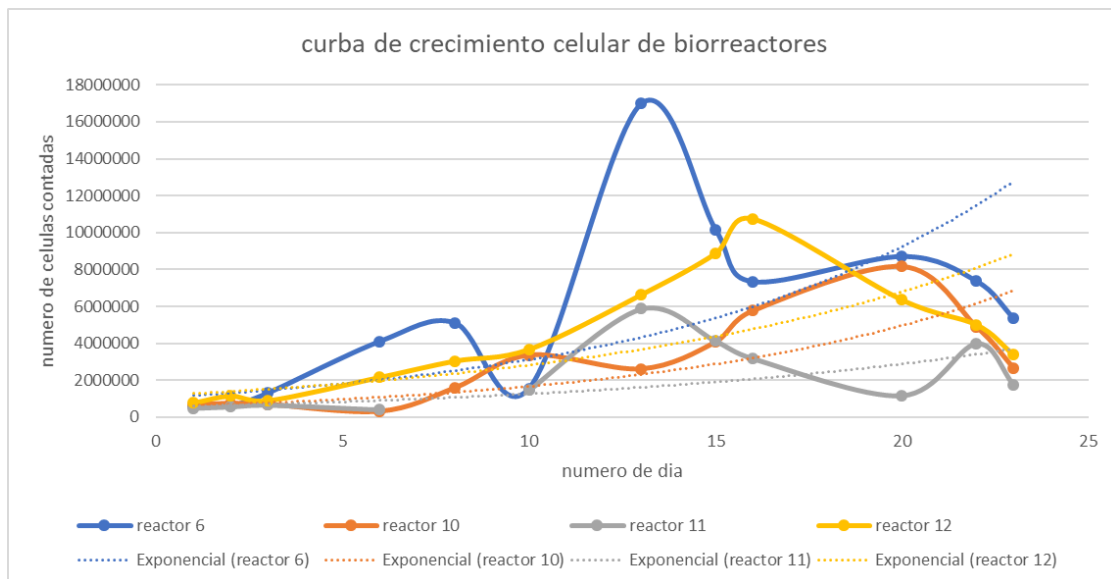


Figura 3. Grafica mostrando las curvas de crecimiento de los reactores 6,10,11 y 12

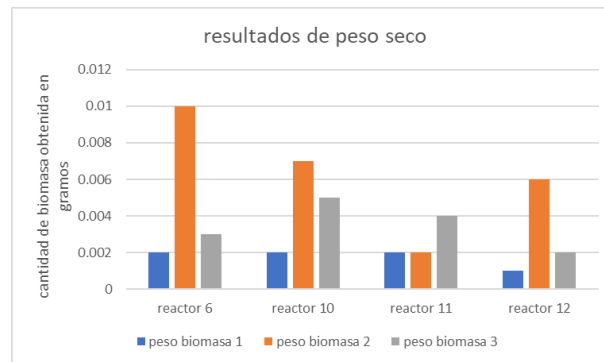


Figura 4. Grafica de peso seco obtenido de cada fotobiorreactor en cada muestreo

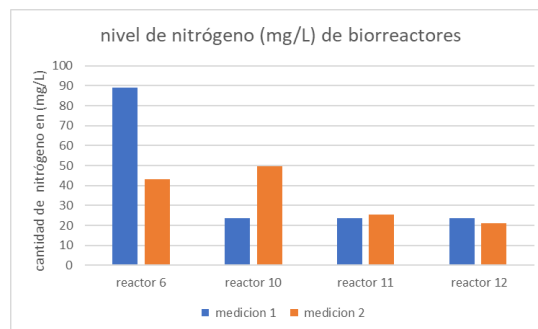


Figura 5. Grafica de nivel de nitrógeno disuelto en fotobiorreactores en cada muestreo realizado



Figura 6; A) control, B) control + medio BBM, C) reactor 6, D) reactor 11, E) reactor 10, F) reactor 12.

V. ANALISIS DE RESULTADOS

Las especies de microalgas contenidas en los fotobiorreactores fueron previamente aisladas e identificadas y se utilizaron, para la determinación de posibles cualidades de inhibición de hongos patógenos y la realización de crecimiento de algas. Así como la determinación del nivel de nitrógeno generado.

En las curvas de crecimiento de cada reactor se puede observar que, hacia el final de la gráfica, hay un punto donde empieza disminuir el número de células. Esto debido a que los fotobiorreactores contenían muy poco medio BBM que nutriera a las microalgas en ese momento. Lo cual se debió a la continua extracción de muestras para la realización de conteos celulares y extracción de muestras para la realización de peso seco y determinación de la cantidad de nitrógeno disuelto en cada fotobiorreactor.

La inhibición de *Aspergillus parasiticus* en la prueba de la microplaca, puede ser debido a la liberación de metabolitos secundarios del alga contenida en el fotobiorreactor 12. Así como también es posible que el aumento de la cantidad de nitrógeno disuelto en el fotobiorreactor 10, se deba a la liberación de metabolitos secundarios por parte del alga contenida.

VI. CONCLUSIONES

Se cumplió uno de los principales objetivos del proyecto el cual era la identificación de especies de microalgas encontradas en cuerpos de agua dulce del eje Neovolcánico, así como la observación de una posible utilización de *Chlorella vulgaris* (fotobiorreactor 12) para la inhibición de *Aspergillus parasiticus*. Que es una plaga en cultivos. También de la posible utilización de microalgas del género de Testraspora (reactor 10), como un posible fertilizante o parte de un fertilizante de suelos esto por la cantidad de nitrógeno que llega a liberar en el medio, lo cual muy benéfico para el crecimiento y desarrollo de planta.

VII. AGRADECIMIENTOS

Al ITESI por haberme recibido a mí y a mis compañeros del verano de investigación para realizar este proyecto y haber brindado el apoyo que requeríamos en cuanto a materiales y lugar de trabajo.

Se agradece el apoyo de los compañeros estudiantes del proyecto del verano de investigación Leslie y Aldo, que sin ellos no habría podido trabajar como lo hice en el proyecto además de darme su amistad. A los estudiantes realizando tesis bajo el apoyo del profesor Ayala, me hicieron sentir bienvenido y apoyaron en procedimientos que nunca había realizado. Y sobre todo al profesor Alberto Ayala Islas por haberme enseñado usos para algas y sus posibles implementaciones, las cuales a mí nunca se me habrían ocurrido.

REFERENCIAS

- [1] E. Bellinger y D. Sigee, *Freshwater Algae*, Chichester: Wiley Blackwell, 2015.
- [2] F. Castañeda, «slideshare,» 7 septiembre 2012. [En línea]. Available: <https://es.slideshare.net/luiska08/la-bioprospeccion-14486393>. [Último acceso: 15 junio 2019].
- [3] AWWA, APHA y WEF, *standar methods for the examination of water and waste water*, Washinton D.C.: American water works association.
- [4] HANNA instruments, «dropbox,» [En línea]. Available: <https://www.dropbox.com/h?preview=MANUAL+C214.pdf>. [Último acceso: 22 7 2019].
- [5] O. Bastidas, «dropbox,» [En línea]. Available: <https://www.dropbox.com/home/Bibliograf%C3%ADa?preview=T%C3%A9cnica+Neubauer.pdf>. [Último acceso: 22 7 2019].
- [6] , Fraunhofer; , CCCryo; , «dropbox,» [En línea]. Available: <https://www.dropbox.com/home/Bibliograf%C3%ADa?preview=BBM.pdf>. [Último acceso: 22 7 2019].
- [7] R. Andersen, *Algal culturing techniques*, elsevier academic press, 2005.
- [8] E. G. Nuñez Yapias, «slideshare,» [En línea]. Available: https://es.slideshare.net/ki_kenu_77/biorreactores-ultimo. [Último acceso: 22 7 2019].

Bioprospección de microalgas nativas del Eje Neovolcánico para determinar su potencial biotecnológico (A)

Aldo García Carrillo

Universidad Autónoma de Aguascalientes
Ingeniería Bioquímica
Domicilio: Av. Universidad #940. Edificio C.P.
20100. Aguascalientes, Ags.
aldolatrinidad@gmail.com

Asesor: Alberto Ayala Islas

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Ingeniería Bioquímica
Carr. Irapuato-Silao Km 12.5
C.P. 36821, Irapuato, Gto.
alayala@itesi.edu.mx

Resumen — En el presente trabajo, se muestra una bioprospección de algunas especies de microalgas de diversas formas de agua proveniente del Eje Neovolcánico, que consistió en la recolección, la identificación morfológica en microscopio, el aislamiento por método de dilución seriada, el crecimiento en los fotobiorreactores con medio BBM y lo más importante, el posible uso biotecnológico de estas. Se inocularon 4 especies por separado junto con el hongo *Aspergillus parasiticus* (hongo patógeno), para observar si hubo influencia de los metabolitos secundarios de las microalgas sobre el hongo. Donde se observó que la especie *Chlorella*, retardó la germinación y el crecimiento del hongo en la cámara de Elisa. Por otro lado, *A. parasiticus* se vio beneficiado en el crecimiento por la especie *Tetraspora*.

Palabras clave — Bioprospección, microalgas, fotobiorreactor.

Abstract — In this article, shows a bioprospecting of some species of microalgae for diferents lakes of Neovolcanic Axis, which consisted of the collection, in microscopic morphological identification, isolation by dilution method, the growth in the photobioreactors medium BBM and most importantly, the potential biotechnological use of these. The 4 species were inoculated separately along with the fungus *Aspergillus parasiticus* (phytophatogen fungi), to see if there was influence of the microalgae on the fungus. Where it was noted that the species of *Chlorella*, delayed germination and the growth of the fungus in the Elisa's chamber. On the other hand, *A. parasiticus* benefited growth by species *Tetraspora*.

Keywords — Bioprospection, microalgae, photobioreactor.

I. INTRODUCCIÓN

Debido al gran avance y desarrollo de la bioquímica y biotecnología, el descubrimiento de nuevos productos alrededor del mundo para el beneficio humano a partir de microorganismos, además de la gran diversidad de microalgas en México y la poca investigación que existe sobre estas en nuestro país, no se puede descartar que algunas de las especies que existen puedan tener beneficios biotecnológicos, por lo que se optó por realizar una bioprospección de estos microorganismos fotosintéticos que habitan en una zona que aporta características específicas y por ende las microalgas presentan cualidades y metabolitos de interés.

Actualmente, las microalgas son utilizadas en diversas áreas de interés, como la energética (síntesis de biodiésel, biorrefinería), farmacéutica (extracción de lípidos), remediación de agua y en agricultura (producción de biofertilizantes), entre otras aplicaciones [1, 2].

II. MATERIALES Y MÉTODOS

- ✓ Fotobiorreactores
- ✓ Fotómetro C 214 de Hanna instruments
- ✓ Desecador
- ✓ Cámara de Elisa
- ✓ Medio BBM
- ✓ Microscopio óptico compuesto
- ✓ Cámara de Neubauer
- ✓ Matraces
- ✓ Autoclave
- ✓ Mecheros Bunsen

La bioprospección realizada se estableció por diferentes áreas o etapas:

En la primera etapa se realizó la preparación de medio BBM (4x) [3, 4] y se recolectaron las sepas del Eje Neovolcánico.

En la siguiente etapa se realizó un aislamiento de las cepas con el método de dilución seriada, y, a la par, se realizó una caracterización morfológica en el microscopio óptico a 40x y una guía de identificación dicotómica.

Una vez que la cepa se aisló, se fabrican los fotobiorreactores, los cuales constan de frascos de vidrio estériles con tapa de aproximadamente 1 litro, con una entrada de aire y una salida (diferentes) y una salida para toma de muestra, pero totalmente aislados del exterior.

Se inocularon las cepas de microalgas aislada en condiciones estériles y se colocó una fuente de luz cerca de los reactores.

Posteriormente cada día, se realizó un conteo de células en cámara de Neubauer, para observar el crecimiento.

Simultáneamente, se realizó una prueba de peso seco, por el método de filtración al vacío y secado, además de una prueba de Nitrógeno total por el método de ácido cromotrópico. En donde una digestión de persulfato convierte todas las formas de nitrógeno en nitrato. Entonces la reacción entre el nitrato y los reactivos originan una coloración amarilla en la muestra y, por último, también se realizó una prueba de fósforo total rango alto con una adaptación del método ácido Vanadomolibdofosfórico donde una digestión del persulfato convierte las formas orgánicas e inorgánicas condensadas de los fosfatos en ortofosfatos. A continuación la reacción entre los ortofosfatos y los reactivos originan una coloración amarilla en la muestra [5].

Una vez que las microalgas alcanzaron su máximo crecimiento, se filtró una muestra y el sobrenadante se utilizó para la prueba con el hongo patógeno, se inoculó el hongo *Aspergillus paraciticus* en cámara de Elisa, dejando dos controles (uno con BBM más el hongo y otro el hongo solo), en los otros pocillos se agrega el hongo más el sobrenadante

de la cepa elegida, se incubó en una estufa bacteriológica a 28 °C durante 24 horas (ver figura 3 en resultados).

Posteriormente, se realizó la siembra como en el paso anterior, sin embargo se sembró en cajas Petri para observar el crecimiento radial por día del hongo.

Nota: debido al tiempo de estancia, se dejó para futuras investigaciones.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la finalidad de observar el crecimiento de las microalgas se realizó una figura en donde se muestran las curvas de crecimiento de cada una de las cepas en los reactores (Ver figura 1), en donde se puede observar que la cepa con mayor crecimiento fue la *Oocystis*, por otro lado, la que presentó un menor crecimiento fue la especie *Tetraspora*

Es importante destacar que para realizar el conteo, se extraían muestras de los fotobiorreactores todos los días, esto pudo ser una razón por la cual el crecimiento no se dio en su máxima faceta, por la falta de nutrientes, por lo que se agregó más medio, sin embargo, cuando se realizó la prueba de peso seco nuevamente, se tenía un menor peso, ya que al agregar el medio, la concentración de células por mililitro disminuyó (ver tabla 1).

Por otro lado, los niveles de nitrógeno y fosforo iban en disminución, esto fue un indicio para agregar más medio y cuando se realizaron nuevamente las pruebas, los valores fueron más altos, lo cual es un dato lógico, ya que como se describe en la formulación de BBM [4], contiene nitrógeno y fósforo, nutrientes esenciales en el crecimiento de microalgas.

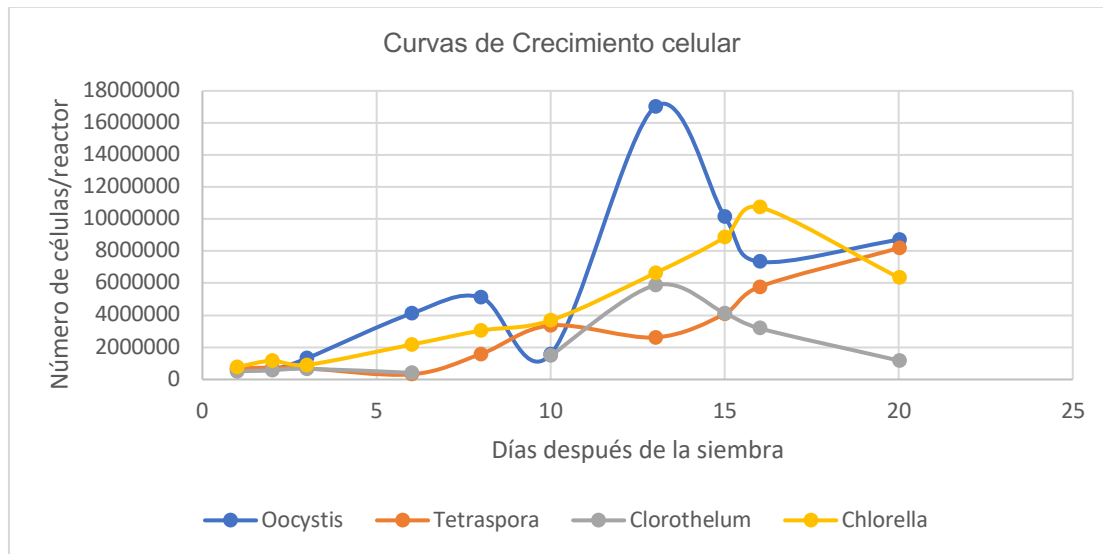


Figura 1. Curvas de crecimiento celular de las 4 especies de cepas aisladas

Tabla 1. Pruebas realizadas a las 4 cepas de microalgas (3 repeticiones, 1 por semana)

	Oocystis	Tetraspora	Clorothelum	Chlorella
Peso seco	0.002g, 0.01g, 0.003g	0.002g, 0.007g, 0.004g	0.002g, 0.002g, 0.004g	0.001g, 0.006g, 0.002g
Nitrógeno	43mg/L, ---, 89mg	23.5mg/L, ---, 25.5mg/L	23.5mg/L, ---, 25.5mg/L	23.5mg/L, ---, 21mg/L.
Fósforo	24.4mg/L, 11mg/L, 25mg/L	8.5mg/L, 1.9mg/L, ---	32.6mg/L, --- , >32.6mg/L	32.6mg/L, ---, >32.6mg/L

Nota: Se realizaron 3 mediciones de estos parámetros, una vez por semana, debido a que es un material costoso, aunque lo ideal, sería hacerlo a diario, para ver la relación con el crecimiento con mayor claridad. Las líneas punteadas fueron resultados erróneos.

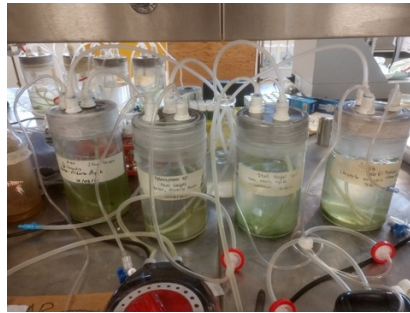
**Figura 2** Fotorreactores en funcionamiento, día 1.

Figura 3. Cámara de Elisa inoculada. (Todos los pocillos contienen medio para el hongo *A. parasiticus*). (1) Pocillos columna 1, Esporas (control). (2) Pocillos columna 2, BBM + Esporas (control 1). (3) Pocillos columna 3, esporas + Oocystis. (4) Pocillos columna 4, esporas + tetraspora. (5) Pocillos columna 5, esporas + Clorothelum. (6) Pocillos columna 6, esporas + Chlorella.

Se observa en la figura 3, que comparando los controles (columna 1 y 2) con la columna 3 y 4, el hongo *A. parasiticus* se vio beneficiado en crecimiento por las cepas presentes, por otro lado, el medio BBM (columna 2), no afecta o beneficia el crecimiento del hongo. En el caso de la cepa de *Clorothelium*, benefició ligeramente el crecimiento del hongo. Se ha visto que algunas especies de microalgas presentan propiedades antibacterianas, antifúngicas, antitumoral, entre otras más [6], esto se puede observar en la columna 6 que contiene *Chlorella*, se notó que el hongo presentó menor crecimiento que en la columna 1, por lo que se notó que el sobrenadante de la cepa *Chlorella* retarda o inhibe parcialmente a *A. parasiticus*, es decir presenta propiedades antifúngicas.

IV. CONCLUSIONES

En el proyecto se logró desarrollar un proceso de bioprospección en 4 cepas de microalgas, donde se descubrió que la que la *Chlorella* presenta propiedades antifúngicas, lo que representa un resultado importante para futuras investigaciones en el desarrollo de productos agrícolas antifúngicos o creación de fármacos.

Por otro lado, se observó que la cepa *Tetraspora* beneficia el crecimiento de *A. parasiticus*, sin embargo podría ser que también pudiera trabajar en simbiosis con algún hongo de interés biotecnológico.

V. RECONOCIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Aguascalientes, al comité organizador del 21º Verano de la Ciencia al Instituto Tecnológico Superior de Irapuato y a mi familia por las facilidades y el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano.

REFERENCIAS

- [1] Taylor and Francis group, *Biotechnological Applications of Microalgae*, Florida: Faizal Bux, 2013.
- [2] Á. d. P. Pérez, *Producción y valorización de biomasa de microalgas: un enfoque de biorrefinería*, Salamanca, España: Universidad de Salamanca, 2010.
- [3] H. C. Bischoff H. W and Bold, *Phycological studies*, Texas: University of Texas publications, 1963.
- [4] R. Andersen, «BBM,» de *Algal culturing techniques*, London, Elsevier academic press, 2005, p. 578.
- [5] Hanna Instrumets, «Manual de instrucciones fotómetro multiparámetro de sobremesa C214,» n/a, USA, 2012.
- [6] L. G. Luna, «Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos,» *Revista Cubana de Química*, vol. XIX, nº 2, p. 10, 2007.

Bioprospección de microalgas nativas del Eje Neovolcánico para determinar su potencial biotecnológico (B)

Lesly Noemi Flores Briano

Universidad Autónoma de Aguascalientes
Ingeniería Bioquímica
Av. Universidad No. 940
C.P. 20100, Aguascalientes, Ags.
leslyflores833@gmail.com

Asesor: Alberto Ayala Islas

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Ingeniería Bioquímica
Carr. Irapuato-Silao Km 12.5
C.P. 36821, Irapuato, Gto.
alayala@itesi.edu.mx

Resumen — En el siguiente trabajo se presenta la importancia del uso de las microalgas en el medio ambiente, así mismo el crecimiento celular de 4 cepas de microalgas obtenidas del Lago de Camécuaro ubicado en Michoacán, éstas fueron previamente aisladas e identificadas, al someterlas en medio BBM dentro de un fotobiorreactor los resultados fueron favorecedores respecto al crecimiento de las muestras al tratarse con dicho medio, así como su respectiva bioprospección al actuar como antifúngico contra el hongo *Aspergillus parasiticus* el cual es patógeno, tal fue el caso de la cepa de *Chlorella vulgaris*, en donde su capacidad antifúngica fue mayor en comparación a las otras 3 cepas tratadas.

Palabras clave — Microalgas, bioprospección, antifúngico, fotobiorreactor.

Abstract — This work presents the importance of the use of microalgae in the natural environment, likewise the cell growth of 4 strains of microalgae obtained from the Camécuaro Lake located in Michoacán, these were previously isolated and identified to the submit them in medium BBM within a photobioreactor, outcomes were flattering regarding the growth of the samples to be treated with such means, as well as their respective bioprospecting to act as antifungal against the fungus *Aspergillus parasiticus* the which is pathogenic, such was the case of the strain of *Chlorella Vulgaris*, where their antifungal capacity was higher in comparison to the other 3 treated strains.

Keywords — Microalgae, bioprospecting, antifungal, photobioreactor.

I. INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos de suma importancia tanto económica como ambiental para el ser humano pues han despertado un gran interés debido a su gran potencial de acción y rápido crecimiento. El término microalga está muy ligado al desarrollo biotecnológico; éste se refiere a aquellos microorganismos que contienen clorofila a y otros pigmentos fotosintéticos, capaces de realizar fotosíntesis oxigénica [1].

Estos microorganismos pueden estar presentes en diferentes medios naturales siempre y cuando se encuentre una temperatura adecuada, suficiente luz, diversos nutrientes, además de una fuente de carbono y, por supuesto, agua. Tienen la capacidad de crecer y hacer fotosíntesis tanto en condiciones autotróficas y heterotróficas, esta plasticidad metabólica les permite adaptarse a diferentes ecosistemas y procesos biotecnológicos, generando biomasa que puede ser usada en la producción de alimentos, concentrados, compuestos bioactivos, biocombustibles, en la biorremediación y producción de fertilizantes [2]. De aquí la importancia de la bioprospección, que se define como el aprovechamiento de los componentes naturales y organismos que se encuentran dentro en la biodiversidad, esta

actividad genera productos que tienen relación con industrias como la farmacéutica, la biotecnológica, la de agro insumos y la de medicina botánica; entre otras [3].

Dentro de los objetivos del estudio se encuentra la toma y manejo adecuados de las muestras en los lugares de interés, tal fue el caso de Yuridia, Cuitzeo, Lago de Camécuaro, y Zacapu, la identificación morfológica, el aislamiento de las microalgas, la realización de las curvas de crecimiento de estos microorganismos además de la ya mencionada bioprospección al someterlas contra un hongo patógeno.

II. METODOLOGÍA

A. Medio de cultivo BBM

Es un medio de cultivo con micro y macronutrientes minerales, éstos son: nitrato de sodio; cloruros de calcio y sodio; fosfatos de potasio y de magnesio, sulfato férrico; hidróxido de boro. Los micronutrientes son: sulfatos de zinc y de cobre; cloruro de manganeso; nitrato de cobalto y óxido de molibdeno). El medio carece de vitaminas y algunas concentraciones de trazas de metales son altas, este es un medio útil para muchas algas, sin embargo, la formulación no es adecuada para algas con requerimientos vitamínicos [4].

B. Técnica de dilución seriada

Este método se utiliza cuando la microalga que se desea aislar tiene un tamaño inferior a 10 μm de diámetro, además de ser útil para aislar las especies más abundantes de la muestra, consiste en tomar 1mL de la muestra original y agregar a un tubo de ensayo que contiene 9 mL de medio de cultivo estéril, se homogeniza y así sucesivamente con los demás tubos hasta la dilución requerida [5].

C. Conteo celular

El conteo celular se realiza para obtener las curvas de crecimiento con ayuda de una cámara de Neubauer, micropipeta y un microscopio óptico.

D. Determinación de peso seco

El peso seco total de la biomasa microalgal presente en un cultivo se determina usando muestras de volumen y concentración celular conocidos que se concentran en filtros de peso seco conocido y se secan en una estufa hasta peso constante. La cantidad de biomasa total presente en ese cultivo se calcula como la diferencia entre el peso inicial del filtro con la muestra [5].

E. Determinación de Nitrógeno

El método usado para la determinación de nitrógeno total rango alto es el del ácido cromatográfico. Una digestión de persulfato convierte todas las formas de nitrógeno en nitrato.

Entonces la reacción entre el nitrato y los reactivos origina una coloración amarilla en la muestra [6].

F. Medio de cultivo PDB

La elaboración del caldo de papa dextrosa es similar a la de PDA excepto que no se adicionó agar al medio, ya que se trata de un medio de cultivo líquido.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para observar el potencial de las microalgas se realizó una recolección en donde se tomaron muestras de los lugares Yuridia, Cuitzeo, Lago de Camécuaro y Zacapu, éstas se colocaron en tubos con medio BBM para su posterior tratamiento en el laboratorio.

En cuanto al aislamiento se realizó la técnica de dilución seriada con la muestra y medio BBM y se dejaron en incubación, sin embargo, solo se observó su morfología en el microscopio ya que, para su completo aislamiento e identificación, las muestras tienen que mantenerse en incubación para su correspondiente crecimiento celular mínimo dos meses, tiempo que no se pudo completar debido a que la estancia del proyecto de investigación consistió solo de 5 semanas. Fue por esta razón que se trabajó con 4 cepas ya aisladas e identificadas, las cuales se encontraban almacenadas dentro de la Institución además de que a éstas no se les había realizado ningún manejo posterior para observar su bioprospección.

Sin embargo, se tomaron varias muestras en proceso de aislamiento y se colocaron en el microscopio para observarlas, en la figura 1 se puede observar un ejemplo que, al compararlo con literatura es posible que se haya tratado de células de *Chlorella*, esta microalga, como se muestra en la figura 2, es esférica o sub esférica con un solo cloroplasto parietal que casi llena la célula, es común en aguas ricas en nutrientes, pero es fácilmente ignorada debido a su pequeño tamaño [7].

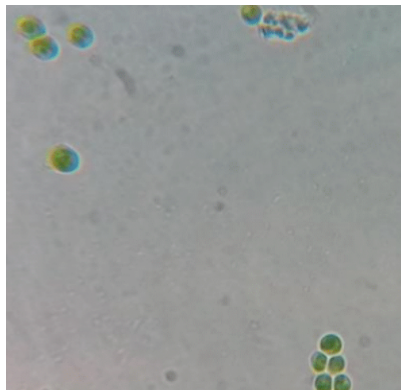


Figura 1. Vista desde el microscopio de una de las muestras tomadas.

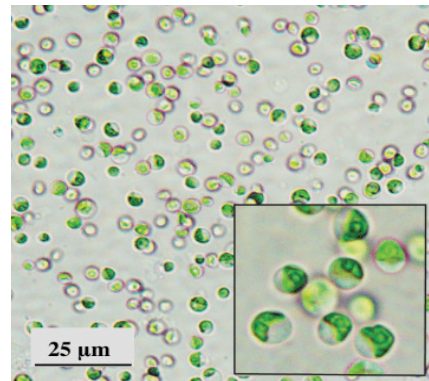


Figura 2. Morfología de *Chlorella* [7].



Figura 3. Fotobiorreactores con las cepas.

Como se observa en la figura 3, las 4 cepas tratadas se colocaron en fotobiorreactores con medio BBM para su crecimiento celular. En el reactor 6 se adicionó la cepa *Oocystis*, en el 10 se adicionó a *Tetraspora sp.*, en el 11 la cepa *Clorothelium* y por último en el 12 se adicionó la cepa *Chlorella vulgaris*. Como se puede observar en la gráfica 4, el crecimiento es favorecido con el medio y el reactor al realizar el conteo celular con la ayuda de la cámara de Neubauer, sin embargo, resultó un decremento en el número de células con forme pasaron los días. Para tener una mejor certeza en cuanto el crecimiento celular de las microalgas se realizó la técnica de peso seco (tabla 1) y una determinación de nitrógeno (tabla 2). Los resultados arrojaron que en efecto la falta de nitrógeno afectó en el número de células al disminuirse el crecimiento celular y al consumirse el medio. El nitrógeno es el nutriente más importante para las microalgas (después del carbono) y se incorpora como nitrato (NO_3^-) o como amonio (NH_4^+), es también un factor crítico para regular el contenido de lípidos de las microalgas [8]. Fue de esta manera que se preparó más medio y se adicionó a los reactores.

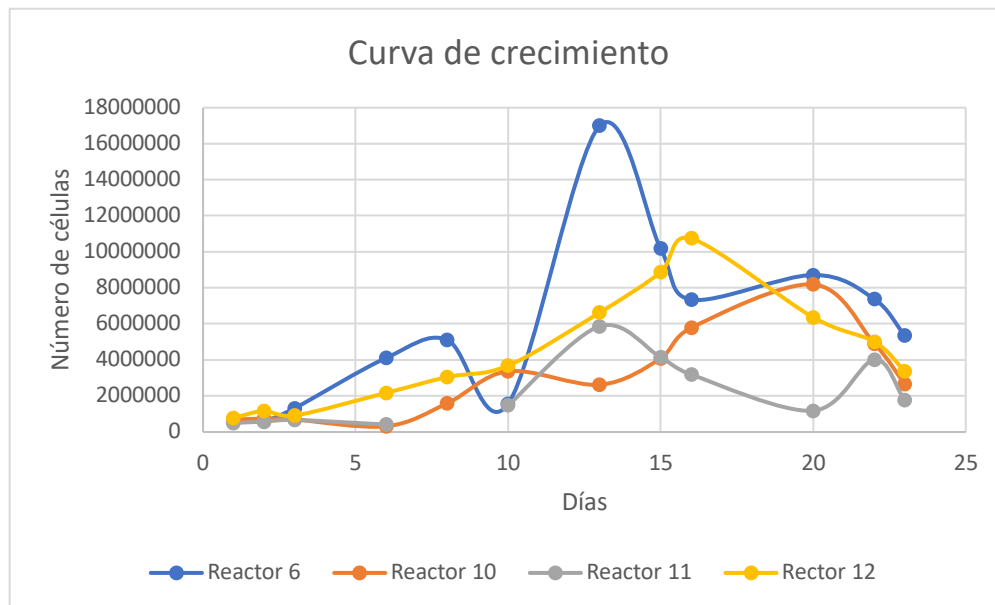


Figura 4. Curvas de crecimiento celular de las cepas.

Tabla 1. Determinación de peso seco.

Medición	Reactor 6	Reactor 10	Reactor 11	Reactor 12
1	0.002	0.002	0.002	0.001
2	0.01	0.007	0.002	0.006
3	0.003	0.005	0.004	0.002

Tabla 2. Determinación de nitrógeno.

Medición	Reactor 6	Reactor 10	Reactor 11	Reactor 12
1	89	23.5	23.5	23.5
2	43	49.5	25.5	21

En cuanto a la bioprospección, las cepas fueron sometidas contra un hongo patógeno el cual se trató de *Aspergillus parasiticus*, para esto, se utilizó una caja de Elisa en donde se preparó medio PDB, se inoculó el hongo y se adicionaron cada una de las 4 cepas con un antibiótico llamado Estreptopen para evitar contaminaciones no deseadas. Como se observa en la figura 5 hubo una germinación y esporulación en las cepas y los controles, sin embargo, en la cepa número 12 se analizó un aspecto interesante, pues se tardó más tiempo en crecer el hongo y hubo menos desarrollo en comparación a las otras 3, dicha cepa se trató se *Chlorella vulgaris*, este resultado demuestra que esta microalga puede ser de suma importancia para estudios posteriores y ser utilizado como antifúngico al ser sometido a una investigación más profunda. Cabe mencionar que *Chlorella vulgaris*, de acuerdo a la literatura tiene propiedades estimulantes sobre el crecimiento de células y microorganismos. De esta manera a partir de la clorofila extraída de diferentes especies de microalgas, se obtiene extracto con propiedades antisépticas y desinfectantes [1].

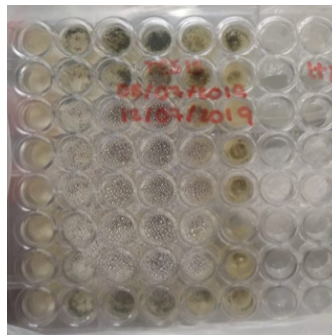


Figura 5. Placa de Elisa, las primeras dos columnas pertenecen a los controles sin las cepas,

IV. CONCLUSIONES

En este proyecto de investigación se dio a conocer que las microalgas resultan ser de suma importancia para el ser humano debido a su amplio campo de aplicación, en este caso se observó su crecimiento y su acción como antifúngico en donde los resultados obtenidos

arrojaron que *Chlorella vulgaris* tiene potencial para combatir al hongo patógeno *Aspergillus parasiticus*.

Se comprendió además que en la actualidad los aspectos que se buscan al desarrollar un producto o servicio son el aspecto económico y la sustentabilidad, es decir, que sea agradable con el medio ambiente, tal es el caso de las microalgas, de estas existe una gran diversidad con gran potencial de investigación además de que se pueden encontrar en una infinidad de zonas y en distintos lugares.

V. RECONOCIMIENTOS

Expreso mi más sincero agradecimiento a la Universidad Autónoma de Aguascalientes al Instituto Tecnológico Superior de Irapuato y al Investigador Alberto Ayala Islas por hacer la estancia más amena y agradable, así como a todas las personas involucradas en el proceso por las facilidades y el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano.

REFERENCIAS

- [1] L. L. M. Gómez, «Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos,» *Revista Cubana de Química*, vol. 19, nº 2, pp. 3, 10, 2007.
- [2] Y. Chisti, «Biodiesel from microalgae.,» *Biotechnology Advances*, vol. 25, nº 2, pp. 294-306, 2007.
- [3] K. Moran, S. King y T. Carlson, «Biodiversity Prospecting Lesson and Prospects,» *Annual Review of Anthropology*, vol. 30, pp. 505-526, 2001.
- [4] R. A. Andersen, *Algal Culturing Techniques*, London: Academic Press, 2005.
- [5] B. & V. D. Olivia, *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*, México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., 2007.
- [6] H. Instruments, «Fotómetro Multiparámetro de sobremesa para aplicación en tratamiento de aguas residuales,» Italia, 2002.
- [7] E. G. Bellinger y D. C. Sigeo, *Freshwater algae*, USA: Wiley Blackwell, 2015.
- [8] A. Hernández Pérez y J. I. Labbe, «Microalgas, cultivo y beneficios,» *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, vol. 49, nº 2, p. 160, 2014.

Búsqueda de cepas sexualmente compatibles de *Ustilago maydis* con potencial para la producción de huitlacoche (A)

Alan Daniel Tovar Chávez

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Campus aeropuerto
Carr. a Chichimequillas s/n C.P. 76140,
Querétaro, Qro
dan_6198@hotmail.com

Asesor: José Antonio Cervantes Chávez

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Campus aeropuerto
Carr. a Chichimequillas s/n C.P. 76140,
Querétaro, Qro
cervanteschavez@gmail.com

Resumen — *Ustilago maydis* es un hongo fitopatógeno que afecta plantas de maíz (*Zea mays*), causa tumores oscuros conocidos como "huitlacoche", los cuales tienen un alto valor en la gastronomía mexicana. El proceso natural de infección de *U. maydis* es complejo, por lo que la producción de huitlacoche en cultivos de maíz es mínima. En este proyecto se plantea encontrar cepas de *U. maydis* sexualmente compatibles que tengan el potencial de generar infección en *Z. mays*. Para ello, se maceran tumores silvestres de *U. maydis*, se aislaron 30 cepas distintas y se induce un apareamiento entre ellas para comprobar su compatibilidad sexual. Se obtuvieron cinco cepas compatibles, las cuales tienen el potencial de infectar *Z. mays* y producir huitlacoche.

Palabras clave — *Ustilago maydis*, apareamiento, huitlacoche, cepas compatibles.

Abstract — *Ustilago maydis* is a phytopathogenic fungus that affects corn plants (*Zea mays*), causes dark tumors known as "huitlacoche", which have a high value in Mexican gastronomy. The natural process of infection of *U. maydis* is complex, so the production of huitlacoche in corn crops is minimal. This project proposes to find sexually compatible strains of *U. maydis* that have the potential to generate infection in *Z. mays*. For this, wild tumors of *U. maydis* are macerated, 30 different strains were isolated and mating is induced between them to check their sexual compatibility. Five compatible strains were obtained, which have the potential to infect *Z. mays* and produce huitlacoche.

Keywords — *Ustilago maydis*, mating, huitlacoche, compatible strains.

I. INTRODUCCIÓN

Ustilago maydis es un hongo basidiomiceto fitopatógeno que produce enfermedad en plantas de maíz (*Zea mays*), la enfermedad se caracteriza por generar tumores oscuros en diferentes zonas de la planta, comúnmente se le conoce a estos tumores como "huitlacoche" [1]. Aunque *U. maydis* infecta plantas de gran valor económico, no es considerado un problema en la producción de maíz, ya que generalmente sólo infecta del 1 al 5% de un cultivo. Por el contrario, el maíz infectado con *U. maydis* representa una ganancia económica para los agricultores [2], porque el huitlacoche es un hongo con un alto valor gastronómico para los mexicanos ya que se consume desde el México precolombino; actualmente existe una gran cantidad de platillos típicos elaborados a base de huitlacoche. [2-3]

Para que se desarrolle el huitlacoche en la planta de maíz, se debe cumplir el ciclo de vida de *U. maydis*, el cual comienza con la germinación de las teliosporas que se encuentran en el ambiente, la germinación da lugar a células haploides levaduriformes.

Para que se dé la infección, un par de células haploides de sexos opuestos deben encontrarse en la superficie de la planta y muy cerca una de la otra. Ambas células se aparearán sexualmente para generar una célula diploide, en esta parte del ciclo, *U. maydis* cambia su morfología a un hongo filamentoso, por lo que desarrolla hifas que tienen la capacidad de infectar a la planta de maíz y posteriormente generar tumores en las zonas aéreas de la planta. [4]

En este proyecto, se pretende aislar diferentes cepas de *U. maydis* a partir de tumores silvestres, realizar una serie de apareamientos entre las cepas aisladas, con el fin de encontrar células haploides sexualmente compatibles que tengan el potencial de infectar plantas de maíz y producir huitlacoche.

II. MATERIALES Y MÉTODO

A. Germinación de teliosporas de *U. maydis*

El huitlacoche se obtiene a partir de plantas de maíz infectadas con *Ustilago maydis*. En condiciones de esterilidad, el huitlacoche se macera en un mortero estéril con 5 ml de agua destilada, posteriormente el macerado se filtra con ayuda de un embudo y una tela tipo magitel, el líquido se recupera en un tubo cónico de 50 ml y se somete a centrifugación a 3500 rpm por 5 minutos. A continuación el contenido es decantado lentamente con cuidado de no perder la pastilla, ésta se resuspende en 5 ml de agua destilada y se agita con vortex. Se toman 20 μ l de esta solución, se colocan en un porta objetos y se observa al microscopio en busca de teliosporas de *U. maydis*. Al tubo cónico se le añaden 5 ml de solución de sulfato cúprico 3%, 100 μ l de carbenicilina (100 mg/ml) y 200 μ l de kanamicina (50 mg/ml) y se incuba con agitación de 120 rpm a 28° C durante 2 horas. Una vez terminada la incubación, se centrifuga el tubo a 3500rpm por 5 minutos. El contenido se decanta sin perder la pastilla de células y se agregan 10 ml de agua destilada y se mezcla con vortex. Posteriormente se centrifuga una vez más a 3500rpm por 5 minutos, el contenido se decanta sin perder la pastilla, ésta se resuspende en 1 ml de agua destilada y se mezcla con vortex. A partir del concentrado de teliosporas obtenido se realiza una dilución 1:10 y 1:100, ambas diluciones y el concentrado se siembran en cajas de Petri con medio completo (MC) adicionado con kanamicina, carbenicilina y 0.5% de tritón 100-X mediante sembrado masivo. Las cajas se incuban a 28°C durante 48 a 72 horas.

B. Aislamiento de *U. maydis*

De las colonias que crecieron, se pica una con un palillo estéril y se disuelve en 20 μ l de agua destilada en un portaobjetos con el fin observar al microscopio la presencia de *U. maydis*. Posteriormente, con un palillo estéril, se recuperan 10 colonias de *U. maydis* y se deposita en un tubo cónico de 50 ml que contenga 10 ml de agua destilada. Este proceso de recolecta de colonias se repite de 10 a 15 veces para recolectar de 100 a 150 colonias de *U. maydis*. El tubo donde se colocaron los palillos se mezcla con vortex durante 1 minuto y se realiza una dilución 1:10. A partir de la dilución, se hace un estriado masivo con 150 μ l y 250 μ l en cajas de Petri con medio completo adicionado con kanamicina y carbenicilina (50mg/ml), las cajas se incuban a 28°C por 24 a 48 horas.

De las colonias que crecieron, se recuperan 30 y se siembre una pequeña estría de cada una de ellas en una caja de Petri con medio completo. La caja se incuba a 28°C por 24 a 48 horas. De las 30 colonias aisladas, se hace una réplica de ellas en tubos cónicos de 1.5ml con 1 ml de MC líquido.

C. *Apareamiento de cepas de U. maydis*

A partir de las 30 colonias en MC líquido, se realiza una prueba fuzz, esta reacción fue descrita por Banuett en 1995 [5] donde se induce un apareamiento entre diferentes cepas de *U. maydis* en medio de cultivo con carbón activado, las colonias que se reproducen sexualmente tienen un aspecto algodonoso, y de color blanco; las colonias que se reproducen asexualmente tienen un aspecto cremoso, brillante y de color gris. En este paso se descartan a todas aquellas colonias que se aparean por sí solas. Para ello, se toman 5 µl de cada colonia y se colocan ordenadamente en una caja de Petri con MC adicionado con 1% de carbón activado. Como control negativo se utiliza el apareamiento de las cepas silvestres FB1 y FB2.

Una vez descartadas todas colonias que se aparean por si solas, se realiza el apareamiento al azar de las colonias aisladas. Para ello se coloca una gota de 5µl de una colonia en una caja de Petri con MC más 1% de carbón activado; se espera a que se seque la gota y a continuación se colocan 5µl de otra colonia encima de la primera. Como control positivo se utiliza el apareamiento de las cepas silvestres FB1 y FB2.

D. *Preparación de cepas para cepario*

Las colonias que mostraron una reacción fuzz positiva en el apareamiento al azar, se crecen en 5ml de MC líquido con 200µl de ampicilina, se incuba con agitación por 24 hrs a 28°C. Los crecimientos se observan al microscopio para confirmar la presencia de *U. maydis* y la ausencia de bacterias. A continuación se coloca en tubos cónicos de 1.5ml, 500µl de glicerol y 1 ml de las células preparadas anteriormente. Se rotulan los tubos y se agitan en vortex durante 1 minuto. Rápidamente se meten a un ultracongelador y se almacenan a -80°C.

III. RESULTADOS

A partir de las 30 cepas aisladas, se realizó la reacción fuzz sin inducir ningún apareamiento, es decir, se sembraron las 30 cepas independientemente en MC adicionado con carbón activado 1%. Se utilizó como control negativo el apareamiento de las cepas silvestres FB1 con FB2. Ninguna de las cepas aisladas fue fuzz positivo (Fig 1), por lo tanto, no se descartó ninguna cepa.

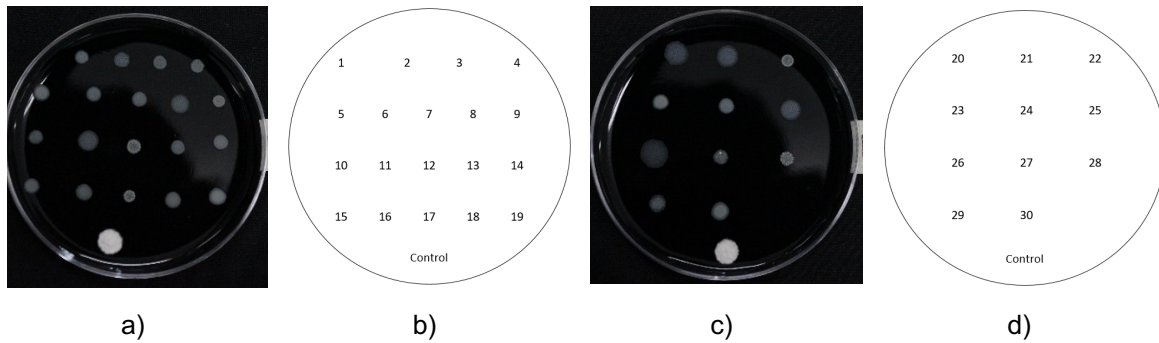


Figura 1. Reacción fuzz sin inducir apareamiento y representación del orden de las cepas. A) reacción fuzz cepas 1 a 19. B) orden de las cepas 1 a 19. C) reacción fuzz cepas 20 a 30. D) orden de las cepas 20 a 30.

Una vez que se comprobó que las cepas no se aparean entre sí mismas, se procedió a realizar una serie de apareamientos ordenado y al azar entre las diferentes cepas aisladas (Fig. 2). Para lograr que los apareamientos fueran ordenados, se colocaron 25 apareamientos por cada caja de Petri, donde cada columna y cada fila correspondían a una cepa diferente (Fig. 3). Se utilizó como control positivo el apareamiento de las cepas silvestres FB1 con FB2.

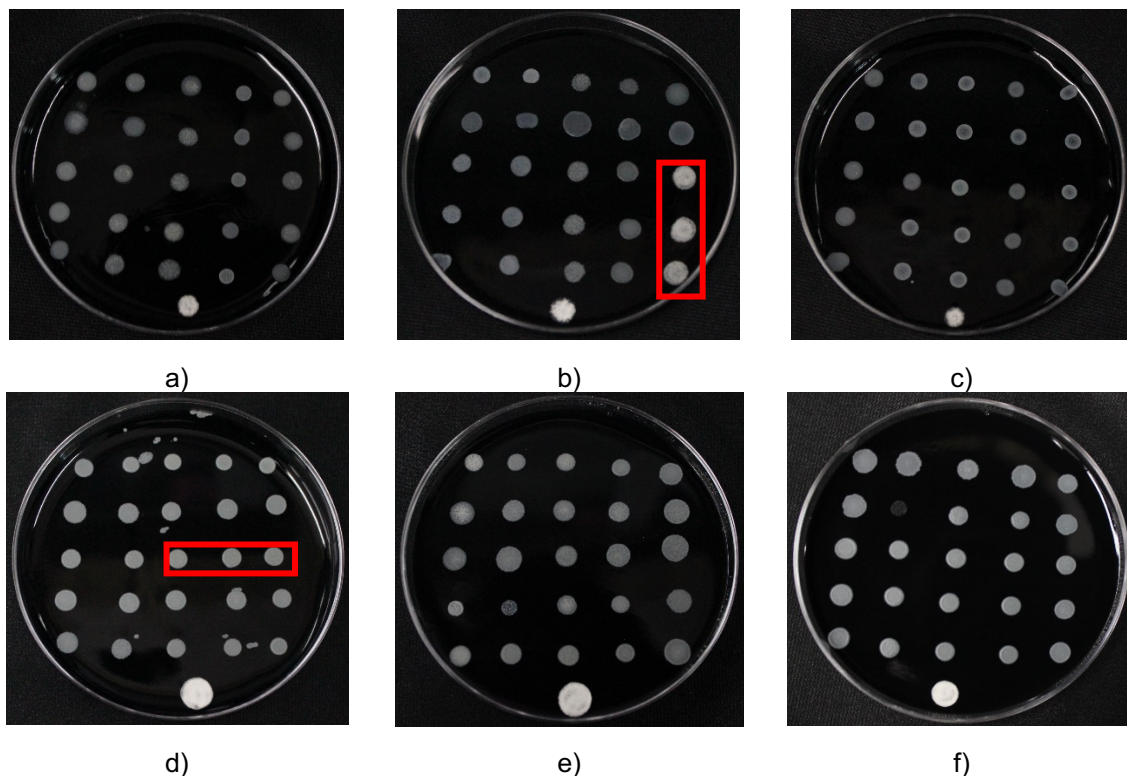


Figura 2. Reacción fuzz del apareamiento al azar de las cepas aisladas. A) Apareamiento entre cepas 1 a 10. B) Apareamiento entre cepas 11 a 20. C) Apareamiento entre cepas 21 a 30. D) Apareamiento entre cepas 1 a 5 y 11 a 15. E) Apareamiento entre cepas 6 a 10 y 16 a 20. F) Apareamiento entre cepas 11 a 15 y 21 a 25. En rojo se marca los apareamientos positivos.

Finalmente se observó que hubo apareamientos exitosos entre las cepas 13, 14 y 15 con la cepa 20, también se observó un apareamiento exitoso, 13,14 y 15 con la cepa 3, como se muestra en las figuras 2 y 3.

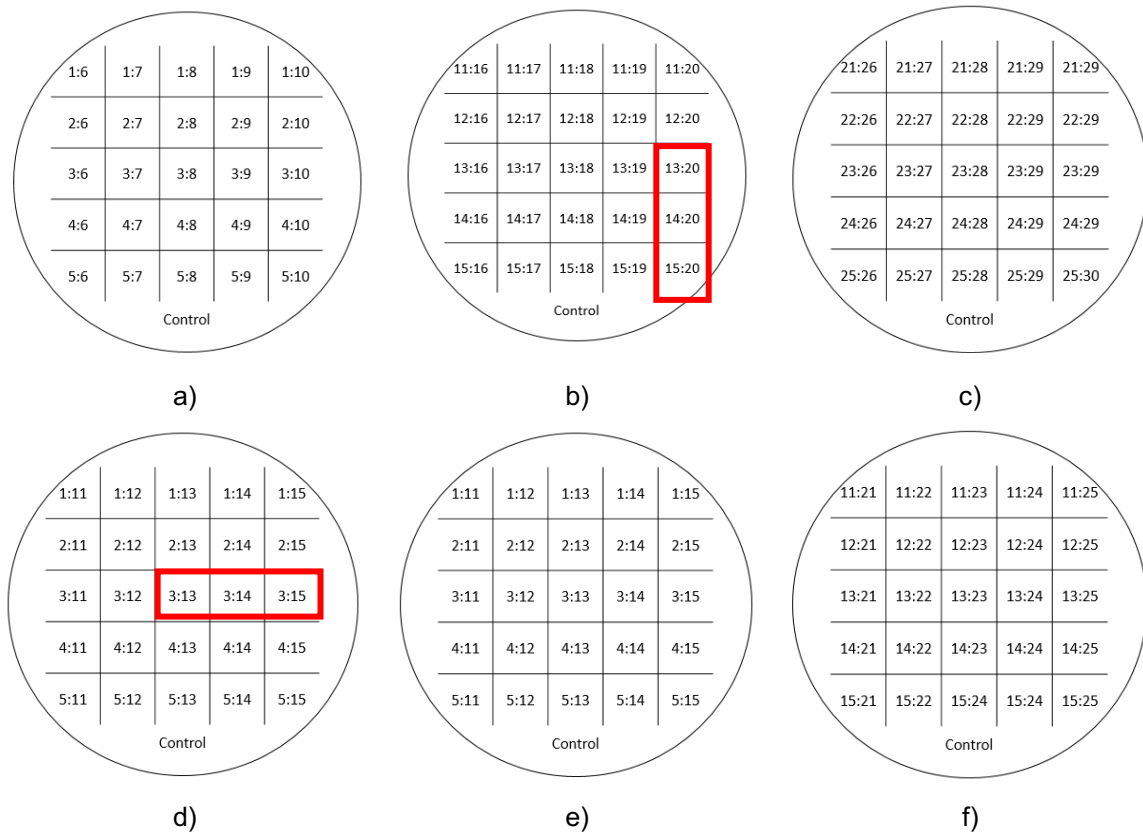


Figura 3. Representación gráfica de los apareamientos realizados. A) Apareamiento entre cepas 1 a 10. B) Apareamiento entre cepas 11 a 20. C) Apareamiento entre cepas 21 a 30. D) Apareamiento entre cepas 1 a 5 y 11 a 15. E) Apareamiento entre cepas 6 a 10 y 16 a 20. F) Apareamiento entre cepas 11 a 15 y 21 a 25. En rojo se marca los apareamientos positivos.

IV. DISCUSIÓN

Se realizaron un total de 150 apareamientos diferentes a partir de las 30 cepas aisladas, sin embargo únicamente se recuperaron 5 cepas sexualmente compatibles. Esto es dado porque *U. maydis* tiene mecanismos moleculares para regular la compatibilidad sexual.

La compatibilidad sexual es controlada por dos *loci*: *a* y *b*. El locus *a* tiene dos alelos, *a1* y *a2*, que codifican para una feromona *mfa* y un receptor de feromonas *pra*; ambos son esenciales para el apareamiento entre células haploides. Mientras que el locus *b* es multialélico y posee a los genes *bE* y *bW* que son traducidos una vez que se genera la célula dicariótica y son reguladores transcripcionales que controlan la patogenicidad de la forma filamentosa de *U. maydis*. [1,6].

La presencia de dos alelos diferentes para el locus *a* y el hecho de que el locus *b* sea multialélico, amplía la cantidad de sexos existentes para *U. maydis*, lo que provoca que sea más complicado encontrar cepas sexualmente compatibles que tengan el potencial de generar infección en plantas.

V. CONCLUSIONES

Los mecanismos moleculares que regulan la reproducción sexual de *U. maydis* son muy eficientes, esto dificulta la búsqueda de cepas sexualmente compatibles. Se realizaron 150 apareamientos al azar y únicamente se observaron 6 reacciones fuzz positivas, sin embargo únicamente se recuperaron 5 cepas compatibles debido a que en los apareamientos hubo coincidencias en las cepas fuzz positivas, es decir, la cepa 13, 14 y 15 se aparearon tanto con la cepa 3 como con la 20.

A partir de las 5 cepas almacenadas, en un futuro, se puede realizar un experimento para determinar el sexo al que pertenece cada cepa, y diferentes proyectos para determinar cuál es el apareamiento más eficaz al infectar *Z. mays*, y cuál es el más virulento; esto con el fin de determinar las cepas más óptimas para la producción de huitlacoche.

VI. AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Querétaro por facilitar las instalaciones correspondientes para la elaboración de este proyecto y al Dr. José Antonio Cervantes Chávez, por haber guiado esta investigación.

REFERENCIAS

- [1] M. Jimenez. *Análisis de la diversidad genética de Ustilago maydis en la República Mexicana*. [Tesis de doctorado]. Instituto Politécnico Nacional, Raynosa, Tamaulipas, 2016.
- [2] J. Ruiz-Herrera. "Ustilago maydis: ascenso de un hongo mexicano de la gastronomía local al mundo científico" *Revista Electrónica Nova Scientia* 0705. pp:118-135, 2008.
- [3] M. Juárez-Montiel, S. Ruiloba, G. Chávez-Camarillo *et al.* "Huitlacoche (corn smut), caused by the phytopathogenic fungus Ustilago maydis, as a functional food" *Revista Iberoamericana de Micología*. Volume 28, 2011, pp 69-73. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.riam.2011.01.001> [consultado en 2019]
- [4] M. Feldbrügge, J. Kämper, G. Steinberg, & R. Kahmann.. "Regulation of mating and pathogenic development in Ustilago maydis." *Current Opinion in Microbiology*, 7(6), 666–672. 2004. Disponible en <https://doi:10.1016/j.mib.2004.10.006> [consultado en 2019]
- [5] Banuett F. (1995) Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors un maize. *Annual Review Genetics*, 29: 179-208
- [6] Y. Zhang, Y. Yin, P. Hu, *et al.* "Mating-type loci of Ustilago esculenta are essential for mating and development" *Fungal Genetics and Biology* Volume 125, 2019, Pages 60-70. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.01.008> [consultado en 2019]

Búsqueda de cepas sexualmente compatibles de *Ustilago maydis* con potencial para la producción de huitlacoche (B)

Alejandro Javier Maciel Carrera
Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Carrera Ingeniería Bioquímica
Irapuato-Silao Km 32.5
C.P.36821, Irapuato, Gto.
macielalejandro23@gmail.com

Asesor: José Antonio Cervantes Chávez
Universidad Autónoma De Querétaro
Facultad de Ciencias de la vida-Campus
Aeropuerto
Carr. a Chichimequillas s/n
C.P. 76140, Querétaro, Qro.
cervanteschavez@gmail.com

Resumen — En este trabajo se muestra el método utilizado para la obtención de cepas sexualmente compatibles del hongo *Ustilago maydis*, así como también el método adecuado para inocular el maíz, y poder así producir huitlacoche.

Palabras clave — *Cepas sexualmente compatibles, Ustilago maydis*

Abstract — This work shows the method used to obtain sexually compatible strains of the *Ustilago maydis* fungus, as well as the appropriate method to inoculate corn, and obtain huitlacoche.

Keywords — *sexually compatible strains, Ustilago maydis*

I. INTRODUCCIÓN

El huitlacoche es producido por *Ustilago maydis*, es un hongo que infecta a las plantas del maíz. En la parte central de México y algunos países de primer mundo, es considerado un delicatessen. En otros países es simplemente una enfermedad en el maíz por lo tanto se desecha.

Su naturaleza como infección fúngica fue reconocida solo hasta la segunda mitad del siglo XIX. *U. maydis* se introdujo a los laboratorios de investigación a principios del Siglo XX, convirtiéndose en un modelo clásico para el estudio de las bases de la patogénesis fúngica en plantas, de la especificidad en el apareamiento y de la recombinación genética, entre otras.

Existen diversos factores que favorecen el desarrollo del hongo *U. maydis*, como la temperatura, la humedad relativa y el material genético. La gran mayoría de las variedades de maíz presentan algún grado de resistencia al ataque del hongo, siendo las variedades de maíz dulce las más susceptibles a esta enfermedad (Pataky, 1995).

II. MARCO TEÓRICO

Se sabe que el maíz se domesticó en la parte central de México. Aunque las fechas de este proceso son aún discutibles, lo más probable es que el proceso se inició hace 9000 años, a.c., según datos obtenidos de material recogido en la cuenca del río Balsas. Las muestras más antiguas de maíz (de hace 6250 años) han sido encontradas en la cueva Guila Naquitz del Valle de Oaxaca. Pero el proceso debió haber sido lento hasta poder obtener variedades autóctonas semejantes a las actuales referencias.

La enfermedad del huitlacoche es causada por el hongo, *Ustilago maydis*, que es un basidiomiceto del grupo de los Ustilaginales. Los Ustilaginales constituyen un importante grupo de hongos fitopatógenos con más de 50 géneros y 1200 especies, que infectan a más de 4000 plantas monocotiledóneas divididas en 75 familias en todo el mundo (Herrera, 2014).

Se sabe que el huitlacoche fue introducido en Europa por los españoles (probablemente en forma accidental con maíz infectado), pero durante siglos se pensó que la enfermedad era debida a una alteración fisiológica de la planta. No fue sino hasta 1836 que Unger identificó al huitlacoche como la infección por un hongo al que llamó *Ustilago zaeae*; y en 1883-1895 Brefeld logró la infección experimental del maíz con esporas del hongo; pero no fue sino hasta 1927 que se conoció su ciclo de vida al descubrirse su estado sexual. Su nombre fue oficialmente cambiado a *U. maydis* (De Candolle, Corda) por Stevenson y Johnson en los Estados Unidos (Christensen, 1963).

U. maydis no es un parásito obligado, pero requiere de uno de sus dos hospederos naturales para realizar su ciclo sexual. Solamente los dicariones y los diploides son infecciosos, lo que muestra la interrelación entre los aspectos de sexualidad, morfogénesis y patogénesis, y revela la complejidad de los tres procesos. (Ruiz-Herrera et al. 2000).

Durante el ciclo de vida de *U. maydis* se distinguen dos fases. Una de ellas es saprofítica, durante la cual el hongo crece en forma de levaduras haploides alargadas que se reproducen por gemación (también llamadas esporidias). La gema aparece en la zona de máxima curvatura formando un ángulo de 30-45º grados con respecto a la célula madre. La gemación bipolar es común en contraste con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *U. maydis* no es un colonizador eficiente de nichos naturales, ya que el rango de las fuentes de carbono que puede utilizar es muy restringido (Caltrider y Gottlieb, 1965).

III. METODOLOGÍA

El método utilizado para obtener las cepas sexualmente compatibles cuenta de los siguientes pasos, en el cual los tumores que se obtuvieron de las plantas de maíz infectado se identificaron como (14,15,16,17, C.C.A y C.C.B) (Fig. 1)

Las cuales son molidas en un mortero estéril, adicionando 5 ml de agua destilada esto se realiza en condiciones estériles. Después el *U. maydis* molido se vertió aun tubo cónico de 50 ml para enseguida pasar a una centrifuga a 3500 rpm durante 5 minutos, se decantó sin perder la pastilla y se adiciono 5 ml de agua destilada estéril aplicando vortex para homogeneizar y ver al microscopio las teliosporas, posteriormente se agregó 5 ml de sulfato cúprico, se adicionaron 100 µl de carbanecilina, 200 µl de kanamicina y se incubo a 28°C durante 2 horas a 120 rpm. Se centrifugo a 3500 rpm durante 5 minutos, se decantó sin perder la pastilla y se agregó 10 ml de agua destilada estéril aplicando vortex para homogenizar Nuevamente se centrifugó, se decantó y se resuspendió en 1 ml de agua destilada estéril. Para la 14, 15 y 16 se realizaron diluciones de (1:10) y (1:100) (en tubos eppendorf) por que se encontraban con una concentración más grande de teliosporas, 200 µl de la suspensión de teliosporas fueron esparcidas con perlas de vidrio estériles en cajas de Petri con medio de cultivo adicionado de antibióticos kanamicina (200 ul, 50 mg/ml, para

50 ml de medio), carbenicilina (100 μ l, 100 mg/ml para 50 ml de medio), 0.5 % tritón X-100. El *U. maydis* de la 17, C.C.A y C.C.B se trabajó sin diluciones, 200 μ l de la suspensión de teliosporas fueron esparcidas con perlas de vidrio estériles en cajas de Petri con medio de cultivo adicionado de antibióticos kanamicina (200 μ l, 50 mg/ml, para 50 ml de medio), carbenicilina (100 μ l, 100 mg/ml para 50 ml de medio), 0.5 % tritón X-100.

Nota: el medio de cultivo o MC cuando se encuentre a un aproximado de 60°C o su consistencia sea líquida se agrega el antibiótico y el tritón para después verter en cajas Petri.

Las cajas se incubaron a 28° C y se observó el crecimiento de colonias de *U. maydis*.

Nota: con los tumores identificados como 14, 15, 16 y C.C.A no se siguió el siguiente procedimiento ya que al momento de observar al microscopio se identificaban otros microorganismos no deseados.

Con palillos estériles se recuperaron 100 colonias que fueron puestas en un tubo cónico de 50 ml, adicionando 10 ml de agua destilada estéril, los cuales se agitan por medio de un vortex durante un minuto esto para obtener un concentrado único de células de *Ustilago maydis*. Se realizó una dilución de (1:10) y se inocularon en cajas Petri con M.C con carbenicilina y kanamicina (50 mg/ml) y fueron incubadas a 28° C durante 24 a 48 horas. Con palillos estériles se tomaron 30 colonias de la caja Petri anteriormente sacadas de incubar y se recuperaron en una caja Petri con divisiones (como se muestra en la Fig. 2), se mete a incubar a 28°C durante 24 h. Después de que las 30 colonias crecieran se inocularon en tubos eppendorf de 2 ml con 1 ml de M.C líquido para después sembrar estas colonias en M.C con carbón activado al 1%. Se incubaron a temperatura ambiente durante 24 o 36 h. Aquellas colonias con aspecto blanquecino indica que son diploides (Reacción Fuzz positiva, esas ya no se usarán). Las que crecen grises son reacción fuzz negativa, con esas se hacen combinaciones tomando 5 μ l de las 30 cepas colocándola en la caja Petri con M.C adicionadas de carbón activado al 1%, Dejando que esta gota se seque para colocar en esa misma gota 5 μ l de una de las 30 cepas. Una vez secas las gotas, las cajas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 24 o 36 horas. Se inoculan en un tubo eppendorf adicionando glicerol sin dejar de agitar y de inmediato meter al supercongelador.



Fig. 1 Tumor producido por *Ustilago maydis* "Huitlacoche"

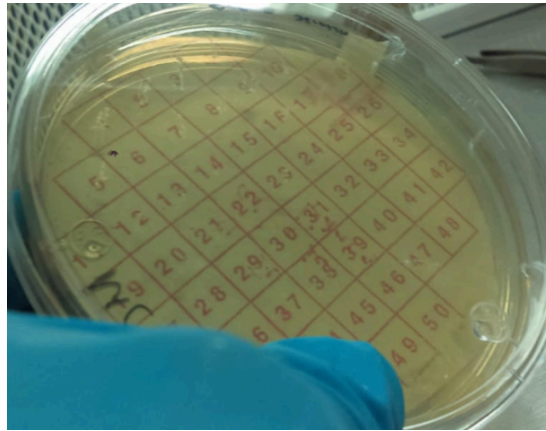


Fig. 2 Se sembraron solo 30 colonias

IV. RESULTADOS

Se realizaron combinaciones de las reacciones Fuzz negativas para el tumor C.C.B fueron 165 combinaciones y 150 combinaciones para el tumor 17, en el cual, nuestro tumor C.C.B no se encontraron ningunas cepas compatibles sexualmente y en nuestro tumor 17 se encontraron 6 cepas sexualmente compatibles. (Ver Tabla 1 y Fig. 3)

Tabla 1 Esta tabla nos muestra las combinaciones de cepas sexualmente compatibles que se podrán utilizar para la producción de huitlacoche.

3	13
	14
	15
20	13
	14
	15

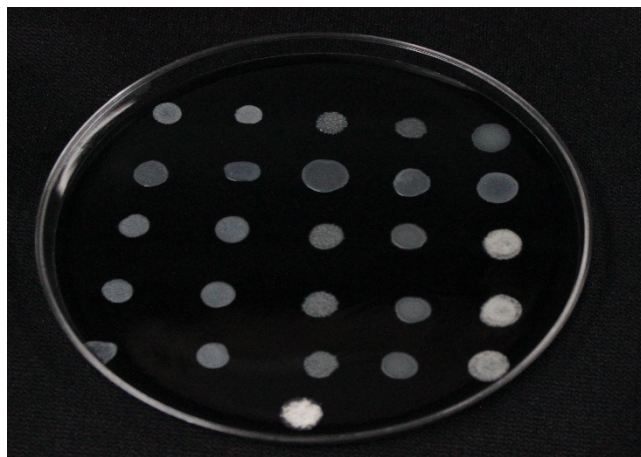


Fig. 3 Combinación de la cepa 20 con las cepas 13, 14 y 15.

V. ANALISIS DE RESULTADOS

Con estos resultados podemos llegar a saber que las cepas clasificadas como 20 y 3 sexualmente compatibles con las cepas 13, 14 y 15 cuentan con diferentes alelos a que pueden fusionarse y la compatibilidad de locus b controla el crecimiento filamentosos y la patogenicidad de *Ustilago maydis* independientemente del locus a.

VI. CONCLUSIÓN

Se concluye que es una investigación capaz de ayudar a crecer el nivel económico de las personas que manejan sembradíos de maíz, ya que se sabe que el huitlacoche tiene un valor mayor en el mercado que la mazorca.

VII. RECONOCIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Querétaro, al Dr. José Antonio Cervantes Chávez por aceptarme en esta estancia de verano y a las personas encargadas del verano de la ciencia, en especial a mis papás que me brindaron su apoyo.

REFERENCIAS

- [1] Pataky, J. K.; Nankam, C. and Kerns, M. R. 1995. Evaluation of a silkinoculation technique to differentiate reactions of sweet corn hybrids to common smut. *Phytopathology*.
- [2] Herrera, J. R. (2014). *Ustilago maydis*: ascenso de un hongo mexicano de la gastronomía local al mundo científico. *Nova Scientia*.
- [3] Christensen, J. J. (1963). Corn smut caused by *Ustilago maydis*. Monograph No. 2. American Phytopathological Society
- [4] Ruiz-Herrera, J., León-Ramírez, C., Cabrera-Ponce, J. L., Martínez-Espinoza, A. D. y Herrera-Estrella, L. (1999). Completion of the sexual cycle and demonstration of genetic recombination in *Ustilago maydis* in vitro. *Mol. Gen. Genet*.
- [5] Caltrider, P. G. y Gottlieb, D. (1965). Effect of sugar on germination and metabolism of *Ustilago maydis*. *Phytopathology*

Cambios morfológicos en embriones de *Echinocactus platyacanthus* bajo diferentes tratamientos germinativos

José Emmanuel Martínez Cortés

Universidad de Guanajuato
División de Ciencias Naturales y exactas
Notaria Alta s/n, C.P. 36050 Guanajuato, Gto.
je.martinezcortes@ugto.mx

Asesor: Francisco Alejo Iturvide

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Silao-Irapuato km 12.5
El Copal, 36821 Irapuato, Gto.
fralejo04@gmail.com

Resumen — En la investigación llevada a cabo se emplearon semillas de la especie *Echinocactus platyacanthus*. Las semillas fueron sometidas a seis tratamientos distintos (empleando diez semillas por tratamiento): un control, temperatura baja, inmersión en ácido sulfúrico al 50%, en agua a temperatura de 50–55°C, inmersión en ácido giberélico y escarificación mecánica. El objetivo ha sido determinar un método óptimo para disminuir el tiempo de germinación y, a su vez, favorecer la propagación y conservación de la especie. Finalmente, se realizó el análisis estadístico ANOVA junto con la prueba de Turkey, comparando las medias de cada tratamiento mediante el software Minitab 17. El ácido giberélico resultó ser el tratamiento más efectivo poseyendo el porcentaje de germinación más alto (50%).

Palabras clave — *Echinocactus platyacanthus*, latencia, germinación.

Abstract — In the investigation carried out, were employed seeds from the specie *Echinocactus platyacanthus*. These seeds were subjected to six different treatments (using ten seeds per treatment): a control, low temperature, immersion in sulfuric acid at 50%, in water at a temperature of 50–55 ° C, immersion in gibberellic acid and mechanical scarification. The objective has been to determine an optimal method to reduce germination time and, in turn, favor the propagation and conservation of the specie. Finally, the ANOVA statistical analysis was performed together with the Turkey test, comparing the means of each treatment using the Minitab 17 software. Gibberellic acid proved to be the most effective treatment with the highest germination percentage (50%).

Keywords — *Echinocactus platyacanthus*, latency, germination.

I. INTRODUCCIÓN

A. *Echinocactus platyacanthus*, una especie amenazada

Echinocactus platyacanthus es una especie endémica de México (Arias S, 2005) y está catalogada como protegida bajo la NOM-059 (NOM-059-ECOL-2001).

El incremento de la actividad humana en zonas áridas, hábitat de la especie *E. platyacanthus*, ha dado como resultado la desaparición gradual de la especie debido a las perturbaciones en el uso del suelo (como lo son la actividad agrícola o urbanización de la zona). También cabe destacar que la introducción de especies exóticas, tanto de animales como de plantas, amenaza a la flora local (Challenger, 1998). En la actualidad, uno de los mayores problemas para *E. platyacanthus*, es el uso de su pulpa para la producción del dulce tradicional mexicano, el acitrón.

B. *La testa y la dormancia, factores que perjudican su reproducción*

Para el estudio llevado a cabo se deben tomar en cuenta algunas características externas de la semilla, como la forma, el tamaño, la cantidad de semillas producidas por el fruto y el color de las semillas, puesto que son variables que estiman la viabilidad y velocidad del proceso germinativo y reproductivo. La dormancia, o latencia, en las semillas es un proceso donde las actividades fisiológicas cesan de forma reversible, incluso cuando las condiciones son adecuadas para la germinación (Rojas-Aréchiga et al., 2019). La dormancia tiene un valor de supervivencia cuando las condiciones para la germinación y el establecimiento no son adecuadas. No obstante, de ser el caso contrario, es solo un impedimento para su reproducción. Se han descrito tres tipos de inactividad: innata, forzada e inducida [5].

Cabe mencionar que las sustancias inhibitorias de la germinación (causantes de la latencia) poseen un rol ecológico, ya que proveen información relevante sobre las condiciones ambientales en las que habitan (Rojas-Aréchiga et al., 2019). Estos inhibidores solubles de la germinación están mayormente presentes en la testa y son los "identificadores", para la semilla, de las condiciones viables del desarrollo embrionario. La información sobre el comportamiento de la latencia y la germinación de las semillas tiene como antecedentes a los autores Alcorn & Kurtz (1959) y McDonough (1964), demostrando que la luz tiene un efecto estimulante sobre la germinación. Se descubrió que algunas semillas germinaban en la obscuridad, mientras que otras requerían de distintas intensidades de luz (Zimmer, 1969). Otros estudios llevados a cabo estudiaron si la adición de ácido giberélico podía sustituir las necesidades de luz para la germinación en algunas especies. Se encontró que, para ciertas especies, como *Carnegieia gigantea*, la germinación incrementaba empleando ácido giberélico ya sea bajo condiciones de luz u obscuridad; mientras que, para algunas otras especies, bajo condiciones de luz, una muy alta concentración de ácido giberélico podría inhibir su germinación y, en otras, promoverla (Alcorn et al., 1959).

El objetivo de este proyecto es encontrar un método que favorezca la disminución del tiempo en la germinación de la especie *E. platyacanthus*, con el fin de favorecer a la propagación y conservación de la especie en riesgo. Para esto, se las semillas a distintos tratamientos pre-germinativos empleando: baja temperatura (4°C), inmersión de la semilla en ácido sulfúrico, ácido giberélico, temperatura de 50 a 55 °C, escarificación mecánica y un control. Así como observar los cambios morfológicos internos que se presenten dentro de las semillas sometidas a los distintos tratamientos antes de su germinación.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron colectas de frutos maduros y sanos de la especie *Echinocactus platyacanthus*, en la zona destinada a protección de cactáceas gigantes en Tierra Blanca Gto. el cual cuenta con las coordenadas geográficas céntricas 21°5'26.27" de latitud norte y 100°10'35.02" de longitud oeste (Google earth, 2019) y su altitud varía de 1740 a 1800 msnm (Morales, 2018).

La viabilidad de las semillas se determinó por apariencia y mediante el método de flotación (Varela, 2011) eliminando las semillas sobrenadantes, y de las restantes se seleccionaron aleatoriamente 10 para cada tratamiento. Las semillas elegidas se lavaron y

desinfectaron por inmersión en hipoclorito de sodio comercial al 10% durante 5 min (Villasante et al., 1996), y se enjuagaron varias veces con agua destilada y se sumergieron en etanol al 70% durante 1 minuto. Se secaron y se colocaron en sobres de papel para posteriormente dar inicio a los ensayos de germinación.

Los tratamientos empleados a las semillas fueron: T1) Control, T2) Temperatura baja (4°C por una semana), T3) Ácido sulfúrico 50% por 5 min, T4) Agua entre 50 y 55°C por 12.5 min, T5) Acido giberélico (0,02gr/200 ml por 4hrs) y T6) Escarificación mecánica por 1min. Para todos los tratamientos se usaron dos réplicas, cada una con 10 semillas. Posterior a los tratamientos se enjuagaron varias veces con agua destilada y se pusieron a germinar en semilleros de 2.6 X 2.6 cm. que contenían una preparación de sustrato constituido por: turba, tierra de coco y perlita blanca. El sustrato utilizado se esterilizó en olla de presión. Los semilleros se mantuvieron en el invernadero a capacidad de campo y diariamente se registró el número de semillas germinadas hasta los 30 días que duró el experimento.

El porcentaje de germinación se obtuvo por regla de tres simple, considerando el número semillas por tratamiento como el 100% de germinación. Posteriormente, se analizaron mediante un Análisis de Varianza (ANOVA; $P \leq 0.05$), además de realizar una prueba de Tukey para comparar las medias de cada tratamiento, empleando el programa Minitab 17.

Se pusieron a germinar otras 10 semillas por cada tratamiento de las cuales, previo a que comenzaran a germinar, se realizaron colectas por cada uno de los tratamientos, las cuales se depositaron en FAA durante 24hrs., se enjuagaron varias veces con agua de grifo y se colocaron en ablandador de GAA durante 72 horas, una vez pasado el tiempo se realizaron nuevamente enjuagues con agua de grifo hasta eliminar por completo el ablandador de tejidos y las muestras se procesaron en bloques de cera, los cuales se cortaron con un micrótopo de mano (MCT001 Hand Microtome) realizando cortes seriados (10 μm). Se midió en μm la longitud del embrión en cada etapa con el programa Motic-images.

III. RESULTADOS

El mayor porcentaje (Fig. 1) de germinación fue del 50% en semillas tratadas con ácido giberélico (T5). Con respecto a los otros tratamientos los porcentajes de germinación fueron de 35% para temperatura baja (T2), 5% en inmersión en ácido sulfúrico al 50% (T3), 15% en semillas tratadas con agua entre 50 y 55°C por 12.5 min (T4), 30% por escarificación mecánica (T6) y un 40% para el grupo control (T1). Los resultados de la prueba estadística ANOVA arrojaron que se encontraron diferencias significativas en los tratamientos $p = 0.001$ (Tabla 1).

La prueba de Tukey (Tabla 2) indicó que se formaron cuatro grupos estadísticos; A, B, C y D. Siendo el primero "A" en él están los tratamientos T5, T1 y T2 que representan los tratamientos con las medias de mayor valor. Seguidamente se muestra el tratamiento T3 con literal individual lo que indica un menor porcentaje de semillas germinadas y por lo consiguiente una media más baja.

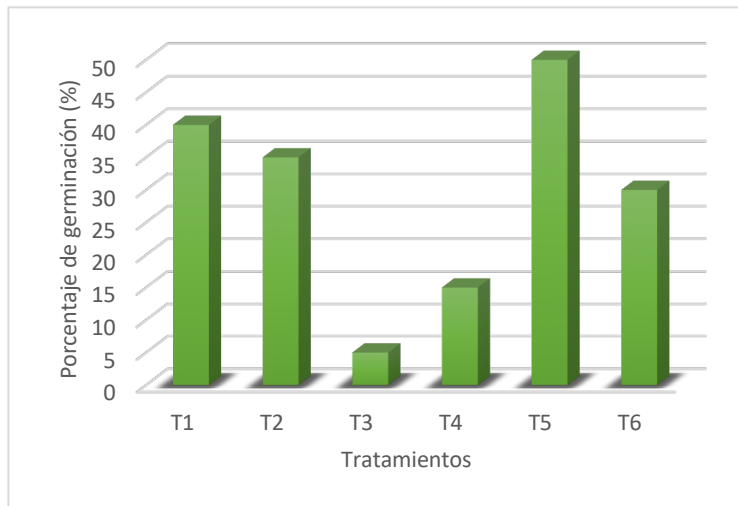


Fig. 1. Porcentaje de germinación de semillas sometidas a 6 tratamientos diferentes a lo largo de 30 días.

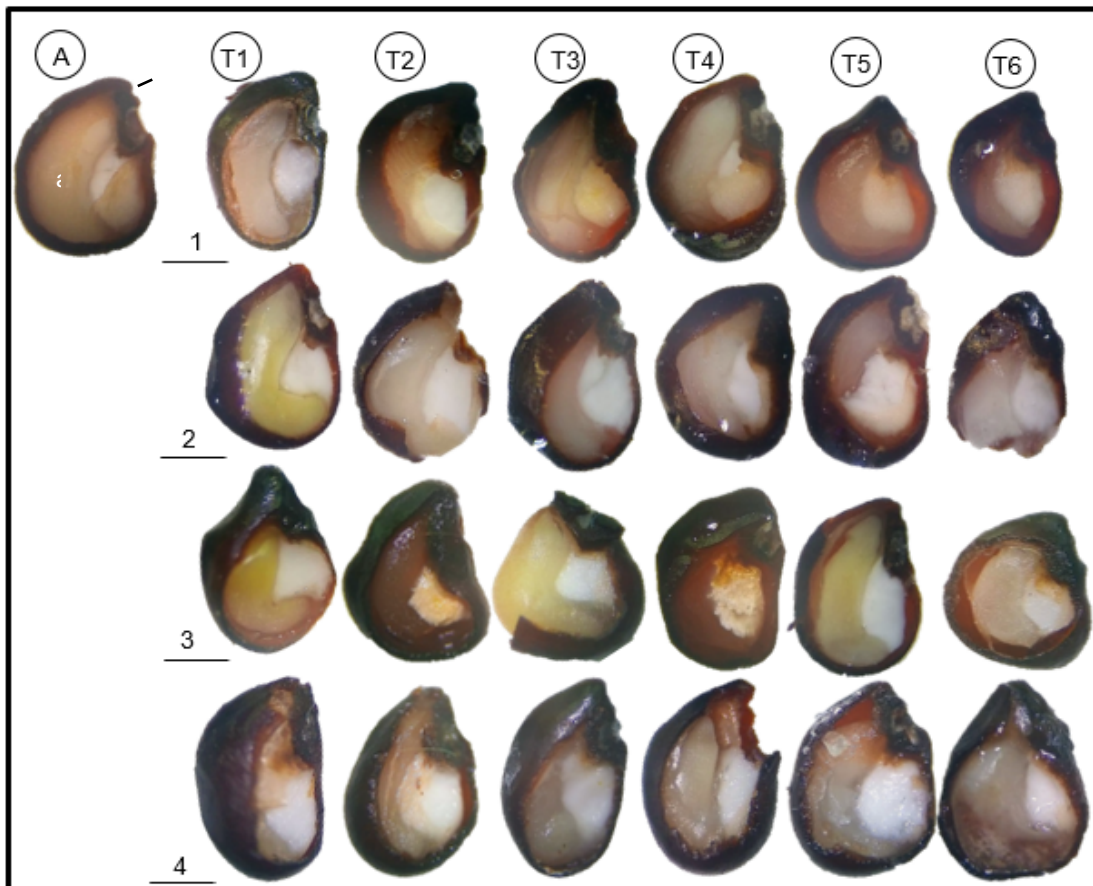


Fig. 2. Cambios morfológicos de semillas de *Echinocactus platyacanthus*, antes de su germinación, en los diferentes tratamientos. A) Semilla sin ningún tratamiento pre-germinativo ni puesta a germinar. 1, 2, 3 y 4) Colectas de distintos días. a) Testa, b) embrión, c) endospermo, d) hilio y e) micrópilo.

Tabla 1. Comparación entre los 6 tratamientos por Análisis de Varianza (ANOVA)					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	5	2741.7	548.33	21.93	0.001
Error	6	150.0	25.00		
Total	11	2891.7			

Tabla 2. Resultados de la comparación de medias (Tukey, $\alpha = 0.05$) de la interacción tratamiento.		
Tratamiento	Media	Literal
T5	50	A
T1	40	A B
T2	35	A B
T6	30	B C
T4	15	C D
T3	5	D

IV. DISCUSIÓN (O ANÁLISIS DE RESULTADOS)

Como se esperaba teóricamente por la literatura consultada, además por sus antecedentes en el uso agrícola, el tratamiento con ácido giberélico fue aquel que mostró mejores resultados por porcentaje de germinación de las semillas. No obstante, no se esperaba que el control tuviese una mejor tasa de germinación en comparación con los otros tratamientos, puesto que se planteaba que tratamientos que actuaran de manera agresiva o directa sobre la testa, como el ácido sulfúrico o la escarificación mecánica, tuviesen un mayor porcentaje de germinación. Puede deberse, en parte, a que la concentración del ácido sulfúrico fuera demasiada lo cual ocasiono que pudiese llegar a matar el embrión.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La presencia de ácido giberélico mostró nuevamente ser la mejor opción, entre las pruebas realizadas, para el mejoramiento del proceso germinativo de las semillas de *E. platyacanthus*, por lo que, en función de preservar y mejorar la reproducción de la especie, se podría buscar complementar el resultado obtenido en esta investigación con otras fitohormonas que mejorasen, no solo el proceso germinativo, sino también el crecimiento y desarrollo de la cactácea, así como también emplear compuestos que puedan serle de utilidad para combatir ciertos fitopatógenos a los cuales está expuesta. También pueden realizarse futuras experimentaciones sobre las concentraciones de ácido giberélico, ya que se probó solo la que, según la literatura, trae un mejor resultado en otro tipo de plantas.

VI. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Se agradece al Dr. Francisco Alejo Iturvide y a Rut Valeria Santibañez Barrientos, estudiante de biología del ITESI, por brindarme la oportunidad de trabajar junto con ellos en

este proyecto de investigación sobre *Echinocactus*. También agradezco al Instituto Tecnológico Superior de Irapuato por su hospitalidad y al programa de Veranos de la Región Centro.

REFERENCIAS

- Arias, S., G. Ulises, M.C. Mandujano, M. Soto y J. Golubov. 2005. Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción. I. Una comparación entre los listados NOM-059-ECOL-12001 (México), La Lista Roja (UICN) y CITES. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. 50(4): 100-125.
- NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de Riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación 6 marzo de 2002, México
- Challenger, A. 1998. Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México. Pasado, presente y futuro. Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad-Instituto de Biología de la UNAM, Agrupación Sierra Madre. México.
- Rojas-Aréchiga, M., & Vázquez-Yanes, C. *Journal of Arid Environments*. Retrieved 18 July 2019, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0140196399905827>.
- Murdoch, A.J. & Ellis, R.H. (1992). Longevity, viability and dormancy. In: Fenner, M. (Ed.), *The Ecology of Regeneration in Plant Communities*, pp. 193-229. U.K.: C.A.B. International. 373 pp
- Alcorn, S.M & Kurtz, E.B. (1959). Some factors affecting the germination of seed of the saguaro cactus (*Carnegiea gigantea*). *American Journal of Botany*, 46: 526-529.
- Google earth. (7 de Marzo de 2019). *Mapa de Tierra Blanca, Guanajuato en Google earth*. Obtenido de https://www.google.com/maps?client=firefox-b-d&q=tierra+blanca+guanajuato+cactaceas&um=1&ie=UTF8&sa=X&ved=0ahUKEwixguzamZnhAhUDblAKHY7bAqYQ_A
- Palomo Morales, M. (2018). "Análisis de la estructura vegetal y la avifauna en dos comunidades semiáridas del estado de Guanajuato" (Tesis). Iztapalapa: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA.
- Varela, A. S. (2011). Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. San Carlos de Bariloche: INTA EEA.
- Vega-Villasante F., Nolasco H., Montañó C., Romero-Schmidt H.L. y Vega-Villasante E. 1996. Efecto de la temperatura, acidez, iluminación, salinidad, irradiación solar y humedad sobre la germinación de semillas de *Pachycereus pecten-aboriginum* "cardón barbón" (Cactaceae). *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 41:51-61.

Cambios neurogénicos inducidos por el acetato de leuprolida, un agonista de la GnRH, en ratas con isquemia cerebral

Luis Omar Hernández Ocegueda
Tecnológico Nacional de México en Celaya
Antonio García Cubas 600
15121034@itcelaya.edu.mx

Asesor: José Luis Quintanar Stephano
Universidad Autónoma de Aguascalientes
Avenida Universidad 940
jlquinta@correo.uaa.mx

Resumen —El acetato de leuprolida(AL) es un agonista de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) la cual tiene propiedades neurotróficas. Este estudio tuvo como finalidad determinar cómo la administración de AL puede ayudar a la regeneración de células nerviosas de ratas en cultivo y mejorar la memoria a corto plazo afectada por la isquemia cerebral. 4 grupos de ratas, más el grupo control fueron sometidas a daños cerebrovasculares, 2 de ellos fueron tratados con acetato de leuprolida y 2 con solución salina. El 80% de los grupos tuvieron una mejoría en la evaluación independiente del tratamiento administrado. Pueden existir factores externos que pueden intervenir en el Test y variar de manera importante los resultados obtenidos.

Palabras clave — Acetato de leuprolida AL, GnRH, isquemia cerebral.

Abstract — Leuprolide acetate (AL) is a gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist which has neurotrophic properties. This study aimed to determine how the administration of AL can help the regeneration of nerve cells from rats in culture and improve short-term memory affected by cerebral ischemia. 4 groups of rats, plus the control group were subjected to cerebrovascular damage, 2 of them were treated with leuprolide acetate and 2 with saline. 80% of the groups had an improvement in the independent evaluation of the treatment administered. There may be external factors that can intervene in the Test and vary significantly the results obtained.

Keywords — Leuprolide acetate AL, GnRH, cerebral ischemia.

I. INTRODUCCIÓN

La isquémica cerebral se produce cuando se bloquean los vasos sanguíneos que suministran sangre al cerebro y a la cabeza (arterias carótidas). El bloqueo aumenta el riesgo de sufrir un accidente cerebrovascular, lo que genera una disminución en los niveles de oxígeno en el cerebro; En cuestión de minutos, la liberación de glutamato y la entrada de calcio en las células origina la puesta en marcha de una serie de procesos bioquímicos que terminan con la muerte neuronal.

Los síntomas ocasionados por un daño cerebrovascular son: cambios en los sentidos (como en la audición, la visión, el gusto y el tacto), cambios mentales (como confusión, pérdida de memoria), problemas musculares (tales como debilidad, dificultad para deglutir, dificultad para caminar).

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) fue inicialmente descrita como un axón reproductivo endócrino, pero también tiene otras funciones extrapituitarias incluyendo efectos neurotróficos. La administración de GnRH modifica la densidad de espinas dendríticas en el hipocampo y neuronas cerebrales cultivadas en embriones de rata.

Adicionalmente GnRH incrementa tanto crecimiento como número de neuritas, así como la expresión de neurofilamentos. [1,2]

El daño neurológico perinatal es considerado como la lesión del cerebro que altera la integridad estructural y funcional del sistema nervioso en desarrollo secundario a un evento perinatal. En él se incluye la encefalopatía perinatal, que es un proceso con perfiles neuropatológicos y clínicos que condicionan deficiencias neurológicas severas no progresivas. Representa causa frecuente de secuelas neurológicas tales como: parálisis cerebral, retardo mental, epilepsia, alteraciones sensoriales y trastornos del aprendizaje en preescolares, entre otras

Acetato de Leuprolida (LA) es un agonista sintético análogo de GnRH. Éste es menos susceptible a proteólisis y tiene una afinidad de unión más grande a los receptores GnRH que la hormona natural, incrementando su actividad biológica. LA es usada para desordenes del sistema reproductivo tal como el cáncer de próstata. Sin embargo, el tratamiento de LA ha demostrado que disminuye la gravedad de los signos clínicos relacionados con la locomoción de ratas con encefalomiелitis autoinmune experimental. También induce un aumento significativo de peso corporal junto con aumentos en la expresión de proteínas básicas de neurofilamentos y mielina y el diámetro axonal en la médula espinal. [2]

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Ratas Wistar machos y hembras de edad de 8 meses, pesando entre 230-350 g, de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, México fueron usadas en este estudio. Las ratas fueron divididas en 5 grupos: (1) Isquemia con solución salina (IS SS), (2) Isquemia con acetato de Leuprolida (IS AL), (3) Ratas con intervención quirúrgica sin isquemia (SHAM), (4) Ratas sin cirugía y sin tratamiento (CONTROL) y (5) Isquemia castrados tratados con acetato de leuprolida (ISQ ORX AL).

La evaluación de la actividad de memoria a corto plazo fue realizada utilizando pruebas de reconocimiento de lugar, las cuales todas las ratas de estudio fueron sometidas antes de la cirugía y después de la misma (4 semanas de tratamiento). Dicha evaluación consiste en colocar las ratas en una caja enumerada en 6 cuadrantes, los cuales dos de ellos contengan un objeto conocido, se aguarda un lapso de tiempo de cinco minutos con la finalidad de que la rata explore el lugar y los objetos antes mencionados. Después de haber cumplido el lapso de tiempo, se espera treinta minutos y se repite el procedimiento, con la diferencia de que un objeto haya cambiado de posición, es decir, se cambia de cuadrante. Se busca que la rata explore más tiempo el objeto que cambia de posición.

La cirugía para provocar la isquemia cerebral consta de una obstrucción de la carótida derecha en las ratas de estudio. Dicha obstrucción dura aproximadamente 2 minutos, tiempo suficiente para generar un daño cerebrovascular y por lo tanto muerte neuronal.

Veinte días después de la cirugía, a las ratas del grupo IS AL y ISQ ORX AL se les inyectó cada tercer día AL (10 µg / Kg) durante 4 semanas consecutivas. Las ratas de los grupos IS SS y SHAM recibieron el mismo esquema, pero se les inyectó una solución salina fisiológica (0.9 % cloruro de sodio). Se utilizaron los mismos animales para la evaluación de memoria a corto plazo. [3]

III. RESULTADOS

Se analizaron los resultados obtenidos a las cuatro semanas de tratamiento post cirugía (cx), ya que nos interesaba conocer si se obtuvo una regeneración del sistema nervioso en el grupo sometido con el tratamiento de acetato de leuprolida, en comparación con los otros grupos de estudio. [4]

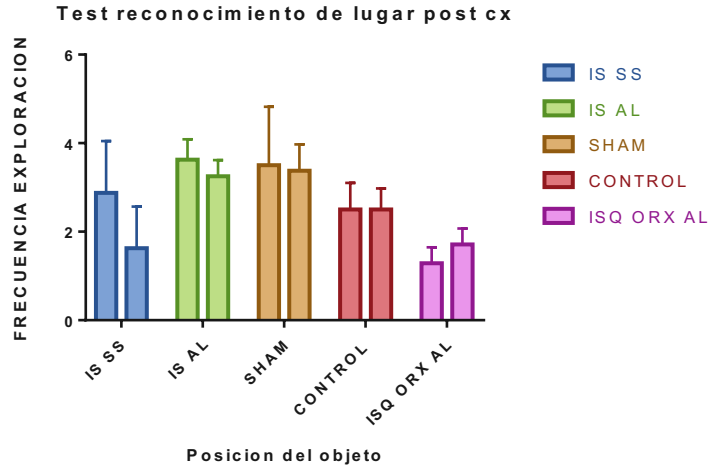


Fig. 1. Frecuencia de exploración del objeto nuevo (barra de la izquierda), versus el objeto con una posición ya conocida (barra de la derecha).

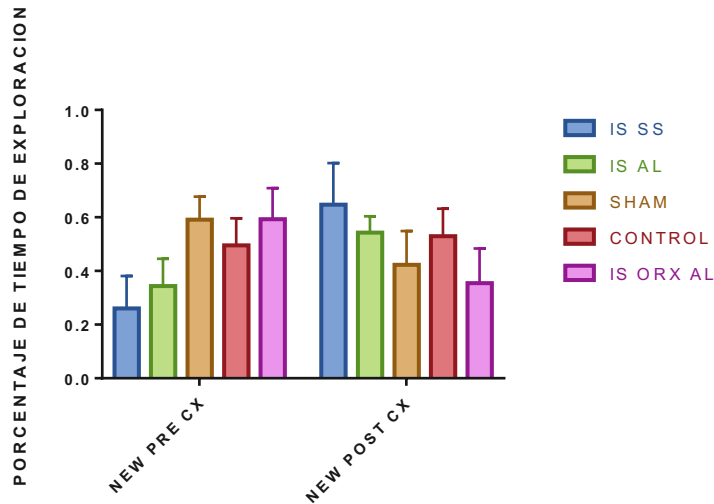


Fig. 2. Porcentaje de tiempo de exploración del objeto con nueva posición entre las mismas ratas de estudio, antes y después de la cirugía.

En la Fig. 1 se muestra la frecuencia de exploración exclusivamente del objeto nuevo antes y después que cambiará la posición. En todos los grupos, excepto ISQ ORX AL, tuvo mayor tiempo de exploración después del cambio de lugar.

En la Fig. 2 se muestran los resultados comparando a los mismos sujetos antes de ser sometidos a cualquier intervención tanto quirúrgica como farmacológica vs después de las cirugías con el tratamiento correspondiente. Los resultados indicaron una mejoría en el tiempo de exploración post cx excepto en el grupo CONTROL e ISQ ORX AL.

El efecto del acetato de Leuprolida tuvo una mejoría en la memoria de los ratones en el grupo IS AL, sin embargo, dicha mejoría también se pudo observar en el grupo con tratamiento con solución salina. Los resultados presentaron mucha similitud entre todos los grupos de estudio, podemos suponer que existen otros factores externos al momento de ejecutar las evaluaciones, tales como fotoperiodos, sexo del animal, ingesta de alimento etc.

IV. CONCLUSIONES

El grupo ISQ ORX AL tuvo un efecto contrario a lo esperado. La frecuencia en el tiempo de exploración del objeto nuevo fue menor antes de la cirugía que la post cirugía. Podemos concluir que la castración es un factor a considerar al momento del tratamiento con acetato de leuprolida.

Trabajar con fármacos in vivo es una tarea muy difícil, los resultados pueden tener variaciones de manera considerable, en comparación con las pruebas in vitro en donde se tienen condiciones y organismos más controlados.

El siguiente paso que se necesita llevar a cabo en esta investigación es la obtención de resultados con otras pruebas conductuales y así evaluar el efecto del acetato de Leuprolida en otros síntomas ocasionados por el daño cerebrovascular (cambios en los sentidos tacto, visión y audición).

V. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento al doctor José Luis Quintanar Stephano, por la dedicación, apoyo y confianza que me brindó durante toda la estancia, así como a todos los miembros del laboratorio de neurofisiología por el recibimiento, trato y conocimientos compartidos desde mi llegada al verano de investigación.

De igual manera agradezco a la Universidad Autónoma de Aguascalientes y al CONACyT por las facilidades y el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano.

REFERENCIAS

- [1] J. Luis Quintanar, Denisse Calderón-Vallejo e Irma Hernández-Jasso (2016) Efectos de GnRH en crecimiento de neuritas, Expresiones de proteínas de espinofilina en neuronas de médula espinal cultivadas de embriones de rata. *Neurochemical Research*. 33:1051-1056.
- [2] Carmen Díaz Galindo, Beatriz Gómez-González y J Luis Quintanar. (2015). Acetato de leuprolida induce la recuperación estructural y funcional de lesiones en la médula espinal en ratas. *Neural regeneration research*: 10(11):1819-1824.

- [3] Daniel Medina-Aguiñaga y J. Luis Quintanar. (2017). Administración de acetato de leuprolida, un agonista de GnRH, mejora los parámetros urodinámicos en ratas ovariectomizadas. *Neurourology and Urodynamics*;37:1574-1582.
- [4] Quintanar JL, Salinas E, González R (2007). Expresión del receptor de GnRH en neuronas corticales cerebrales de embriones y ratas adultas. *Neurosci Lett*; 411:22-25.

Caracterización de lipasas producidas por hongos aislados de México

Cecilia Villarreal Reyes

Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Av. Dr. Salvador Nava s/n
C.P.78290, San Luis Potosí, S.L.P.
cec_180@hotmail.com

Asesor: Divanery Rodríguez Gómez

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Silao-Irapuato km 12.5 El Copal,
C.P. 36821, Irapuato, Gto.
divanery.rodriguez@itesi.edu.mx

Resumen —Se analizaron cinco aislados de hongos de “Los Azufres”, Michoacán, en cultivo líquido y superficial, con aceite de oliva o de motor usado a concentraciones de 0.1 y 0.5%. Se determinó la velocidad de crecimiento radial, biomasa y actividad enzimática de las lipasas producidas. La actividad enzimática se analizó por dos métodos, uno titrimétrico con NaOH y uno colorimétrico con 4-nitrofenil acetato. Se determinó que el método colorimétrico es más sensible que el titrimétrico. Además, se encontró que el aislado I9 en medio líquido con aceite de motor usado al 0.5%, produce mayor biomasa y esterases. Por lo que este aislado sería una buena opción para ser aplicado en procesos de biorremediación de aceite de motor usado.

Palabras clave — lipasas fúngicas, aceite de motor usado, biorremediación.

Abstract — Five isolates of fungi previously isolated from “Los Azufres”, Michoacan were analyzed in liquid and surface culture, with olive or used motor oil at concentrations of 0.1 and 0.5%. The radial growth rate, biomass and enzymatic activity of the produced lipases were evaluated. The enzymatic activity was analyzed by two methods, a titrimetric with NaOH and a colorimetric with 4-nitrophenyl acetate. The colorimetric method was more sensible than the titrimetric one. Also, it was found that the isolate I9 grew more and produced more esterase activity in liquid medium in presence of used motor oil at 0.5%. This isolate would be a good choice to be applied in processes of bioremediation of used motor oil.

Keywords — fungal lipases, used motor oil, bioremediation.

I. INTRODUCCIÓN

La región geotérmica de “Los Azufres”, es una zona de temperatura y pH extremos, por lo que los microorganismos asociados al suelo y brotes de agua de la zona, resultan de interés por las capacidades metabólicas que les permiten desarrollarse en estas condiciones [1], como la producción de enzimas termofílicas.

Las enzimas termofílicas poseen características como: mayor estabilidad termodinámica a altas temperaturas y pueden llevar a cabo reacciones de hidrólisis y síntesis en presencia de disolventes orgánicos. Las lipasas son de las enzimas termofílicas más prometedoras para aplicaciones industriales [2]. Las lipasas hidrolizan los triglicéridos a ácidos grasos y glicerol, y bajo ciertas condiciones catalizan la reacción reversa. Algunas pueden catalizar reacciones de esterificación, transesterificación y de hidrólisis enantioselectivas [3].

Las lipasas de microorganismos termófilos, por su capacidad para descomponer y remover sustancias oleosas [3] se han utilizado como alternativa a los métodos fisicoquímicos de biorremediación de sólidos y aguas residuales contaminadas con hidrocarburos, aceites y lípidos [2]. El aceite de motor es un riesgo ambiental con ramificaciones globales. Las lipasas de microorganismos termófilos, por su capacidad para descomponer y remover sustancias oleosas [3] se han utilizado como alternativa a los

métodos fisicoquímicos de biorremediación de sólidos y aguas residuales contaminadas con hidrocarburos, aceites y lípidos [2]. El aceite de motor es un riesgo ambiental con ramificaciones globales. El aceite de motor usado contiene metales pesados e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) que pueden contribuir a riesgos mutagénicos y carcinogénicos. La ausencia de nutrientes esenciales como nitrógeno y fósforo es uno de los factores que afecta mayormente la biodegradación de los hidrocarburos por los microorganismos en ambientes de agua y suelo. Por ello la adición de nutrientes ricos en nitrógeno orgánico e inorgánico (bioestimulación) es un acercamiento efectivo para mejorar el proceso de biorremediación [4].

Al trabajar *in vitro* algunos hongos aislados de la zona de “Los Azufres”, para los cuales previamente se había determinado su capacidad de producir lipasas [5], inoculándolos en un medio rico en nutrientes para observar el crecimiento y cuantificar la correspondiente producción de lipasas en presencia de aceite de motor usado. Buscando en estos hongos una posible alternativa para la remoción de este aceite.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos. Se llevó a cabo el análisis de 5 aislados de hongos (339, 297, 137, 271 e I9) de la colección del Laboratorio de Diversidad e Interacción Microbiana (LDIM-ITESI). Aislados de la zona geotérmica de “Los Azufres” en Michoacán. Fueron resembrados en agar papa dextrosa (PDA) para su posterior análisis.

Medio de cultivo. El medio se preparó a partir la formulación propuesta por Colla *et. al* (2016). Se hicieron dos tratamientos con la adición de aceite de oliva o aceite de motor usado. Estas formulaciones se trabajaron a las concentraciones de aceite al 0.1 y 0.5% (v/v). Para los cultivos superficiales se agregaron 15 g/L de agar bacteriológico y se colocó posteriormente en cajas Petri. La adición del aceite se llevó a cabo de la siguiente manera, el aceite de oliva se agregó previo a la esterilización del medio y en el caso del aceite de motor se adicionó después de la esterilización, de manera individual, es decir, en cada recipiente.

Velocidad de crecimiento radial. A partir de cultivos en crecimiento activo, se extrajo un disco de agar con micelio de 5 mm de diámetro y se colocó en una caja de Petri por inoculación central. La tasa de crecimiento radial se determinó con la medición del diámetro cada 24 horas por cuatro días. Se analizaron tres réplicas para cada medio y cada aislado [6].

Cinética de crecimiento en medio líquido. A partir de un cultivo en PDA de 8 días, se extrajo un disco de agar con micelio de 5 mm de diámetro y se colocó en un frasco de Gerber con 20 mL de medio líquido. Se incubaron durante 6 días a 36.5°C en un agitador orbital (134 rpm). La biomasa se separó de la parte líquida por filtración y esta se determinó por peso seco. Al filtrado líquido se le midió pH y actividad enzimática.

Determinación de la actividad enzimática. Se evaluó por dos métodos:

- **Método titrimétrico con NaOH.** La actividad lipolítica de la enzima se analizó de acuerdo al método de titulación con NaOH ligeramente modificado. Basado en la titulación con NaOH 0.05 N de los ácidos grasos, liberados por acción de la enzima lipasa en los triglicéridos del aceite de oliva emulsificado en goma arábica, incubado a 36.5°C, 108 rpm y usando azul de bromotimol como indicador. Una unidad de actividad lipolítica se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de ácido graso por minuto por mL del extracto de la enzima (1 U=1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$) [3,7].

- **Método colorimétrico con 4-paranitrofenil acetato.** La curva de calibración se llevó a cabo con concentraciones crecientes de p-nitrofenol y midiendo la absorbancia a 405 nm, los resultados se ajustaron a una ecuación lineal. Para evaluar la actividad enzimática se utilizaron 10 μL de sobrenadante, 200 μL de 100 MM Tris-HCl (pH 8) y 10 μL de sustrato (4-nitrofenil acetato 20 mM). Se incubó durante 2-4 minutos y se leyó la absorbancia a 405 nm [8]. Una unidad de actividad lipolítica se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de acetato por minuto por mL del extracto de la enzima (1 U=1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$).

III. RESULTADOS

Velocidad de crecimiento radial. En la Figura 1, se muestra la comparación de la velocidad de crecimiento radial en mm/h. Se puede observar a la concentración de 0.1% (a), el aislado I9 crece con mayor velocidad, siendo más alta en aceite de oliva (0.24 ± 0.007 mm/h). Para el aislado 297 se observa una diferencia en el comportamiento entre las gráficas (a) y (b), teniendo un aumento en el crecimiento a mayor concentración de aceite (0.5%), predominando en aceite de oliva (0.24 ± 0.003 mm/h).

Determinación de biomasa. En la Figura 2, se compara la biomasa obtenida en medio líquido. Se observa como es más alta la cantidad de biomasa para todos los aislados con una concentración de aceite al 0.5% (b). Cabe resaltar que el aislado I9 a esta concentración de aceite de motor, obtuvo la mayor cantidad de biomasa (6.03 g/L). Además en la Tabla 1 se muestran los pH del sobrenadante restante.

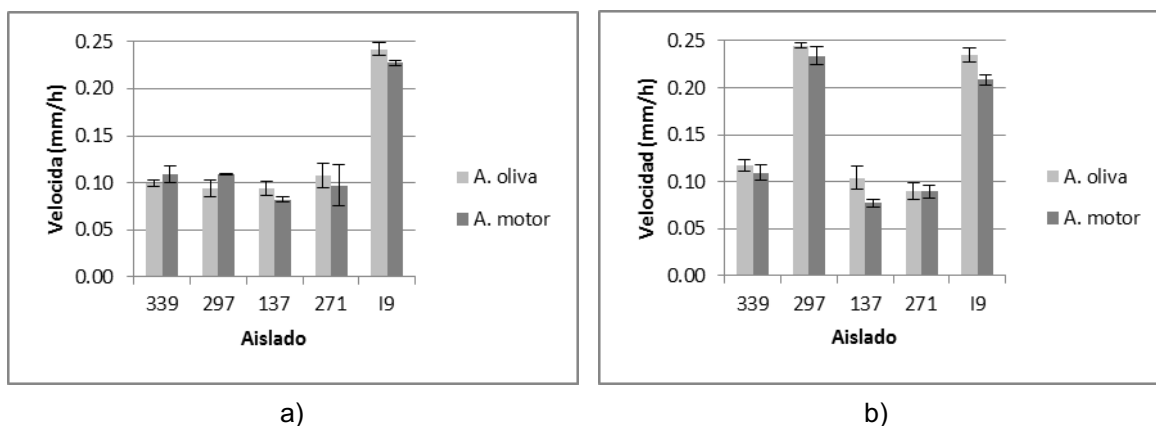


Fig. 1. Velocidad de crecimiento radial, a) 0.1% y b) 0.5%

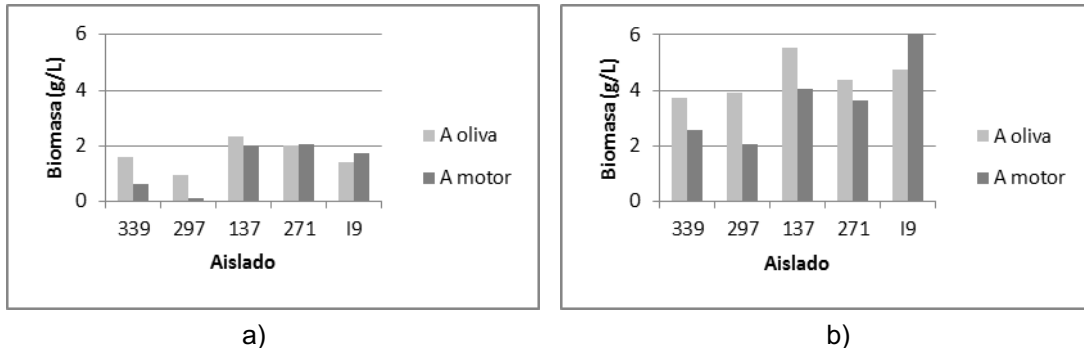


Fig. 2. Biomasa, a) 0.1% y b) 0.5%

Determinación de la actividad enzimática. En la Figura 3, se comparan los métodos por los que se evaluó, el colorimétrico con 4-paranitrofenil acetato (4-PNA) y el titrimétrico con NaOH.

Tabla 1. pH del sobrenadante en medio líquido

	0.1%		0.5%	
	A oliva	A motor	A oliva	A motor
Medio	6.12	6.18	6.05	6.21
339	6.51	6.58	6.19	6.2
297	6.43	6.47	6.17	6.03
137	8.49	7.85	7.58	7.41
271	8.38	8.09	7.74	7.31
19	8.27	8.5	7.94	8.53

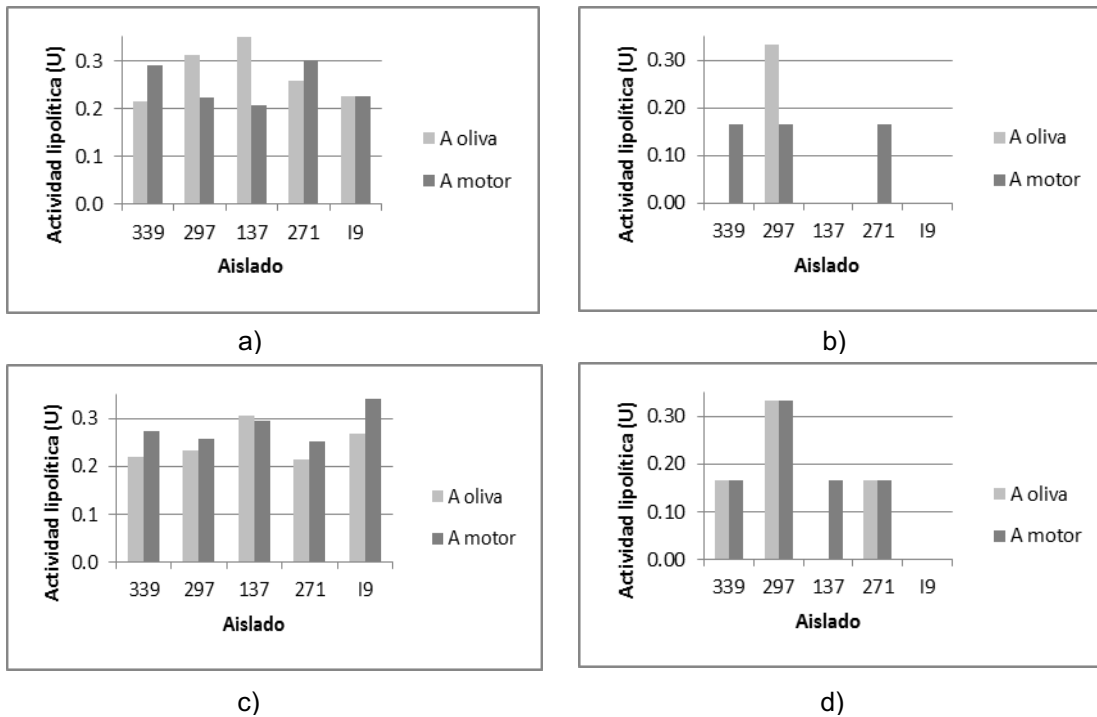


Fig. 3. Caracterización de lipasas distintos métodos, a) 4-PNA/0.1%, b) titrimétrico/0.1%, c) 4-PNA/0.5%, d) titrimétrico/0.5%

IV. DISCUSIÓN

El crecimiento de la mayoría de los aislados se favoreció a 0.5% de aceite, tanto en cultivo líquido como en superficial, lo cual puede deberse a que se encuentran disponibles más lípidos que inducen la producción de lipasas y con ello su aprovechamiento. El crecimiento fue mayor en presencia de aceite de oliva para casi todos los aislados por lo que podríamos suponer que algunas sustancias contenidas en el aceite de motor usado inhiban o retrasen de alguna manera el crecimiento de estos hongos ya que no son capaces de degradarlos, como podría ser el caso de los PAHs o algunos metales [9, 10]. El aislado I9 en medio líquido con aceite de motor al 0.5% presenta la máxima cantidad biomasa lo que coincide con que produce la mayor cantidad de enzima (determinado por el método colorimétrico).

Para la medición de la actividad hidrolítica de las lipasas, el método más usado es el titrimétrico con aceite de oliva como sustrato, en cual los ácidos grasos liberados del triglicérido se determinan por la titulación con hidróxido de sodio. De cualquier manera, este método tiene severas desventajas, incluyendo un rango de pH restringido, baja sensibilidad (mayor a 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$) y la necesidad de emulsificantes como la goma arábiga o surfactantes para mantener la homogeneidad del medio de reacción. Los aditivos pueden interactuar con la lipasa y actuar como activadores o inhibidores de la enzima. El segundo método más comúnmente usado es con p-nitrofenil como sustrato midiendo la liberación de p-nitrofenol como un cromóforo amarillo, la mayor ventaja de este método es la simplicidad [11].

En este trabajo se utilizó p-nitrofenil acetato, los ésteres de cadena corta son usados para medir la actividad esterasa, mientras que cadenas más largas como laurato o palmitato se usan para la actividad lipolítica [12]. Por lo tanto, con el método titrimétrico se midió la actividad lipasa ya que el aceite de oliva contiene mayormente ácido oleico y palmítico [13], mientras que por el método colorimétrico con 4-nitrofenil acetato se midió la actividad esterasa.

Los resultados para cada aislado variaron mucho de un método a otro, se considera que el método colorimétrico es más sensible porque determina la actividad enzimática para todos los aislados mientras que el método titrimétrico no. Para la determinación titrimétrica se debe considerar el pH inicial del medio y final (del sobrenadante), así como el viraje del indicador ya que puede haber error del analista al determinar el punto final.

V. CONCLUSIONES

En este trabajo se determinó que el aislado I9 tiene mejor crecimiento de la biomasa en medio líquido con aceite de motor usado al 0.5%, además de producir mayor actividad de esterases. Por ello este sería el aislado de elección para llevar a cabo un proceso de biorremediación de aceite de motor usado.

Se comparó la determinación de la actividad enzimática por dos métodos, se comprobó que el método colorimétrico con 4-nitrofenil acetato es más sensible que el titrimétrico con NaOH.

VI. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Expreso mi agradecimiento al Instituto Tecnológico Superior de Irapuato y a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, por el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano.

REFERENCIAS

- [1] I. A. Quiñones, A.T. Vargas, y V. Ramírez, “Aislamiento y caracterización de hongos y levaduras provenientes de la región geotérmica de “Los Azufres”, Michoacán”, *Jóvenes en la ciencia*, vol. 1, no. 1, pp. 180-187, 2014.
- [2] R. M. Oliart-Ros, A. Manresa-Presas, y M.G. Sánchez-Otero, “Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico”, *CienciaUAT*, vol. 2, pp. 79-90, Jul. 2016.
- [3] J. F. M. Burkert, F. Maugeri, y M.I. Rodrigues, “Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design”, *Bioresource Technology*, vol. 91, pp.77 -84, Feb. 2004.
- [4] O.P. Abioye, P. Agamuthu, y A.R. Abdul, “Biodegradation of Used Motor Oil in Soil Using Organic Waste Amendments”, *Biotechnology Research International*, vol. 2012, pp. 1-8, Abr, 2012.
- [5] I. Navarro, D. Rodríguez. “Producción de actividad enzimática de capas aisladas de Azufres de Michoacán”, *Inducción a la ciencia, la tecnología y la innovación en la región centro*, vol. 4, no. 7.
- [6] D, Rodríguez-Gómez, O. Loera, G. Saucedo-Castañeda, y G. Viniestra-González, “Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of *Tenebrio molitor*”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 25, pp. 513-518, Mar. 2009.
- [7] L.M. Colla, A.L. Primaz, R.A. Loss, M. de Lima, C.O. Reinehr, *et al.* “Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi”, *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 47, no. 2, pp. 461-467, Abr. 2016.
- [8] F. Bergmann, S. Rimon, R. Segal. “Effect of pH on the Activity of Eel Esterase towards Different Substrates”, *Biochemical Journal*, vol. 68, no. 3, pp. 493-499, Mar. 1958.
- [9] A. E. Mbachu, E. I. Chukwura, N.A. Mbachu. “Isolation and characterization of hydrocarbon degrading fungi from used (spent) engine oil polluted soil and their use for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation”, *Universal Journal of Microbiology Research*, vol. 4, no.1, pp.31-37, 2016
- [10] R. Thenmozhi, K. Arumugam, A. Nagasathya, N. Thajuddin, A. Paneerselvam. “Studies on Mycoremediation of used engine oil contaminated soil samples”, *Advances in Applied Science Research*, vol. 4, no. 2, pp. 110-118, 2013.
- [11] S. Hernández-García, M.I. García-García, F. García-Carmona. “An improved method to measure lipase activity in aqueous media”, *Analytical Biochemistry*, vol. 530, pp. 104-106, May. 2017.
- [12] D. Gilham, R. Lehner. “Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro”, *Methods*, vol. 36, pp.139-147, 2005.
- [13] E. Gimeno, K. de la Torre-Carbot, R. M. Lamuela-Reventós, A.I. Castellote. “Changes in the phenolic content of low density lipoprotein after olive oil consumption in men. A randomized crossover controlled trial”, *British Journal of Nutrition*, vol. 98, no. 6, pp. 1243-1250, Dec. 2007.

Caracterización de microorganismos tolerantes y/o resistentes a manganeso

Ana Brenda Ramírez Corona

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Carr. Silao-Irapuato km 12.5
El Copal, 36821 Irapuato, Gto.
is15111602@es.itesi.edu.mx

Asesora: María Azucena Márquez Lucio

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Carr. Silao-Irapuato km 12.5
El Copal, 36821 Irapuato, Gto.
zucet01@gmail.com

Resumen — En la actualidad, la contaminación del medio ambiente ocasionada por metales pesados es una de las principales preocupaciones. Dentro de los metales pesados, el Manganeso (Mn) es un contaminante presente en suelo y aguas residuales provenientes de industrias, campos agrícolas y hogares. En este documento se muestra la caracterización de microorganismos tolerantes y/o resistentes a manganeso a partir de muestras de sedimentos en diferentes puntos de la presa de la Purísima, Guanajuato de acuerdo con la norma mexicana NMX-AA-014-1980. Se realizó el aislamiento con el método de dilución seriada en agua peptonada, se realizó tinción diferencial y pruebas bioquímicas para su identificación. Los aislados se clasificaron en el género *Enterobacteriaceae*.

Palabras clave — Caracterización, tolerantes, resistente, *Enterobacteriaceae*, manganeso.

Abstract — At present, the contamination of the environment by heavy metals is one of the main concerns. Within heavy metals, Manganese (Mn) is a pollutant present in soil and wastewater from industries, agricultural fields and homes. This document shows the characterization of microorganisms tolerant and / or resistant to manganese from sediment samples at different points of the Purísima dam, Guanajuato according to Mexican standard NMX-AA-014-1980. Isolation was performed with the serial dilution method in peptonated water, differential staining and biochemical tests were performed for identification. The isolates were classified in the genus *Enterobacteriaceae*.

Keywords — Characterization, tolerant, resistant, *Enterobacteriaceae*, manganese.

I. INTRODUCCIÓN

El desarrollo industrial y la creciente urbanización han causado graves problemas ambientales debido al vertimiento de efluentes industriales y domésticos en diferentes ecosistemas. La liberación de compuestos tóxicos, presentes en aguas residuales, constituyen la causa de la contaminación de los ecosistemas acuáticos, en particular los ríos, por ejemplo, el río Guanajuato [1]. Los efectos de la contaminación han conllevado a la degradación de los recursos hídricos, a la disminución de la calidad de las aguas disponibles para el abastecimiento de la población, así como para el uso agrícola e industrial [2].

La presencia de sedimentos contaminados en ambientes acuáticos ya sea en aguas continentales o en aguas marinas, es un hecho constatado a nivel mundial, sobre todo a partir de la segunda mitad del siglo XX. La existencia de estos sedimentos es debido tanto a los vertidos incontrolados desde industrias como a la utilización de productos químicos tales como los pesticidas [3].

El manganeso es un metal que ocurre naturalmente y que se encuentra en muchos tipos de rocas. El manganeso puro es de color plateado, pero no ocurre naturalmente, en forma

de óxidos y como sulfuro. El manganeso también puede combinarse con carbono para producir compuestos orgánicos de manganeso [4].

Existen pocos estudios sobre microorganismos tolerantes y/o resistentes a manganeso, ya que actualmente la mayoría de las investigaciones se enfocan en metales pesados más tóxicos como son el cromo, plomo y cobre.

II. MARCO TEÓRICO

A. Metales pesados

Los metales se encuentran presentes formando parte de los seres vivos y de la corteza terrestre. Una de las principales funciones de los oligoelementos metálicos es formar parte de las denominadas metaloenzimas en las que intervienen como coenzimas [5].

La toxicidad de los metales pesados es muy alta. Su acción directa sobre los seres vivos ocurre a través del bloqueo de las actividades biológicas, es decir, la inactivación enzimática por la formación de enlaces entre el metal y los grupos -SH (sulfhidrilos) de las proteínas, causando daños irreversibles en los diferentes organismos [6].

B. Manganeso

Manganeso (Mn), un metal gris rojizo es el duodécimo elemento más abundante con 0.095% concentración estimada en la corteza terrestre. El manganeso tiene un número atómico de 25 con un peso atómico 54.938 g/mol [7].

El manganeso es un metal traza esencial que se encuentra en todos los tejidos, y es necesario para el metabolismo normal de aminoácidos, lípidos, proteínas e hidratos de carbono. La toxicidad crónica de manganeso, que afecta principalmente el sistema nervioso central [8]. El requerimiento de la dieta humana para el manganeso es de 2-3 mg d⁻¹, mientras que la ingesta típica es de 5.4 a 12.4 mg d⁻¹ [9].

C. Aplicaciones en la industria

El manganeso es utilizado en la manufactura en la producción de acero para aumentar su dureza, rigidez y solidez. Se usa en acero de carbono, acero inoxidable, acero de alta temperatura y acero para herramientas, como también hierro colado y súper aleaciones [10].

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Aislamiento

Se realizó un aislamiento microbiano a partir de muestras de sedimentos de la presa de la Purísima, Guanajuato. La toma de muestra se llevó a cabo en cuatro puntos de muestreos, en Mayo de 2019, los cuales se especifican en la Tabla 1. El muestreo se realizó con el procedimiento señalado en la norma mexicana NMX-AA-014-1980. A partir de las muestras de sedimentos se prepararon diluciones seriadas en agua peptonada, posteriormente se sembraron por técnica de estriado en medio PYG (peptona, extracto de levadura y glucosa) por Hurt y colaboradores [11] por triplicado y se incubaron a 30 °C ± 2 °C por 24 horas.

A. Caracterización morfológica y pruebas bioquímicas

Se realizó tinción diferencial de Gram, de acuerdo con el manual de prácticas del laboratorio de Microbiología General [12], para el caso de las pruebas bioquímicas se empleó el protocolo de prácticas microbiología [13].

Tabla 1. Localización de los puntos de muestreo presa de la Purísima

Punto de muestreo	Geoposicionamiento
1	N:20° 53' 42.0" W:101° 16' 45.5"
2	N:20° 53' 31.7" W:101° 16' 47.5"
3	N:20° 53' 18.2" W:101° 16' 48"
4	N:20° 53' 0.6 " W:101° 16' 50.8"

IV. RESULTADOS

Del aislamiento microbiano a partir de sedimentos de la presa de la Purísima, se obtuvo un aislado microbiano.

A. Caracterización morfológica

En la Figura 1 se puede observar una coloración rosa y estructura circular definidas e irregulares, agrupados y en dupla, de esta manera se puede decir que es una bacteria gram negativa.

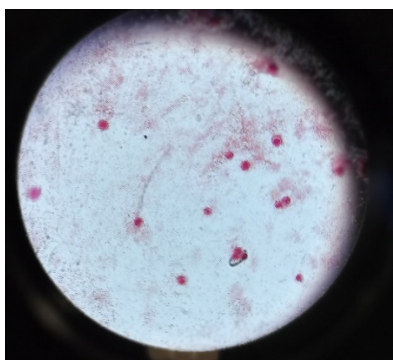


Figura 1. Observación en el microscopio

B. Pruebas bioquímicas

En la Figura 2 se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas en a) presenta una coloración purpura dando positivo para Ornitina descarboxilasa y presencia de movilidad, en el b) presenta un pico color amarillo con fondo amarillo, c) se observa turbidez por lo cual da positivo para movilidad, d) tres de los tubos presentan un color azul intenso y dos color verde e) cuatro de los tubos presentan pico amarillo con fondo amarillo y uno de los tubos presenta pico rojo y fondo amarillo. Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas se muestran en la Tabla 2.

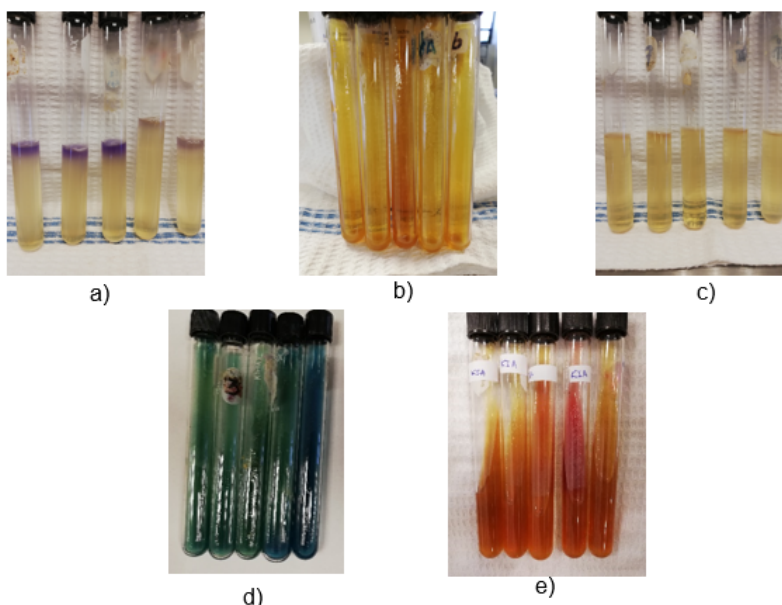


Figura 2. a) medio MIO, b) medio TSI, c) medio SIM ,d)medio Simmons y e)medio Kligler

Tabla 2. Pruebas bioquímicas

Prueba	Tubo				
	1	2	3	4	5
TSI	Glucosa, Sacarosa y Lactosa	Glucosa, Sacarosa y Lactosa	Glucosa, Sacarosa y Lactosa	Glucosa, Sacarosa y Lactosa	Glucosa, Sacarosa y Lactosa
Kliger	A/A Gas (-) H ₂ S(-)	A/A Gas (-) H ₂ S(-)	K/A Gas (-) H ₂ S(-)	A/A Gas (-) H ₂ S(-)	A/A Gas (-) H ₂ S(-)
MacConkey	Lactosa positiva	Lactosa positiva	Lactosa positiva	Negativa	Negativa
MIO	Positiva Ornitina	Positiva Ornitina	Positiva Ornitina	Positiva Ornitina	Positiva Ornitina
SIM	Movilidad H ₂ S	Movilidad H ₂ S	Movilidad H ₂ S	Movilidad H ₂ S	Movilidad H ₂ S
Simmons	+	+	+	-	-

V. DISCUSIONES

Los resultados de la prueba de citrato indican que el pH es de 6 y ocurre la condensación de acetilo con la coenzima A y oxalacetato para entrar al ciclo de Krebs; la prueba SIM determinó que las bacterias tienen movilidad por contener flagelo y es capaz de liberar azufre de manera enzimática de los aminoácidos por lo tanto produce el gas ácido sulfhídrico; prueba MIO las bacterias son capaces de descarboxilar la ornitina para formar una amina por lo tanto es positiva para ornitina descarboxilasa ; prueba TSI las bacterias utilizan los azúcares (glucosa, lactosa o sacarosa) para producción de energía al ser bacterias del género *Enterobacteriaceae* utiliza la glucosa como su primera fuente de carbono para obtener mayor energía y dar inicio al ciclo de Krebs; medio MacConkey el crecimiento de colonias con un color rojo es un indicador de un pH neutro y que son capaces

de fermentar lactosa y para el caso de la prueba en medio Kliger muestra que su pH es ácido y las bacterias son capaz de fermentar glucosa y lactosa.

De acuerdo con resultados obtenidos las bacterias son coco Gram negativa, son fermentadoras de glucosa, sacarosa y lactosa, utilizan el citrato como única fuente de carbono, son productoras de H₂S y se produce ornitina decarboxilasa de esta manera se consideró que son bacterias del género *Enterobacteriaceae*. De acuerdo con las L. Bailón y colaboradores (2003) las *Enterobacteriaceae* es fermentadora de glucosa, sacarosa y lactosa, además de producir H₂S [14].

VI. CONCLUSIONES

Los aislados son coco gram negativo del género *Enterobacteriaceae* son fermentadoras de glucosa, sacarosa y lactosa pueden utilizar el citrato como única fuente de carbono.

Las bacterias tienen actividad enzimática Ornitina decarboxilasa, que actúa sobre la Ornitina generando putrescina.

Se requiere realizar más pruebas para identificar la especie de las bacterias.

VII. RECONOCIMIENTOS

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo y aceptación brindada para la realización del estudio, al Dr. Francisco Alejo Iturvide del Departamento de Biología del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato por su apoyo para el desarrollo de este trabajo así como al Instituto Tecnológico Superior de Irapuato por la facilitación de las instalaciones y materiales utilizados en el presente estudio, como el apoyo brindado en diferentes tiempos para avance tecnológico y fondos brindados para la realización de la investigación en el marco del 21° Verano de la Ciencia Región Centro.

REFERENCIAS

- [1] G. Hernández, J. Solorio, M. Maples, L. Vasallo, L. Flores, D. Hernández, S. Solís, M. E. Hernández y J. R. Alcalá, Monitoreo de contaminantes en las cuencas de los ríos Guanajuato, San Juan de Otates y Turbio y su impacto en el río Lerma, estado de Guanajuato, México, México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México, 2005.
- [2] A. Martínez, M. Cruz, O. Veranes, M. E. Carballo, I. Salgado, S. Olivares, L. Lima y D. Rodríguez, «Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares,» *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, vol. 41, pp. 1-10, 2010.
- [3] M. C. González, L. C. Méndez, D. G. López y A. Vázquez, «Evaluación de la contaminación en sedimentos del área portuaria y zona costera de Salina Cruz, Oaxaca, México,» *Interciencia*, vol. 31, n° 9, pp. 647-656, 2006.
- [4] INSHT, «MANGANESO Y COMPUESTOS INORGÁNICOS,» *Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo*, pp. 1-14, 2017.
- [5] A. D. Ferrer, «Intoxicación por metales,» *ANALES Sis San Navarra*, vol. 26, n° 1, pp. 141-153, 2003.
- [6] D. L. Vullo, «Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente,» *Química Viva*, vol. 2, n° 3, pp. 93-104, 2003.

- [7] D. S. Patil, S. M. Chavan y J. U. Kennedy, «A review of technologies for manganese removal from wastewaters,» *Journal of environmental chemical engineering*, vol. 4, n° 1, pp. 468-487, 2015.
- [8] U. Gupta y S. C. Gupta, «Sources and Deficiency Diseases of Mineral Nutrients in Human Health and Nutrition: A Review,» *Soil Science Society of China*, vol. 24, n° 1, pp. 13-38, 2014.
- [9] L. Ruzik, «Speciation of challenging elements in food by atomic spectrometry,» *Talanta*, vol. 93, pp. 18-31, 2012.
- [10] C. V. Espinoza, «Química del hierro y manganeso en el agua, métodos de remoción [bachelorThesis],» *Universidad de Cuenca*, 2011.
- [11] C. J. Hurt, R. L. Crawford, J. L. Garland, D. A. Lipson, A. L. Mills y L. D. Stetzenbach, *Manual of environmental microbiology : Third Edition, United States of America : Board*, 2007.
- [12] M. A. Aquiahuatl y M. L. Pérez, *Manual de prácticas del laboratorio de MICROBIOLOGÍA GENERAL*, México,D.F., 2004.
- [13] D. d. Biología, *Protocolo de Prácticas: Microbiología Experimental*, México: UNAM, 2012.
- [14] L. Bailón, R. González y A. Cervantes, *Atlas de Pruebas Bioquímicas para Identificar Bacterias*, México: UNAM, 2003.

Caracterización de mutantes de dimorfismo de M102, M104 y M114 *Sporothrix schenckii*, generadas por mutagénesis insercional

Marianzazu Olivo Guerra

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Departamento de Ingeniería Bioquímica,
Carr. Irapuato-Silao Km 12.5,
C.P. 36821, Irapuato, Gto.
Marianzazuolivo1@gmail.com

Asesor: Gustavo A. Niño Vega

Universidad de Guanajuato,
Departamento de Biología, División de Ciencias
Naturales y Exactas, Campus Guanajuato,
Noria Alta s/n, col. Noria Alta, C.P. 36250
Guanajuato Gto.
gustavo.nino@ugto.mx

Resumen — *Sporothrix schenckii* es un hongo dimórfico que se distribuye ampliamente en la naturaleza. Es dimórfico ya que posee dos morfologías; su forma saprofita y su forma levaduriforme. La esporotricosis es una micosis subcutánea donde *Sporothrix schenckii* es uno de los agentes infecciosos. Uno de los posibles factores de virulencia en *S. schenckii* es que pasa por una transición donde convierte una hifa no patógena, en una levadura patógena. Sin embargo, aún se desconocen aspectos básicos del dimorfismo y los genes que se expresan en la transición y por lo tanto es importante el uso de nuevas herramientas que permitan conocer más de este tema. Por ello anteriormente en el grupo de trabajo se generaron mutantes por mutagénesis insercional usando como intermediario a la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. En el presente trabajo, se procedió a la caracterización morfológica de seis mutantes seleccionadas por su poca capacidad en completar el proceso dimórfico, en comparación con la cepa silvestre.

Palabras clave — *Sporothrix schenckii*; dimorfismo; características morfológicas

Abstract — *Sporothrix schenckii* is a dimorphic fungus widely distributed in nature. It is dimorphic since it has two morphologies; its saprophytic form and its form. Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis where *Sporothrix schenckii* is one of the infectious agents. One possible virulence factor in *S. schenckii* is that it goes through a transition where it converts a non-pathogenic hypha, into a pathogenic yeast. However, basic aspects of dimorphism and the genes that are expressed in the transition are still unknown and therefore it is important to use new tools that allow us to know more about this topic. Therefore, previously in the working group, mutants were generated by insertional mutagenesis using as an intermediary the bacterium *Agrobacterium tumefaciens*. In the present work, we proceeded to the morphological characterization of six mutants selected for their low capacity to complete the dimorphic process, in comparison with the wild strain.

Keywords — *Sporothrix schenckii*; dimorphism; morphological types

I. INTRODUCCIÓN

Sporothrix schenckii es un hongo dimórfico que se distribuye ampliamente en la naturaleza y se puede encontrar en el suelo asociado a materia orgánica viva y en descomposición, animales mamíferos e incluso en algunos insectos [1]. En su forma saprofita o cuando se cultiva a 28°C asume una forma filamentosa compuesta por micelios finos y alargados por lo general septados con conidios que surgen de los micelios, estos conidios unicelulares tienen forma circular o similar a una lagrima y no se observan en cadena, a menudo surgen conidios con pared celular gruesa. Las paredes celulares oscuras de los conidios distinguen a *S. schenckii* de otras especies de *Sporothrix* no patógenas [2].

Cuando es cultivado a 37°C se observa con una morfología levaduriforme pueden ser redondos u ovalados y generalmente son alargados similar a un gusano.

La esporotricosis es una micosis subcutánea que se presenta en humanos y en algunos otros mamíferos que se caracteriza por la presencia de lesiones nodulares en la piel causada por el género *Sporothrix* donde *Sporothrix schenckii* es uno de los agentes infecciosos, se ha reportado también la infección por contaminación de heridas abiertas, inhalación de conidios o por lesiones causadas por animales infectados [3,4].

Los microorganismos patógenos están dotados de ciertos componentes que les brindan la capacidad de poseer un fenotipo de virulencia esto nos dirige hacia el concepto de factores de virulencia que son componentes microbianos que favorecen el crecimiento o sobrevivencia del microorganismo durante la infección [5]. Uno de los posibles factores de virulencia en *S. schenckii* es que pasa por una transición donde convierte una hifa no patógena presente en el suelo, en una levadura patógena. Sin embargo, aún se desconocen aspectos básicos del dimorfismo y los genes que se expresan en la transición y por lo tanto es importante el uso de nuevas herramientas moleculares que permitan conocer más acerca de este importante tema.

Entre las alternativas para estudiar la afectación del proceso dimórfico, se utilizaron las transformaciones mediadas por *A. tumefaciens* para generar mutantes de *S. schenckii* que expresaban de manera estable el gen de la GFP (*green fluorescent protein*) y resistencia a higromicina por la expresión de un gen de resistencia a este antibiótico como marcador de selección.

En este trabajo tras la obtención previa de cepas mutantes se seleccionaron aquellas que presentaban deficiencias en el cambio dimórfico y se estudiaran las características morfológicas a nivel celular (microscópico) y crecimiento en colonias (macroscópico) de *S. schenckii* así como se analizara de manera indirecta alteraciones en la composición de la pared celular mediante el uso de agentes perturbadores de pared tales como rojo Congo y blanco de carcofluor.

II. METODOLOGÍA

A. Obtención de conidios

Se inocularon placas con medio YPD sólido, pH 4.5 con 30 µL de un stock de conidios congelados a -70°C. Las placas inoculadas se incubaron a 28°C de 7 a 8 días. Una vez que creció el cultivo, los conidios se cosecharon de cada placa agregando 5 mL de agua estéril, fría y frotando la superficie del cultivo con un asa de vidrio estéril. El agua junto con los conidios se recuperó y se colocó en tubos falcon de 50 mL. Posteriormente se centrifugaron los tubos a 4500 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 4°C. Las pastillas de conidios se lavaron y resuspendieron con PBS pH 7.4; y se utilizaron para la propagación de otras morfologías fúngicas.

B. Análisis del fenotipo

Macroscópico

De las mutantes se cortaron con un bisturí estéril un cuadro de aproximadamente 0.5 cm x 0.5 cm y se colocó en placas con medio YPD a pH de 4.5 y se incubaron a 28°C de 7 a 8 días para poder observar el crecimiento de colonias aisladas en placa.

Microscópico

Se hicieron diluciones 1:100 para poder observar la muestra al microscopio en un tubo eppendorf de 2 ml se colocó 90 µl de agua destilada y 10 µl del inóculo mezclamos y posteriormente se colocaron 50 µl de cada muestra en un portaobjetos se colocó el cubreobjetos y se observó en microscopio óptico con el objetivo 10X Y 40X.

C. Análisis de fluorescencia

Las mutantes se observaron al microscopio para verificar la presencia o ausencia de fluorescencia, debido a la presencia del gen GFP presente en T-DNA que se integró al genoma de *S. schenkii*. Después de crecer las mutantes por aproximadamente 3 a 4 días para análisis de conidios y de 7 a 8 días para levaduras a 28°C y 37°C, se tomaron 10µL de medio y se pusieron en un portaobjetos nuevo y se cubrió con un cubreobjetos. Las muestras fueron selladas y vistas en fresco en un microscopio con una luz UV acoplada para verificar la fluorescencia de las muestras. Se observaron bajo los objetivos 63X y 100X utilizando aceite de inmersión.

Las muestras fueron documentadas con una cámara [AxioCam] acoplada al microscopio [ZEISS axioskop 40] se observaron con el objetivo de 10X y 40X.

D. Medición de la sensibilidad de agentes perturbadores de pared celular

Se tomaron las células en fase logarítmica (~18h) y se cosecharon por centrifugación posteriormente se realizaron dos lavados con H₂O mQ y se ajustó la densidad óptica a 600 nm= 0.05. Las células ajustadas de densidad se añadieron a la placa con los agentes a probar: Blanco de Calcofluor y Rojo Congo. Se realizaron diluciones dobles seriadas de los agentes perturbadores además de que se añadió un control de cada agente diluido. Se incubó la placa a 28°C/~48h por un periodo de 3 a 4 días. Finalmente, se determinó la densidad óptica por pozo, utilizando un lector de microplacas EPOCH de Biotek con una longitud de onda de 600 nm.

III. RESULTADOS

Se trabajo con tres cepas mutantes de *S. schenkii* (M102, M104, M114) y una cepa control (4821). Tras la obtención de conidios de cada cepa se realizó un recuento en cámara de Neubauer obteniendo los siguientes resultados.

Para determinar la presencia o ausencia de fluorescencia, debido a la presencia del gen

GFP presente en T-DNA en las cepas mutantes de *S. schenkii*; se observaron al microscopio. Para este caso se utilizaron cultivos frescos de células. Como control negativo se observó la cepa silvestre 4821 y todas las cepas observadas presentaron fluorescencias algunas más representativas que otras.

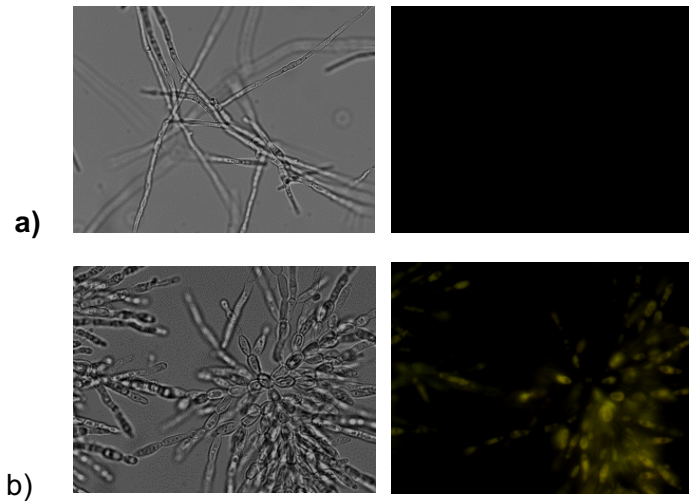
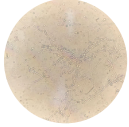
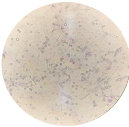
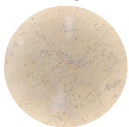
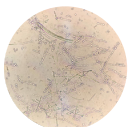


Fig. 1. Microscopia de fluorescencia. Objetivo 40X. [37°C, pH 4.5]
a)Cepa silvestre 4821 (control) **b)**Cepa M102

Tabla 1. Descripción de morfología microscópica de las cepas mutantes a 28°C, pH 4.5.

Cepa	Morfología
4821 	Micelio delgado, alargado y definido con ramificaciones con presencia de conidios.
M102 	Pocos micelios cortos y finos. Se aprecia gran cantidad de conidios redondeadas y con la pared celular un poco gruesa.
M104 	Pocos micelios finos y alargados con ramificaciones finas y largas. Se aprecian conidios redondas aun pegadas al micelio y con la pared celular gruesa.
M114 	Abundantes micelios cortos y gruesos con ramificaciones gruesas con conidios aun incrustadas.

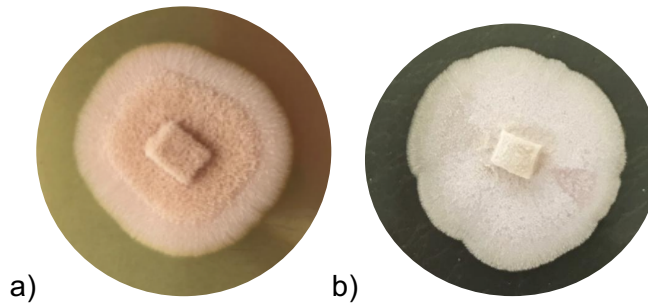
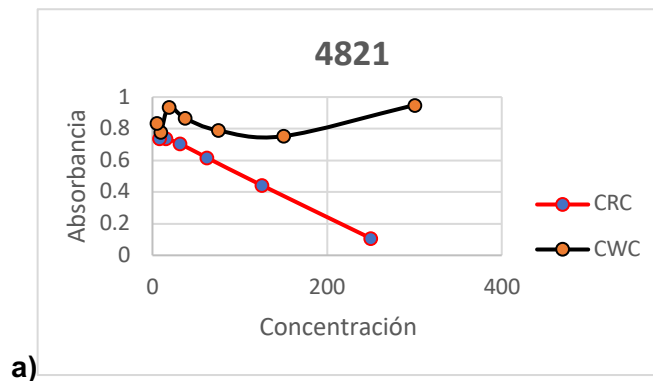


Fig. 2. Morfología macroscópica
a) Cepa silvestre (control) **b)** Mutante M102

Tabla 2. Descripción de la morfología macroscópica de las mutantes en medio YPD sólido pH 4.5

Cepa	Características
4821	Forma: Filamentosa Elevación: Convexa Margen: Filamentoso Color: Beige mate Superficie: Rugosa, seca e invasiva
M102	Forma: Filamentosa Elevación: Convexa Margen: Filamentoso Color: Blanco mate Superficie: Rugosa, seca e invasiva
M104	Forma: Filamentosa Elevación: Convexa Margen: Filamentoso Color: Blanco mate Superficie: Rugosa, seca e invasiva
M114	Forma: Filamentosa Elevación: Convexa Margen: Filamentoso Color: Beige mate Superficie: Rugosa, seca e invasiva



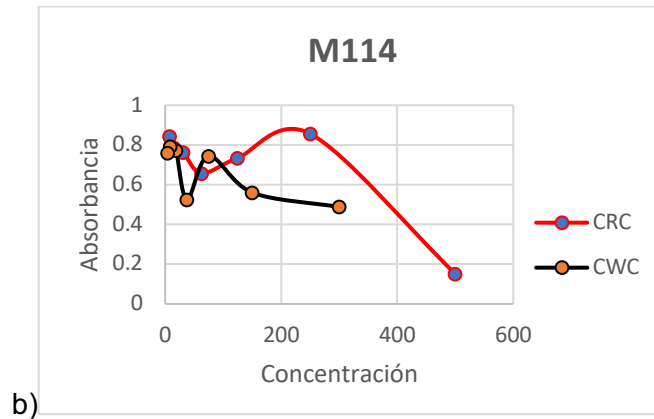


Fig. 3. Crecimiento de las células respecto a la concentración del agente perturbador. Rojo Congo(CRC, línea azul); Calcofluor White (CWC, línea roja) a)Cepa silvestre 4821 b) M114

IV. DISCUSIÓN

En la obtención de conidios se observó que la cepa control presentaba adherencia al medio, sin embargo las mutantes no manifestaban esta resistencia. Según Bastos Monica [2] en su artículo *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis, el hongo tiene moléculas de lectina similares a la adhesina que le permiten adherirse y esta adhesión esta relacionada con su virulencia, por lo tanto se puede creer que estas moléculas sufrieron algún cambio en el proceso de mutagenesis.

Como se puede observar en la figura 2. Las mutantes a diferencia de la cepa control presentaron diferente coloración; según estudios previos la concentración de carbohidratos disponible durante el crecimiento de *S. schenckii* modula la síntesis de melanina por este hongo lo que mejora la formación de pigmento de una manera dependiente de la concentración de glucosa. Por tanto, se podría decir que las mutantes al perder el pigmento también sufrieron modificaciones en algunas rutas metabólicas como se mencionó un ejemplo podría ser la síntesis de melanina.

Los agentes perturbadores mostraron distintos comportamientos en cada una de las mutantes; no se sabe con exactitud cuál fue la modificación que sufrieron pues solo fue un estudio preliminar donde se puede suponer que la mayoría de las mutantes mostraron daño a la pared celular según los datos mostrados en las gráficas de absorbancia; sin embargo se podría creer que debido a que los agentes se unieron al polisacárido interfieren en la síntesis del mismo pero no se sabe con certeza, ya que el daño de la pared celular conduce a la activación de mecanismos propios del hongo a prueba de fallas que apuntan y reparan las paredes para evitar la ruptura de su integridad y así evitar que se afecte directamente la función de la pared y las interacciones con el medio ambiente, incluido el reconocimiento inmune por parte de plantas y animales.

V. CONCLUSIÓN

Según el análisis realizado se puede concluir que, por lo general, las seis cepas mutantes presentaron bastantes diferencias tanto a nivel microscópico como macroscópico con respecto a la cepa silvestre. A sí mismo las cepas mutantes conservan el gen de

resistencia a Higromicina, esta resistencia confirma que contienen el plásmido y que son las colonias positivas. Además, como se mencionó previamente el factor de virulencia en las mutantes pudo ser atenuado ya que manifestaron una disminución en su adherencia y también al ser modificadas se alteraron algunas de sus rutas metabólicas.

Además, agentes como el rojo Congo y el blanco de carcofluor causan algún daño en la pared celular de los hongos, ya que al estar muy concentrado el agente se notó una disminución en la concentración celular. Es necesario corroborar esto, así como hacer un estudio más extenso sobre las modificaciones que dichos agentes causan en *Sporothrix Schenkii*.

REFERENCIAS

- [1] Ramos-e-Silva,M.,Vasconcelos,C.,Carneiro,S. and Cestari,T.(2007). "Sporotrichosis" clinics in Dermatology 25(2):181-187.
- [2] Bastos, Monica. (2011) Sporothrix schenckii and Sporotrichosis. American Society for Microbiology. National School of Public Health, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.
- [3] Brown,G.D.;Denning,D.W.;Gow,N.A.;Levitz,S.M.;Netea,M.G.;White,T.C.Hiddenkillers. (2012): Human fungal infections. Sci. Transl. Med. [CrossRef] [PubMed]
- [4] Lopez-Romero,E., Reyes- Montes Mdel,R., Perez-Torres, A., Ruiz-Baca, E., Villagomez-Castro J.C., Mora-Montes, H.M., et al. (2011) "Sporothrix schenckii complex and sporotrichosis, an emerging health problem" Future Microbiol 6(1):85-102
- [5] Teixeira, M. M., de Almeida, L. G., Kubitschek-Barreira, P., Alves, F. L., Kioshima, É. S., Abadio, A. K., ... & Ruiz, J. C. (2014). Comparative genomics of the major fungal agents of human and animal Sporotrichosis: Sporothrix schenckii and Sporothrix brasiliensis. BMC Genomics, 15(1), 1.
- [6] Lopez-Romero, E., Reyes-Montes Mdel, R., Perez-Torres, A., Ruiz-Baca, E., Villagomez-Castro, J. C., Mora-Montes, H. M., et al. (2011). Sporothrix schenckii complex and sporotrichosis, an emerging health problem. Future Microbiol. 6, 85–102.

Caracterización de mutantes de dimorfismo M107, M111 y M116 de *Sporothrix schenckii*, generadas por mutagénesis insercional

Juan Manuel Rangel Pérez

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Departamento de Ingeniería Bioquímica,
Carr. Irapuato-Silao Km 12.5,
C.P. 36821, Irapuato, Gto
manne_rangel6@hotmail.com

Asesor: Gustavo A. Niño Vega

Universidad de Guanajuato,
Departamento de Biología, División de Ciencias
Naturales y Exactas, Campus Guanajuato,
Noria Alta s/n, col. Noria Alta,
C.P. 36250 Guanajuato Gto.
gustavo.nino@ugto.mx

Resumen —La esporotricosis es una micosis subcutánea donde *Sporothrix schenckii* es uno de los agentes infecciosos. *Sporothrix schenckii* es un hongo dimórfico que se distribuye ampliamente en la naturaleza. Su forma saprofita y su forma levaduriforme. Uno de los posibles factores de virulencia en *S. schenckii* es que pasa por una transición donde convierte una hifa no patógena, en una levadura patógena. Sin embargo, aún se desconocen aspectos básicos del dimorfismo y los genes que se expresan en la transición y por lo tanto es importante el uso de nuevas herramientas que permitan conocer más de este tema. Por ello anteriormente en el grupo de trabajo se generaron mutantes por mutagénesis insercional usando como intermediario a la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. En el presente trabajo, se procedió a la caracterización morfológica de seis mutantes seleccionadas por su poca capacidad en completar el proceso dimórfico, en comparación con la cepa silvestre donde se concluyó que hay una gran diferencia entre cada una fenotípicamente.

Palabras clave — *Sporothrix schenckii*, dimorfismo, fenotipo.

Abstract —Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis where *Sporothrix schenckii* is one of the infectious agents. *Sporothrix schenckii* is a dimorphic fungus widely distributed in nature. Its saprophytic form and its form levaduriform. One possible virulence factor in *S. schenckii* is that it goes through a transition where it converts a non-pathogenic hypha, into a pathogenic yeast. However, basic aspects of dimorphism and the genes that are expressed in the transition are still unknown and therefore it is important to use new tools that allow us to know more about this topic. Therefore, previously in the working group, mutants were generated by insertional mutagenesis using as an intermediary the bacterium *Agrobacterium tumefaciens*. In the present work, we proceeded to the morphological characterization of six mutants selected for their low capacity to complete the dimorphic process, in comparison with the wild strain where it was concluded that there is a great difference between each phenotypically.

Keywords —*Sporothrix schenckii*, dimorphism, phenotype.

I. INTRODUCCIÓN

El cuerpo alberga normalmente una variedad de microorganismos, que incluyen bacterias y hongos. Algunos son útiles para el cuerpo, algunos no producen ni daño ni beneficio y algunos otros pueden provocar infecciones dañinas.

Algunas infecciones micóticas son causadas por hongos que a menudo viven en el cabello, las uñas y las capas externas de la piel. Estos incluyen hongos levaduriformes como *S. schenckii* que es un hongo dimórfico cuya transformación es dependiente de la temperatura de cultivo: a 25°C se manifiesta su forma saprófita, mostrando crecimiento

filamentoso o micelial; mientras que a 37°C se transforma en su forma patógena, exhibiendo una morfología levaduriforme [1]. *Sporothrix schenckii* es un patógeno fúngico y es el agente causal de la esporotricosis humana y animal. La esporotricosis es una micosis subcutánea que se presenta en humanos y en algunos otros mamíferos que se caracteriza por la presencia de lesiones nodulares en la piel causada por el género *Sporothrix* donde *Sporothrix schenckii* es uno de los agentes infecciosos, se ha reportado también la infección por contaminación de heridas abiertas, inhalación de conidios o por lesiones causadas por animales infectados. Es una infección emergente en pacientes inmunocomprometidos, y una enfermedad laboral en agricultores y trabajadores en estrecho contacto con el suelo, madera, corteza, forraje y paja [2].

Los microorganismos patógenos están dotados de ciertos componentes que les brindan la capacidad de poseer un fenotipo de virulencia esto nos dirige hacia el concepto de factores de virulencia que son componentes microbianos que favorecen el crecimiento o sobrevivencia del microorganismo durante la infección[3]. Uno de los posibles factores de virulencia en *S. schenckii* es que pasa por una transición donde convierte una hifa no patógena presente en el suelo, en una levadura patógena.

Entre las alternativas para estudiar la afectación del proceso dimórfico, se utilizaron las transformaciones mediadas por *A. tumefaciens* para generar mutantes de *S. schenckii* que expresaban de manera estable el gen de la GFP (green fluorescent protein) y resistencia a higromicina por la expresión de un gen de resistencia a este antibiótico como marcador de selección. En este trabajo tras la obtención previa de cepas mutantes se seleccionaron aquellas que presentaban deficiencias en el cambio dimórfico y se estudiaron las características morfológicas a nivel celular (microscópico) y crecimiento en colonias (macroscópico) de *S. schenckii* así como se analizaron de manera indirecta alteraciones en la composición de la pared celular mediante el uso de agentes perturbadores de pared tales como rojo Congo y blanco de carcofluor.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Obtención de conidios

Se inocularon placas con medio YPD sólido, pH 4.5 con 30 µL de un stock de conidios congelados a -70°C. Las placas inoculadas se incubaron a 28°C de 7 a 8 días. Una vez que creció el cultivo, los conidios se cosecharon de cada placa agregando 5 mL de agua estéril, fría y frotando la superficie del cultivo con un asa de vidrio estéril. El agua junto con los conidios se recuperó y se colocó en tubos falcon de 50 mL. Posteriormente se centrifugaron los tubos a 4500 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 4°C. Las pastillas de conidios se lavaron y resuspendieron con PBS pH 7.4; y se utilizaron para la propagación de otras morfologías fúngicas.

B. Análisis del fenotipo

Macroscópico

De las mutantes se cortaron con un bisturí estéril un cuadro de aproximadamente 0.5 cm x 0.5 cm y se colocó en placas con medio YPD a pH de 4.5 y se incubaron a 28°C de 7 a 8 días para poder observar el crecimiento de colonias aisladas en placa.

Microscópico

Se hicieron diluciones 1:100 para poder observar la muestra al microscopio en un tubo eppendorf de 2 ml se colocó 90 µl de agua destilada y 10 µl del inóculo mezclamos y posteriormente se colocaron 50 µl de cada muestra en un portaobjetos se colocó el cubreobjetos y se observó en microscopio óptico con el objetivo 10X Y 40X.

C. Análisis de fluorescencia

Las mutantes se observaron al microscopio para verificar la presencia o ausencia de fluorescencia, debido a la presencia del gen GFP presente en T-DNA que se integró al genoma de *S. schenkii*. Después de crecer las mutantes por aproximadamente 3 a 4 días para análisis de conidios y de 7 a 8 días para levaduras a 28°C y 37°C, se tomaron 10µL de medio y se pusieron en un portaobjetos nuevo y se cubrió con un cubreobjetos. Las muestras fueron selladas y vistas en fresco en un microscopio con una luz UV acoplada para verificar la fluorescencia de las muestras. Se observaron bajo los objetivos 63X y 100X utilizando aceite de inmersión.

Las muestras fueron documentadas con una cámara [AxioCam] acoplada al microscopio [ZEISS axioskop 40] se observaron con el objetivo de 10X y 40X.

D. Medición de la sensibilidad de agentes perturbadores de pared celular.

Se tomaron las células en fase logarítmica (~18h) y se cosecharon por centrifugación posteriormente se realizaron dos lavados con H₂O mQ y se ajustó la densidad óptica a 600 nm= 0.05. Las células ajustadas de densidad se añadieron a la placa con los agentes a probar: Blanco de Calcofluor y Rojo Congo. Se realizaron diluciones dobles seriadas de los agentes perturbadores además de que se añadió un control de cada agente diluido. Se incubó la placa a 28°C/~48h por un periodo de 3 a 4 días. Finalmente, se determinó la densidad óptica por pozo, utilizando un lector de microplacas EPOCH de Biotek con una longitud de onda de 600 nm.

III. RESULTADOS

Se caracterizaron tres cepas mutantes de *S. schenkii* (M107, M111, M116) comparándolas con la cepa silvestre como control (4821). Tras la obtención de conidios de cada cepa se realizó un recuento en cámara de Neubauer obteniendo los siguientes resultados.

Para determinar la presencia o ausencia de fluorescencia, debido a la presencia del gen GFP presente en T-DNA en las cepas mutantes de *S. schenkii*; se observaron al microscopio de fluorescencia. Para este caso se utilizaron cultivos frescos de células. Como control negativo se observó la cepa silvestre 4821 y todas las cepas mutantes presentaron fluorescencias algunas más representativas que otras.

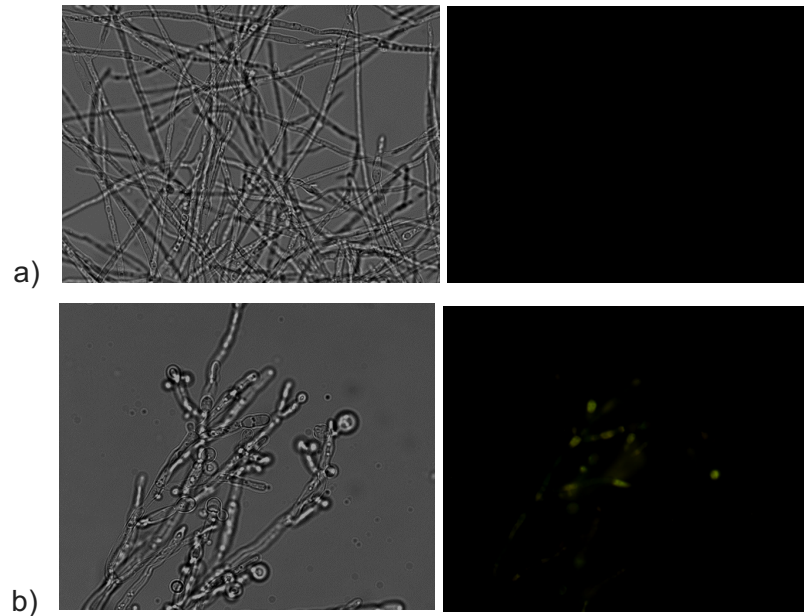


Fig. 1. Microscopía de fluorescencia. Objetivo 40X. [37°C, pH 4.5]
a) Cepa silvestre 4821 control b) Cepa M107

Tabla 1. Descripción de morfología microscópica de las cepas mutantes a 28°C, pH 4.5

Cepa	Morfología	Cepa	Morfología
4821	Micelio delgado, alargado y definido con ramificaciones con presencia de abundantes conidios.	M111	Micelio muy ramificado, septado y aglomerado, sin conidios.
M107	Micelio fino y alargado un poco ramificado con presencia de muy pocos conidios de forma circular.	M116	Micelio fino alargado un poco ramificado y aglomerado, sin conidios.

Para llevar a cabo el estudio macroscópico de las cepas mutantes se hizo crecer una colonia en medio YPD a pH 4.5.

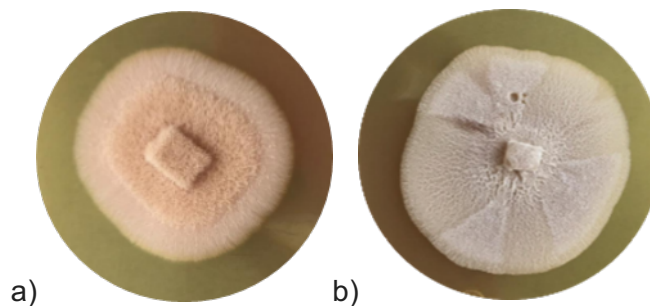


Fig. 2. Morfología macroscópica
a) Cepa silvestre (control) b) Mutante M111.

Tabla 2. Descripción de la morfología macroscópica de las mutantes en medio YPD solido pH 4.5

Cepa	Características	Cepa	Características
4821	Forma: Filamentosa Elevación: Convexa Margen: Filamentoso Color: Beige mate Superficie: Rugosa, seca e invasiva	M111	Forma: Filamentosa Elevación: Convexa Margen: Filamentoso Color: Blanco mate Superficie: Rugosa, seca e invasiva
M107	Forma: Filamentosa Elevación: Convexa Margen: Filamentoso Color: Blanco mate Superficie: Rugosa, seca e invasiva	M116	Forma: Filamentosa Elevación: Convexa Margen: Filamentoso Color: blanco claro Superficie: Rugosa, seca e invasiva

Para la medición de la sensibilidad de agentes perturbadores de pared celular se utilizó Rojo Congo y Blanco de Calcofluor al hacer las respectivas diluciones en microplacas se obtuvieron los siguientes resultados:

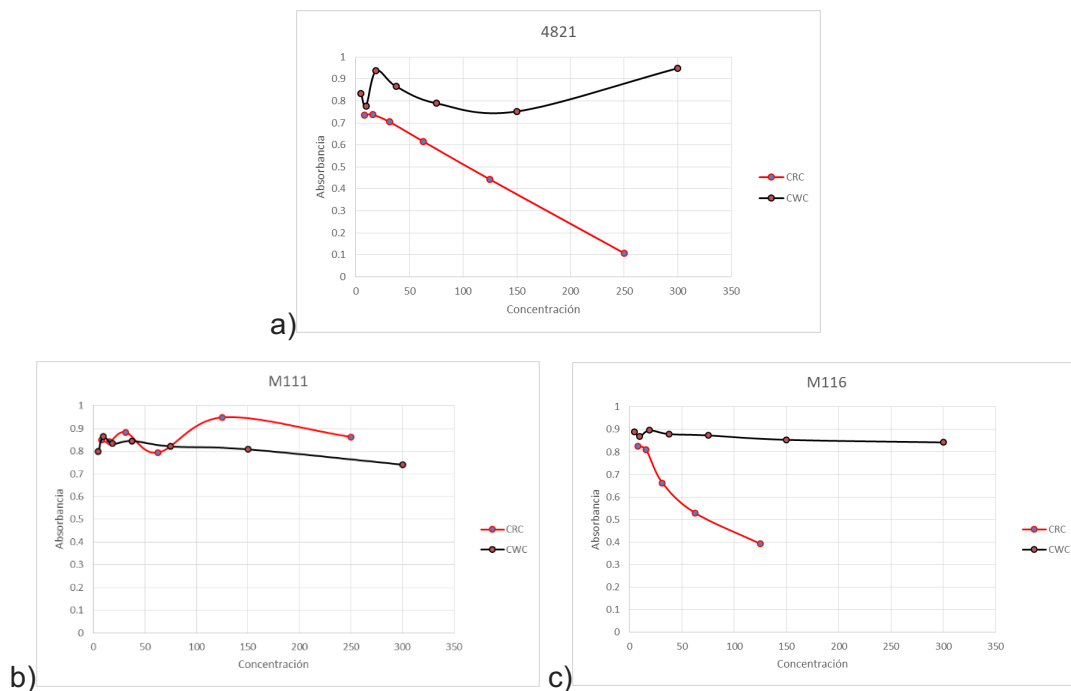


Fig. 3. Crecimiento de las células contra la concentración del agente perturbador. Rojo Congo (CRC, línea azul); Calcofluor White (CWC, línea roja) a) Cepa silvestre 4821 b) M116 c) M111

IV. DISCUSIÓN

Según estudios previos en medios como el agar de extracto de malta o el agar de dextrosa de patata a menudo las colonias son suaves y arrugadas, de color blanco a cremoso al principio y luego se vuelven de color marrón a negro después de unos días. En el análisis macroscópico realizado las colonias cultivadas en medio YPD se observaron filamentosas, en las mutantes se observó una diferencia en la coloración respecto a la cepa control, estas mantuvieron un tono blanco cremoso. Según Ramos Silva [4] ciertos estudios in vitro indican que la melanización en *S. schenckii* está controlada por varios factores, como la temperatura, el pH y las condiciones de nutrientes, sin embargo en el presente trabajo se podría decir que la melanización se vio afectada en el proceso de mutagénesis.

Además se sabe que la melanización también tiene un papel en la patogénesis de la esporotricosis cutánea [5], ya que los aislados pigmentados tienen una capacidad invasiva mayor que la cepa albina mutante en un modelo experimental de esporotricosis en ratas. Por tanto según lo mencionado podemos pensar que las cepas mutantes M107, M111, M116 debido a su coloración blanca disminuyeron su patogenicidad.

Los agentes perturbadores mostraron cierto daño a la pared celular según lo observado en los gráficos de la figura 3 comparando la cepa control con la mutante M116 se muestra que en la segunda dilución del CRC mostro una caída en la gráfica eso puede indicar que este perturbador afecto en su pared celular dañando la enzima en la que se une por otro lado el CWC se mantuvo sin dañar a la pared. La mutante 111 presenta una resistencia al perturbador debido a que las quitinasas pueden sustituir a la β -Glucano por lo que las mutantes tienen gran deficiencia en sus componentes de la pared celular o alteraciones que las hacen resistentes a los perturbadores.

Sin embargo la pared de *Sporothrix* es rígida y compleja y posee mecanismos de defensa que se activan para reparar o evitar daños, por ello son necesarios estudios posteriores a este preliminar que puedan validar las perturbaciones.

V. CONCLUSIONES

Como conclusión las tres cepas mutantes presentaron bastantes diferencias tanto a nivel microscópico como macroscópico con respecto a la cepa silvestre. A sí mismo las cepas mutantes conservan el gen de resistencia a Higromicina, está resistencia confirma que contienen el plásmido y que son las colonias positivas. Las cepas mutantes mostraron una disminución en la adherencia al medio de cultivo debido a que el factor de virulencia pudo ser atenuado y al ser modificadas se alteraron algunas de sus rutas metabólicas

Además, los agentes perturbadores como el rojo Congo y el blanco de carcofluor causan algún daño en la pared celular de los hongos, ya que al estar muy concentrado el agente se notó una disminución en la concentración celular. Es necesario corroborar esto, así como hacer un estudio más extenso sobre las modificaciones que dichos agentes causan en *Sporothrix Schenkii*.

REFERENCIAS

- [1] Teixeira, M. M., de Almeida, L. G., Kubitschek-Barreira, P., Alves, F. L., Kioshima, É. S., Abadio, A. K., ... & Ruiz, J. C. (2014). Comparative genomics of the major fungal agents of human and animal Sporotrichosis: *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. *BMC Genomics*, 15(1), 1.
- [2] Lopez-Romero, E., Reyes-Montes Mdel, R., Perez-Torres, A., Ruiz-Baca, E., Villagomez-Castro, J. C., Mora-Montes, H. M., et al. (2011). *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. *Future Microbiol.* 6, 85–102. doi: 10.2217/fmb.10.157
- [3] Teixeira, M. M., de Almeida, L. G., Kubitschek-Barreira, P., Alves, F. L., Kioshima, É. S., Abadio, A. K., ... & Ruiz, J. C. (2014). Comparative genomics of the major fungal agents of human and animal Sporotrichosis: *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. *BMC Genomics*, 15(1), 1.
- [4] Ramos-e-Silva, M., Vasconcelos, C., Carneiro, S. and Cestari, T. (2007). "Sporotrichosis" clinics in *Dermatology* 25(2):181-187
- [5] Bastos, Monica. (2011) *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. American Society for Microbiology. National School of Public Health, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.

Caracterización molecular y virulencia de hongos entomopatógenos aislados en sierra gorda de Guanajuato (A)

Isis Pérez Hernández

Universidad Autónoma de Coahuila
Carretera Torreón-Matamoros km 7.9
isis.perez@uadec.edu.mx

Asesor: Dr. Juan Gualberto Colli Mull

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Carr. Irapuato - Silao km 12.5 Colonia El Copal
jcolli@itesi.edu.mx

Resumen — En el siguiente trabajo se estudió el nivel de virulencia de los hongos entomopatógenos por medio de una infección de insectos, así como también una caracterización molecular por los métodos de microcultivo, *extracción de DNA, PCR y restricción*. En los resultados se obtuvo que el hongo de la especie *Metarhizium anisopliae* fue el que presentó mayor índice de infección en comparación de las otras dos especies, *Cordyceps fumosorosea* y *Beauveria bassiana*, por lo tanto, este hongo es altamente recomendado para eliminar las plagas en los cultivos.

Palabras clave — Hongos, entomopatógenos, virulencia.

Abstract — In the following work the virulence level of the entomopathogenic fungi is studied through an insect infection, as well as a molecular characterization by microculture, *DNA extraction, PCR and restriction methods*. In the results it was obtained that the fungus of the species *Metarhizium anisopliae* was the one with the highest infection rate compared to the other two species, *Cordyceps fumosorosea* and *Beauveria bassiana*, therefore, this fungus is highly recommended to eliminate pests in crops.

Keywords — fungi, entomopathogenic, virulence.

I. INTRODUCCIÓN

La agricultura ha sido una actividad altamente practicada en nuestro país debido a los diversos cultivos que se pueden producir, sin embargo, una desventaja son las plagas que afectan a estos y disminuyen su eficiencia. Meyling y Eilenberg (2007)

Por ello la aplicación de agentes de control biológico ha ocupado una importancia relevante, pues resulta ser una alternativa en el desarrollo de una agricultura sostenible que preserve los recursos naturales y el medio ambiente para las futuras generaciones.

Los hongos entomopatógenos son un grupo de microorganismos que funcionan como biocontroladores y son utilizados principalmente para el control de plagas en los cultivos, estos hongos se encargan de infectar a los insectos hasta matarlos. Según Samson et al. (1998), son los primeros agentes biológicos en ser utilizados para el control de plagas.

La muerte del insecto es ocasionada por la destrucción de tejidos y, ocasionalmente, por toxinas producidas por los hongos. Una vez que la plaga muere, los hongos emergen de su cuerpo para producir esporas, las cuales, llevadas por el viento, lluvia o por otros insectos pueden expandir la infección.

Los géneros de mayor importancia para la FAO(2003) son *Metarhizium*, *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Verticillium*, *Rhizopus* y *Fusarium*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 6 métodos durante todo el proyecto.

- A) Resiembra:** En la resiembra se utiliza la técnica de siembra por disco, en el cual con el sacabocado se saca un trozo de micelio y se siembra en una placa con medio de peptona glucosa agar (PGA) y otro de medio Sabouraud, así con cada tipo de hongo, se incuba durante 3 días o hasta que crezca lo suficiente el hongo.
- B) Microcultivos:** Se preparan cajas Petri de vidrio con cubre objetos, porta objetos, papel filtro y palillos de madera estériles, se cortan cubos de medio PGA y medio Sabouraud se ponen en el centro del cubre objetos, se toma un fragmento de micelio y se inocula en los cuatro lados del medio de cultivo, se deja incubar durante 3 o 4 días. Se hacen observaciones en el microscopio con azul de algodón.
- C) Extracción de DNA:** Para la extracción de DNA se utiliza micelio de las placas, se añade a un tubo eppendorf con 200µl PBS, se hace una lisis con homogeneizadores y se agrega 300µl. del buffer de extracción. Este primer paso es esencial para obtener una buena extracción de DNA. Después se sigue el protocolo de extracción de DNA con algunas modificaciones (P. Rocha, Cenipalma 2005). Por último se toman 5 µl y se mezclan con 1µl de colorante y se cargan en un gel compuesto de 1% de agarosa y 35ml. TAE 1X. después se deja correr el gel a 80 volts por 30 min. y se da lectura en un transluminador de luz.
- D) PCR:** Para la amplificación del DNA se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa(PCR) y se lleva a cabo en un termociclador por aproximadamente 3hr.
- La mezcla final de cada tubo es de 25µl y consiste de lo siguiente; 12.5µl de *Dream taq*, 1µl del oligo *ITS1*, 1µl del oligo *ITS4*, 9.5µl de agua y 1µl de DNA.
- Al finalizar se hace una electroforesis de 5µl de PCR con 1µl de colorante en un gel de agarosa 1%. Se deja correr el gel a 80 volts por 30 min. y se da lectura en un transluminador de luz.
- E) Restricción de DNA:** Para la restricción del DNA se prepararon 3 super mix, la primera con dos enzimas juntas y las otras dos solo con una de las enzimas. 5µl PCR, 2µl de buffer, 0.3µl de enzima *HinfI*, 0.3µl de enzima *AclI* y 12.4µl de agua. La mezcla final para cada tubo es de 20 µl.
- Se incubaron en baño a 37°C por 3 hr. Después se les da un choque térmico a 65°C por 10 min.
- Se hace una electroforesis con todo el contenido del tubo se mezcla con 1µl de colorante y se pone en un gel de agarosa 2.5%
- Se deja correr el gel a 100 volts por 30min. y se da lectura en un transluminador de luz.
- F) Infección:** Para la infección primero se hace un conteo de esporas con la cámara de Neubauer y cada cepa se dejó en un conteo de 10^8 /ml.
- Se preparan cajas Petri con papel filtro estéril, se agregan 1000µl de esporas y se agregan 10 insectos se sella la caja y se deja incubando por 4 o 5 días. Se checan los resultados en el microscopio.

III. RESULTADOS

A. Resiembra

La resiembra fue de las cosas que más se dificultaron en el trabajo debido a que por un mínimo error se contaminaban las placas, por lo tanto, fue muy difícil tener las cajas puras, también uno de los hongos, el *Metarhizium* (Fig.1b.), esporula mucho y se tenía que trabajar con extremo cuidado ya que era el principal contaminante de las demás placas, también por este motivo la resiembra de este hongo fue la más sencilla y se puede observar como el hongo abarca toda la placa fácilmente ya que su crecimiento fue rápido. La Cepa que más se contamina y que costo más trabajo obtener pura fue *Beauveria* (Fig.1c.) en la imagen se puede observar como no hubo tanto crecimiento y como está contaminada.

Después de varios intentos se logró obtener las cepas puras y listas para trabajar con ellas.

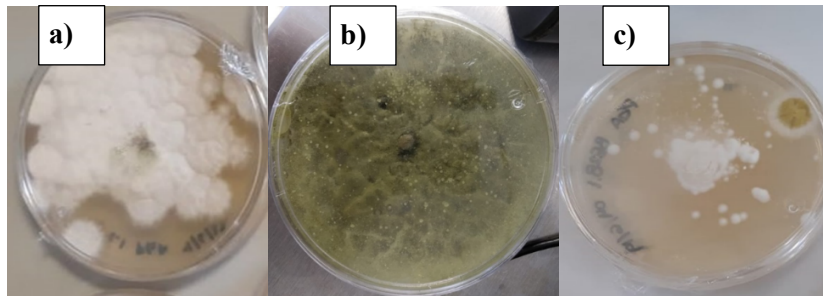


Fig. 1. Fotografías de los hongos resembrados a) Hongo *Cordyceps fumosorosea*, b) Hongo *Metarhizium anisopliae*, c) Hongo *Beauveria bassiana*

B. Microcultivos

Al hacer las observaciones microscópicas se obtuvo como resultado que ninguna de las cepas se logró apreciar su estructura completamente, solo obtuvimos algunas ramificaciones, esto pudo haber sucedido porque a la hora de despegar los cubres objetos se rompían, esto pudo afectar en algo ya que solo pudimos observar una parte que se rescató. También pudo ser que no incubamos el tiempo suficiente como para tener una buena estructura.

Pero con los resultados obtenidos pudimos tener una mejor visión de las estructuras de los hongos con los que trabajamos y ayudo a conocerlos.

En todas las observaciones 10x se ve un panorama más amplio, pero se aprecian unas ramificaciones, a los 40x se distingue un poco más las ramificaciones y a los 100x es posible distinguir mejor incluso se observaron algunas hifas.

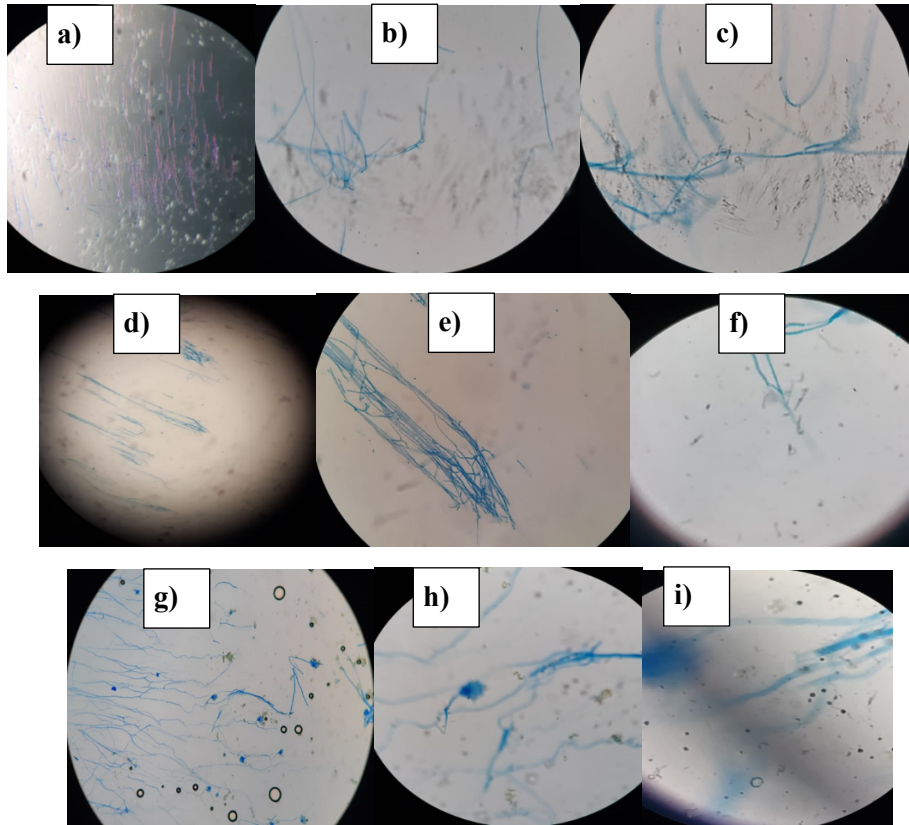


Fig. 2 Observaciones microscópicas de la cepa Be28.1 a)10x b)40x c)100x, observaciones microscópicas de la cepa Co19 d)10x e)40x f)100x, observaciones microscópicas de la cepa Me2.1 g)10x h)40x i)100x.

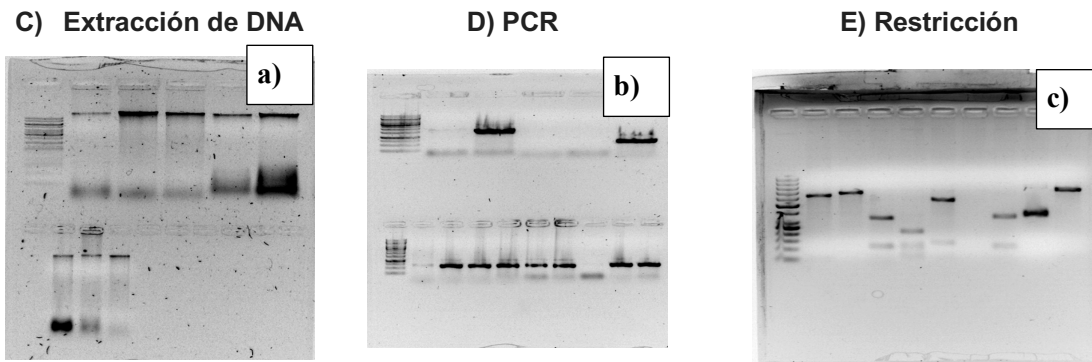


Fig.3 Lectura de geles a) extracción de DNA b) PCR y c) restricción de DNA

C. Extracción de DNA

Los fragmentos de DNA provenientes del micelio de las cepas salieron exitosos. Como se ve en la Fig.3 a) todas las cepas dieron positivo en la extracción de DNA. Después de tres intentos se pudo obtener una buena extracción, esto fue porque se modificaron muchas cosas en el procedimiento, se cambiaron algunos reactivos como el buffer de extracción, el etanol, el isopropanol, también se modificaron los tiempos de centrifugación y las

revoluciones, así como los tiempos de vortex y los de incubación, se trató de hacer una muy buena lisis ya que es la clave para poder extraer el DNA del micelio.

D. PCR

Para la amplificación del DNA se utiliza una técnica sencilla llamada PCR la reacción en cadena de la polimerasa que ayuda a estudiar fragmentos de DNA fácilmente, los resultados obtenidos se pueden ver en la Fig.3 b) donde las barras indican que la amplificación es positiva a excepción de una muestra que se repitió dos veces, pero siguió dando negativa por lo tanto no fue posible trabajar con ella y tuvo que omitirse.

E. Restricción de DNA

Las enzimas de restricción pueden reconocer una secuencia característica de nucleótidos que se encuentran dentro del DNA, con los cuales podemos contar los pares de bases para poder diferenciar especies de hongos, según la Fig.3 c) se observa como todas las muestras de las cepas son diferentes entre sí, y también como tiene diferentes pares de bases según la enzima de restricción con la que se trabajó.

F. Infección

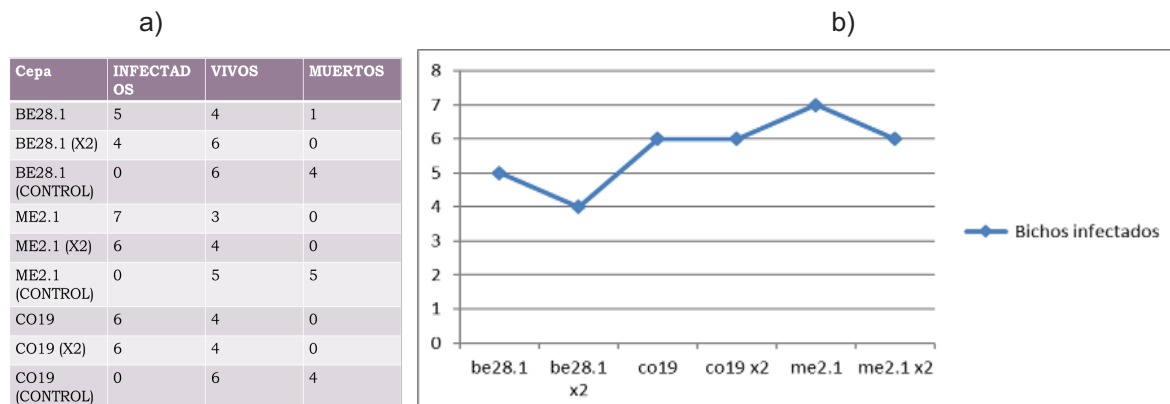
Para la infección primero se realizó un conteo de esporas en el cual el hongo *Metarhizium* se le tuvo que hacer una dilución debido al alto contenido de esporas.

Los resultados de la infección se muestran en la Tab.1, en los cuales hubo variaciones de infección entre especies, pero todos dieron positivo. En la Tab.2 se muestra quien tuvo la mayor virulencia lo cual es el *Metarhizium* por su alto índice de infección.

Lo podemos comprobar por la forma en que se infectaron los insectos, en la Fig. 8c) se observa como el hongo *Metarhizium* invadió y completamente el esqueleto del insecto en tan solo 5 días. Mientras que la actividad virulenta de los otros hongos Fig. 8 a) y b) fue menor a la del hongo anterior.

Aun así, se comprobó que todos los hongos fueron positivos en lo que se esperaba.

Tab.1 a) Se muestra el número de insectos que fueron infectados, murieron sin ser infectados o que permanecieron vivos, por cada caja Petri según el tipo de cepa. b) Se muestra un gráfico con el índice de virulencia de cada cepa durante 5 días.



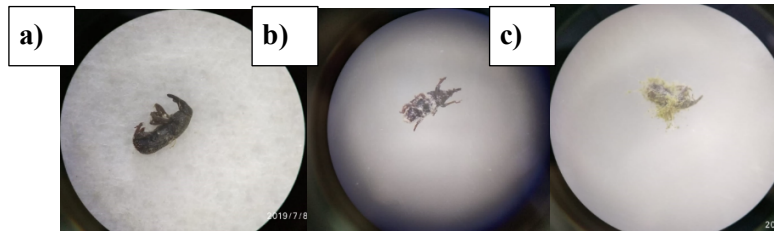


Fig. 8 observaciones microscópicas de insectos infectados según cada cepa. a) infección Co19 b) infección be28.1 c) infección Me2.1

IV. CONCLUSIONES

Para este proyecto es importante conocer si los hongos entomopatógenos son capaces de infectar los insectos, por lo tanto, basándome en los resultados se concluye que todos los hongos con los que se trabajó son entomopatógenos ya que tienen la capacidad de eliminar las plagas exitosamente. Es importante tener en cuenta el nivel de virulencia de cada hongo, para saber cuál es más conveniente usar según lo que se requiere. El *Metarhizium* es el que presento mayor índice de virulencia por lo tanto es altamente efectivo para el control de plagas. También se comprobó que los hongos tienen mecanismos de invasión únicos que les permiten atravesar de forma directa la cutícula de los insectos, lo que los convierte en muy buenos agentes para el control biológico.

V. RECONOCIMIENTOS

Agradezco profundamente al Instituto Superior de Irapuato y al Dr. Juan Colli por todo el apoyo y el interés que me otorgaron para poder ampliar mis conocimientos y así poder realizar mi estancia en el verano.

REFERENCIAS

1. Formulación de hongos entomopatógenos como control biológico. Publicado el: 7/2/2007 Autor/es: Ivis Fragas, Gema G. Fleitas, Hidalgo, L. Centro Nacional De Sanidad Agropecuaria. Carretera de Tapaste y Autopista Nacional, Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.
2. Motta-Delgado, Pablo Andrés; Murcia-Ordoñez, Betselene Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas Ambiente & Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science, vol. 6, núm. 2, 2011
3. HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Microorganismos benéficos para el control de *A.nodipennis* Andrés France I. Ing. Agr. Ph.D.; Ernesto Cisternas A. Ing. Agr. Dr. y Irina Urtubia H. Bioq.

Caracterización molecular y virulencia de hongos entomopatógenos aislados en Sierra Gorda de Guanajuato (B)

Dámaris Juárez Ledezma

Universidad Autónoma de Zacatecas
Carretera Zacatecas-Guadalajara km 6, Ejido “La Escondida”, Ciudad Universitaria Campus Siglo XXI C.P. 98160 Zacatecas, Zacatecas
damirzled@gmail.com

Asesor: Juan Gualberto Colli Mull

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Carretera Irapuato Silao km 12,5 Col. El copal
C.P. 36821, Irapuato, Guanajuato México
jcolli@itesi.edu.mx

Resumen — Los hongos entomopatógenos (HE), son un grupo de microorganismos biocontroladores ampliamente estudiado, distribuidos mundialmente, capaces de infectar insectos y causarles la muerte. Existen más de 700 especies de HE con alta capacidad de esporulación e infección, entre los géneros más representativos se encuentran: *Verticillium*, *Beauveria*, *Metarhizium* y *Cordyceps*. De los cuales se hablará de los últimos tres géneros anteriormente mencionados. A los cuales se les realizaron una serie de pruebas como extracción de DNA, PCR y restricción de DNA, así también se realizó una infección a una población de *Sitophilus zeamais*, la cual nos permitió monitorear el grado de infección de la especie con los hongos utilizados, por 10 días, obteniendo resultados positivos en todos los hongos.

Palabras clave — Hongos entomopatógenos, extracción de DNA, PCR, restricción de DNA, infección.

Abstract — The entomopathogenic fungi (HE), are a group of micro-organism biocontrollers widely studied, distributed worldwide, capable of infecting insects and causing their death. There are more than 700 species of HE with high capacity of sporulation and infection, among the most representative genera are: *Verticillium*, *Beauveria*, *Metarhizium* and *Cordyceps*. Of which will speak of the last three genres mentioned above. Which were performed as DNA extraction, PCR and DNA restriction, and an infection was also performed on a population of *Sitophilus zeamais*, which allowed us to monitor the degree of infection of the species with the fungi used, for 10 days, obtaining positive results in all fungi

Keywords — Entomopathogenic fungi, DNA extraction, PCR, DNA restriction, infection.

I. INTRODUCCIÓN

Los hongos son un grupo de microorganismos filogenéticamente diverso, heterotróficos, eucariontes, unicelulares o hifales (filamentosos), que presentan reproducción por esporas sexuales, asexuales o ambas (Araujo, 2008-2009). Los hongos entomopatógenos (HE), son un grupo de microorganismos biocontroladores ampliamente estudiado, distribuidos mundialmente, capaces de infectar insectos y causarles la muerte (Sepúlveda E).

Los HE son importantes agentes de control biológico de insectos y frecuentemente ocasionan epizootias que reducen significativamente sus poblaciones. Se conocen más de 700 especies de hongos entomopatógenos (Araujo, 2008-2009). Entre las especies más representativas de hongos entomopatógenos se encuentran, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii*, *Cordyceps militaris* (Zúñiga et al., 2016).

El modo de infección de un hongo entomopatógeno comienza cuando una conidia entra en contacto con la cutícula de un insecto susceptible, formando un tubo germinativo que permitirá el ingreso del hongo al hemocele gracias a una serie de enzimas que degradan la

cutícula del hospedero. Una vez en el interior del cuerpo del insecto, el hongo comienza a colonizar distintos órganos, liberando toxinas que inhiben el desarrollo fisiológico y finalmente provocan la muerte al insecto (Sepúlveda E).

Dentro de las principales características de estos microorganismos se encuentra la inocuidad para los seres humanos, lo que garantiza que con su manipulación no se corre riesgo alguno. A su vez, los entomopatógenos son inoos para los insectos benéficos y al resto de los insectos en general ya que, junto a esta inocuidad, se les adjudica la especificidad y selectividad con la que actúan sobre otros organismos (Sepúlveda E).

El objetivo del presente trabajo fue determinar las características moleculares y virulentas de los hongos entomopatógenos, obtenidos en la comunidad de El Ocotero Xichú, una porción de la Reserva de la biósfera Sierra Gorda de Guanajuato en el año 2014, que fue recolectada y entregada por el Instituto Tecnológico Superior de Irapuato (ITESI), para la determinación y el cumplimiento de los objetivos correspondientes para este trabajo.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Los hongos fueron proporcionados por el cepario institucional del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, ya que estos fueron obtenidos del aislamiento de insectos recolectados en una parte de Sierra Gorda de Guanajuato en el año 2014, así que para poder trabajar con ellos se realizó una re-siembra de estos hongos, por duplicado, en medio de cultivo de Agar Papa Dextrosa y Sabouraud. Posteriormente los hongos sembrados se dejaron crecer a temperatura ambiente por 48 hrs o hasta observar crecimiento.

De igual manera se realizaron microcultivos por el método de Ridell, una vez que se observó crecimiento se procedió a la tinción con azul de algodón, para la observación al microscopio a diferentes aumentos del crecimiento del hongo, así también para determinar las estructuras del mismo, como el micelio y de igual forma si se podía observar la producción de esporas.

Una vez que el hongo fue observado microscópicamente, procedimos a la extracción del DNA genómico total de los diferentes hongos proporcionados, para esto se utilizó el protocolo de Skroch y Nienhuis 1995, con algunas modificaciones, 100mg de micelio fue homogeneizado y macerado en una solución amortiguadora de lisis (NaCl 0.7, Tris 0.1M ph 7.5, EDTA 0.01M ph 8, BME 1% y CTAB 1%) se incubó a 65°C y se centrifugo a 10,000 rpm. El sobrenadante fue tratado con una solución de fenol puro. El DNA fue precipitado con un volumen y medio de isopropanol absoluto y resuspendido en H₂O grado miliQ.

La región ITS del gen ribosomal 5S se amplificó mediante los iniciadores universales ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Las reacciones se realizaron en tubos de 0.2 ml con un volumen total de reacción de 25µl con una Super Mix DreamTaq (Thermo Scientific) en un termociclador BIORAD® con el siguiente programa: desnaturalización de 3m a 95°C, 50s a 95°C, 1m a 53°C, 90s a 72°C y un ciclo final de 5m a 72°C. Los productos fueron separados en un gel de agarosa 1% y visualizados en un transluminador UV.

Los productos de PCR de la región ITS, fueron digeridos con las endonucleasas, *HinfI* y *AluI* a 37°C por 3 horas. Posteriormente se le dio un choque térmico a 65°C por 10 min. Los productos fueron separados en un gel de agarosa al 2.5% y visualizado en un transiluminador UV. Los grupos relacionados filogenéticamente, se realizaron con base al número y tamaño de los fragmentos obtenidos.

La infección se dio a una población de *Sitophilus zeamais*, se tomaron 10 insectos para uno de los hongos y así de igual forma se realizó un duplicado y un para cada uno. Las esporas obtenidas fueron suspendidas en una solución de Tritón 0.01%, éstas fueron contadas por mililitro con la ayuda de una cámara de Neubauer, una vez obtenidos el número de esporas por mililitro de cada uno de los hongos procedimos a la infección de los insectos.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los respectivos hongos con los que se trabajaron fueron *Metarhizium*, *Beauveria* y *Cordyceps*, que están representados en la figura 1, los cuales, al momento de ser proporcionados por la institución, se procedió a la realización de una resiembra de los hongos, en dos tipos de agar, los cuales fueron Sabouraud (SAB) y Agar Papa Dextrosa (PGA), con su respectivo duplicado, esto para tener cepas propias de cada uno, con los cuales trabajar.

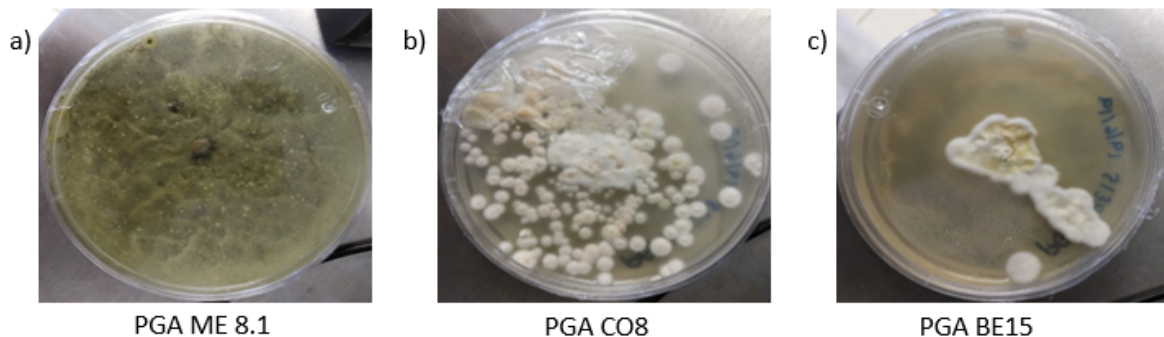


Fig. 1. Hongos entomopatógenos. a) *Metarhizium* en PGA, con clave ME8.1, b) *Cordyceps* en PGA, con clave CO8 c) *Beauveria* en PGA, con clave BE15.

Para cada hongo se realizó un microcultivo, el cual al momento de que creció se desprendió el portaobjetos del hongo y se tiñó con azul de algodón, para su posterior observación en el microscopio, con el cual, al momento de su crecimiento, se logró la visualización del micelio y las esporas de cada uno de los hongos, cada uno fue observado a 10X, 40X y 100X, como está representado en la Figura 2.

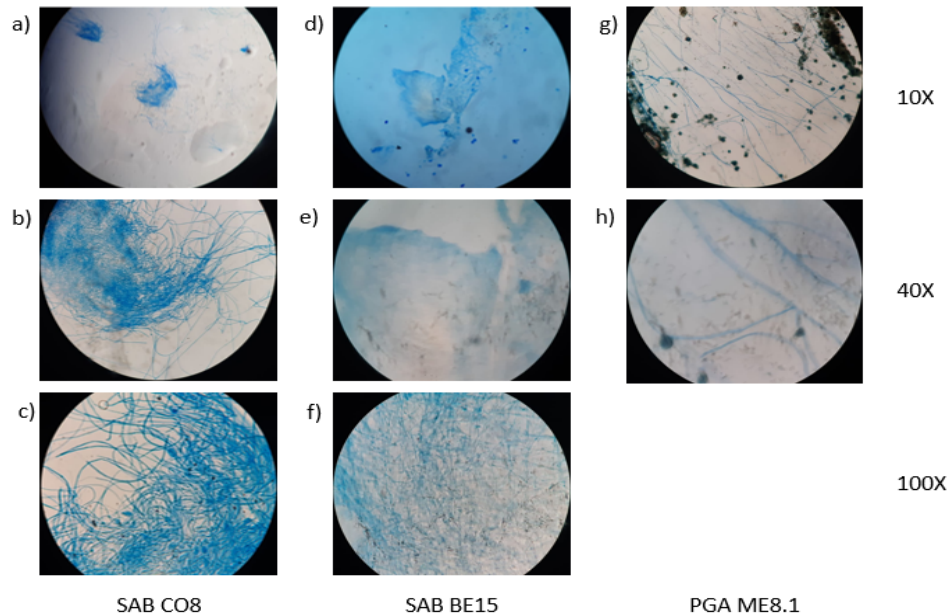


Fig. 2. Microcultivos observados en microscopio a, b y c son cordyceps, realizados en agar sabouraud, a 10, 40 y 100 aumentos, d, e y f son beauveria en agar sabouraud a 10, 40 y 100 aumentos, g y h son metarhizium en agar Papa Dextrosa a 10 y 40 aumentos.

Después de la identificación de las estructuras de los HE, procedimos al análisis de la parte molecular de este proyecto, en el cual se extrajo el DNA de cada uno de lo HE, posterior a la extracción e identificación del DNA de cada HE, se realizó la amplificación de un gen marcador por medio de PCR, siendo amplificada la región ITS del gen ribosomal 5S, mediante los iniciadores universales ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), y por último los productos de PCR de la región ITS, fueron diferidos con las endonucleasas *HinfI* y *AluI*, en el orden mostrado en la tabla 1, de igual manera se puede apreciar en la Figura 3, los resultados arrojados por la electroforesis. En el primer carril se encuentra un marcador molecular de 50 pb y los carriles 2-10 corresponden a los HE a analizar, dejandonos ver que cada uno es diferente ya que cada uno arroja una secuencia de pares de bases distintas entre ellos.

Tabla 1. Orden de los carriles y su contenido

No. Carril	Contenido	Pb
2	CO8 <i>HinfI</i> y <i>AluI</i>	50 – 260
3	CO8 <i>HinfI</i>	60 – 270
4	CO8 <i>AluI</i>	500
5	BE15 <i>HinfI</i> y <i>AluI</i>	160 - 230 – 280
6	BE15 <i>AluI</i>	510
7	BE15 <i>HinfI</i>	150 - 220 – 275
8	ME8.1 <i>HinfI</i> y <i>AluI</i>	280
9	ME8.1 <i>AluI</i>	520
10	ME8.1 <i>HinfI</i>	275

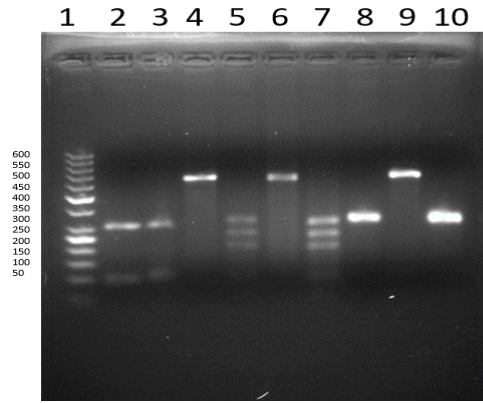


Fig. 3. Restricción de DNA de los hongos entomopatógenos, siendo así el carril 1 un marcador molecular de 50 pb, y los carriles 2 – 10 los hongos entomopatógenos con las diferentes endonucleasas.

Una vez obtenida la parte molecular, procedimos a la infección, siendo así primero se realizó un conteo de esporas, como se puede ver en la tabla 2, posteriormente se utilizaron *Sitophilus zeamais*, donde pudimos observar que todos los insectos tuvieron una infección de los hongos, sin embargo, esta infección no fue tan efectiva como se tenía esperado, ya que por el número de esporas contadas, se tenía contemplado que la infección sería más efectiva de lo que se obtuvo en los resultados, esto pudo ser motivo de una mala agitación al momento de la obtención de las esporas en los tubos, sin embargo, esto no descarta que la infección se dio al 100% en todas las cepas de hongos utilizados, como podemos ver en la figura 4.

Tabla 2. Esporas por mililitro, contadas en cámara de Neubauer.

Hongos	Esporas/ml
CO8	620,000,000
BE15	295,000,000
ME8.1	141,500,000

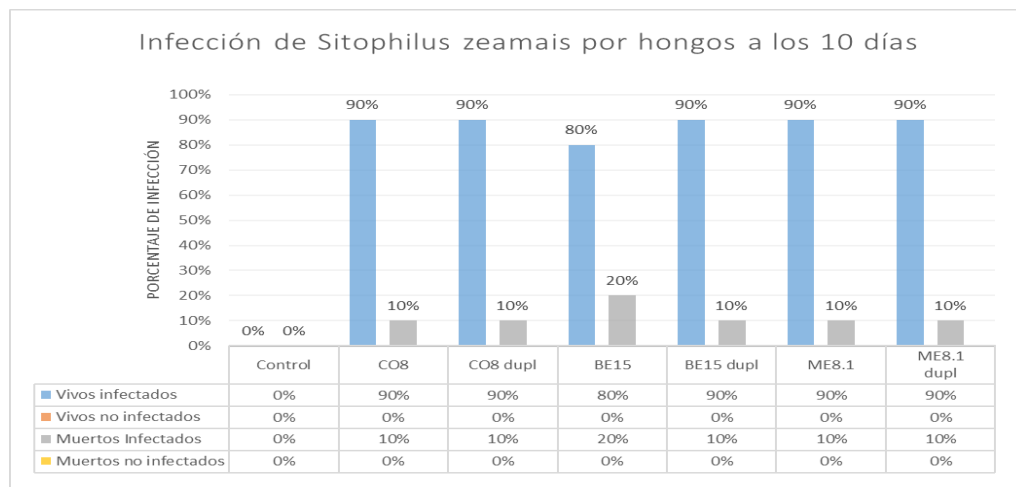


Fig. 4. Porcentaje de infección de *Sitophilus zeamais* por HE durante 10 días

IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los hongos entomopatógenos son un importante agente de control biológico de insectos, como se pudo comprobar en este trabajo de investigación, cada uno de los HE, tiene características macro y microscópicas diferentes, entre los tres HE tratados, así también en su caracterización molecular, quedó demostrado que los hongos tuvieron resultados diferentes. En cuanto a la parte de la virulencia, se demostró la efectividad de los HE, sin embargo, el hongo más destacado en cuanto a virulencia, fue *Metarhizium*, ya que, al momento de trabajar con él, fue el más problemático, sin embargo, se pudo aislar de manera correcta, ya que, al momento de su utilización fue el último con el que se trabajó.

V. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Mi agradecimiento al Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, por brindarme el material necesario para realizar este trabajo.

Al Dr. Colli, por su hospitalidad, amabilidad, comprensión, paciencia y asesoramiento, en este trabajo, así mismo por brindar una facilidad para los materiales proporcionados en el laboratorio; así mismo a cada uno de sus tesisistas por su gentileza, y por las enseñanzas tanto de este proyecto, como de los suyos.

A mis compañeros de verano, Isis y Juan, por su comprensión, colaboración y el buen trabajo en equipo, que me brindaron.

A mi familia, por el permiso y apoyo que me han brindado, porque sin ellos, yo no sería la persona que soy ahora, por inspirarme a seguir estudiando, por sus enseñanzas, consejos, amor, y preocupaciones, por creer en mí.

REFERENCIAS

- E. Araujo y E. Henrique, et al., "Hongos entomopatógenos: importante herramienta para el control de "moscas blancas" (Homoptera: aleyrodidae)". *Anais da Academia Pernambucana de Ciencia Agronómica, Recife*, Vol. 5 y 6, pp. 209-242, 2008-2009.
- Delgado, P. A. M.; Murcia-Ordoñez, B. "Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas". *Ambi-Agua, Taubaté*, Vol. 6, pp. 77-90, 2011. (doi:10.4136/ambi-agua.187)
- Sepúlveda S. M. E., "Hongos Entomopatógenos". *Institución de Investigaciones Agropecuarias*. Ministerio de Agricultura, Chile. Disponible en: <http://www.inia.cl/bioinia/hongos-entomopatogenos/> [consultado en 2019].
- Zúñiga-Zúñiga A., Hernández-Hernández V., De la Riva- De la Riva G. A., Alejo- Iturbide F. y Colli-Mull J.G. "Regulación de la población de insectos por asociaciones fúngicas en la comunidad el "ocotero" Xichú, parte de la Sierra Gorda de Guanajuato". *Entomología mexicana*, 3: 474-480 (2016).

Citocinas (TNF alfa, IL-2, MCP-1 e INF gamma) y marcadores bioquímicos implicados en la desregulación mediada por proteínas cinasas C, PKC en un modelo de obesidad y diabetes mellitus tipo 2

Karen Almendra Arguijo Vielma
 Universidad Autónoma de Coahuila
 Carretera Torreón-Matamoros Km. 7.5,
 Ciudad Universitaria. Ejido El Águila,
 C.P. 27276, Torreón, Coahuila.
karenalmen@hotmail.com

Patricia Monserrat Rodríguez Loza
 Universidad Autónoma de Aguascalientes
 Centro de Ciencias de la Salud
 Av. Universidad 940
 C.P. 20130, Aguascalientes, Ags
patriciarodriguez.pmr@gmail.com

Asesora:
Santiago Marisela Ahumada Solórzano
 Universidad Autónoma de Querétaro
 Av. de las Ciencias s/n, Colonia Juriquilla,
 Campus Juriquilla, Querétaro. C.P. 76230
santiago.marisela.ahumada@uaq.mx

Resumen — Presentamos el efecto y niveles de citocinas (IL-2, IL-6, TNF- α , INF- γ y MCP-1) en el suero de ratas Wistar con inducción de diabetes mellitus tipo 2 con estreptozotocina y obesidad con dieta obesogénica, los cuales fueron comparados con el grupo control. El objeto de estudio es determinar la relación entre citocinas proinflamatorias de los tres grupos. Se usó el método de ELISA multiplex. Se observó que el INF-gamma incrementó en los grupos DO y DO+STZ, lo cual confirma el estado inflamatorio presente en estas condiciones. Mientras que las demás citocinas analizadas disminuyeron. En fases iniciales de diabetes y obesidad predominan factores inflamatorios, sin embargo, en un estado crónico del padecimiento suelen disminuir e incrementar los factores antiinflamatorios.

Palabras clave — Diabetes mellitus tipo 2, Obesidad, Citocinas.

Abstract — We present the effect and the levels of cytokines (IL-2, IL-6, TNF- α , INF- γ y MCP-1) in Wistar rats serum with induced Diabetes mellitus type 2 by streptozotocin and obesity with obesogenic diet, which were compared with the control group. The objective of the study is to determine the relation between proinflammatory cytokines of the three groups. We used an ELISA multiplex method. It was observed that INF-gamma increased in DO and DO+STZ groups, that confirm the inflammatory state in these conditions. Even though the other analyzed cytokines decreased. In beginning phases of diabetes and obesity the inflammatory factor prevails and decreases, however, in chronic state anti-inflammatory factors increase.

Keywords — Diabetes mellitus type 2, Obesity, Cytokines.

I. INTRODUCCIÓN

Las citocinas son polipéptidos o glicoproteínas extracelulares reguladoras con características hidrosolubles y de bajo peso molecular (8 a 30 kDa). Estas moléculas son secretadas por los glóbulos blancos o por otras células del cuerpo como el tejido adiposo en respuesta a un proceso inflamatorio. Algunas de las citocinas implicadas en obesidad y diabetes son las interleucinas 2 y 6, TNF - α (factor de necrosis tumoral - alfa), INF - γ (interferón - gamma) y MCP - 1 (quimioatrayente de macrófagos - 1). Las citocinas se clasifican en dos grupos algunas de estas pueden tener un efecto anti inflamatorio (Th2) y otras inflamatorio (Th1). En la actualidad, la diversidad de métodos disponibles ofrece información sobre la concentración de citocinas en distintos líquidos biológicos. (Filella, Molina and Ballesta, 2002) La incidencia de obesidad ha aumentado en México, ocupando el segundo lugar a nivel mundial. Una de las complicaciones asociadas es la diabetes

mellitus tipo 2, la cual se caracteriza por resistencia a la insulina. En este estudio se busca relacionar el efecto de las citocinas (IL-2, IL-6, TNF- α , INF- γ y MCP-1) con la desregulación mediada por proteínas cinasas, específicamente PKC, como molécula clave en futuras investigaciones que permitan disminuir el índice de pacientes con diabetes u obesidad o bien las complicaciones.

II. MARCO TEÓRICO

La OMS define la obesidad como una acumulación de grasa que genera la hipertrofia perjudicial para la salud siendo un factor de riesgo para enfermedades crónicas como la diabetes mellitus tipo 2. El tejido adiposo funciona como un órgano endocrino clave al liberar adipocinas con actividades inflamatorias y antiinflamatorias. (Liang., Ye., 2019). En condiciones de obesidad el aumento de hipertrofia se ha asociado a la desregulación del tejido adiposo que conlleva a un remodelado de su estructura posterior a la inflamación con repercusiones a nivel local como sistémico. (De Luis, et al. 2011) haciendo que se presente una infiltración masiva de macrófagos M1, secundaria al incremento de la secreción de la MCP - 1 que tiene un papel crucial en la respuesta inflamatoria en obesidad. (Prieur, et al. 2011). La TNF- α tiene un importante papel en la resistencia a la insulina, ya que inhibe la acción de la insulina en los adipocitos a través de inhibidores en la vía de señalización de esta hormona. Por tanto, la población de macrófagos M1 domina en el tejido adiposo obeso expresando una serie de factores pro-inflamatorios y demuestra una correlación positiva con la resistencia a la insulina. (Heilbrom, LK., Campbell, LV. ,2008). La interleucina - 2 (IL-2) actúa al promover la proliferación de las células T. Es producida por los linfocitos T activados, formando parte del tipo Th1. Efectúa su acción biológica a través de un receptor de membrana constituido por tres subunidades (α , β , χ). (Rich, et a., 2001). La interleucina - 6 (IL-6) tiene un efecto directo sobre la sensibilidad a la insulina al ser secretada por el tejido adiposo llega al hígado y estimula la secreción hepática de triglicéridos y la gluconeogénesis. Regula la respuesta inmunológica en la hematopoyesis y tiene efectos pro inflamatorios y anti inflamatorios. (Fiella, et al., 2002)

INF - gamma conocido como interferón del tipo 2. IFN - γ es producido por linfocitos T activados por células NK (natural killer); inhibe la proliferación de las células del tipo Th2 e induce la expresión de antígenos HLA (antígenos leucocitarios humanos). (Fiella, et al., 2002). Por otra parte PKC al ser una enzima que se encuentra tanto en el citosol como unida a la membrana y participa en múltiples funciones fisiológicas como mecanismos de señalización que conducen a la inducción de mitosis celular, proliferación celular, apoptosis, activación plaquetaria, reordenamiento del citoesqueleto de actina, modulación de canales iónicos, en la secreción de células nerviosas y en procesos patológicos como el cáncer y algunas cardiopatías. (Kaibuchi et al., 1983; Nishizuka, 1995). Además las isoformas de PKC han sido implicadas en resistencia a la insulina, obesidad y diabetes. (Becerril & Ahumada, 2018). ELISA multiplex es un método novedoso que permite el análisis simultáneo de hasta cien analitos. Los anticuerpos primarios contra las citocinas están unidos a micro esferas, las cuales reaccionan con las biomoléculas de interés que están presentes en la muestra. Se realiza una incubación con un anticuerpo secundario y una detección por colorimetría. (Francesch, et al.2007)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Materiales

Tabla1. Materiales empleados para la obtención de suero y tratamiento previo.

24 Ratas wistar macho	Colato de sodio	Inyección de buffer de citratos	Tubos BD vacutainer
Agua ad libitum	Grasa origen animal	Alimento Rodent Lab Chow	Centrifuga
Estreptozotocina	Fructosa	Bascula	Ultra congelador

Tabla2. Materiales empleados para la cuantificación de las citocinas.

Suero de muestras
Kit Rat Custom ProcartaPlex 6 – plex
Equipo luminex 100/200

B. Metodología

24 Ratas wistar macho de 5 semanas de edad se sometieron a un tratamiento durante 6 semanas, se mantuvieron en condiciones de temperatura (22°C), humedad (60%) e iluminación (ciclos de 12 h de luz/oscuridad) controladas. 16 de las ratas fueron alimentadas con una dieta obesogénica (grasa de origen animal 20% combinada con fructosa 20% y alimento rodent lab chow 5001 60% adicionado con un 0.15% de colato de sodio).

A las 3 semanas de dieta obesogénica, aleatoriamente, a 8 ratas se les administró una dosis de buffer de citratos al 0.1M con un pH de 7.2 (vehículo). Al resto de las ratas se les aplicó estreptozotocina (40 mg/kg de peso) diluida en el vehículo. Las ratas se clasificaron en 3 grupos: sanas (S), dieta obesogénica (DO) y DO + estreptozotocina (DO + STZ). Se registró el peso de los animales de forma semanal. El alimento y agua que se les suministró a libre demanda.

Al finalizar el periodo de tratamiento, después de ayuno durante la noche, los animales se sometieron a eutanasia por decapitación y se recolectaron muestras de sangre y tejido para análisis bioquímicos, histológicos y de expresión proteica. Las muestras de sangre se recolectaron en tubos BD vacutainer SSTTM para suero, y se centrifugaron a 2000 rpm por 10 minutos, obteniendo el suero, que se alicuotó y almacenó a -80°C hasta su procesamiento.

La cuantificación de las citocinas presentes en el suero se realizó por medio de un ensayo múltiple ELISA el cual se llevó en colaboración con el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) en el laboratorio de biología molecular de la Ciudad de México. Para su traslado las muestras se guardaron dentro de bolsas plásticas rotuladas de acuerdo a su clasificación y se colocaron en hielo. El kit para las citocinas fue elaborado por ThermoFisher “Rat Custom ProcartaPlex 6 – plex”. Se preparó el estándar del antígeno,

después se añadió a la placa las perlas magnéticas agitando durante 30 segundos; enseguida se agregó el suero de las muestras incubando por 90 minutos, se realizaron 3 lavados y se adicionó la estreptavidina – avidina - PE (ficoeritrina) se incubó durante 30 minutos, se realizaron 3 lavados. Se leyó la placa en el equipo luminex 100/200.

IV. RESULTADOS

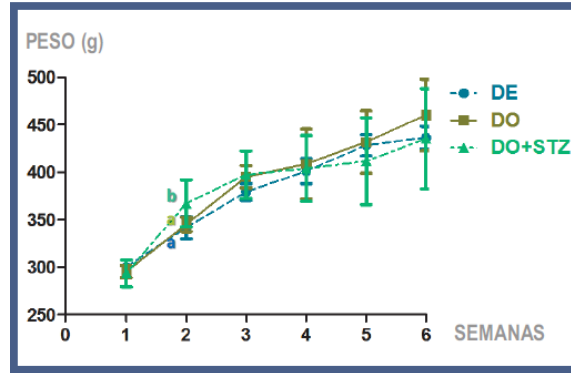


Fig. 1. Peso en ratas macho Wistar tratadas con dieta obesogénica y estreptozotocina. Las ratas fueron pesadas semanalmente por duplicado. Se presentan los datos como media \pm desviación estándar. Se compararon medias con ANOVA post hoc Tukey, letras diferentes $p \leq 0.05$; DE: dieta estándar; DO: dieta obesogénica; DO+STZ: dieta (Becerril & Ahumada, 2018)

Tabla 3. Concentración de glucosa, insulina, HOMA-IR y perfil de lípidos en ratas macho Wistar tratadas con dieta obesogénica y estreptozotocina, en comparación con dieta estándar (Becerril & Ahumada, 2018)

	DE n= 8	DO n= 8	DO + STZ n= 8
Glucosa (mg/dL)	147.8 \pm 4.3 ^a	154.3 \pm 17.5 ^a	385.9 \pm 167.8 ^b
Insulina (μ UI/mL)	10.5 \pm 0.1 ^a	12.4 \pm 1.8 ^a	9.7 \pm 0.9 ^a
HOMA-IR	4.3 \pm 0.4 ^a	4.5 \pm 0.7 ^a	9.9 \pm 4.3 ^b
Colesterol (mg/dL)	66.4 \pm 7.0 ^a	116.0 \pm 8.5 ^{a,b}	143.8 \pm 67.9 ^b
Triacilglicéridos (mg/dL)	134.6 \pm 32.4 ^a	229.6 \pm 49.5 ^{a,b}	326 \pm 130.6 ^b
HDL (mg/dL)	24.0 \pm 0.8 ^a	27.7 \pm 7.5 ^a	17.9 \pm 5.9 ^a
LDL (mg/dL)	15.4 \pm 0.3 ^a	42.2 \pm 9.1 ^a	62.5 \pm 44.6 ^a
VLDL (mg/dL)	26.9 \pm 6.5 ^a	45.9 \pm 9.9 ^{a,b}	51.3 \pm 18.9 ^b

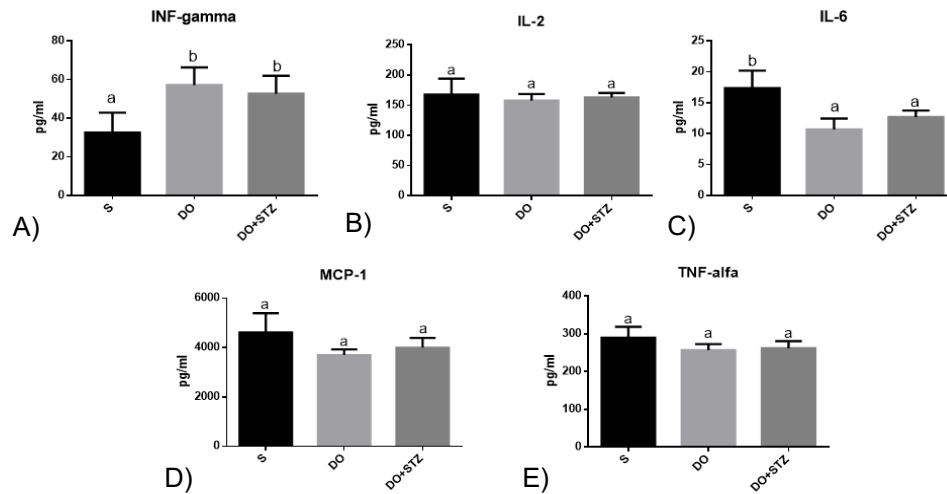


Fig. 2. Cuantificación de citocinas: A) INF – gamma, B) IL – 2, C) IL – 6, D) MCP -1 y E) TNF – alfa. Presentes en suero de rata Wistar

V. ANALISIS DE RESULTADOS

Al inicio del experimento, las ratas presentaron un peso promedio de 296.5 ± 3.5 g; en la segunda semana, la ganancia de peso en las ratas con DO+ STZ fue significativamente mayor (Fig. 1) que en los otros grupos (26 g); sin embargo, después de 6 semanas de tratamiento, no hubo diferencias significativas. En las ratas sanas (S) se observó una ganancia de peso de 136.2 ± 7.3 g, mientras que en DO y con STZ (DO+STZ) fue de 164.8 ± 31.4 g y 141.5 ± 38.6 g, respectivamente. (Becerril & Ahumada, 2018).

La concentración de glucosa en ayuno fue de 107.5 ± 5.0 mg previo a STZ. En la semana 6 (Tabla 4), con la DO+STZ, la glucosa incrementó 161%, indicando hiperglicemia sostenida. No hubo diferencias estadísticamente significativas con respecto a la insulina 8.8 y 14.2 μ UI/mL. El índice HOMA-IR (The homeostasis model assessment to insuline resistance) indicó valores normales (3.8 μ UI/mL) en S, mientras que en DO incrementó 34.2%; es decir, los animales con DO requirieron mayor cantidad de insulina que aquellos sanos para mantener las concentraciones de glucosa sérica normal; por otro lado, con DO+STZ, el HOMA-IR incrementó 118.4%, casi a la par de la glucosa (hiperglicemia), y las concentraciones de insulina fueron incapaces de mantener la glucemia estable (resistencia a la insulina). (Becerril & Ahumada, 2018).

En la Fig. 2 se observa que el INF-gamma y la IL-6 presentaron diferencia significativa entre grupos. INF-gamma incrementó en DO y DO+STZ (1.75 y 1.62 veces respectivamente), por otro lado IL-6 disminuyó en DO y DO+STZ (1.62 y 1.36 respectivamente) respecto al grupo control. IL-2, MCP-1 y TNF-alfa no mostraron diferencia significativas entre grupos. Estos datos son similares a los reportados en Yazar, et al., 2011, donde menciona que a IL-2 del grupo con diabetes disminuyó significativamente en comparación con el grupo control. De igual forma se ha implicado a las citocinas MCP-1 y TNF-alfa en diabetes observando que estas disminuyen en relación a su valor normal, lo cual fue encontrado en este trabajo.

VI. CONCLUSIONES

En este trabajo se observó que el INF-gamma tiene una relación significativa con respecto a los grupos con DO y DO+STZ incrementando sus valores lo cual confirma el estado inflamatorio presente en estas condiciones. En fases iniciales de diabetes y obesidad predominan factores inflamatorios, sin embargo, en un estado crónico del padecimiento suelen disminuir e incrementar los factores antiinflamatorios.

VII. RECONOCIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Querétaro por las facilidades y el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano. De igual forma a la Universidad Autónoma de Coahuila por formar parte de este proyecto, brindando así a sus estudiantes la oportunidad de desarrollarse como futuros profesionistas e investigadores en sus correspondientes áreas de estudio.

REFERENCIAS

- Filella, X., Molina, R. and Ballesta, A. (2002). Estructura y función de las citocinas. In: *Formación continuada de médico practico*. Barcelona, pp.63-71.
- Liang, W., & Ye, D. (2019). The potential of adipokines as biomarkers and therapeutic agents for vascular complications in type 2 diabetes mellitus. In *Cytokine and Growth Factor Reviews*. China: Elsevier.
- De Luis DA, González Sagrado M, Conde R, Aller R, Izaola O, Castro MJ. Circulating adipocytokines in morbid obese patients, relation with cardiovascular risk factors and anthropometric parameters. *Nutr Hosp*. 2011; 26(1):91-6.
- Prieur X, Mok CY, Velagapudi VR, Núñez V, Fuentes L, Montaner D, Ishikawa K, Camacho A, Barbarroja N, O'Rahilly S, Sethi JK, Dopazo J, Orešič M, Ricote M, Vidal-Puig A. Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice. *Diabetes* 2011; 60: 797-809.
- Heilbronn LK, Campbell LV. Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. *Curr Pharm Des* 2008; 14 (12): 1225-1230.
- Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Kotzin BL, Schroeder HW, editors. *Clinical immunology. Principles and practice*. Vol 1 y 2. London: Mosby, 2001
- Kaibuchi, K., Takai, Y., Sawamura, M., Hoshijima, M., Fujikura, T., & Nishizuka, Y. (1983). Synergistic functions of protein phosphorylation and calcium mobilization in platelet activation. *J.Biol. Chem.*, 258(11), 6701–6704.
- Nishizuka, Y. (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB Journal*: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 9(7), 484–496. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/773745>
- Becerril, A. and Ahumada, S. (2018). Dieta obesogénica y estreptozotocina: un modelo in vivo de diabetes tipo 2. In: *Revista NTHE*, 20th ed. Querétaro: Revista electrónica de difusión y divulgación científica, tecnológica y de innovación del estado de Querétaro, pp.33-38.
- Franceschi C, Capri M, Monti D, et al. Inflammaging and antiinflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev*. 2007;128:92–105.
- Yazar, M., Deger, Y. and Yur, F. (2011). Serum cytokine and vitim levels in experimental diabetic rats. In: *journal of animal and veterinary advances*, 10th ed. turkey: medwell jorunals.

Comportamiento del ácido hipúrico ante la determinación de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA)

María Fernanda Delgado Díaz

Centro de Ingeniería Bioquímica
Universidad Autónoma de Aguascalientes
Av. Universidad #940, Ciudad Universitaria, C.P.
20131, Aguascalientes, AGS
al223902@uaa.edu.mx

Asesora: Aída Jimena Velarde Salcedo

Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Av. Dr. Salvador Nava s/n
C.P. 78290, San Luis Potosí, S.L.P.
aida.velarde@uaslp.mx

Resumen — La hipertensión arterial está clasificada como una enfermedad crónica que a su vez se clasifica dependiendo de la causa; sin embargo, cerca del 95 % de los diagnósticos no responden a una causa precisa. La enzima convertidora de angiotensina (ECA) es una de las más importantes que se ven afectadas con la hipertensión, obteniendo como resultado una vasoconstricción continua y disminución de vasodilatación debido a una disminución en la secreción de prostaciclina y producción de óxido nítrico (NO). La manera de detección de la hipertensión pulmonar relacionada con sarcoidosis se basa en la medición de actividad enzimática de la ECA in vitro, mediante la técnica de Cushman y Cheung (1971), que utiliza el hipuril-histidil-leucina (HHL) como sustrato para la enzima, liberando ácido hipúrico como producto. En el presente trabajo se utilizó ECA de riñón y pulmón de rata y se evaluó el comportamiento del ácido hipúrico ante el buffer de reacción a diferentes valores de pH, los cuales a su vez se sometieron a diferentes medidas de tiempo de extracción del ácido hipúrico y temperaturas de incubación diferentes para determinar los valores óptimos de estandarización de la prueba.

Palabras clave — Hipertensión, enzima convertidora de angiotensina, ácido hipúrico.

Abstract — Arterial hypertension is a chronic disease which is classified depending on its cause, nevertheless, 95% of the diagnoses doesn't belong to an accurate reason, in which case it is called essential or primary hypertension. The angiotensin converting enzyme (ACE) is one of the most important enzymes affected by hypertension which results in a continuous vasoconstriction and a decrease in vasodilation due to a reduced secretion of nitric oxide (NO) and prostacyclin residues. The most common form of detection for pulmonary hypertension related to sarcoidosis its trough the Cushman and Cheung method (1971) that uses hipuril-histidil-leucine (HHL) as substrate for the ACE to measure its activity in vitro producing in the reaction hippuric acid. In this work we used ACE obtained from rat lung and kidney evaluating the behavior of hippuric acid at different pH, incubation temperature, and time of the extraction, all this with the aim to determine the optimum values to perform the Cushman and Cheung (1971) method.

Keywords — Hypertension, angiotensin-converting enzyme, hippuric acid.

I. INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial (HTA) es una enfermedad crónica en la que aumenta la presión con la que el corazón bombea sangre a las arterias para que circule por todo el cuerpo. En una etapa adulta se considera HTA en cifras iguales o superiores a 140/90 mmHg. Esta a su vez se clasifica dependiendo de las causas en donde los factores más comunes son el sobrepeso, alimentación inadecuada, falta de actividad y sobre todo un estado anormal de estrés psico-social. Sin embargo, el 95% de los diagnósticos no responden a una causa precisa, por lo que la mayoría de las hipertensiones caen en esencial o primaria. A nivel mundial se estima que existen más de mil millones de personas con hipertensión [1]. En

México, se habla de 30 millones, es decir uno de cada 4 mexicanos padece hipertensión arterial [2].

La hipertensión no tiene un tratamiento esencialmente etiológico, sino va dirigido a disminuir la presión arterial eliminando las afecciones cardiovasculares y cerebrovasculares. El tratamiento farmacológico dispone de gran variedad de fármacos antihipertensivos, como lo son diuréticos, inhibidor de la enzima de conversión de angiotensina (IECA), antagonista en los receptores de angiotensina-II (ARA-II), beta-bloqueador (B-B) y bloqueadores de los canales del calcio (BCC) [3].

Los fármacos antihipertensivos más utilizados son los IECA por su eficacia y baja toxicidad, ya que, a diferencia del resto de los tratamientos, estos no provocan episodios de asma o alteraciones a nivel de las arterias periféricas, glucemia o los niveles de lípidos en sangre. Entre ellos los más utilizados son: benazepril, captopril, enalapril, fosinopril y lisinopril [4].

El padecer de hipertensión radica en una insuficiencia cardíaca, puesto que el corazón es incapaz de satisfacer los requerimientos metabólicos sobre la autorregulación. Esta incapacidad motiva una cascada de señales y transformaciones bioquímicas llamado sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) cuyas acciones incluyen la regulación de la presión arterial, el tono vascular, volemia y facilitar la transmisión simpática. El SRAA comienza con la enzima renina que actúa sobre el angiotensinógeno transformándolo en angiotensina-I seguido de la enzima convertidora de angiotensina-I (ECA) obteniendo como producto angiotensina-II el cual es un potente vasoconstrictor. Además, la ECA tiene acción sobre la degradación de la bradicidina (BQ) el cual es un péptido que causa vasodilatación por medio de la secreción de prostaciclina y óxido nítrico (NO).

La ECA se encuentra en mayor proporción en el borde luminal endotelial del lecho vascular pulmonar, sin embargo, también puede presentarse en el endotelio renal, de glándulas adrenales, cerebro y algunas veces corazón.

La medición de la actividad de la ECA en la sangre de pacientes ha mostrado ser una herramienta útil para el diagnóstico de sarcoidosis, Gaucher y lepra. Mientras que la determinación de la actividad de la ECA in vitro se utiliza el método de Cushman y Cheung [5], en este se utiliza como sustrato el compuesto hipuril-histidil-leucina (HHL) como sustrato de la ECA, el cual libera el dipéptido His-Leu y ácido hipúrico. La cantidad de ácido se cuantifica espectrofotométricamente a 228 nm una vez que ha sido extraído con acetato de etilo. Sin embargo, esta técnica tiene bajos rendimientos, así como se puede sobreestimar la actividad ECA si el HHL no hidrolizado también es extraído, por lo que se recomienda utilizar la técnica de la cromatografía en capa fina o electroforesis capilar [6].

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Curva patrón de ácido hipúrico

Se realizó una curva patrón de ácido hipúrico utilizando una concentración inicial de 10 mM, de la cual se hicieron diluciones (por triplicado) de 0.1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM,

10 μ M, 100 μ M, 1 mM y 10 mM. Se determinó la absorbancia de las muestras a 228 nm utilizando una microceldilla de cuarzo.

B. *Actividad de ECA*

Se preparó una solución stock de 2 U/mL de la ECA en solución de K_2HPO_4 10 mM - NaCl 0.5 mM pH 7. El ensayo de actividad se llevó a cabo usando a una concentración final de 0.3 U/ μ L de ECA, 0.3 % de HHL en HEPES pH 8.3 a 37 °C. Al término de este tiempo la reacción se detuvo adicionando HCl 0.1 M. Posteriormente, el producto de la reacción enzimática se extrajo con acetato de etilo, el cual fue evaporado y el contenido de la reacción se resuspendió en agua y se cuantificó a 228 nm. Adicionalmente se evaluó la liberación del ácido hipúrico a diferentes tiempos de incubación (15, 30, 45, 60, 90 y 120 min), pH (3, 5, 7, 8.3 y 10) y temperatura (4, 25, 37, 45 °C).

C. *Comportamiento de ácido hipúrico*

Para verificar el punto máximo de absorbancia del ácido hipúrico, se llevó a cabo un barrido 200 a 800 nm a una concentración 1 mM.

Adicionalmente, se evaluó el comportamiento del ácido hipúrico en las diferentes pH probados en el ensayo de actividad de ECA y modificando los tiempos de extracción con acetato de etilo.

D. *Extracción de ECA de pulmón y riñón de rata*

Con el fin de obtener un extracto con actividad de ECA que pudiera ser utilizado para posteriores ensayos de actividad enzimática, se extrajo la proteína total proveniente del pulmón e hígado de rata. Los órganos frescos obtenidos de la rata fueron limpiados y triturados; se agregó solución de lisis (HEPES 50 mM pH 8.3, CHAPS 5 %) a 1 g de órgano seguido de una agitación vigorosa por 10 min y una subsecuente sonicación. El lisado fue centrifugado a 7500 g por 20 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante, el cual fue nuevamente centrifugado a 13 000 rpm por 20 min a 4 °C. Este sobrenadante fue colectado y conservado a -20 °C para determinar si presentaban actividad enzimática.

Se cuantificó la concentración de proteína del extracto mediante el método de Bradford en microplaca utilizando BSA como estándar de cuantificación. Se trabajó con una concentración inicial de 10 mM de BSA, de la cual se hicieron diluciones hasta obtener 300 μ L (por triplicado) de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg/mL. En una celdilla de 96 pozos se agregaron 200 μ L de solución bradford (dilución 1:4 en agua), añadiendo 4 μ L de la BSA y se leyó la absorbancia a 595 nm.

Para determinar la integridad de las proteínas contenidas en los extractos se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida bifásico (4 % poliacrilamida para el gel concentrador y 12 % poliacrilamida del gel separador) utilizando 5, 10 y 15 μ L de muestra para cada uno de los órganos. El gel se corrió en una cámara de electroforesis, durante 40 minutos a 100 volts. Posteriormente se realizó la tinción del gel utilizando el método de tinción coomassie y finalmente se revisó utilizando un fotodocumentador.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Actividad ECA

Siete diferentes tiempos fueron seleccionados (Fig. 1) para determinar el tiempo de incubado óptimo en el que trabaja la enzima respecto a la liberación de ácido hipúrico mediante el procedimiento reportado anteriormente. Los datos obtenidos muestran mayor actividad al dejar incubar por 30 a 60 minutos, teniendo concentraciones finales de [0.128 μM] y [0.132 μM] respectivamente, rendimiento inferior al presentado en el trabajo de Sushill, Apurba, Santanu & Pulok, [7], quien obtuvo [100 $\mu\text{g/mL}$] de ácido hipúrico bajo una incubación a 30 minutos. Posteriormente, se evaluaron cuatro diferentes temperaturas (Fig. 2) siendo 25 °C la temperatura de incubación óptima ([0.442 μM] ácido hipúrico), contrario a los datos reportados por Pulok [7] donde las concentraciones predominantes se encuentran en incubación a 37 °C. Esto puede ser resultado de la inestabilidad de la incubación por dificultades técnicas. Por otra parte, cinco valores de pH en el buffer de reacción fueron evaluados (Fig. 3), mostrando mejores rendimientos para los valores extremos de pH, 10 y 5, teniendo como producto final [0.200 μM] y [0.188 μM] respectivamente; contrastando con los datos presentados previamente [7] quien obtuvo mayor concentración de ácido hipúrico al utilizar como buffer de reacción HEPES a pH ligeramente básico, 8.3. Lo anterior podría deberse a la formación de un producto de mayor estabilidad, se recomienda realizar una espectroscopía en infrarrojo donde indique la formación de un nuevo producto al momento de decaer el compuesto de ácido hipúrico.

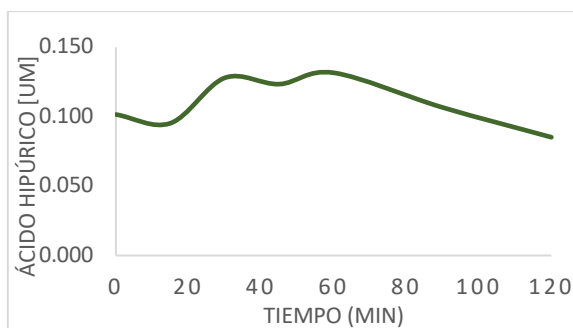


Figura 1. Actividad ECA a diferentes tiempos

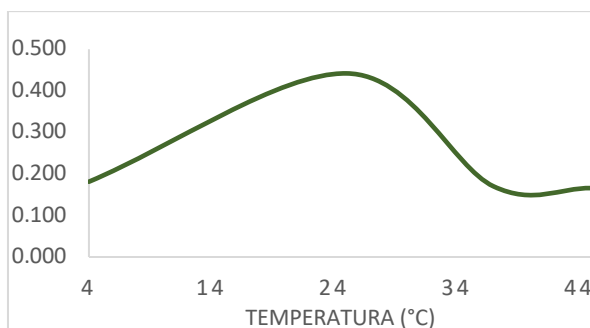


Figura 2. Actividad ECA a diferente temperatura

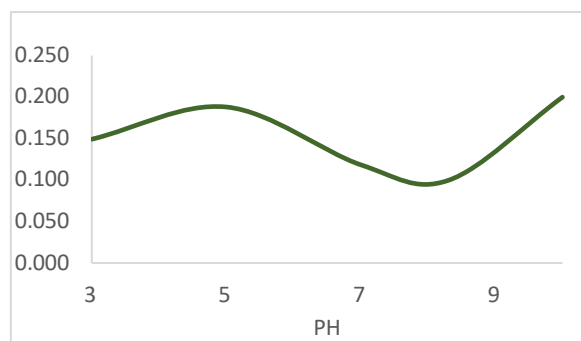


Figura 3. Actividad ECA a diferente pH

B. Comportamiento ácido hipúrico

La variabilidad y poca reproducibilidad de los resultados anteriores sugieren que, bajo las condiciones óptimas de incubación, durante la reacción enzimática y su correspondiente liberación de producto se está generando un producto inestable, por lo que se consideró evaluar el comportamiento químico del ácido hipúrico en diferentes condiciones. En primera instancia se realizó un barrido (Fig. 4) el cual tuvo absorbancia máxima a 228 nm, seguido de una curva patrón (Fig. 5) que permitiera evaluar la concentración del producto conforme el tiempo de extracción en acetato de etilo fuera aumentando (Fig. 6).

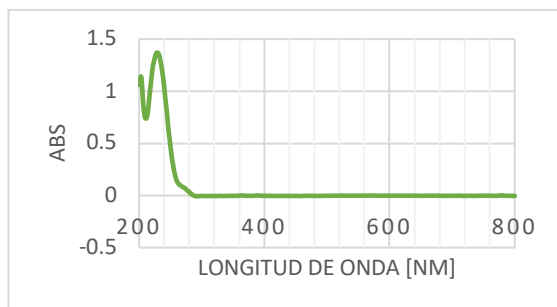


Figura 4. Barrido ácido hipúrico

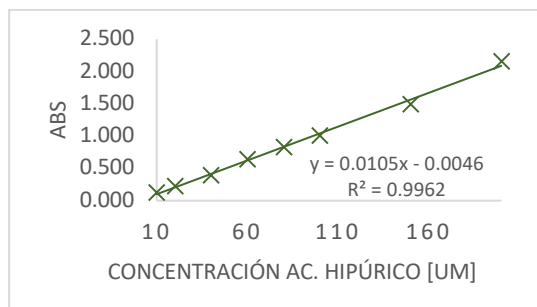


Figura 5. Curva patrón de ácido hipúrico

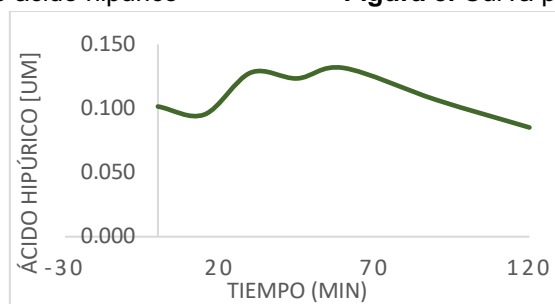


Figura 6. Tiempo de extracción con acetato de etilo

En vista de que el ácido hipúrico es inestable ante los cambios de temperatura, así como de tiempo de agitación se realizó un ensayo sobre su comportamiento ante siete distintos valores de pH antes y después de la incubación (Fig. 7 y 8). Las líneas rectas mostradas en la fig. 7 dan a entender que no influye el cambio de pH, no obstante, presenta mayor concentración de ácido hipúrico en condiciones ácidas, a diferencia de la fig. 8 quien después de la incubación presenta rendimientos nulos para estas condiciones. Estos resultados indican el momento en el producto reacciona de manera contraria a lo marcado por la literatura, se recomienda realizar la espectroscopía en infrarrojo al momento de la incubación en un lapso de 30 – 60 minutos utilizando como concentración inicial de AH [30 µM] siguiendo las indicaciones del proveedor (Sigma-Aldrich).

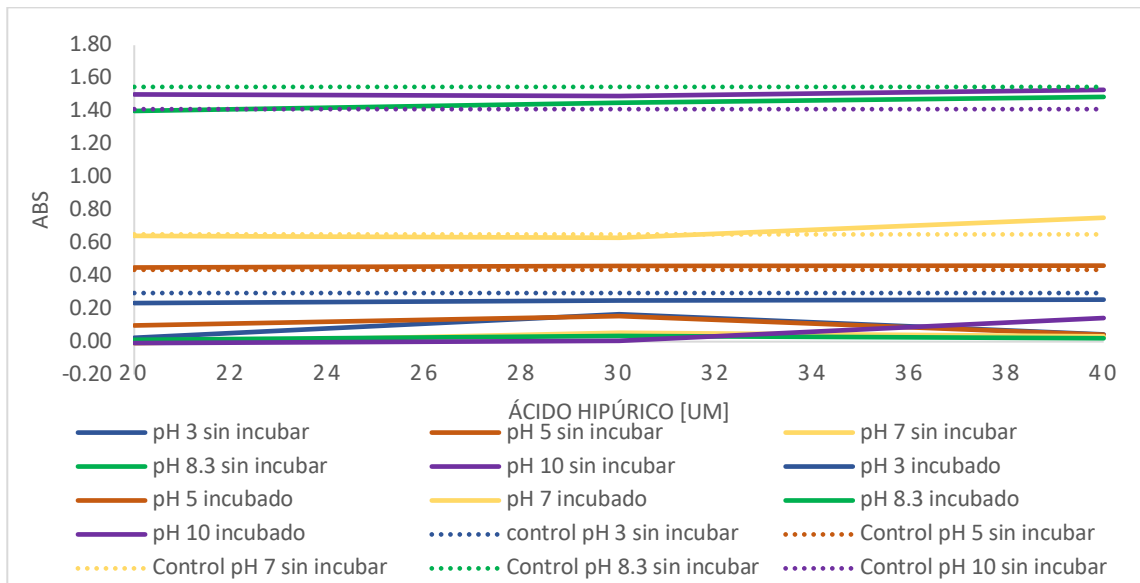


Figura 7. Comportamiento ácido hipúrico a diferente pH, antes de la incubación

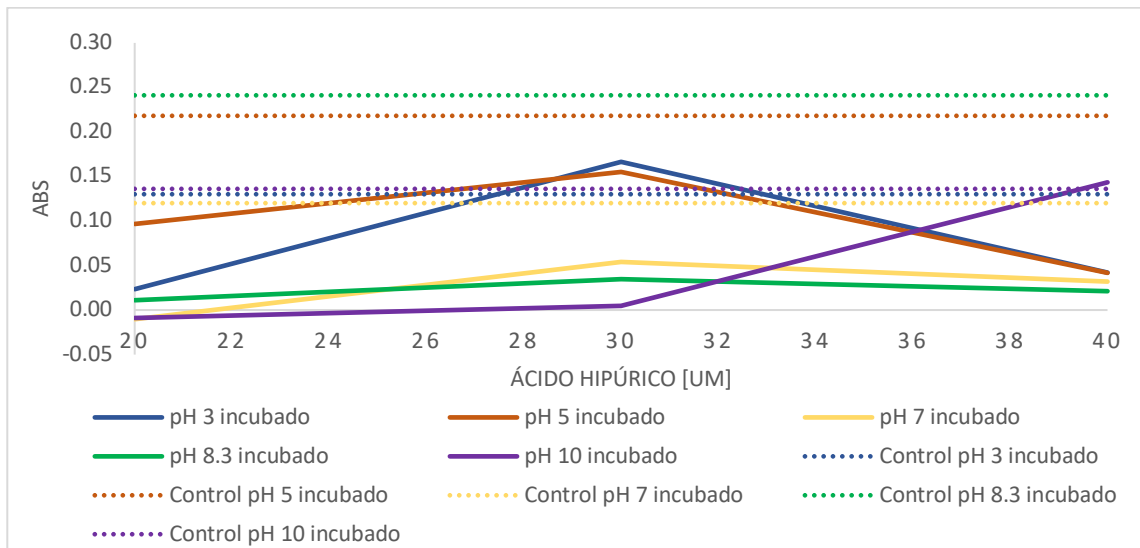


Figura 8. Comportamiento ácido hipúrico a diferente pH, después de incubación

C. Extracción ECA pulmón y riñón de rata

Con el fin de obtener un extracto con actividad de ECA que pudiera ser utilizado para posteriores ensayos de actividad enzimática, se extrajo la proteína total proveniente del pulmón e hígado de rata.

Los resultados de la corrida electroforética mostraron un barrido en las bandas debido a la degradación de las muestras por temperaturas elevadas y la ausencia de inhibidores de proteasas (omitidos ya que la ECA es una proteasa) por lo cual la banda esperada de 50-100 kDa [8] no pudo ser identificada.

Interpolando los valores de la figura 10 se obtuvo el contenido total de proteína, 12.77 y 10.27 mg/mL para el riñón y pulmón respectivamente (tabla 1), sin embargo, como se presenta en la tabla 2, no presenta actividad enzimática, por lo que la proteína obtenida carece de ECA. Por esta razón se recomienda utilizar el kit Spinreact (distribuido por cromakit), así como suero heparinizado (ya que el EDTA actúa como inhibidor de la ECA) para obtener resultados mínimos de 2.4 U/L.

La técnica empleada para la recuperación del ácido hipúrico marca la extracción del producto con acetato de etilo en agitación vigorosa, el ensayo de tiempo de extracción mostrado en la figura 6 indica agitación por 30 – 60 s, no obstante, pasando el minuto el rendimiento de la reacción disminuye indicando con esto inestabilidad del producto formado, por lo que para ensayos posteriores se recomienda realizar la extracción por inversión, como indica el protocolo reportado por el proveedor (Sigma-Aldrich).

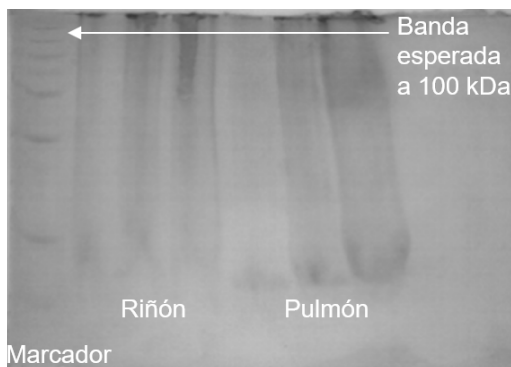


Figura 9. Gel acrilamida extracción ECA de riñón y pulmón de rata

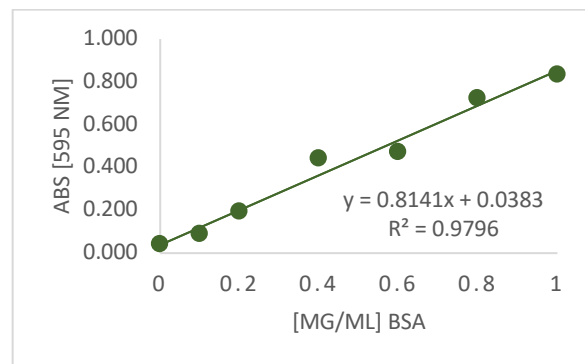


Figura 10. Curva calibración proteína

Tabla 1. Concentración de proteína de lisados de órganos de rata

Órgano	Proteína [mg/mL]
Riñón	12.767
Pulmón	10.270

Tabla 2. Actividad ECA del lisado de órganos de rata

Órgano	Muestra	Proteína [mg/mL]
Riñón	Blanco	0.411
	Control	0.326
	Inhibidor	0.346
Pulmón	Blanco	0.381
	Control	0.362
	Inhibidor	0.435

IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La hipertensión es una enfermedad de impacto mundial, simplemente en México 1 de cada 4 mexicanos presenta hipertensión, por lo que en las últimas décadas se han propuesto y buscado soluciones a este mal. Uno de los cuales tiene mayor interés es la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Los resultados parciales de este estudio son:

- La determinación eficiente de la actividad de ECA reveló una serie de dificultades técnicas e intrínsecas como la dificultad para estandarizar el pH del buffer de reacción, no reportado previamente.
- El ácido hipúrico se mantiene estable a pH básicos (10) bajo una incubación de 25 °C por 50 min.
- La estabilidad del producto está relacionada con la formación de un nuevo componente bajo las condiciones mencionadas.

Se recomienda realizar trabajos posteriores implementando la espectroscopía de infrarrojo en incubación a 37 °C por 30 – 60 min observando con ello la formación de ácido hipúrico y posible intervención de algún producto que inestabilice al ácido hipúrico. Además de probar las condiciones reportadas en este estudio, buffer a pH 5 y 10 con incubación a 25 °C por 30 – 60 min.

V. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

El estudiante agradece a la Dra. Aída Jimena Velarde Salcedo, la Dra. Carmen González Castillo y la Dra. Gabriela Navarro Tovar por la dirección del proyecto y el uso de sus instalaciones; así como a la Facultad de Ciencias Químicas por permitirle realizar la estancia de investigación.

REFERENCIAS

- [1] Instituto Mexicano del Seguro Social. Hipertensión arterial. Disponible en: <http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/hipertension-arterial> [consultado en julio 2019].
- [2] Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. Informe Final de Resultados. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/209093/ENSANUT.pdf> [consultado en julio 2019].
- [3] Sellén Crombet J. (2007). Hipertensión arterial: diagnóstico, tratamiento y control (Tesis doctoral). Hospital General Calixto García. Facultad de Ciencias Médicas, La Habana, Cuba. 24-26.
- [4] Oropesa Fernández, C. & Gallego Fernández C. (1995) Utilidad Terapéutica de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina. *Farm Hosp* 1, 3-9.
- [5] Cushman, D.W. & Cheung, H.S. (1971) Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharma* 20(7), 1637-1648.
- [6] Vázquez-Valadéz, V. et al. (2018). Evaluation of the inhibition of angiotensin-converting enzyme by new thiomorpholine compounds using capillary zone electrophoresis. *J. Mex. Chem. Soc.* (62(3)).
- [7] Sushil, K.C.; Apurba, D.; Santanu, B. & Pulok, K. (2015) Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory potential of standardized *Mucuna pruriens* seed extract. *Pharmaceutical Biology*. 53, 1614-1620.
- [8] Faygas, M. et al. (2014). New Perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) I: Endogenous angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition. *PloS One*. 9 (4).

Comunidades de macroinvertebrados en manantiales áridos y templados de Querétaro

Lendy Yustin García Miranda

Universidad de Guanajuato
División de Ciencias Naturales y Exactas
Noria Alta s/n
ly.garciamiranda@ugto.mx

Asesor: Raúl Francisco Pineda López

Universidad Autónoma de Querétaro
Centro Académico Multidisciplinario. Campus
UAQ-Aeropuerto. Carretera a Chichimequillas.
rufuspinedal@gmail.com

Resumen —El uso inadecuado de los manantiales dulceacuícolas en México amenaza su existencia, por ello, es necesario conocerlos bien para promover su conservación, dada su importancia ambiental, cultural, económica y social. En este trabajo se hizo una comparación entre un estudio en el año 2002 y el presente, mediante un análisis de las comunidades de macroinvertebrados en 15 manantiales de zonas áridas y templadas del estado de Querétaro. Se encontraron familias indicadoras en tres manantiales, las que no habían sido registradas, así como la disminución de familias indicadoras en diversos manantiales. La diversidad aún se conserva en el mismo manantial desde 2002 hasta 2019, lo que indica que el impacto antropológico no ha tenido gran efecto en los ecosistemas.

Palabras clave — Manantiales, monitoreo, conservación, macroinvertebrados, comunidades

Abstract — Inadequate use of freshwater springs in Mexico threatens their existence, thus, it is necessary to know them in order to improve their conservation due to their environmental, cultural, economic and social importance. This paper compares the features of macroinvertebrates communities and the water quality of 15 springs located in arid and template ecosystems in the state of Querétaro. Indicator families were found in three springs which hadn't been registered, as well as a notable decrease of indicator families in several springs. The diversity is still conserved in the same spring from 2002 to 2019, indicating that the human impact hasn't had a greater effect on said ecosystems.

Keywords — Spring, monitoring, conservation, macroinvertebrates, communities.

I. INTRODUCCIÓN

La evaluación de la integridad biológica en ecosistemas dulceacuícolas ha permitido estimar de manera holística, los efectos del impacto de actividades humanas y es una metodología de amplio uso en el manejo de recursos naturales [1,2]. La cuantificación de la integridad biológica se logra sumando varios atributos medibles de una comunidad biológica, que estiman su estructura, composición y funcionamiento [3].

Las condiciones ambientales de algunos manantiales en el estado de Querétaro fueron anteriormente analizadas por Morales [4], este estudio se centró en 28 manantiales de las zonas templadas y áridas, los cuales fueron analizados usando aspectos hidrológicos, físicos, bióticos y socioeconómicos, encontrando que muchos de ellos estuvieron en desuso y mostraron un amplio rango de estados de conservación. Por ello, la investigación actual pretende, mediante un equipo multidisciplinario, repetir el análisis de varios de los manantiales analizados hace 17 años y evaluar su integridad biótica, calidad del agua y su estado de

conservación actual. Se busca tener una visión general de la conservación de manantiales en el estado de Querétaro con el fin de disminuir el impacto antrópico sobre ellos y promover la restauración-conservación de estos ecosistemas.

En este artículo, se presenta el análisis de las características de las comunidades de macroinvertebrados en los manantiales analizados y se establece su importancia para definir el papel ecológico de estos ecosistemas en el contexto del cambio climático.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el final de estación de estiaje y el inicio de la estación de lluvias del 2019, se muestrearon 15 manantiales en zona templada y árida de Querétaro, pertenecientes a las cuencas de Pánuco y Lerma. Algunos de los manantiales visitados no pudieron ser analizados debido a que han sido modificados y otros que no pudieron accederse o bien han desaparecido (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación entre manantiales analizados por Morales [4] y los actualmente estudiados

Estudio realizado en 2002			Estudio realizado en 2019		
Localidad	Manantial	No. De manantial	No visitado	Analizado	Desapareció
Escolásticas	Los Sabinos	1	x		
Barrio Santa María	La Canoa	2		x	
Barrio Santa María	La Campanita	3			x
Barrio Santa María	Tashai	4		x	
La Zorra	La Zorra	5		x	
La Esperanza	La Esperanza	6	x		
San Pedro	Los Vázquez	7		x	
San Pedro	La Cieneguita	8	x		
San Pedro	Las Canoas	9	x		
San Pedro	Capula	10	x		
El Batán	El Batán	11	x		
Tlacote el Alto	Tlacote puerta	12	x		
Tlacote el Alto	Tlacote fondo	13	x		
El Lobo	Lobo 1	14			x
El Lobo	Lobo 2 "El Barreno"	15		x	
El Lobo	Lobo 3	16	x		
El Lobo	El Pozo	17	x		
Alfajayucan	La Huerta	18		x	
El Saucillo	La Alberca	19			x
Coyotillos	La Cueva	20		x	
Agua Azul	El Pocito	21		x	
Las Rosas	La Cascada	22	x		
El Boye	La Huerta	23		x	
Santa Elena	Santa Elena	24	x		
San Bartolo	San Bartolo	25		x	
San Martín	San Martin 1	26	x		
San Martín	San Martin 2	27	x		
La Beata	La Beata	28		x	
El Lobo	Lobo 4 "El Bordo"	29		x	

En cada manantial, se determinaron la calidad del agua [5], el estado de conservación [6] y la estructura de sus comunidades de macroinvertebrados. Para estas últimas, el muestreo se hizo usando una red acuática tipo "D", procurando mover sedimento del fondo del manantial, realizando sólo un arrastre de red por microhábitat. Las muestras colectadas se separaron en campo, fijando los organismos en una solución de etanol 70%.

Posteriormente en el laboratorio, los macroinvertebrados fueron separados por grupos taxonómicos mayores (clases y órdenes) usando un estereoscopio. Finalmente se identificaron en familias y luego en morfoespecies basadas en sus caracteres anatómicos usando las claves y criterios tomados de diversas fuentes bibliográficas [7,8]. Una vez identificados los organismos fueron colocados en frascos con alcohol al 70% indicando en su etiqueta el nombre del manantial, la fecha de colecta, orden y familia a la que estos pertenecen, y finalmente, una clave que fue asignada con las tres primeras letras del orden y las letras "sp" para designar si dentro de la familia había alguna variación aún más específica entre las mismas familias (Ejemplo: Colsp1, fue la clave asignada para el orden Coleóptera y la familia Driopidae y Colsp2 fue asignada al orden Coleóptera y familia Ditiscidae).

El análisis de la estructura de las comunidades de macroinvertebrados asociados a cada manantial se hizo mediante la determinación del número de especies (S), número de individuos (N) y los índices de diversidad (Shannon) y dominancia (Simpson) Para ello, se utilizaron las ecuaciones (1) y (2).

$$H' = -\sum p_i (\log_2 p_i) \quad (1)$$

$$D = \sum p_i^2 \quad (2)$$

donde:

H' = Dominancia

D = Diversidad

p_i = Frecuencia relativa de cada familia.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados en una tabla y un gráfico que contienen la riqueza y diversidad de los manantiales, así como el número de individuos pertenecientes al análisis realizado en 2002 y los actuales.

En la comparativa de los estudios realizados en 2002 y 2019 se encontraron similitudes en cuanto al mayor número de familias y la mayor diversidad en el mismo manantial (La Beata). En cuanto a las diferencias, la mayor dominancia se encontró en 2019 en Tashai, donde en 2002 se reportó sólo una familia. En relación con el número de individuos también se observaron diferencias, en 2002 en el manantial Los Vázquez se registraron 874 individuos, mientras que en La Huerta se encontraron 82 individuos y fue el manantial con un mayor número de individuos en el 2019.

Los resultados muestran que el mayor número de familias fue encontrado en 2002 en el manantial de La Huerta y en 2019 en La Beata, mientras que el mayor número de individuos estuvo en Los Vázquez en 2002 y en La Huerta en 2019. El análisis de diversidad y dominancia mostró que La Beata es el manantial más diverso y que la dominancia fue mayor en el manantial Tashai tanto en 2002, como actualmente (Tabla 2).

Tabla 2. Comparativa de resultados (2002/2019) de la estructura de la comunidad de macroinvertebrados de 15 manantiales de Querétaro.

Número de manantial	Localidad	Manantial	Número de familias		Número de individuos		Diversidad		Dominancia	
			Estudio 2002	Estudio 2019	Estudio 2002	Estudio 2019	Estudio 2002	Estudio 2019	Estudio 2002	Estudio 2019
2	Barrio Santa María	La Canoa	4	3	74	15	1,04	1	0,41	0,39
4	Barrio Santa María	Tashai	1	3	18	19	0	0,53	1	0,77
5	La Zorra	La Zorra	5	4	255	14	1,42	1,19	0,28	0,33
7	San Pedro	Los Vázquez	12	11	874	54	1,3	1,9	0,37	0,2
15	El Lobo	El Lobo 2. El Barreno	0	5	0	14	----	1,4	----	0,28
18	Alfajayucan	La Huerta	12	8	497	345	1,76	1,38	0,22	0,35
20	Coyotillos	La Cueva	0	2	0	6	----	0,63	----	0,55
21	Agua Azul	El Pocito	0	5	0	109	----	0,93	----	0,47
23	El Boye	La Huerta	2	8	142	82	0,72	1,31	0,52	0,39
25	San Bartolo	San Bartolo	7	9	550	99	1,6	0,79	0,27	0,67
28	La Beata	La Beata	13	19	136	161	2,1	2,41	0,18	0,11
29	El Lobo	El Bordo	0	2	0	3	----	0,63	----	0,55

En cuanto a las familias de macroinvertebrados indicadoras de buena calidad de agua, se observa que del orden Ephemeroptera se encontraron individuos pertenecientes a la familia Leptopheridae en el manantial El Pocito en el cual no se encontraron macroinvertebrados en el 2002.

Con relación al orden Coleoptera se encontró una morfoespecie de la familia Staphylinidae en los manantiales de Tashai y La Huerta, que tampoco fue registrada en el 2002. Las familias Gyrinidae y Elmidae encontrados en La Beata y San Bartolo, actualmente no fueron registradas previamente.

Del orden Hemiptera se encontraron morfoespecies de dos familias indicadoras: Hebridae en el manantial El Boyé que no fue reportada en 2002, y Corixidae, que se registró para ambas fechas. En el orden Trichoptera se pudo observar que en Los Vázquez la familia Hydrophillidae registrada en 2019 no estuvo presente en el muestreo del año 2002, En cambio en esa fecha la morfoespecie de familia presente en dicho manantial fue Polycentropodidae. El manantial la Beata es habitado por varias morfoespecies de este orden, donde la familia Philopotamidae encontrada en 2002 no fue observada en esta

ocasión, sin embargo, si se encontraron morfoespecies de otras familias como: Helicopsychidae, Hydropsychidae, Depodosmatidae y Calamoceratidae.

Cabe resaltar que en nuestros últimos muestreos se encontraron algunos órdenes no registrados con anterioridad, como es el caso del orden Ostracoda en El Pocito y Boye y los anélidos en El Boye. El número de individuos del orden Isópoda disminuyó en Los Vázquez de 86 a sólo 2, del Orden Unionoidea no se encontraron individuos en manantiales como Los Vázquez y La Huerta, donde antes había. En cambio en San Bartolo, donde antes no se habían reportado, se encontraron individuos de esta morfoespecie y en La Beata se mantuvo constante la presencia de individuos desde el estudio del 2002.

Se encontraron morfoespecies del orden Odonata y familia Libellulidae en la localidad de El Lobo (El Barreno y El Bordo), mientras que en el 2002 no se encontraron. En el manantial La Beata en donde antes habían sido localizados morfoespecies de este orden, ahora no se encontraron (Figura 1).

Los resultados señalan que manantiales que no presentaban invertebrados en 2002, tales como: El Lobo 2, La Cueva y El Pocito, ahora tienen una moderada a alta diversidad.

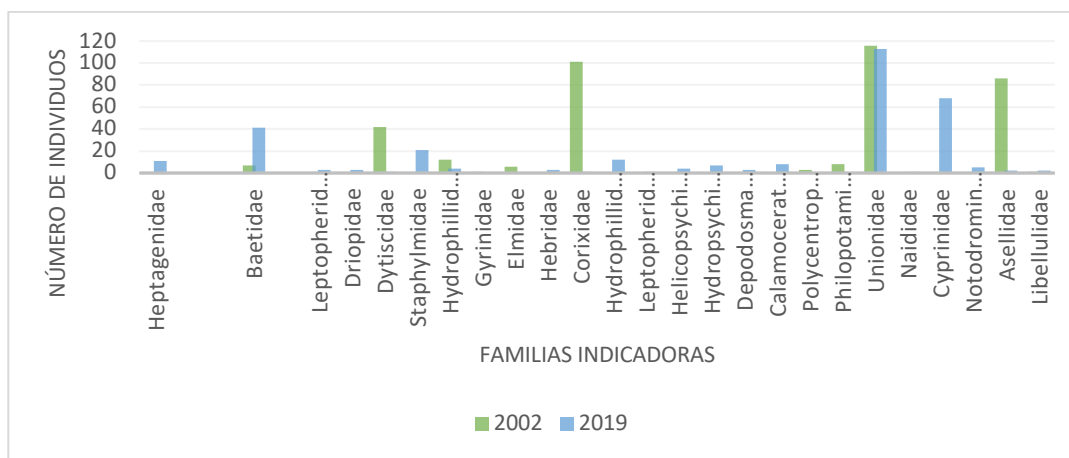


Figura 1. Comparativa de familias indicadoras encontradas en el 2002 y actualmente observadas

El manantial más rico en morfoespecies fue La Beata, el cual tuvo un estatus de conservación óptimo [6] esto teniendo en cuenta parámetros tales como el uso del suelo circundante y del manantial en sí, así como el impacto antrópico. El saber que los parámetros fisicoquímicos del agua afectan el estatus de conservación y la diversidad de invertebrados, hace posible el plantear metodologías de preservación que involucren a la población que habita las comunidades donde estos se encuentran.

IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Debido al impacto antrópico que han sufrido los manantiales de las cuencas de Pánuco y Lerma, varios de ellos en la actualidad han desaparecido o disminuido la diversidad las de comunidades de macroinvertebrados, ello como consecuencia de una modificación en la calidad del agua, principalmente la temperatura y el pH del agua.

La conservación de los ecosistemas en dichos manantiales depende de un adecuado uso de los recursos ambientales mediante un análisis y una capacitación de las poblaciones humanas para lograr la preservación del patrimonio natural, cultural y social de este territorio.

Cabe resaltar que algunas de estas áreas han sido conservadas debido, en su mayoría, a que pertenecen a una reducida población que regula el manejo del agua y el uso de territorio circundante.

V. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad de Guanajuato por el apoyo para llevar a cabo mi participación en el Verano de la Ciencia Región Centro, así como a la Universidad Autónoma de Querétaro por la grata bienvenida y la disposición de los recursos necesarios. A Andrea Guadalupe Celestino y a Jesús Palafox García por su compañerismo, solidaridad, profesionalismo y entusiasmo para lograr conjuntamente este proyecto.

REFERENCIAS

- [1] Karr, James, Assesment of Biotic Integrity Using Fish Communities, Fisheries, Vol.6, pp. 21-27, Nov 1981
- [2] Fausch, K. D., J. Lyons, J. R. Karr y P. L. Angermeir. Fish communities as indicators of environmental degradation. Am. Fish. Soc. Symp. 8. 1990
- [3] Miller, R. R., D. Williams y J. E. Williams. Extinctions of North American fishes during the past century. Fisheries. 1989
- [4] Morales Tovar Cecilia, Valoración Biótica Rápida de los Manantiales de la zona templada y semiárida de Querétaro [Tesis de licenciatura], Universidad de Querétaro, Santiago de Querétaro, Querétaro, Nov 2002
- [5] Palafox Jesús. Análisis de Calidad del Agua en Manantiales de la zona templada y árida de Querétaro; Universidad de Querétaro, Santiago de Querétaro, Querétaro, 2019.
- [6] Celestino Andrea, Análisis del estado de Conservación de la zona templada y árida de Querétaro; Universidad de Querétaro, Santiago de Querétaro, 2019.
- [7] Pineda et al, Biota acuática de arroyos y ríos (Cuencas Lerma-Chapala y Pánuco). Manual de Identificación, UAQ, Oct 2009.
- [8] Merritt, R.W., Cummins, M.W. y M.B. Berg, An Introduction to the Aquatic Insects of North America, Ed. Kendall, United States of America, 2008.

Construcción de la mutante en el factor de transcripción Msn4 de *Cándida glabrata*, un patógeno oportunista

Diana Laura Vázquez Durán

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química - Centro Universitario
Cerro de las Campanas s/n C.P. 76010, 76010
Santiago de Querétaro, Qro.
diana.vazdur96@gmail.com

Asesor: Alejandro de Las Peñas Nava

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C.- División de Biología Molecular
Camino a la Presa de San José #2055, Lomas 4ta sección, 78216, San Luis Potosí, S.L.P.
cano@ipicyt.edu.mx

Resumen — *Cándida glabrata* es un patógeno oportunista que ha desarrollado una alta resistencia a estrés oxidante, lo que dificulta su eliminación por el sistema inmunológico del huésped. Los genes que codifican para enzimas que le confieren esta resistencia están reguladas por factores de transcripción como Yap1 y Skn7. En *S. cerevisiae* los factores de transcripción Msn2 y Msn4 están relacionados con la respuesta a estrés general y tienen sus respectivos ortólogos en *C. glabrata*. Se construyó la mutante *msn4Δ* de *C. glabrata* mediante técnicas de biología molecular, como la transformación de *C. glabrata* con la construcción *msn4Δ*. La mutación se confirmó mediante PCR: se estableció la ausencia de *MSN4*, y la estructura correcta de los extremos 5' y 3'.

Palabras clave — *Candida glabrata*, respuesta a estrés oxidante, Msn4, transformación por acetato de litio.

Abstract — *Candida glabrata* is an opportunistic pathogen that has developed high resistance to oxidative stress, which makes it difficult to extract it from the host's immune system. The genes that encode for enzymes that confer this resistance are regulated by transcription factors such as Yap1 and Skn7. In *S. cerevisiae* the transcription factors Msn2 and Msn4 are related to the general stress response and have their corresponding orthologs in *C. glabrata*. The *msn4Δ* mutant of *C. glabrata* was constructed by molecular biology techniques, such as the transformation of *C. glabrata* with the *msn4Δ* construct. The mutation was confirmed by PCR: the absence of *MSN4* was established, and the correct structure of the 5' and 3' ends.

Keywords — *Candida glabrata*, oxidative stress response, Msn4, transformation by lithium acetate.

I. INTRODUCCIÓN

Cándida glabrata es un comensal en el tracto gastrointestinal y genitourinario humano que en condiciones de inmunodepresión puede causar infecciones masivas severas [1, 2]. *C. glabrata* se ha adaptado evolutivamente a las defensas inmunes del huésped, lo que le permite ser un patógeno exitoso [3, 4, 5]. Entre estas adaptaciones se incluyen la adherencia a células epiteliales de huésped [1, 3, 6], resistencia a antifúngicos [1, 6, 7], formación de biopelículas [3] y una alta supervivencia al ataque de células fagocíticas [2,7].

Las células fagocíticas son la primera línea de defensa contra las infecciones fúngicas [4, 9]; generan fagolisosomas donde predomina un ambiente hostil con especies reactivas de oxígeno (ERO): como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el superóxido (O₂⁻), y el radical hidroxilo (OH) [2, 5]. Debido a su inestabilidad, las ERO causan daños al ADN, proteínas y lípidos, resultando en la destrucción de los patógenos fagocitados [1, 7, 8]. Sin embargo, *C. glabrata* puede desintoxicar estos químicos mediante la síntesis de moléculas antioxidantes que ayudan a mantener el equilibrio redox [2, 5]. Estas moléculas pueden ser enzimas

(catalasas, superoxidodismutasas y peroxidasas) o moléculas no enzimáticas (glutatión y tiorredoxinas) [1, 7, 2].

La respuesta a estrés oxidante (REO) en levaduras está regulada transcripcionalmente mediante diversos factores de transcripción [1, 2, 9]. La REO en *S. cerevisiae* está en parte bajo el control de ScYap1, ScSkn7, ScMsn2 y ScMsn4 [1]. En *C. glabrata* se han demostrado que las funciones de los ortólogos CgYap1 y CgSkn7 están conservadas. [1, 2], mientras que el efecto de CgMsn2 y CgMsn4 se ha reportado como miembros importantes de esta respuesta [1, 8, 9].

En *S. cerevisiae* Msn2 y Msn4 son factores transcripcionales con dominios de unión al DNA de dedos de Zinc C_2H_2 (Zf- C_2H_2) [1], que reconocen la secuencia STRE y que están altamente conservados (Fig. 1), por lo que su función podría estar también conservada en los ortólogos CgMsn2 y CgMsn4. En el caso de los ortólogos de Msn2, se ha encontrado que comparten varios blancos comunes [9, 10], sin embargo se conoce menos sobre Msn4 por lo que es necesario estudiarlo. La mutante de *C. glabrata* *msn4Δ* se construyó con el objetivo de caracterizar la participación de Msn4 en la REO.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Obtención del DNA para la transformación

Los plásmidos pRD97 y pGH9 y se extrajeron mediante un sistema comercial estandarizado (Thermo Scientific GeneJET #K0502) a partir de las cepas de *E. coli* 1789 (pRD97, *msn4Δ::hph*, R. Domergue y B. Cormack) y 4274 (pGH9, *P_{EPAl}::FLPI::hph*, control de transformación, colección del laboratorio). Las cepas se inocularon en 3 mL de caldo LB adicionado con carbenicilina (100 µg/mL) y se incubaron durante toda la noche en agitación a 30°C. El plásmido pRD97 se digirió con la enzima de restricción *BcgI* (New England Biolabs ©). Las condiciones de la reacción fueron: 40 µl de pRD97, 6 µl de SAM (S-adenosil-metionina) al 1% en etanol 10%, 6 µl de Buffer 3.1 en un volumen final de 60 µl. La reacción se incubó a 37°C durante 1 h y se inactivó a 60°C por 20 min.

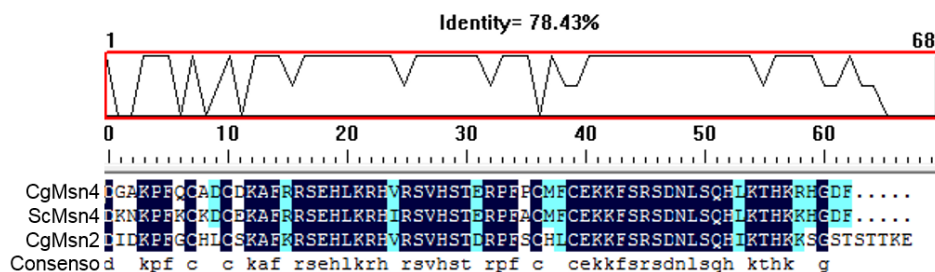


Fig. 1. Alineación del dominio de dedo de zinc de las proteínas CgMsn4, ScMsn4 y CgMsn2. Se observa una alta conservación de secuencia, especialmente entre CgMsn4, ScMsn4. Al final se muestra la secuencia consenso.

B. Transformación de *C. glabrata*

La cepa parental de *C. glabrata* BG14 [11] se inoculó en 5 mL de caldo YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa) y se incubó durante toda la noche en agitación a 30°C. De este cultivo se tomaron 300µl y se inocularon en 30 ml de YPD fresco. El inóculo

se dejó en agitación a 30°C hasta alcanzar una O.D._{600nm} de 0.7891. Las células se obtuvieron por centrifugación a 3500 rpm, se lavaron con agua mili-Q estéril y se concentraron en 300 µl de LiAc 100mM. A 50 mL de las células se agregaron 240 µl de PEG 50%, 36 µl de LiAc 1M, 25 µl de ssDNA (DNA de cadena sencilla de esperma de salmón) y 50 µl de plásmido pRD97, pGH9 (control positivo), o 50µl de Tris10mM sin DNA (control negativo) según el caso. La mezcla se incubó en agitación a 30°C durante 45 min. Después se adicionó 43 µl de DMSO y se incubó a 42°C durante 15 min. Las células se recuperaron por centrifugación, se resuspendieron en 600 µl de YPD y se incubaron en agitación durante 4 h a 30°C. Posteriormente, las transformaciones se platearon en cajas de YPD adicionado con higromicina (500 µg/ml) usando 300, 200 y 100 µl para la transformación con pRD97, 300µl para pGH9 y 300 µl para la transformación sin DNA. Las cajas se dejaron incubando por 48 h a 30°C. Finalmente, se seleccionaron 24 colonias de las que se realizaron dos purificaciones consecutivas por estría en cajas de YPD adicionado con higromicina (500 µg/ml) e incubadas durante 48 h a 30°C.

C. Extracción de DNA genómico

Las colonias purificadas se inocularon en 3mL de YPD y se incubaron durante toda la noche con agitación a 30°C. Las células se colectaron por centrifugación a 15,000rpm por 1 min y se resuspendieron en 500µl de Buffer A (Tris 50mM, EDTA 10mM, NaCl 150mM, tritón 1%, SDS 1%). Se agregaron 500 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se incubó a 42°C por 15 min. Se colocó en el FastPrep-24™ (MP Biomedicals™) por 1s a 6m/s. Se centrifugó a 15,000rpm por 1 min, se recuperó la fase acusa y se agregaron 15 µl de NaCl 5M y 1mL de etanol 100%. Se mezcló y centrifugó a 15,000rpm por 1 min y se eliminó el sobrenadante. El pellet se lavó con 1mL de etanol 70% y se secó. El DNA se resuspendió en 250µl de Tris 10mM con RNase Cocktail™ (Invitrogen™) y se incubó por 2 h a 37°C.

D. Identificación de colonias *msn4Δ*

La identificación de colonias con la mutación *msn4Δ* se realizó mediante PCR por ausencia, PCR de los extremos 5' y 3' y PCR across. Los oligonucleótidos empelados se muestran en la Tabla 1. A partir de las colonias identificadas como *msn4Δ* se realizó un pasto y se guardó en glicerol 15%.

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en el presente trabajo

Oligonucleótido	Secuencia	Descripción
15	CGATAAGAGGCCACGTGCTTTATG	P _{PGK1} Rv-out
16	AGAAATACGCACGAACACGATATAGAGG	3ÚTRHIS3Fw-out
417	GCGGGTACCTTACAGCAGTTAATGATTGGG	MSN4, 3'UTR
418	GGCAGCAGAAGAGTCAG	MSN4, interno
419	GCGGGATCCTAAAGTCTCCGTGTCTTTTATGTG	MSN4, interno
1218	CTGTGTATTGTGTGCAGGG	MSN4, 5'UTR

III. RESULTADOS Y DICUSIÓN

El plásmido pRD97 se digirió para obtener un fragmento de 3146 pares de bases (Fig. 2), que contiene la secuencia que codifica para el gen *hph* con los extremos 5' y 3' homólogos a *MSN4*, ya que se busca la inserción del fragmento por recombinación homóloga en el sitio del gen *MSN4* (Fig. 3). El plásmido pRD97 tiene otro sitio de restricción para *BcgI*, por lo que se muestran bandas adicionales en el gel de 2.4 Kb y 1.6 Kb.

El crecimiento colonias definidas de las células transformadas con pGH9 (datos no mostrados) evidencia la efectividad del método de transformación. Respecto a las transformantes con el plásmido pRD97, se observó un crecimiento homogéneo en las cajas con 300 y 200 μ L y colonias aisladas en la caja con 100 μ L (datos no mostrados), por lo que el resto de las pruebas se realizaron considerando solo esta caja.

A. PCR por ausencia

Para el diagnóstico por ausencia se usaron los oligonucleótidos #418 y #419, los cuales son complementarios a secuencias dentro del gen *MSN4*, por lo que de llevarse a cabo la recombinación homóloga no se observaría amplificación. El par de oligonucleótidos empleados dan un producto de PCR de 987 pb. Del total de las colonias analizadas solo se detectaron 4 candidatas, que corresponden con los números 5, 6, 13 y 17 (Fig.4). Como control positivo se empleó la cepa BG14 de *C. glabrata*.

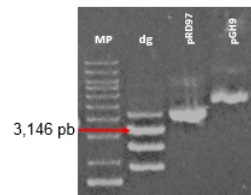


Fig. 2. Digestión del plásmido pRD97. MP: marcador de peso molecular, dg: digestión del plásmido pRD97, pRD97: plásmido pRD97 sin digerir, pGH9 plásmido pGH9. Se indica el fragmento de interés para la transformación.



Fig. 3. Transformación de *C. glabrata* BG14. La inserción del fragmento de interés se hará por doble recombinación homóloga en el sitio del gen *MSN4*, la sustitución conferirá resistencia a higromicina.

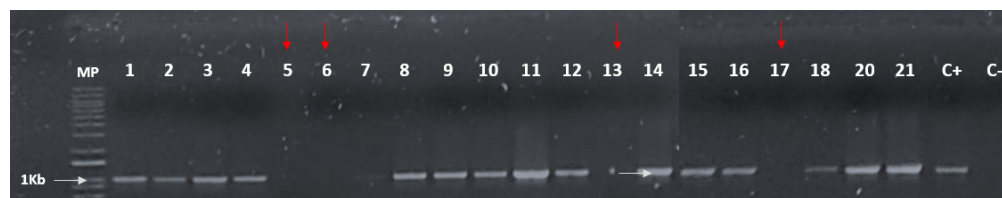


Fig. 4. Las colonias 5, 6, 13 y 17 carecen del gen *MSN4*. Los oligonucleótidos #418 y #419 un fragmento en aproximadamente 987 pb. Se busca la ausencia de amplificación. MP: marcador de peso molecular, C+: control positivo, C- control negativo, números 1 a 21 colonias evaluadas

A. PCR de los extremos 5' y 3'

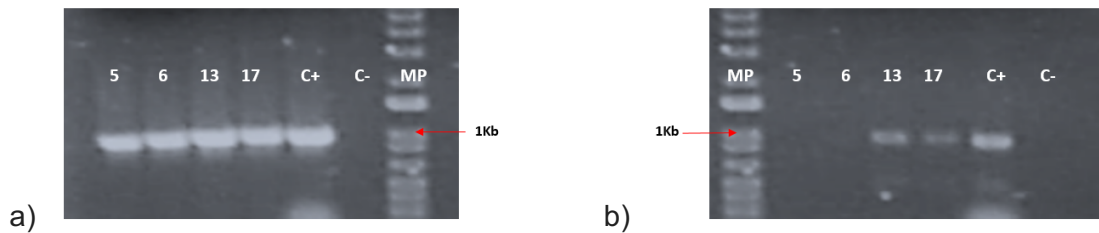


Fig. 5. Las colonias 13 y 17 muestran recombinación en los extremos 5' y 3' del gen *MSN4*. a) PCR del extremo 5', todas las colonias amplificaron un producto de 1Kb b) PCR del extremo 3', solo las colonias 13 y 17 amplificaron un fragmento de 1Kb. MP: marcador de peso, C+: control positivo, C- control negativo, números: colonias evaluadas

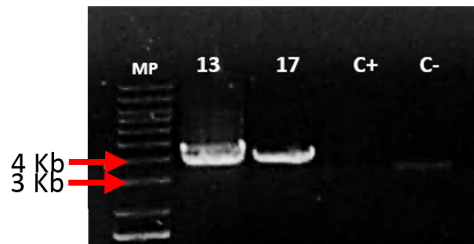


Fig. 6. Las colonias 13 y 17 son positivas a la recombinación en el sitio del gen *MSN4*. Se muestran los fragmentos amplificados de 3.8 Kb. MP, marcador de peso molecular. C+: control positivo *C. glabrata msn2Δ msn4Δ*, C- control negativo de recombinación *C. glabrata* BG14.

De las colonias candidatas 5, 6, 13 y 17 se llevó a cabo el diagnóstico de los extremos 5' y 3'. Se emplearon oligonucleótidos complementarios al genoma de *C. glabrata* y al gen *hph*. Para el extremo 5', se emplearon los oligonucleótidos #1218 y #16, que amplifican un fragmento de 1kb. Para el extremo 3' se emplearon los oligonucleótidos #15 y #417, que amplifican para un fragmento de 1kb. Solo las colonias 13 y 17 (Fig. 5 a y b) tienen un fragmento amplificado con los tamaños deseados.

B. PCR across

Para este análisis se emplearon los oligonucleótidos #1218 y #417, con un producto de 3.8 Kb (Fig. 6). La cepa BG14 de *C. glabrata* se empleó como control negativo de recombinación, de la cual se espera un fragmento de 3.4 Kb. Como control positivo se empleó la cepa *msn2Δ msn4Δ* de *C. glabrata*. Las cepas 13 y 17 fueron positivas.

IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

C. glabrata tiene diversos factores de virulencia cuyos mecanismos de acción representan importantes áreas de estudio para desarrollar estrategias en el tratamiento de las infecciones que genera. Durante la obtención de la mutante *msn4Δ* fue evidente la importancia de la preparación reciente de las soluciones de transformación, ya que el protocolo debió realizarse varias veces. Posiblemente las colonias 5 y 6 resultaron negativas porque la secuencia de DNA insertada sufrió algún tipo de daño (corte) en su trayecto al interior de la célula, o bien que pudo tratarse de una inserción en tándem. El control positivo en la PCR

across posiblemente no amplificó por un exceso de DNA en la misma. Con la mutante obtenida se podrán llevar a cabo algunas pruebas para determinar el efecto que Msn4 tiene sobre la respuesta al estrés oxidante en *C. glabrata*.

V. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro, al comité organizador del 21° Verano de la Ciencia, al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica y especialmente al Dr. Alejandro De Las Peñas Nava y a todo su equipo de trabajo; por toda la ayuda, en tantos sentidos.

VI. REFERENCIAS

- [1] M. Cuéllar-Cruz, M. Briones-Martin-del-Campo, I. Cañas-Villamar, et al., “High Resistance to Oxidative Stress in the Fungal Pathogen *Candida glabrata* is Mediated by a Single Catalase, Cta1p, and Is Controlled by the Transcription Factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p”, . *Eukaryotic Cell*, Vol. 7, No 5, pp 814–825. Disponible en <https://doi.org/10.1128/EC.00011-08> [consultado en 2019].
- [2] M. Briones-Martín-Del-Campo, E. Orta-Zavala, J. Juárez-Cepeda, et al., “The oxidative stress response of the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*”, *Revista Iberoamericana de Micología*, Vol. 31, No 1, pp 67-71. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.09.012> [consultado en 2019].
- [3] K. Kumar, F. Askari, M. Sahu, et al., “*Candida glabrata*: A Lot More Than Meets the Eye”, *Microorganisms*, Vol. 7, No 2, pp 39. Disponible en <https://doi.org/10.3390/microorganisms7020039> [consultado en 2019].
- [4] A. Roetzer, E. Klopff, N. Gratz, et al., “Regulation of *Candida glabrata* oxidative stress resistance is adapted to host environment”, *FEBS Letters*, Vol. 585, No 2, pp 319-327. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.12.006> [consultado en 2019].
- [5] A. J. Brown, K. Haynes, J. Quinn “Nitrosative and oxidative stress responses in fungal pathogenicity”, *Current Opinion in Microbiology*, Vol. 12, No 4, pp 384-391. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.06.007> [consultado en 2019].
- [6] R. E. Zordan, Y. Ren, M. S.-J. Pan, et al., “Expression Plasmids for Use in *Candida glabrata*”, *Genes | Genomes | Genetic*, Vol. 3, No 10, pp 1675–1686. Disponible en <https://doi.org/10.1534/g3.113.006908> [Consultado en 2019].
- [7] G. Gutierrez-Escobedo, E. Orta-Zavala, I. Castaño, et al., “Role of glutathione in the oxidative stress response in the fungal pathogen *Candida glabrata*”, *Current Genetic*, Vol. 59, No 3, pp 91-106. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s00294-013-0390-1> [consultado en 2019].
- [8] G. G. Luna-Arvizu, *La respuesta al estrés oxidante de Candida glabrata a través de la regulación génica de CTA1* [MS Thesis]. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., San Luis Potosí, S.L.P, 2017.
- [9] A. Roetzer, C. Gregori, A. M. Jennings, et al., “*Candida glabrata* environmental stress response involves *Saccharomyces cerevisiae* Msn2/4 orthologous transcription factors”, *Molecular Biology*, Vol. 69, No 3, pp 603-620. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.12.006>[consultado en 2019].
- [10] B. P. Cromack, S. Falkow, “Efficient Homologous and Illegitimate Recombination in the Opportunistic Yeast Pathogen *Candida glabrata*”, *Genetics*, Vol. 151, No 3, pp 979-987. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.12.006>[consultado en 2019].

Construcción de una celda con carbón activado para la electrosorción de Cr (III) (Parte I)

Alma Cristina Gaytán Lara

Universidad Autónoma de Aguascalientes
Depto. Ciencias Básicas
Av. Universidad #940. Col. Ciudad Universitaria,
C.P. 20131, Aguascalientes, Ags.
al218746@edu.uaa.mx

Asesora: Lucía Guadalupe Alvarado Montalvo

Universidad de Guanajuato
Depto. Ingeniería en Minas, Metalurgia y Geología,
División de Ingenierías, Ex. Hda San Matías S/N
Fracc. San Javier, C. P. 36020, Guanajuato, Gto.
lucia.alvarado@ugto.mx

Resumen — Uno de los principales problemas de contaminación del agua es la presencia de metales pesados en ella, como lo es el cromo. El objetivo de este trabajo es evaluar la remoción de cromo trivalente con una mezcla de carbón activado sintetizado a partir de chabacano-oliva, mediante electrosorción. Se llevaron a cabo experimentos sobre la capacidad de adsorción, obteniendo una capacidad máxima de $11.14 \text{ mg}_{\text{Cr}} \text{ g}^{-1}$, mientras que con el uso de la electrosorción se obtuvo una capacidad máxima de $53.4221 \text{ mg}_{\text{Cr}} \text{ g}^{-1}$. Por lo tanto, la técnica de electrosorción mostró mayor eficacia.

Palabras clave — Carbón activado, cromo, electrosorción

Abstract — One of the main problems of water pollution is the presence of heavy metals in it, such as trivalent chromium. The objective of this work is to evaluate the trivalent chromium removal by means of a mixture of activated carbon synthesized from apricot-olive, using electrosorption. Experiments on adsorption capacity were carried out, obtaining a maximum capacity of $11.14 \text{ mg}_{\text{Cr}} \text{ g}^{-1}$, meanwhile with the use of electro sorption a maximum capacity of $53.4221 \text{ mg}_{\text{Cr}} \text{ g}^{-1}$ was observed. Therefore the electro sorption technique showed greater efficiency.

Keywords — Activated carbon, chrome, electro sorption

I. INTRODUCCIÓN

La presencia de metales pesados en solución acuosa representa un serio peligro para la salud humana. Entre los principales metales tóxicos destacan el plomo, cadmio, cromo y mercurio. El cromo, en particular, es un metal reductor activo y en fuentes acuosas, se encuentra principalmente como Cr (III) y Cr(VI); la toxicidad y movilidad del cromo depende de su estado de oxidación, por ejemplo el Cr(VI) es muy tóxico y tiene gran movilidad mientras que el Cr(III) no es tóxico a bajas concentraciones, sin embargo, en grandes concentraciones su efecto tóxico genera alteraciones hepáticas, dermatitis y quemaduras [1-2]. La recuperación de metales de efluentes acuosos puede llevarse a cabo por diferentes tratamientos. Los procesos más comunes implican la precipitación mediante hidróxidos o sulfuros, la oxido-reducción, intercambio iónico, separación sólido-líquido mediante decantación-flotación y la separación mediante membranas. Sin embargo, el mayor inconveniente de estos tratamientos es la formación de lodos que tienen que estar sujetos a restricciones o la baja eficiencia del proceso en el caso de las membranas. En este sentido, la adsorción sobre carbón activado ha sido ampliamente estudiada y se han explorado nuevos adsorbentes con el fin de encontrar materiales más eficientes y menos costosos [3] al mismo tiempo que se han desarrollado estudios sobre adsorción inducida mediante un campo eléctrico, denominándose electrosorción. La cual es una tecnología de

bajo consumo de energía que promete ser una técnica de fácil aplicación a sistemas con iones en baja concentración.

II. MARCO TEÓRICO

La adsorción es un fenómeno interfacial en el que la asociación entre las moléculas de sorbato y la fase sólida sucede en la superficie de ésta. Existen 2 tipos: quimisorción, es decir, cuando una reacción química es la razón básica de la retención; y la fisisorción, es decir, ocurre a través de interacciones débiles de tipo electrostático [4-5]. La electrosorción ha sido uno de los métodos usados para la eliminación de iones de metales pesados y desalinización de soluciones diluidas [6]. Su fundamento consiste en imponer un campo eléctrico externo a un sistema de 2 electrodos sumergidos en una solución acuosa, de tal manera, que los iones se ven obligados a moverse hacia los electrodos con carga opuesta, esto permite la separación de carga a través de la interfaz [7]. Una de las principales ventajas de éste método consiste en que, a diferencia con el intercambio iónico, no es requerido el uso de ácidos, bases ni soluciones salinas para la regeneración de la superficie, reduciendo así sustancialmente la cantidad de residuos secundarios y el tiempo del tratamiento; además consume menos energía para lograr resultados similares obtenidos por medio de procesos térmicos como la evaporación [6].

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Todas las soluciones de Cr (III) fueron preparadas a partir de $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich >96% pureza), el agua utilizada fue desionizada (18 M Ω), el sustrato usado fue un carbón activado mezcla de Chabacano-oliva sintetizado en el Laboratorio de Química Molecular de la Universidad de Savoie Mont Blanc, Francia. Todos los experimentos fueron llevados a temperatura ambiente, 20°C. Los análisis de concentración, fueron llevados en un espectrofotómetro de absorción atómica AAnalyst 200 Perkin Elmer y Perkin Elmer 3100.

A. Adsorción

Se preparó una solución de 10 ppm de Cr (III). Se pesaron en una balanza analítica distintas muestras de carbón activado (1, 5, 10, 15, 20, 30 y 40 mg), dichas muestras se colocaron en matraces Erlenmeyer de 25 ml para posteriormente colocarles 25 ml de la solución de Cr (III), colocando un agitador de media pulgada a cada uno y se sometieron a agitación utilizando una placa de multiposición por 3 horas a 800 rpm. Las muestras se filtraron y analizaron para conocer su concentración.

B. Isotermas

A 7 matraces Erlenmeyer de 25 ml se les colocó la misma masa de carbón activado (2.5 mg) mencionado en el párrafo anterior. Se prepararon soluciones de Cr (III) en matraces aforados de 50 ml a distintas concentraciones (5, 10, 50, 100, 200, 300 y 400 ppm). Las soluciones se dividieron en dos partes: 25 ml se apartaron como muestras iniciales y 25 ml se colocaron en cada uno de los matraces. Se sometieron a agitación utilizando una placa de multiposición por 3 horas a 800 rpm. Posteriormente se filtraron y se determinó su concentración.

C. Electrosorción

Los electrodos consistieron en una placa de grafito como soporte y una ligera capa de carbón activado. Las placas de grafito se lavaron, secaron y se determinó su peso constante. Después se realizó una mezcla de etanol, solución de Nafion® y carbón activado, dicha mezcla se le colocó con una brocha sobre placas de grafito y fueron secadas en la estufa a 75°C. El peso del carbón activado añadido fue de aproximadamente 1 gramo en cada electrodo. La celda estuvo constituida por 2 placas acrílicas que anidaban 2 electrodos de grafito (30 cm²) y una placa de acrílico de 6 mm de espesor con las mismas dimensiones de los electrodos, por la cual se recircularon 250 ml de una solución de Cr (III) a 100 ppm, a un flujo de 10 mL min⁻¹, a través de una bomba peristáltica Cole-Palmer 6-600 rpm modelo 7553-20, utilizando manguera L/S 14 máster flex®, y mediante una fuente de poder GW-Instek se aplicó una diferencia de potencial de 1V.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

Antes de comenzar la discusión, es importante hacer notar la termodinámica del sistema, Cr (III) – H₂O, donde podemos darnos cuenta, de acuerdo a Fig. 1, mediante el diagrama Eh-pH, que el cromo trivalente puede presentarse en diferentes especies, de las cuales, únicamente por cambios en el pH de la solución podríamos tener: Cr³⁺, CrOH²⁺, Cr(OH)₂⁺, Cr(OH)₃⁰ ó Cr(OH)₄⁻. Lo que implica que un factor de suma importancia para comprender los resultados, será analizar el pH de la solución, para evitar llegar al punto en que el cromo trivalente precipita (aprox. 6.2).

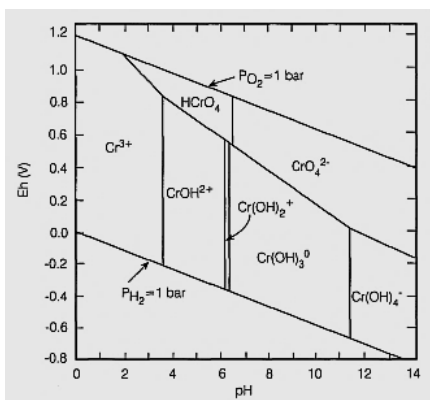


Fig. 1. Diagrama Eh-pH para las especies del cromo en solución acuosa [8].

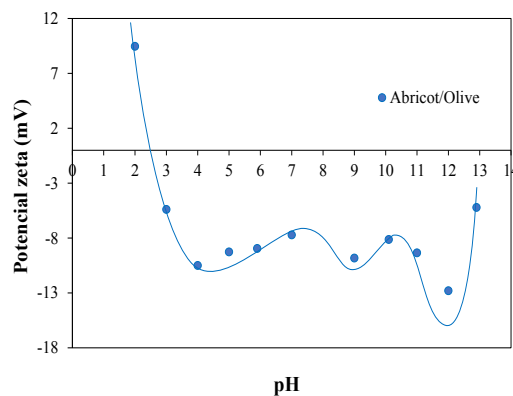


Fig. 2. Potencial zeta para el sustrato carbonoso [9]

Por otro lado, en la Fig. 2 se presentan los resultados de caracterización de potencial zeta para dicho sustrato, realizado por el grupo de trabajo de la Dra. Alvarado. Como se puede ver el pH al que favorece la adsorción de cationes es después de 2.5.

A. Adsorción

En la Fig. 3, se muestra el decaimiento de la concentración a medida de que una mayor masa de carbón es utilizado, encontrando que una mayor remoción se logra utilizando masas pequeñas (0-10 mg), y por lo tanto una mayor capacidad; después, entre 10 y 20 mg se nota un cambio de pendiente, en donde hay una capacidad de remoción distinta, para finalmente, entre 20 y 40 mg, tener una menor capacidad de adsorción. De esta manera, al realizar los cálculos se logró observar que la capacidad máxima fue $21.21 \text{ mg}_{\text{Cr}}/\text{g}_{\text{C}}$ al utilizar 5.2 mg de carbón activado. Los cambios en la capacidad vienen dados por el equilibrio que tiende a establecerse entre la fase sólida y la fase líquida al utilizar distintas cantidades del adsorbente. Por su parte en la misma figura se muestra un pH prácticamente constante durante el experimento, el cual se mantiene entre 4.5 y 5.0, lo que indica que prevalece la especie CrOH^{2+} .

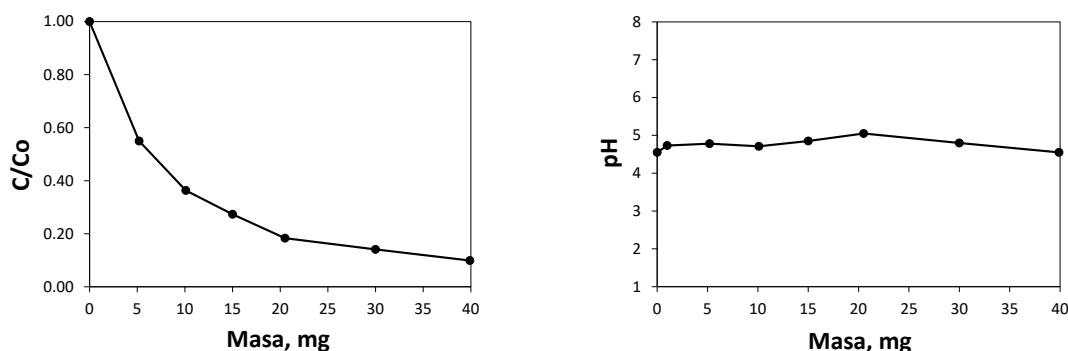


Fig. 3 Izquierda: Fracción de Cr (III) en solución vs masa de carbón activado utilizada, derecha: variaciones de pH durante el experimento de dosificación de masa.

B. Isotermas

En la Fig. 4 se presentan las isotermas de acuerdo a los modelos de adsorción de Freundlich y Langmuir, y como puede ser observado, el ajuste fue mejor para la isoterma de Langmuir. El modelo de Freundlich asume superficies heterogéneas, es decir, que existen múltiples sitios disponibles para la adsorción [10], mientras que el modelo de Langmuir, indica una superficie homogénea y tiene un número específico de sitios donde se puede adsorber la especie, impidiendo que la adsorción continúe después de que los sitios se ocupan [11]. Al realizar el tratamiento de datos, la capacidad máxima que sugiere el modelo de Langmuir para esta relación adsorbato-adsorbente es de $11.14 \text{ mg}_{\text{Cr}} \text{ g}^{-1}$.

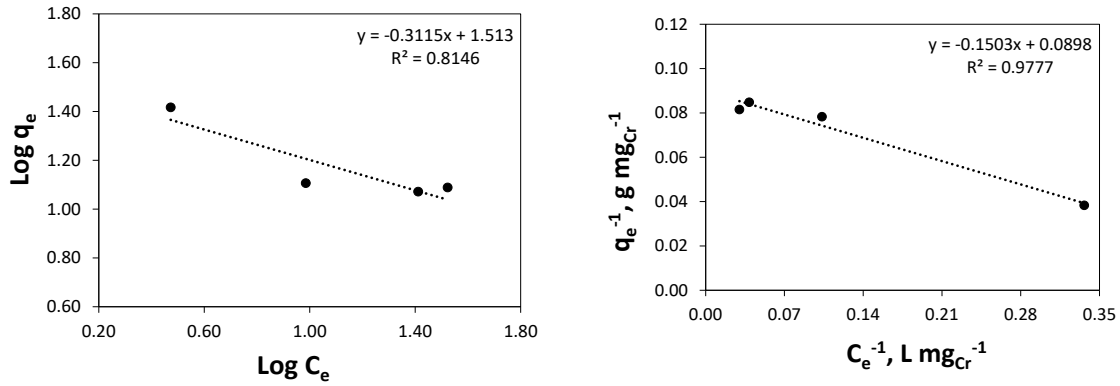


Fig. 4 Isothermas de adsorción, a la izquierda, modelo de Freundlich, a la derecha, modelo de Langmuir

C. Electrosorción

En la Fig. 5 se presentan los resultados de la electrosorción, donde puede observarse que la velocidad de remoción es constante en la primera hora, y mucho mayor, para después decaer drásticamente. Al evaluar la capacidad máxima, se encontró a los 90 minutos con un valor de $53.4221 \text{ mg}_{\text{Cr}}/\text{g}_\text{C}$.

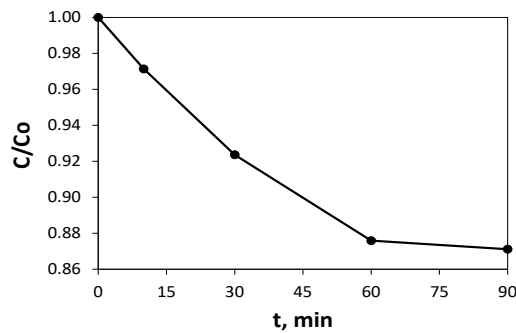


Fig. 5 Fracción de Cr (III) presente en la solución vs tiempo

En la Fig. 6 se muestran los cambios de conductividad y pH durante la prueba. Como se puede observar, la conductividad aumentó en cuanto se hizo pasar la solución por la celda, como producto del contacto de la solución con el carbón activado y las especies encontradas en él, para después mantenerse constante durante toda la prueba, al igual que el pH. Como puede notarse el pH se mantuvo entre 4.5 y 5 lo que significa que no hay cambio en la especie y no llega a precipitar, lo cual es positivo, pues si ese fuera el caso, la técnica no podría ser utilizada.

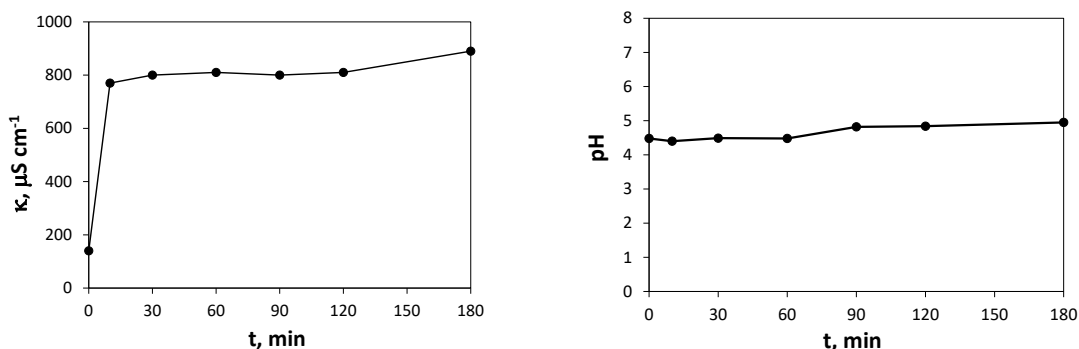


Fig. 6 Comportamiento de conductividad (izquierda) y pH (derecha) contra tiempo

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La capacidad máxima que se obtuvo fue $53.4221 \text{ mg}_{\text{Cr}}\text{g}_{\text{C}}^{-1}$ por medio de la electrosorción, la cual fue mayor a la capacidad máxima que se obtuvo utilizando un sistema de adsorción ($11.14 \text{ mg}_{\text{Cr}}\text{g}_{\text{C}}^{-1}$). Lo anterior se logra debido a que la adsorción resultó ser monocapa, por lo que se encuentra limitada por el número de sitios disponibles por el sustrato. En cambio, al aplicar electrosorción e inducirse el campo, se favorece a que la adsorción aumente por área de electrodo, en este caso siendo un poco más de 4 veces mayor. Con lo anterior se determina que una eliminación total del cromo presente se lograría mediante la electrosorción con electrodos que contengan 0.5 g de Carbón activado. Por otro lado, el valor del pH no presentó grandes cambios, ni precipitación, por lo que la técnica de electrosorción es más eficaz para la remoción del cromo trivalente en agua contaminada que una adsorción. Para trabajos futuros se sugiere analizar la inversión de campo para la recuperación del cromo.

VI. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Lucia Alvarado por haberme permitido formar parte de este proyecto, por guiarme, ayudarme y motivarme en el mundo de la investigación científica, al Departamento de Ingeniería en Minas, Metalurgia y Geología, de la División de Ingenierías de la Universidad de Guanajuato por permitirme hacer uso de sus Laboratorios e instalaciones y recibirme con los brazos abiertos, así como al Técnico académico Juan Carlos Martínez Barrón por el apoyo brindado realizando los análisis de Espectrofotometría de Absorción Atómica. De igual manera se agradece al Profr. Laurent Duclaux por proporcionarnos el carbón activado sintetizado en los laboratorios de química molecular de la Université Savoie Mont Blanc. A mi familia, que a pesar de la distancia siempre me ofreció el apoyo necesario. Finalmente, a la Universidad Autónoma de Aguascalientes y al H. Comité organizador del 21° Verano de la Ciencia por todo el apoyo brindado.

REFERENCIAS

[1] Leyva, R. Flores, J.V. Díaz, P.E. Berber, M.S. (2008). *Adsorción de Cromo (VI) en solución acuosa sobre fibra de Carbón activado*. Información tecnológica, 19(5), 27-36. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642008000500005>

- [2] Garzon, J.A. & González, L.A. (2012). *Adsorción de Cr(VI) utilizando carbón activado a partir de cáscara de naranja* (Tesis de pregrado). Universidad de Cartagena, Cartagena.
- [3] Duarte, E. Olivero, J. & Jaramillo, B. (2009). Remoción de cromo de aguas residuales de curtiembres usando quitosan obtenido de desechos de camarón. *Revista Scientia et technica*, 42, 290-295.
- [4] Doménech, X. & Peral, J. (2006). *Química ambiental de sistemas terrestres*. Reverté: España. Pp. 46 - 47
- [5] Valcárcel, C. & Gómez, A. (1988). *Técnicas analíticas de separación*. Reverté: España. Pp. 15
- [6] Ying, T. Yang, K. Yiacoumi, S. & Tsouris, C. (2002, Abril, 29). *Electrosorption of Ions from Aqueous Solutions by Nanostructured Carbon Aerogel*. *Journal of Colloid and Interface Science*. Vol. 250. Pp. 18-27. doi:10.1006/jcis.2002.8314.
- [7] Foo, K.Y. & Hameed, B.H. (2009, Mayo, 21). *A short review of activated carbon assisted electrosorption process: An overview current stage and future prospects*. *Journal of Hazardous Materials*. Vol. 170. Pp. 552-559.
- [8] Rai, D. Sass, B & Moore, D. (1987). *Chromium (III) hydrolysis constants and solubility of chromium (III) hydroxide*. *Inorg.chem*. Vol. 26, 3. Pp. 345-349.
- [9] Ramírez-Terán, J. L. Moreno-Torres, J. J. Martínez-Barrón, J. C., Corona-Arroyo, M. Duclaux L. Alvarado-Montalvo L. G. (2019). Caracterización electroquímica de carbón activado para evaluar la electrosorción de cromo trivalente, Memorias del XXXIV Congreso de la Sociedad Mexicana de Electroquímica.
- [10] Adamson, A. (1997). *Physical chemistry of surfaces*. Wiley – Interscience publicacion. England
- [11] Ortega, N. & Núñez, O. (2012). *Adsorción de aldehídos insaturados sobre TiO2*. *Av. Cien.Ing.* 3(1). Pp 81-91

Construcción de una celda con carbón activado para la electrosorción de cromo trivalente (Parte II)

Alondra Ramírez Padilla

Universidad Autónoma de Aguascalientes
Depto. Ciencias Básicas
Av. Universidad # 940, Col. Ciudad Universitaria
C. P. 20131, Aguascalientes, Ags.
alondra.rmz.padilla@gmail.com

Asesora:

Lucía Guadalupe Alvarado Montalvo

Universidad de Guanajuato
Depto. Ingeniería en Minas, Metalurgia y Geología,
División de Ingenierías, Ex. Hda San Matías S/N
Fracc. San Javier, C. P. 36020, Guanajuato, Gto.
lucia.alvarado@ugto.mx

Resumen— Existen diversos procesos minero-metalúrgicos, en los cuales el agua es utilizada como un recurso primario, generando efluentes, que al ser expuestos al ambiente, pueden contaminar algún cuerpo de agua o bien el suelo, debido a la presencia de metales pesados. Uno de los metales encontrados, algunas veces como traza es el Cromo (III). En el presente trabajo se empleó la técnica de desionización capacitiva para la electrosorción del Cromo (III), mediante la construcción de una celda con electrodos de carbón activado soportados en grafito, donde se observó una capacidad de $28.8 \text{ mg}_{\text{Cr}}\text{g}_{\text{C}}^{-1}$.

Palabras clave — Desionización capacitiva, Cromo (III), Carbón activado.

Abstract — There are various mining-metallurgical processes in which water is used as a primary resource, generating effluents, which when exposed to the environment, can contaminate some body of water or soil, due to the presence of heavy metals. One of the metals found, sometimes as trace element is Chromium (III). In this work capacitive deionization was used to the electrosorption of Chromium (III), with the construction of a cell with active carbon electrodes supported on graphite, where a capacity of $28.8 \text{ mg}_{\text{Cr}}\text{g}_{\text{C}}^{-1}$ was observed.

Keywords — Capacitive deionization, Chromium (III), Activated Carbon

I. INTRODUCCIÓN

Los metales pesados se encuentran entre los contaminantes más comunes en el agua. Estos metales presentan toxicidad para los seres humanos al encontrarse en una concentración considerable que pueden afectar el sistema nervioso central, cerebro, hígado, riñones y piel. Existen métodos convencionales para la eliminación de los iones metálicos, como lo es la precipitación, la electrodiálisis, el intercambio iónico y la desionización capacitiva (CDI). La precipitación es una de las técnicas más utilizada en la industria debido a que es sencilla de operar, una de las desventajas que presenta esta técnica es que el mantenimiento de los efluentes sólidos puede ser muy costoso [1].

El presente trabajo busca estudiar la capacidad de adsorción y electrosorción de un carbón activado comercial mediante la aplicación de electrodeionización capacitiva, para ello se realizarán experimentos de adsorción convencional e inducidos por un campo eléctrico.

II. MARCO TEÓRICO

La desionización capacitiva (CDI) es empleada porque es simple de operar, tiene un bajo costo, alta eficiencia y no presenta contaminantes secundarios. El sistema de CDI consiste en dos etapas, adsorción y desorción. Durante la adsorción, los aniones o cationes se

adsorben en el cátodo o ánodo, respectivamente, Al aplicar un potencial eléctrico a los electrodos de la CDI, los iones cargados en el agua no contaminada se adsorben en la superficie de los electrodos cargados y forman una doble capa eléctrica, de esta manera los iones se quedan adsorbidos, en consecuencia, la concentración de sales disminuye. Esta técnica se puede aplicar para la remoción de iones como el nitrato, cadmio, cromo, litio o los metales pesados como el cobre dependiendo de la concentración del medio acuoso [2,3]. Según Díaz se utilizó la técnica desionización capacitiva para la disminuir la concentración de iones cloruro, empleando dos tipos de carbones activados con gran área superficial, uno de ellos comercial y el otro activado en laboratorio. Así mismo, mediante las isoterms obtenidas en tal trabajo se observó que el carbón activado en laboratorio tenía multicapas que permitían una mayor adsorción, por tanto, mostro mejor comportamiento como electrodo en CDI [4].

La adsorción es el mecanismo por el cual especies acuosas establecen una interacción con átomos de la superficie de los sólidos. Las isoterms de adsorción son representaciones graficas que muestran la relación de equilibrio entre la concentración del soluto en la fase líquida o gaseosa. Existen cinco tipos de isoterms, en este trabajo nos enfocamos al análisis del modelo de Langmuir y Freundlich. El modelo de Langmuir, corresponde a una adsorción tipo monocapa y característica de un proceso de quimisorción, el cual implica una unión muy fuerte entre adsorbato-adsorbente, energías similares a un enlace químico; mientras que el modelo de Freundlich, supone una superficie con diferentes grados de adsorción, siendo indicativo de una adsorción física en multicapa [5].

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo este trabajo se utilizó carbón activado de cáscara de coco comercial con un secado previo. Se utilizó agua desionizada(18MΩ), el reactivo utilizado para la preparación de la solución de cromo es CrCl₃ 6H₂O (Aldrich® >96% pureza). Para la agitación se utilizó una placa de multiposición y agitadores magnéticos utilizados fueron de media pulgada, la agitación aplicada fue de 800 rpm. Los análisis de concentración de cromo fueron realizados en un espectrofotómetro de absorción atómica AAnalyst 200 Perkin Elmer y Perkin Elmer 3100.

A. Dosificación

Para realizar la dosificación se pesaron ocho muestras del carbón activado con las siguientes masas: 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300 y 400 mg. Cada una de las masas se colocó en un matraz Erlenmeyer de 25 mL. A cada uno de los matraces se les agrego 25 mL de solución de cromo a 10 ppm, posteriormente se dejaron en agitación durante tres horas. Al terminar el tiempo de agitación se filtraron las muestras y se midió temperatura, pH, conductividad y absorbancia de cada una de las muestras para determinar la concentración.

B. Isoterms de Langmuir y Freundlich

Se colocaron 7 matraces con la misma masa de carbón activado (50 mg), a cada uno de los matraces se le añadieron 25 ml de solución de cromo a distintas concentraciones: 5 ppm, 10, 50, 100, 200, 300 y 400 ppm se agitaron las muestras durante tres horas, posteriormente se filtraron y se midió conductividad, temperatura, pH y absorbancia.

C. Electrosorción

Para montar la celda de electrosorción se prepararon los electrodos de grafito de dimensiones 7.5 x 4 cm, se sometieron a peso constante, libre de humedad. Se les añadió varias capas de una mezcla de carbón activado y Nafion[®], hasta formar una superficie uniforme. El electrodo del cátodo contenía 0.8143 g de carbón activado y el ánodo 0.8269 g, posteriormente se colocaron en la celda. La celda estuvo constituida por 2 placas acrílicas que anidaban 2 electrodos de grafito de dimensiones 7.5 x 4 cm y una placa de acrílico de 6 mm de espesor con las mismas dimensiones que los electrodos, por la cual se circuló la solución problema. Las condiciones iniciales de solución circulada en la celda son las siguientes: 500 ml de una solución inicial de cromo de 10 ppm, con pH 4.48, conductividad 140 μ S, temperatura 25.5°C y la diferencia de potencial usada fue de 1V y se h 10 mL/min. Se extrajo muestra de la solución de cromo que circulaba por la celda a los siguientes tiempos: 0, 10, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 min y 360. A cada una de las muestras se les midió la temperatura, pH, conductividad y absorbancia.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Dosificación

Por medio de este experimento se comparó la masa de carbón necesaria para obtener la capacidad máxima de adsorción de Cr (III). La masa máxima adsorbida fue de 24.2 mgCr/gC, como se puede observar en la Fig1, la capacidad de adsorción es mayor utilizando de 0 a 200 mg de carbón y a partir de dicho valor de masa la capacidad disminuye drásticamente, de 24.2 a 8.9 mgCr/gC. Sin embargo, la concentración de cromo fue casi nula cuando estuvo expuesta una masa mayor a 300 mg de carbón activado, esto es debido a la alta capacidad que tiene el carbón activado para adsorber los iones, dado que tiene una gran área superficial y microporosidad elevada que permite realizar interacciones entre estos iones. Como se puede observar la influencia del pH en la solución aumenta su valor al aumentar la masa del carbón, es debido a la formación de un complejo sobre la superficie entre los iones metálicos y los grupos superficiales ácidos con el grupo carboxilo [6-7].

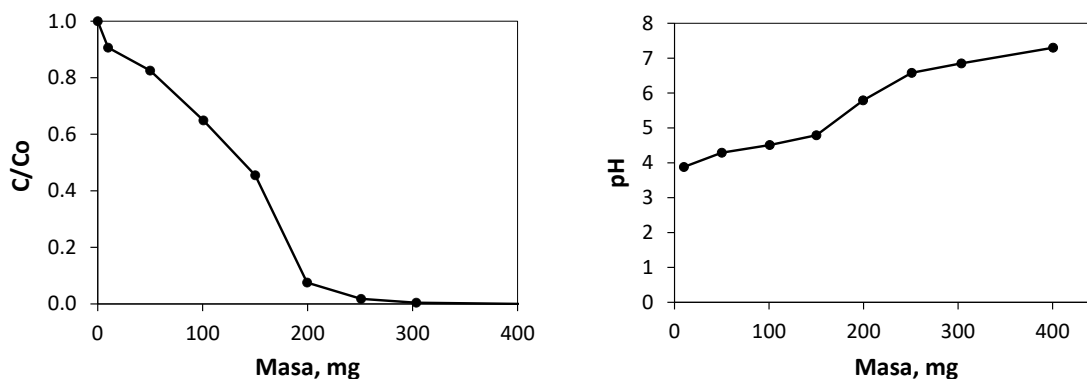


Fig 1. Izquierda: Fracción de Concentración de Cr (III) obtenida vs masa de carbón activado; Derecha: pH vs masa de carbón activado.

B. Isotermas de Langmuir y Freundlich

Como se puede observar en la Fig 2 y haciendo la comparación entre las dos isotermas, los resultados se ajustan al modelo de Freundlich, debido al valor presentado de la correlación en el gráfico de la derecha, lo que significa que el carbón tiene múltiples sitios de adsorción, no solo en una monocapa, esto ayudará a obtener una mayor adsorción de iones de Cr (III), pues se tiene una adsorción multicapas, asimismo implicará una buena reversibilidad del proceso.

Las constantes obtenidas del modelo de Freundlich fueron las siguientes: $K_F = 53.951 \text{ mg}_{Cr}/g_C$ y $n = -2.5$. Con el valor de K_F se pudo obtener la capacidad máxima empírica que podría remover el carbón comercial, así mismo con el valor de n se observó que es negativo por lo cual no se puede tomar en cuenta la intensidad de adsorción en el modelo ya que los valores considerados tienen que ser mayores a la unidad [8,9].

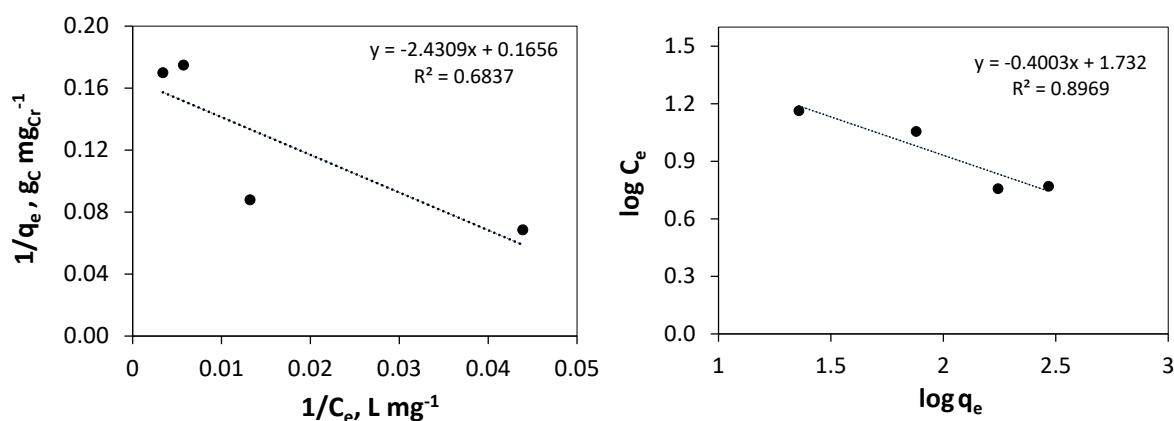


Fig 2. Izquierda: Isotherma de Langmuir. Derecha: Isotherma de Freundlich del carbón activado.

C. Electrosorción

En la Fig 3 se observa que la concentración de Cromo al pasar el tiempo disminuye, esto es debido a que al aplicar una diferencia de potencial entre los electrodos del carbón activado, los iones Cr de la solución son electro-adsorbidos sobre la superficie porosa del carbón activado, migrando los aniones hacia el ánodo y los cationes hacia cátodo, obteniendo de esta manera una masa máxima adsorbida de $28.8591 \text{ mg}_{Cr}/g_C$ a los 360 minutos.

Asimismo, se observa que el pH se mantiene en un intervalo de 4 a 6 durante todo el proceso, esto representa que el Cromo III si está siendo adsorbido y no está siendo precipitado, ya que se sabe que pasando de 6.2 pasa a una especie sin carga.

Otra cuestión importante es que la velocidad de remoción es mantenida constante durante todo el experimento, cuestión que puede ser observada en la pendiente del gráfico.

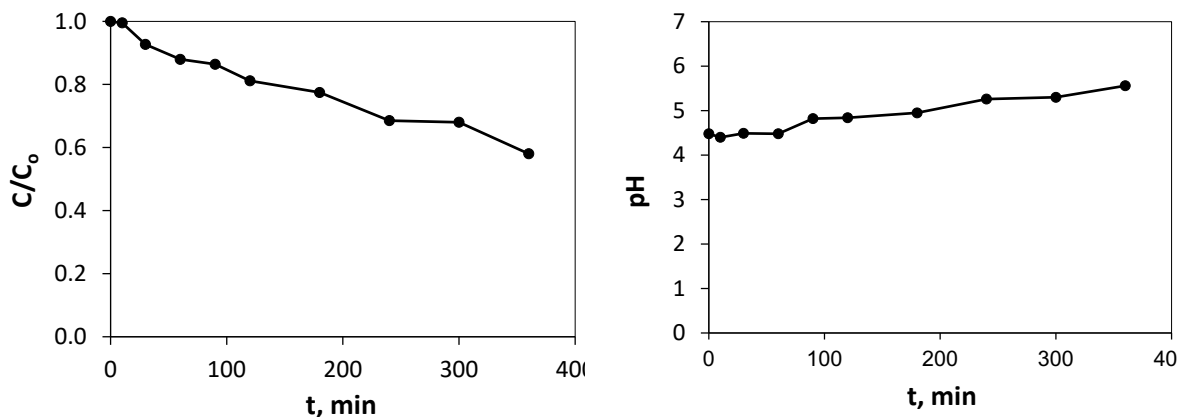


Fig 3. Izquierda: Fracción de la concentración de Cr (III) vs t. Derecha: pH de la solución vs t.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De los resultados obtenidos se encontró que al utilizar electrosorción la velocidad de remoción fue constante durante el experimento, a diferencia del caso de adsorción, donde mantiene distintas velocidades al tratar de llegar al equilibrio. Con lo anterior se puede concluir que al aplicar la técnica de Desionización Capacitiva se tiene mayor control en el proceso de eliminación del ion y también sobre su desorción, evitando la aplicación de sustancias para su regeneración, como lo sería en el caso de adsorción. Por otro lado, el hecho de encontrar que se sigue un modelo de Freundlich, nos habla de que los valores de energía asociados a la adsorción son bajos y por lo tanto existiría capacidad de regeneración de la superficie con facilidad. Con lo encontrado en los presentes experimentos se da la base para un posible escalamiento del sistema de electrodos y estudios de desorción.

VI. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres por apoyarme a poder realizar esta estancia en Guanajuato, así mismo agradezco a la Dra. Lucía Alvarado por recibirme y apoyarme en este proyecto. Se agradece al Departamento de Ingeniería en Minas, Metalurgia y Geología de la División de Ingenierías de la UG Campus Guanajuato por la facilidad para el uso de laboratorios e instalaciones, asimismo al técnico académico Juan Carlos Martínez Barrón por el apoyo de los análisis químicos durante el presente proyecto. También dedico mis agradecimientos a las universidades involucradas para poder realizar el 21° Verano de la Ciencia Región Centro y de antemano a la institución que me permite seguir formándome como profesional, Universidad Autónoma de Aguascalientes.

REFERENCIAS

- [1] Gautam, R; Sharma, S; Mahiya, S; Chattopadhyaya, M; (2014). Contamination of heavy metals in aquatic media: transport, toxicity and technologies for remediation. Recuperado de <http://www.rsc.org/>
- [2] Caviades, R; Muñoz, R; Perdomo, A; Rodríguez, D; Sandoval, I; (30 mayo 2015) Tratamientos para la remoción de metales pesados comúnmente presentes en aguas residuales industriales. Una revisión. *Ingeniería y región (1)*, p. 74.

- [3] García, Enrique; Palma, Jesus (2017) Estudio de la desionización capacitiva para el tratamiento de aguas salobres: evaluación de prestaciones y eficiencia energética (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Madrid. España. p. 25
- [4] Díaz, Patricia (2012) Materiales de carbono para desalinización de aguas mediante desionización capacitiva (tesis de pregrado). Universidad de Oviedo. España.
- [5] Ayora, Carlos (2004) Los sistemas terrestres y sus implicaciones medioambientales. Ministerio de educación. España. P. 97-100
- [6] Rodríguez, P., Giraldo, L., & Moreno, J. (2010). Influencia del pH sobre la adsorción en carbón activado de Cd(II) y Ni(II) desde soluciones acuosas. Revista Colombiana de Química, 39(3), 401-412. Recuperado de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/article/view/20362/29315>.
- [7] Tinto Alencherry, Naveen A.R., Somnath Ghosh, Jency Daniel, Venkataraghavan R. (2017) Effect of increasing electrical conductivity and hydrophilicity on the electrosorption capacity of activated carbon electrodes for capacitive deionization, Desalination (415). Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011916416313224>
- [8] Zhao, Xiaodan; Chen, Donghui; Zhang, Yurong; (2017) A General Isotherm Model for Activated Carbon Adsorption of Typical Natural Organic Matters. Advances in Biological Sciences Research (3). Pp. 270-274
- [9] Penedo Medina, Margarita, Manals Cutiño, Enma Michel, Vendrell Calzadilla, Frank, & Salas Tort, Dolores. (2015). Adsorción de níquel y cobalto sobre carbón activado de cascarón de coco. Tecnología Química, 35(1), 110-124. Recuperado en 06 de agosto de 2019, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852015000100010&lng=es&tlng=es.

Cuantificación de contaminantes en cultivos comestibles (*Chenopodium ambrosioides* y *Petroselinum crispum*) expuestos a aguas residuales

Andrea Anahi Parra Piñón

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Facultad Silao-Irapuato km 12.5 El Copal,
36821 Irapuato, Gto.

andreaanahi@hotmail.com.ar

Asesora: Candy Carranza Álvarez

Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Romualdo del Campo 501, Rafael Curiel,
79060 Cd Valles, S.L.P.

candy.carranza@uaslp.mx

Resumen — En el presente estudio evaluó el efecto de tres metales pesados a diferentes concentraciones: Cu (3 ppm, 6 ppm y 10 ppm), Cd (0.5 ppm, 1 ppm, 2.5 ppm) y Pb (0.5 ppm, 1 ppm y 5 ppm) sobre el crecimiento de *Chenopodium ambrosioides* (epazote) y *Petroselinum crispum* (perejil). Las concentraciones de los metales correspondían a las contenidas en las aguas residuales provenientes de la mancha urbana. Para evaluar el efecto de la concentración y tipo de metal, las semillas de ambos cultivos se expusieron a las diferentes concentraciones durante 10 días, utilizando como medio de soporte agar planta y la concentración del metal en cajas tipo Petri. Se evaluaron cada 24 horas la germinación de las semillas así como la inhibición de las mismas tomando en cuenta la elongación de la raíz, tallo, raíces secundarias y vellos radicales expuestas a las concentraciones determinadas de los metales. Los resultados obtenidos para *P. crispum* mostraron una inhibición del crecimiento a 0.5 ppm de Pb en todas las réplicas preparadas, mientras que para *C. ambrosioides* se observó una inhibición a una concentración de 2.5 ppm de Cd. Los resultados demostraron que ambos cultivos son susceptibles a ciertas concentraciones de los metales más tóxicos, pero son tolerantes a bajas concentraciones u otros metales como el Cu.

Palabras clave — Germinación, medio de cultivo, metales pesados, aguas residuales.

Abstract — In the present study, it evaluated the effect of three heavy metals at different concentrations: Cu (3 ppm, 6 ppm and 10 ppm), Cd (0.5 ppm, 1 ppm, 2.5 ppm) and Pb (0.5 ppm, 1 ppm and 5 ppm) on the growth of *Chenopodium ambrosioides* (epazote) and *Petroselinum crispum* (parsley). The concentrations of the metals corresponded to those contained in the wastewater from the urban stain. To evaluate the effect of the concentration and type of metal, the seeds of both crops were exposed to the different concentrations for 10 days, using as a support medium agar plant and the concentration of the metal in Petri dishes. The germination of the seeds as well as their inhibition were evaluated every 24 hours taking into account the elongation of the root, stem, secondary roots and radical hairs exposed to the determined concentrations of the metals. The results obtained for *P. crispum* showed a growth inhibition at 0.5 ppm of Pb in all prepared replicas, while for *C. ambrosioides* an inhibition was observed at a concentration of 2.5 ppm Cd. The results showed that both cultures are susceptible at certain concentrations of the most toxic metals, but they are tolerant at low concentrations or other metals such as Cu.

Keywords — Germination, culture medium, heavy metals, wastewater.

I. INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso natural imprescindible para la sociedad y se utiliza en todas las actividades que el hombre realiza. No obstante, en la actualidad existen severos problemas de escasez y contaminación del agua (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos

Naturales [SEMARNAT], (2007). La actividad agrícola e industrial utiliza una gran cantidad de agua, la cual puede ser reutilizada como agua residual. Sin embargo, muchas veces estas aguas son mezcladas con las aguas naturales, y se genera una mayor contaminación. Para evitar problemas de contaminantes existen sistemas de depuración que sirven para devolverles características físicas y químicas originales. (Dickson, 2002). En la Huasteca Potosina los ríos están altamente impactados por residuos de origen agrícola y por descargas de aguas residuales. Alfaro y col. (2002) han realizado algunos estudios de calidad del agua en el Río Valles en donde encontraron alta concentración de materia orgánica y concentraciones de Pb y Cd totales disueltos son superiores a los valores máximos recomendados para la preservación de la vida acuática. Los metales pesados como el Pb y Cd son considerados altamente peligrosos debido a que tienden a bioacumularse en diferentes cultivos agrícolas, causando un aumento en la concentración de estos elementos en los tejidos vegetales. Al ser absorbidos por las plantas, los metales pesados pueden incorporarse a las cadenas tróficas, ocasionando severos daños a la salud humana y animal (Jiménez, et al., 2010).[1] Para monitorear la calidad de un cuerpo acuático se pueden emplear especies vegetales biomonitadoras, las cuales ofrecen una de las pocas opciones disponibles para monitorear la contaminación en el suelo, sedimentos, lluvia, agua, aguas residuales y residuos sólidos (Garten y Frank, 1984; Fletcher et al., 1985; Miller y otros, 1985; Thomas et al., 1986). La prueba de elongación de la raíz es uno de los métodos más simples de fitotoxicidad (Wang y Williams, 1988, 1990; Wang y Keturi, 1990; Araújo et al., 2001; Park et al., (2016) porque la semilla germinadora es la primera interfaz de intercambio de materiales entre la planta en desarrollo y el medio ambiente.[2]

II. METODOLOGÍA

Material vegetal. Como material vegetal se emplearon semillas seleccionadas de *Chenopodium ambrosioides* (epazote) y *Petroselinum crispum* (perejil) (marca Rancho los Molinos), las cuales se mantuvieron en su empaque original (sin generar modificaciones en cuanto a condiciones de ambiente, temperatura, etc.) hasta el día de su extracción.

Pruebas de toxicidad. Para determinar la toxicidad de las semillas a la concentración de metales pesados presentes en las aguas residuales, se prepararon cajas Petri con agar con las diferentes concentraciones de metales teniendo como control, cajas Petri con agar solamente. Los metales empleados fueron: Cu (3 ppm, 6 ppm y 10 ppm), Cd (0.5 ppm, 1 ppm, 2.5 ppm) y Pb (0.5 ppm, 1 ppm y 5 ppm), por triplicado. El pH se ajustó entre 5.7 y 6 utilizando hidróxido de sodio (1M) y ácido clorhídrico (1N) para realizar los ajustes correspondientes. Todo el material empleado fue esterilizado mediante autoclave antes de su utilización. De igual manera el material vegetal fue sembrado bajo condiciones de asepsia en la campana de flujo laminar en donde se colocaron cinco semillas de cada especie vegetal. Las cajas Petri con las semillas, se sellaron con vitafilm para evitar la evaporación de las soluciones y se incubaron a 25 ± 1 ° C en la cámara ambiental. Se realizó la evaluación del material vegetal cada 24 horas, y al cuarto y sexto día se realizaron las mediciones de la longitudes de raíz se midieron así como la altura, vellos radicales y raíces laterales. [3][4]

Pruebas de toxicidad en agua. El agua residual fue obtenida de la última etapa de la planta de tratamiento Birmania I. la muestra fue proporcionada por el personal del

Departamento de Agua Potable y Alcantarillado de Cd Valles, S.L.P., durante el mes de Junio de 2019. Las muestras de agua fueron transportadas en contenedores de polietileno, las cuales se congelaron en el laboratorio antes de poder usarlas para el experimento. Se utilizaron muestras de agua de 15 ml en 15 tubos marca FALCON; con tres semillas presentes en cada tubo; tomando un control así como una concentración: baja, media y alta de los metales empleados para el análisis.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de los metales sobre el alargamiento de la raíz en *Chenopodium ambrosioides* y *Petroselinum crispum*. Mora (1998) menciona que el riego con aguas residuales en áreas verdes, cultivos de legumbres y árboles frutales es cada día mayor. En consecuencia, existe alto riesgo de contraer enfermedades intestinales por bacterias coliformes fecales, sobre todo con los productos de consumo crudo. A partir de los resultados obtenidos de los metales empleados se logró observar cambios bastantes significativos, respecto a las distintas concentraciones a las que se sometieron las semillas. Cabe destacar que para que se diera la germinación fue necesario que transcurrieran aproximadamente 13 días para *Petroselinum crispum* y 8 días para *Chenopodium ambrosioides*. Tabla 1. Las concentraciones empleadas fueron tomadas de los límites permisibles que marcaba la NOM-001-SEMARNAT-1996 (SEMARNAT, 2003). [5]

Tabla 1. Efecto del tipo y concentración del metal en la germinación de cultivos comestibles

Cultivo	Metales	Concentración(ppm)	Respuesta
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Cd	0.5	-
		1	-
		2.5	-
	Pb	0.5	-
		2.5	+
		1.5	+
	Cu	3	+
		6	+
		10	+
<i>Petroselinum crispum</i>	Cd	0.5	-
		1	+
		2.5	+
	Pb	0.5	+
		2.5	+
		1.5	+
	Cu	3	+
		6	+
		10	+

A menudo se requiere una respuesta rápida para abordar los eventos de contaminación química, por lo que es deseable que el tiempo de exposición de las pruebas de toxicidad sea lo más corto posible (Wang y Williams, 1988). [6] En el caso de los cultivos evaluados, se observó que al aumentar la concentración del metal, disminuyó la germinación, sin

embargo, se presentó germinación de manera indistinta en todos los metales evaluados. En la Figura 1, se presenta la apariencia de los cultivos estudiados.

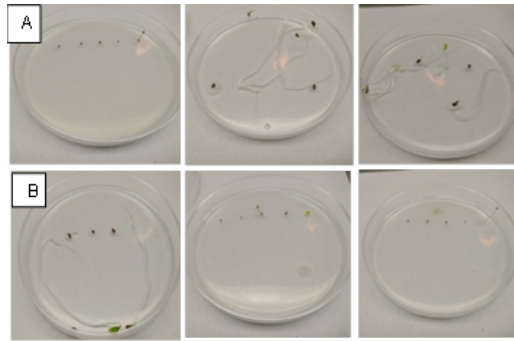
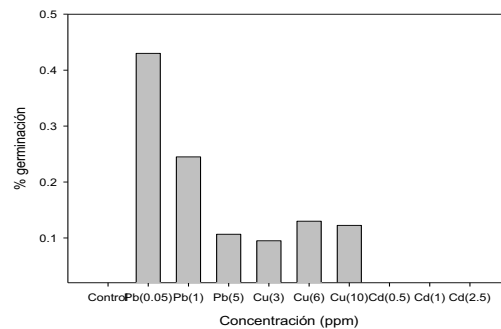


Figura 1. A) Respuesta de *Chenopodium ambrosioides*. B) respuesta de *Petroselinum crispum*.

Es importante señalar que los efectos tardíos de la germinación pueden ser atribuidos a la sensibilidad de la semilla y por esa razón fue más difícil de crecer durante el tiempo de evaluación. Esto se comprobó dado que las semillas control también presentaron problemas de germinación, deduciendo así que los metales no estaban interfiriendo en el proceso de germinación. Una vez observada la germinación a partir del décimo día, se encontró que para las semillas de epazote, el orden de germinación fue de Pb 0.05 ppm>Pb 1 ppm>Cu 3 ppm>Pb 5 ppm>Cu 3 ppm>Cu 10 ppm. Mientras que para el cultivo de perejil el orden en la secuencia de germinación fue el siguiente control>Cd 0.4 ppm>Pb 1 ppm>Pb 5 ppm>Cu 6 ppm>Cd 1 ppm>Cu 3 ppm>Cu 10 ppm>Cd 2.5 ppm (Figura 2).

Chenopodium ambrosioides



Petroselinum crispum

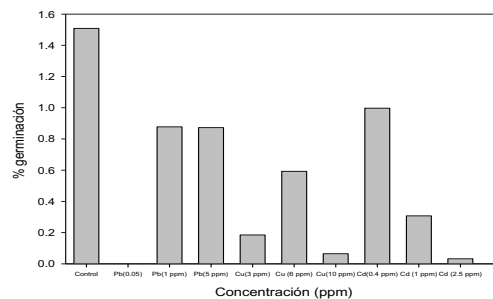


Figura 2. Porcentaje de germinación de *Chenopodium ambrosioides* y *Petroselinum crispum*

Los resultados de la Figura 2, demuestran que para *C. ambrosioides* el porcentaje de germinación fue hasta de un 0.4% en las semillas cultivadas en Pb, y éste porcentaje disminuyó conforme aumentaba la concentración del metal, mientras que para Cu, el máximo de germinación se presentó en la concentración de 6 ppm. Las semillas de este cultivo fueron muy sensibles al Cd por lo que no germinaron en ninguna de las concentraciones. Por otra parte, las semillas de *P. crispum*, fueron más tolerantes a los tres metales evaluados, y se presentó un porcentaje de germinación hasta de 1.1% en la concentración de 1 y 5 ppm de Pb. Además, se presentó una respuesta de germinación tanto en Cd como en Cu. La respuesta de germinación observada, puede atribuirse al tipo de cultivo empleado, y diversos factores el tamaño de la semilla y grosor de su cáscara aunque también posiblemente a la falta de humedad y nutrientes que favorecieran el crecimiento celular. Estos resultados demuestran que los cultivos comestibles son resistentes a crecer a las concentraciones de metales pesados que contienen las aguas residuales, por lo que es importante garantizar que las aguas descargadas y empleadas para el riego de cultivos cumplan con los parámetros establecidos por la Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Veliz et al., (2009) señalan que para evitar problemas de salud pública por patógenos en las aguas residuales, éstas deben utilizarse principalmente en el riego de cultivos no destinados al consumo humano directo, como forrajes y cultivos industriales.

IV. CONCLUSIONES

En Se encontró que los cultivos comestibles evaluados, tienen la capacidad de crecer en un intervalo de concentraciones de metales pesados contenidos en las aguas residuales utilizadas para riego agrícola. Las semillas de *Chenopodium ambrosioides* mostraron el siguiente orden de germinación en las concentraciones de metales contenidos en el agua de residual en estudio: Pb 0.05 ppm>Pb 1 ppm>Cu 3 ppm>Pb 5 ppm>Cu 3 ppm>Cu 10 ppm y las semillas de *Petroselinum crispum* Control>Cd 0.4 ppm>Pb 1ppm>Pb 5ppm>Cu 6 ppm>Cd 1 ppm>Cu 3 ppm>Cu 10 ppm>Cd 2.5 ppm. Se observó un mayor porcentaje de germinación de las semillas de ambos cultivos en las concentraciones de los metales más bajas. Para los cultivos en estudio, es probable incrementar el porcentaje de germinación si las semillas reciben un tratamiento de escarificación previo, de esta forma, se podrán tener resultados más significativos en todas las concentraciones de metales evaluadas.

V. RECONOCIMIENTOS

Al laboratorio de investigación en Ciencias Ambientales de la UAMZH y a la UASLP. Agradeciendo de ante mano a la Dra. Candy Carranza Álvarez por el apoyo brindado dentro de la estancia de verano de investigación en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí para la realización de dicho proyecto, así como las atenciones brindadas y los cursos impartidos.

REFERENCIAS

- [1] Alfaro de la Torre, M.C., Beatriz Adriana Rivera Escoto, Ismael Acosta Rodríguez, Ismael Crispín Espino, Nadia Azenet Pelallo Martínez, Candy Carranza Álvarez, Jazmín González Zurita (2006). Biomonitores del agua contaminada por metales pesados. UNIVERSITARIOS Potosinos, Número 10:4-9.
- [2] Alfaro de la Torre, M.C., Liliana González Quilantán, Dagoberto Pedraza Melgarejo (2002). Impacto de los residuos urbanos y agrícolas sobre la calidad del agua en el Río Valles, S.L.P. Reportes del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. Vol. 1, No. 1, p. 2-7
- [3] Conagua, Semarnat. Estadísticas del Agua en México. Edición 2013. México. 2014.
- [4] Jiménez C., B.; J.C. Durán, J. M. Méndez C. Calidad. En: Jiménez C., M.L. Torregrosa y L. Aboites (Eds.). El Agua en México: cauces y encauces. AMC-Conagua. México. 2010.
- [5] Keith Wilson and John Walker Principles & Techniques of Practical Biochemistry. 5th edition. Cambridge University Press 2000.
- [6] Salvatore, M.Di., Carafa, A.M., Carratù, G., 2008. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: Chemosphere 73, 1461–1464.
- [7] Wong Argüelles, W. Tesis en proceso de la Maestría en Ciencias Ambientales: Comportamiento Geoquímico de Plomo en Sedimentos Acuáticos Contaminados Con Residuos Mineros. Fac. De Ciencias Químicas, UASLP. Colaboradores: Jessica Viridiana García Meza, Jesús Mejía Saavedra, Edna Naranjo (UNAM).

Desarrollo de un inmunoensayo para detectar el contaminante emergente Amoxicilina en aguas residuales

Jesús Emmanuel Alvarado Negrete
Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Silao-Irapuato km 12.5
El Copal, 36821 Irapuato, Gto
Jean37709@gmail.com

Asesor: Norma Angelica Chávez Vela
Universidad Autónoma de Aguascalientes
Centro de Ciencias Básicas, Av. Universidad # 940,
Cd. Universitaria, C.P. 20131, Aguascalientes.
nachavez@correo.uaa.mx

Resumen — La preocupación por la contaminación es un tema de interés desde hace tiempo. Un ejemplo de contaminantes de gran interés, son los antibióticos, ya que de estos existe una escasa o nula eliminación en plantas de tratamiento de agua residual, ante lo cual existe el riesgo de generar cepas bacterianas resistentes ante estos fármacos. La detección de estos contaminantes ha sido posible recientemente gracias al desarrollo de nuevas y más sensibles tecnologías analíticas. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue desarrollar un inmunoensayo, el dot blot, esto con el fin de detectar este antibiótico en aguas residuales para así tener un sistema de control que permita verificar si hay remoción de ese fármaco en las plantas de tratamiento.

Palabras clave — contaminación, amoxicilina, inmunoensayos, dot blot.

Abstract —The concern about pollution has been a topic of interest for a long time. An example of pollutants of great interest are antibiotics, since there is little or no elimination in wastewater treatment plants, where there is a risk of generating bacterial strains resistant to these drugs. The detection of these pollutants has been possible recently thanks to the development of new and more sensitive analytical technologies. Therefore, the objective of this work was to develop an immunoassay, Dot Blot, this in order to detect this antibiotic in wastewater in order to have a control system that allows to verify if there is removal of that drug in the treatment plants .

Keywords —contamination, amoxicillin, immunoassays, dot blot.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la contaminación es un problema que nos concierne a todos, esta se puede ocasionar por el cumulo de agentes químicos o físicos que generan una alteración en la flora y fauna de una zona determinada [1]. Existen contaminantes que por su uso cotidiano fueron ignorados y que con el pasar de años se fueron acumulando y se les conoce como contaminantes emergentes, pues son un nuevo grupo de agentes que generan cambios por su alta concentración en el medio ambiente en este nuevo grupo entran (los jabones, desodorante, fármacos, drogas).

De todos los contaminantes emergentes, los que probablemente suscitan mayor preocupación y estudio en los últimos años son los fármacos y, en particular, los antibióticos. El consumo de fármacos en los países de la UE se cifra en toneladas por año, entre los que destacan los antibióticos, se emplean en cantidades similares a las de los pesticidas [2]

La amoxicilina este es uno de los fármacos que más se utiliza tanto en medicina humana como en veterinaria debido a que es barato y a su amplio espectro de acción y pertenece a

un grupo que se excreta sin cambio en heces y orina. Estas sustancias al igual que otros antibióticos, al ser de uso cotidiano mantienen una mínima o nula regulación lo que genera una afectación directa al medio ambiente, siendo los mantos acuíferos los principales medios de desecho y más afectados por estos nuevos contaminantes. En el presente trabajo desarrollé un método sencillo, fácil, sensible y económico para detectar AMXC en agua residual, previo y posterior a su tratamiento. Para ello, y pensando en las diferentes condiciones a las que podría verse sometido el antígeno, ocasionando cambios en sus epítomos, se emplearon anticuerpos policlonales anti-AMXC previamente obtenidos en el laboratorio.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras: Se trabajó con anticuerpo policlonales anti-AMXC (obtenidos de la inmunización con amoxicilina acoplada a la proteína hemocianina de lapa californiana -KLH-) de conejos de la cepa *Nueva Zelanda*.

A. *Determinación de Pureza de los anticuerpos policlonales contra la amoxicilina*

Con los anticuerpos purificados, se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) según la metodología descrita por Laemmli (1970) y posterior tinción de los geles con plata. Las condiciones de corrida fueron: gel de poliacrilamida 10% (p/v), la electroforesis fue continua se a 80 volts por 1.5 h.

NOTA: las muestras cargadas para analizar por electroforesis fueron de 10-20 µg de proteína. Se esperaba obtener fracciones proteicas de 25 y 50 kDa, que es el PM de los anticuerpos IgG.

Para verificar que las fracciones proteicas obtenidas por electroforesis fueran IgG se realizó inmunoblot, para esto se llevó a cabo una separación electroforética de proteínas. Las proteínas se transfirieron electroforéticamente del gel a membranas de Polivinil difluoruro (PVDF) toda la noche a 12 mAmp. La detección de IgG se realizó utilizando como segundo anticuerpo un anti-IgG de conejo Anti-Rabbit IgG (whole molecule)-alkaline phosphatase Sigma Aldrich con dilución 1:1000. Para el revelado se usó fosfatasa alcalina ((Sigma-Aldrich), utilizando como sustrato para la misma el 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato/nitro azul tetrazolio (BCIP/NBT) que da coloración azul o violeta (Sigma- Aldrich, Steinheim, Alemania).

B. *Reactividad de anticuerpos policlonales anti-amoxicilina*

a) *Dot blot*

Para demostrar la reactividad de los anticuerpos frente a la AMXC se realizó prueba dot blot de la amoxicilina. Para desarrollar la técnica se emplearon membranas de nitrocelulosa a las que se les pusieron 8 µl de amoxicilina (10 µg/µl) en el centro de la membrana. Como primer anticuerpo se utilizaron los anticuerpos policlonales anti-amoxicilina de conejo obtenidos (dilución 1:1000). Como segundo anticuerpo se usó anti-IgG de conejo (dilución 1:5000) unido a fosfatasa alcalina. Se usó agua destilada como control negativo.

b) Especificidad

Para verificar la especificidad, se realizó la prueba dot Blot con los anticuerpos anti-AMXC, siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Se probaron antibióticos de la familia betalactámicos (penicilina, ampicilina) a la cual pertenece la amoxicilina y antibióticos de diversas familias (paramomicina, neomicina, estreptomycin). Para esta prueba se utilizó agua destilada como muestra para el control negativo. Todas las muestras fueron preparadas al instante.

c) Límite de detección de los anticuerpos policlonales IgG anti-AMXC.

Para esta prueba se emplearon las mismas condiciones descritas anteriormente en el protocolo de dot blot pero usando diferentes concentraciones del antibiótico empleado (desde 5 hasta 400 µg) con la finalidad de establecer el límite de detección de la amoxicilina.

d) Reactividad de anticuerpos anti-AMXC en agua residual

Con la finalidad de ver si las condiciones (contaminantes, temperatura, pH) del agua residual no afecta la reactividad de los anticuerpos, se hizo dot blot de las siguientes muestras: se utilizaron muestras de agua de origen diverso: del influente y efluente de diversas plantas tratadora de aguas residuales (PTAR) del estado de Aguascalientes. Como segundo objetivo al tomar y usar agua de los influentes y efluentes de las plantas tratadoras de aguas residuales (PTAR) observar en que puntos se concentran más o menos y si algunas logran remover el contaminante en cuestión (amoxicilina o antibióticos betalactámicos).

III. RESULTADOS

En relación a la **pureza** de los anticuerpos anti-AMXC, en la electroforesis de la muestra correspondiente al antisuero sin purificar, se observó la presencia de bandas proteicas en elevada concentración. Fracciones proteicas que se encontraban en gran concentración (ver figura 1), disminuyeron su concentración (intensidad de las bandas) tras la precipitación con sulfato de amonio (inciso b). Así mismo, después del tratamiento posterior de la muestra con ácido caprílico (inciso c) se observó la presencia de únicamente 2 bandas proteicas de interés, con pesos moleculares aproximados de 50 y 25 kDa. Estas bandas proteicas corresponderían a las cadenas ligeras de los anticuerpos cuyo peso molecular es entre 20 a 25 kDa y a las cadenas pesada de las IgG, cuyo PM es de 50-55 kDa. Estas dos bandas proteicas fueron únicas en la muestra sometida a tratamiento con sulfato de amonio y con ácido caprílico y obtenidas por inmunoafinidad. El hecho de que no se observaran más bandas fue un buen indicio dado que eso confirmó el que los anticuerpos policlonales a emplear durante la investigación fueron sometidos a un buen protocolo de purificación. Por inmunoblot se comprobó que las fracciones obtenidas si son anticuerpos, ya que estos tuvieron reacción con los anticuerpos anti-IgG de conejo.

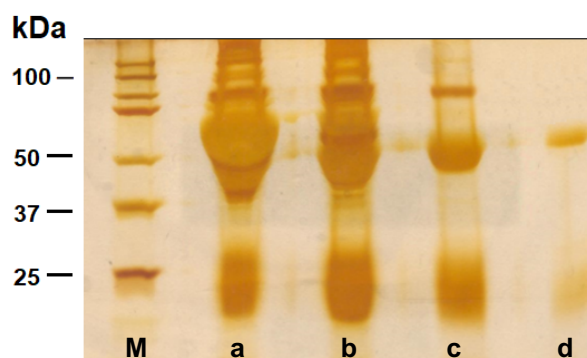


Fig. 1. Análisis electroforético para ver pureza de anticuerpos policlonales anti-amoxicilina en diferentes etapas de purificación: (a) muestra antisuero sin purificar; (b) muestra tratada con sulfato de amonio; (c) muestra b tratada además con ácido caprílico; (d) muestra c purificada por inmovinoafinidad; M: marcador de peso molecular.

Respecto a la **reactividad** frente a la amoxicilina de los anticuerpos policlonales obtenidos quedó demostrado mediante dot blot (ver figura 2). Como se esperaba, muestras de suero de conejo sin inmunizar con amoxicilina, no reaccionaron ante este fármaco (inciso b), mientras que las muestras del antisuero sin purificar (inciso c) y los anticuerpos ya purificados si presentaron reacción.



Fig. 2. Dot blot para probar reactividad de anticuerpos policlonales anti-amoxicilina. Se desarrolló dot blot de 80 µg de amoxicilina con muestras de los antisueros anti-AMXC. (a) control negativo (agua); (b) suero preinmune; (c) anticuerpos sin purificar; (d) anticuerpos purificados (tratados con (NH₄)₂SO₄ y ácido caprílico).

Para determinar la **especificidad** de los anticuerpos anti-AMXC, se hicieron dos pruebas. En la primera, se enfrentaron a los anticuerpos producidos contra diferentes antibióticos de la familia de los betalactámicos, misma a la cual pertenece la AMXC (ver figura 3).



Fig. 3. Dot blot para probar especificidad de los anticuerpos policlonales anti-amoxicilina frente a antibióticos o fármacos diversos. Se desarrolló dot blot de 600 µg de fármaco con muestras de los antisueros anti-amoxicilina (a) paramomicina; (b) neomicina; (c) estreptomicina; (d) ampicilina; (e) penicilina G; (f) amoxicilina (control positivo); (g) agua destilada (control negativo).

























Los resultados obtenidos de la prueba dot blot al utilizar antibióticos de la familia de betalactámicos y fármacos no betalactámicos se muestran en la figura 3. Se observa que no hubo especificidad en el caso de los antibióticos betalactámicos, pues los anticuerpos anti-AMXC reaccionaron con otros antibióticos de la misma familia (ampicilina); cabe señalar que este tipo de compuestos presentan una similitud entre sus estructuras moleculares con la

amoxicilina. Sin embargo, en el caso de los fármacos que no son de esta familia (paramomicina, neomicina, estreptomycin) no hubo reacción de los anticuerpos anti-AMXC con estos.

Al probar diferentes concentraciones de amoxicilina, con el fin de determinar el **límite de detección** de este antibiótico mediante el dot blot desarrollado, se obtuvo que la mínima concentración detectada de este antibiótico fue de 5 µg.

En la **reactividad de los anticuerpos anti-AMXC en muestras de aguas residuales**, se observó que las condiciones es estas (contaminantes, temperatura, pH) no afecta la reactividad de los anticuerpos. Se observó reactividad de los anticuerpos en la mayoría de las muestras de agua de las PTAR, tanto en influentes como en efluentes, siendo menor la concentración (lo que se aprecia por la intensidad del dot blot) en los efluentes (Tabla 1).

Tabla 1. Detección de antibióticos betalactámicos en aguas de plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) de origen municipal del Estado de Aguascalientes y de presas.

PTAR	Influente	Efluente
Jesus maría		
Cedazo		
Pocitos		
Calvillo		
Cd. Aguascalientes		
Pabellón de Arteaga		
San Francisco de los Romos		
Rincón de los Romos		
Cosío Planta Norte		
Ferronales		
Lomita de paso blanco		
Parque industrial valle de Aguascalientes		

IV. DISCUSION

En este trabajo se pudo verificar la pureza de anticuerpos policlonales anti-AMXC, mismos que fueron utilizados para detectar con éxito la presencia de amoxicilina mediante dot blot, inmunoensayo.. Este método es mucho más sencillo de realizar y menos costoso que otros como el HPLC, además de que no requiere purificación previa del antibiótico a detectar.

Al realizar la prueba dot blot, los anticuerpos no reaccionaron al emplear fármacos que no forman parte de los betalactámicos, obteniendo una reacción negativa. Sin embargo, los anticuerpos si reaccionaron con los antibióticos de la misma familia que la amoxicilina, esto se justifica por el hecho de que, al pertenecer a la misma familia, poseen estructuras muy similares y por lo tanto comparten epítomos que fueron capaces de ser detectados por los anticuerpos policlonales anti-AMXC. Lo anterior no resultó ser una desventaja puesto que los anticuerpos no podrían detectar únicamente amoxicilina sino también otros antibióticos (betalactámicos) como ampicilina y penicilina, convirtiéndolos en una excelente herramienta para la detección de esos, no menos importantes contaminantes emergentes. Debido a esto, no puede afirmarse que la intensidad de las reacciones positivas mostradas en cada membrana de nitrocelulosa al probar la reactividad de los anticuerpos anti-AMXC en agua residual corresponda únicamente a la amoxicilina, sino a mezclas de antibióticos betalactámicos.

Se observó que la cantidad de betalactámicos detectado fue menor en efluentes que en los influentes, sin embargo es importante mencionar que no se puede afirmar que esto sea porque hubo una degradación o remoción del fármaco por el tratamiento de aguas, puesto que la toma de muestras de influente y efluente de cada PTAR se tomaron el mismo día, es decir fueron muestras puntuales, y en la PTAR para poder remover los contaminantes del agua hay un tiempo de residencia de varios días, que depende de cada PTAR, de manera que el efluente analizado no corresponde al mismo influente monitoreado. Sin embargo, el análisis permite comprobar que hay presencia de antibióticos betalactámicos en efluentes de PTAR lo que sugiere que probablemente no hay una degradación o remoción total de estos por sistemas biológicos y quizá sea conveniente algún otro tipo de tratamiento como es el caso de los tratamientos de oxidación avanzada, ya que de lo contrario, la presencia de antibióticos puede provocar que los microorganismos adquieran resistencia a estos, afectando con ello al sector salud en el tratamiento de enfermedades. [3]

V. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró usar anticuerpos anti-amoxicilina para la detección de amoxicilina y otros antibióticos betalactámicos, comprobando su reactividad con el uso del método de dot blot. En base a lo anterior, este sistema de dot blot desarrollado, podría ser empleado como método de detección de antibióticos betalactámicos presentes en muestras de agua residual, previo y posterior a su tratamiento, con el fin de alcanzar su futura regulación.

Debido al impacto de los contaminantes emergentes sobre el medio ambiente es necesario continuar con investigaciones enfocadas en la detección y regulación para la búsqueda de tratamientos que permitan su remoción total de aguas residuales.

VI. AGRADECIMIENTOS

De la manera más atenta le agradezco a la Dra. Norma Angélica Chávez Vela y Elizabeth Verónica Moreno Córdova por la paciencia demostrada y todo el conocimiento dado durante este verano, de la misma manera muchas gracias a mis padres, hermanos y novia pues sin

su apoyo a lo largo de estos años no sería posible el estar viviendo esta hermosa experiencia con cada esfuerzo hecho se ve reflejado en cada meta lograda.

REFERENCIAS

- [1] OMS, «Contaminantes emergentes,» OMS, 2001.
- [2] L. D. Barceló, contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes, Barcelona: Fundación Nueva Cultura del Agua, 2009.
- [3] A. M. y. Col, «resistencia microbiana,» N.A, Bogota, 2017.
- [4] C. S. Arandas, «Contaminacion progresiva,» de *nuevos contaminantes* , soyapango, 1998.
- [5] A. C. Rojas, «Conogasi,» 27 julio 2019. [En línea]. Available: <http://conogasi.org/articulos/metodo-gel-de-poliacrilamida-para-proteinas/>.
- [6] B. LOMONTE, «Electroforesis en Gel de Poliacrilamida,» de *INMUNOLOGIA GENERAL* , NA, NA, 1990, pp. 91-101.

Determinación de compuestos fenólicos en cultivos *in vitro* de *Pereskia sacharosa*

Aime Alejandra Romo Bautista

Instituto Tecnológico de Aguascalientes
Av. Adolfo López Mateos # 1801 ote. Fracc.
Bona Gens, C. P. 20256, Aguascalientes, Ags.
MEXICO.

aimeromo1997@gmail.com

Asesora: Yenny Adriana Gómez Aguirre

Catedrática CONACyT-Universidad Autónoma
de Aguascalientes

Av. Universidad # 940, Ciudad Universitaria, C.
P. 20131, Aguascalientes, Ags. MÉXICO.

yagomez@correo.uaa.mx

Resumen — En el presente trabajo se realizó la cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides totales, así como la separación e identificación de grupos de compuestos por cromatografía en capa fina, a partir de hojas de la especie *Pereskia sacharosa* obtenidas de cultivos en condiciones *in vitro* y cultivos en maceta a la intemperie.

Palabras clave — Compuestos fenólicos, *Pereskia sacharosa*, flavonoides.

Abstract — In the present work the quantification of phenolic compounds and total flavonoids was performed, as well as the separation and identification of groups of compounds by thin layer chromatography, from leaves of the *Pereskia sacharosa* species obtained from cultures *in vitro* conditions and cultures in outdoor pot.

Keywords — Phenolic compounds, *Pereskia sacharosa*, flavonoid

I. INTRODUCCIÓN

Como parte de la respuesta de la defensa química contra el daño que ocasionan las heridas y el ataque de microorganismos patógenos en las plantas superiores, se induce la síntesis y acumulación de compuestos de bajo peso molecular, conocidos como metabolitos secundarios. Algunos compuestos pertenecientes a los grupos de los alcaloides, los terpenoides y los fenilpropanoides, participan activamente matando directamente al microorganismo patógeno o restringiendo su invasión al resto de la planta [1]. Otros compuestos tienen función protectora actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas [2].

Las plantas son una fuente importante de metabolitos que han sido usados como medicamentos, pesticidas, saborizantes y fragancias. Con el fin de producir estos compuestos sin necesidad de cultivar la planta completa, se ha propuesto la tecnología de cultivo de sus células *in vitro* (callos, suspensiones y órganos) [3]. El cultivo *in vitro* de células y tejidos es una fuente alternativa para la producción de valiosos compuestos activos a partir de plantas.

El género *Pereskia* es ampliamente utilizado en América del Sur, como alimento y en la medicina tradicional. Se han realizado estudios sobre algunos extractos de especies del género mostrando actividad antioxidante debido a la presencia de compuestos bioactivos dentro de los que destacan los compuestos fenólicos como el β -sitosterol, quercetina y catequina [4].

II. MARCO TEÓRICO

A. *Cultivos in vitro*

La expresión cultivo *in vitro* de plantas, significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de gérmenes, etc), y el control de los factores que afectan el crecimiento. El avance alcanzado por las ciencias biológicas ha permitido en los últimos años el estudio detallado de las plantas tanto a nivel celular como molecular, y en condiciones de laboratorio es posible actualmente reproducir todos los factores que puedan incidir en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Este principio general se aplica también al cultivo *in vitro* de plantas [5].

B. *Compuestos fenólicos*

Son compuestos que tienen uno o más grupos hidroxilo unidos directamente a un anillo aromático. El fenol (Fig.1) es la estructura en la que se basa todo el grupo. El anillo aromático en este caso es el benceno [6].

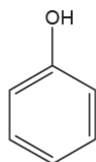


Fig.1 Fenol

Los compuestos fenólicos tienen su origen en el mundo vegetal, son unos de los principales metabolitos secundarios de las plantas y su presencia en el reino animal se debe a la ingestión de éstas. Los fenoles son sintetizados de novo por las plantas y son regulados genéticamente, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo, además actúan como fitoalexinas (las plantas heridas secretan fenoles para defenderse de posibles ataques fúngicos o bacterianos) y contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta [7].

Los polifenoles son compuestos que tienen más de un grupo hidroxilo fenólico unido a uno o más anillos de benceno, cuyo consumo puede desempeñar un papel en la prevención de varias enfermedades crónicas como las enfermedades cardiovasculares, la diabetes tipo II y el cáncer. Un ejemplo de estos compuestos son los flavonoides, los cuales pueden beneficiar la salud cardiovascular al ajustar la adhesión de los monocitos (leucocitos mononucleares grandes en la sangre) en el proceso inflamatorio de la aterosclerosis [6].

III. METODOLOGÍA

Para la determinación de compuestos fenólicos totales presentes en muestras, se realizó por el método de Folin-Ciocalteu descrito por Makkar (2003) con modificaciones en el protocolo [8].

A. *Protocolo*

1. Se rotularon 11 tubos de ensayo, con la numeración de 0 -10, en los que se obtuvieron concentraciones de 0, 2, 4, 8, 12, 16, 18, 20, 24, 28, 30 $\mu\text{g/ml}$ de ácido gálico.
2. Se realizó el análisis por triplicado.
3. Se pipetearon las siguientes cantidades en μL del stock de ácido gálico: 0, 4, 8, 16, 24, 3, 36, 40, 48, 56, 60 y colocarlos en los 11 tubos respectivamente, iniciando desde el tubo rotulado como 0 (blanco). Estas concentraciones se calcularon a partir del stock de 0.5 mg/mL.
4. Se completó a 1000 microlitros los tubos con agua desionizada, a partir de las cantidades colocadas de ácido gálico.
5. Se adicionó a cada uno de los 11 tubos 2.5 mL de agua desionizada
6. Se adicionó a cada uno de los 11 tubos 0.1 mL de reactivo Folin-Ciocalteu 1 N.
7. Se dejaron los tubos durante 6 minutos en obscuridad total.
8. Se adicionaron 0.25 mL de carbonato de sodio al 10% a cada uno de los 11 tubos.
9. Se agitaron cada uno de los tubos en vortex.
10. Se leyó la absorbancia de cada una de las muestras en el espectrofotómetro a 760 nm.

Para la determinación de flavonoides presentes en muestras, se realizó por el método de cloruro de aluminio descrito por Zhishen (1999) con modificaciones en el protocolo [8].

B. *Modificaciones al Protocolo*

1. Se rotularon 12 tubos de ensayo, con la numeración de 0 -10, en los que se obtuvieron concentraciones de 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 $\mu\text{g/ml}$ de quercetina.
2. Se realizó el análisis por triplicado.
3. Se pipetearon las siguientes cantidades en μL del stock de quercetina: 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 y colocarlos en los 12 tubos respectivamente, iniciando desde el tubo rotulado como 0 (blanco). Estas concentraciones se calcularon a partir del stock de quercetina.
4. Se completaron a 1000 μL los tubos con agua desionizada, a partir de las cantidades colocadas de quercetina.
5. Se adicionó a cada uno de los 12 tubos 1.25 mL de agua desionizada
6. Se adicionó a cada uno de los 12 tubos 0.075 mL de nitrato de sodio 5%.
7. Se esperó un tiempo de 5 minutos.
8. Se adicionaron 0.15 mL de cloruro de aluminio 10% a cada uno de los 12 tubos.
9. Se adicionaron 0.5 mL de hidróxido de sodio 1M a cada uno de los 12 tubos.
10. Se adicionaron 2.5 mL de agua desionizada a cada uno de los 12 tubos.
11. Se agitó cada uno de los tubos en vortex.
12. Se dejaron los tubos durante 30 minutos en obscuridad total.
13. Se leyó la absorbancia de cada una de las muestras en el espectrofotómetro a 510 nm.

IV. RESULTADOS

Se realizó la extracción secuencial con hojas de *P. sacharosa* obtenidas de cultivos en condiciones in vitro y cultivos en maceta a la intemperie, con los siguientes solventes: hexano, cloroformo, etanol, metanol y agua. Se realizaron curvas de calibración para la determinación de compuestos fenólicos totales, en el que se utilizó como estándar ácido gálico, a partir de esta se calculó los μg de ácido gálico/g de biomasa seca presentes en los extractos metanólico y etanólico de las hojas de *P. sacharosa* obtenidas de macetas a la intemperie. Mientras que para la determinación de flavonoides se empleó como estándar quercetina, en la que se determinó los μg de quercetina/g de biomasa seca presentes en los extractos metanólico y etanólico de hojas de la misma especie. Esta determinación se realizó de igual manera para hojas de *P. sacharosa* de cultivos in vitro; de los cuales los extractos se emplearon con concentraciones de 3.6 mg/ml para el metanólico y 2.2 mg/ml de etanólico.

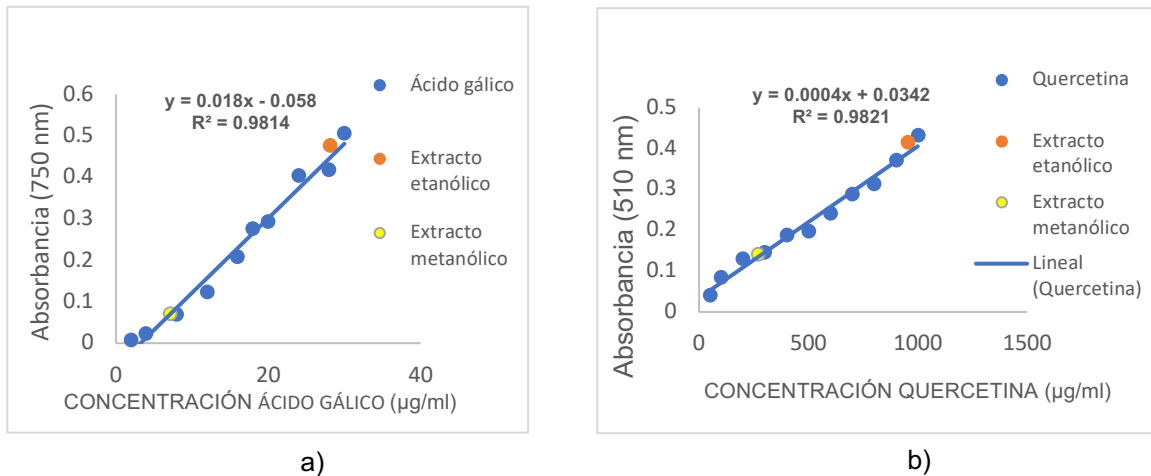


Fig. 2 Curvas de calibración a) Ácido gálico, b) Quercetina. Extracto etanólico y metanólico de hojas de *P. sacharosa* cultivada a la intemperie

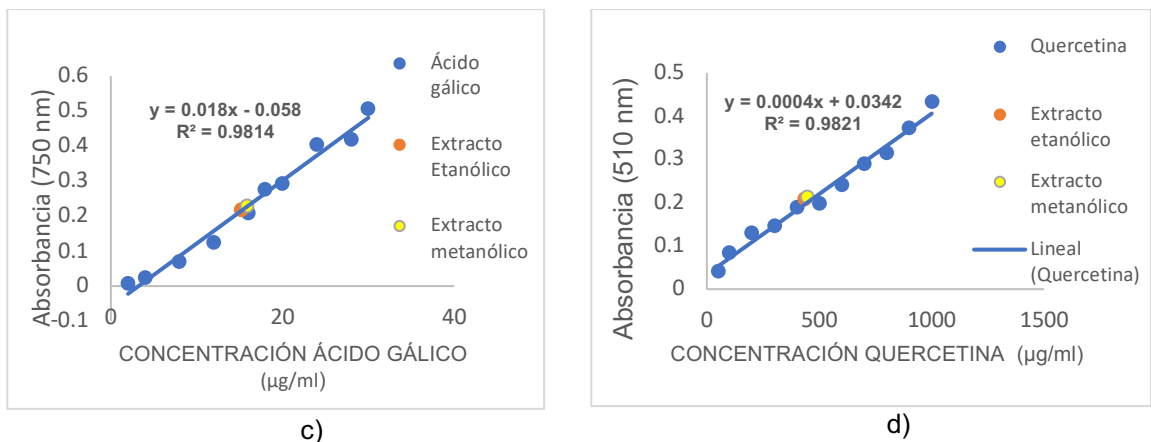


Fig. 3 Curvas de calibración c) Ácido gálico, d) Quercetina. Extracto etanólico y metanólico de hojas de *P. sacharosa* cultivada in vitro

Tabla 1. Compuestos fenólicos presentes en extractos de hojas de *P. sacharosa*.

	Hojas <i>P. sacharosa</i> invernadero		Hojas <i>P. sacharosa in vitro</i>	
	Extracto etanólico	Extracto metanólico	Extracto etanólico	Extracto metanólico
Peso de biomasa seca (g)	1500	1500	1.63	1.63
Peso del extracto (g)	14.7	14.7	0.0022	0.0036
µg ácido gálico/g biomasa seca	36.36±3.56	8.80±0.31	9.36±0.019	9.73±0.49
µg quercetina/g biomasa seca	4672.96±91.44	1316.46±2 8.29	266.56±15. 93	274.23±1 5.93

Se realizó la separación por cromatografía en capa fina del extracto metanólico, con el fin de realizar las pruebas para la identificación de grupos de compuestos; en este caso flavonoides, saponinas, esteroides, triterpenos y alcaloides. Se identificaron los grupos de flavonoides, esteroides y triterpenos. No se detectó la presencia de saponinas y alcaloides.

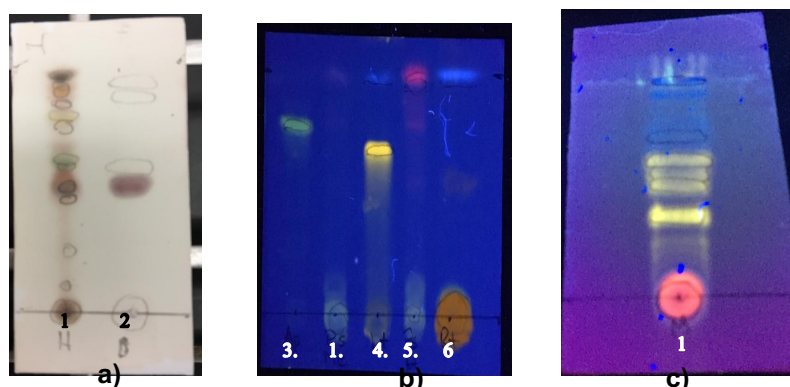


Fig. 4. Separación por cromatografía en capa fina de extractos metanólico y etanólico de *P. sacharosa* a) Esteroides y triterpenos (fase normal; fase móvil hexano: acetato de etilo 7:3; luz visible) hojas de cultivo *in vitro*, b) Flavonoides (fase normal; fase móvil cloroformo: metanol 80:20; UV 365 nm) hojas de maceta a la intemperie, c) Flavonoides (fase reversa; fase móvil agua:acetonitrilo 70:30; UV 365 nm) hojas de maceta a la intemperie. 1. Extracto metanólico de hoja de *P. sacharosa* cultivada *in vitro*. 2. β -sitosterol. 3. Apigenina. 4. Luteína. 5. Extracto etanólico de hoja de *P. sacharosa* en hojas de maceta. 6. Rutina.

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Una vez realizada la determinación de compuestos fenólicos totales y flavonoides se hizo una comparación entre los resultados obtenidos para los extractos metanólico y etanólico de hojas de *P. sacharosa* provenientes de invernadero y hojas de *P. sacharosa* obtenidas de cultivos *in vitro*, los resultados indican que proporcionalmente, para compuestos fenólicos las hojas provenientes de cultivos *in vitro* corresponden un 50% de

µg ácido galico/g biomasa seca respecto a las hojas que se obtuvieron de macetas a la intemperie, mientras que para flavonoides las hojas en cultivo *in vitro* solo corresponde de un 12 – 15 % de µg quercetina/g biomasa seca respecto a las hojas de macetas a la intemperie. Esto puede deberse a las condiciones a las que creció la planta.

Respecto a la separación por cromatografía en capa fina se confirmó que efectivamente en las hojas de *P. sacharosa* existen grupos de compuestos de flavonoides, esteroides y triterpenos, sin embargo no se descarta la posibilidad de que existan más grupos de compuestos fenólicos en esta especie.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este proyecto se logró la cuantificación de compuestos fenólicos totales y flavonoides, a partir de hojas de *P. sacharosa* provenientes de macetas a la intemperie y de cultivos *in vitro*, además de la identificación de grupos de compuestos fenólicos mediante la separación por cromatografía en capa fina, a partir de una extracción secuencial de estas mismas. Lo que nos da la pauta a la realización de nuevas investigaciones, las cuales nos permitan la determinación cualitativa y cuantitativa de más grupos de compuestos fenólicos en esta especie.

VII. RECONOCIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Aguascalientes y a la Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre por las facilidades para la realización del proyecto.

REFERENCIAS

- [1] G. Sepúlveda-jiménez, "Sepúlveda Jiménez , Gabriela; Porta Ducoing, Helena; Rocha Sosa, Mario.," *Rev Mex Fitopatol*, vol. 21, no. 3, pp. 355–363, 2003.
- [2] A. A. García and E. P.-U. Carril, "Metabolismo secundario de plantas," *REDUCA (Biología)*, vol. 2, no. 3, pp. 119–145, 2011.
- [3] M. Arias, A. Aguirre, C. Montoya, and J. Restrepo, "Aspectos Ingenieriles Del Cultivo in Vitro De Células Vegetales Para La Producción De Metabolitos Secundarios Engineering Aspects of the in Vitro Plant Cell Culture for the Production of Secondary Metabolites," *Año*, vol. 76, pp. 109–121, 2009.
- [4] B. Macás Martínez, "Establecimiento de cultivos de callos de *Pereskia* spp., su análisis fitoquímico y evaluación de actividad antioxidante," Julio, 2017.
- [5] "Propagación de plantas por cultivo in vitro."
- [6] R. Bott, *Phenolic Compound Biochemistry*, no. 1. 2014.
- [7] E. V. A. G. Creus, "Compuestos fenólicos," vol. 23, pp. 80–84, 2004.
- [8] T. Parimelazhagan, *Pharmacological Assays of Plant-Based Natural Products*, vol. 71. 2016.

Determinación de la presencia de *Salmonella* en la biota del cuerpo hídrico del área natural protegida “Las Musas” en Manuel Doblado, Guanajuato

Marcela Prieto Guerra

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Carr. Silao-Irapuato km 12.5
El Copal, 36821 Irapuato, Gto.
marcela_p.g@outlook.com

Asesora:

María Azucena Márquez Lucio

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Carr. Silao-Irapuato km 12.5
El Copal, 36821 Irapuato, Gto.
zucet01@gmail.com

Resumen — La determinación de microorganismos patógenos en agua es de gran interés como parámetro microbiológico que garantiza la inocuidad de este. Dentro del presente trabajo se buscó determinar la presencia de *Salmonella spp.* En muestras de agua y peces usando los límites máximos permisibles y metodología establecida por la NOM-210-SSA1-2014. Se obtuvo una presencia de *Salmonella spp.* en diversas muestras mostrando así, un alto grado de contaminación del cuerpo de agua de Las Musas, esto pudiendo ser debido a las escorrentías fecales generadas por el ganado que se abastece de dicho cuerpo de agua, además de que es de vital importancia puesto que en esta Área Natural protegida se realizan otras actividades como el ecoturismo que genera contaminación en la zona.

Palabras clave — escorrentía fecal, límite máximo permisible, *Salmonella spp.*, parámetro microbiológico, calidad del agua.

Abstract — The determination of pathogen microorganisms in water is of great interest as a microbiological parameter that guarantees its safety. Within this work sought to determine the presence of *Salmonella spp.* In water and fish samples using the maximum permissible limits and methodology established by NOM-210-SSA1-2014. A presence of *Salmonella spp.* was obtained in various samples thus showing a high degree of contamination of the Las Musas body of water, this may be due to the fecal runoff generated by the cattle that take water by said river, in addition to it is of vital importance since in this protected Natural Area other activities are carried out such as ecotourism that generates pollution in the area.

Keywords — Fecal runoff, maximum permissible limits, *Salmonella spp.*, microbiological parameter, water quality.

I. INTRODUCCIÓN

Salmonella spp. es una bacteria entérica proveniente de contaminación fecal que genera fiebre tifoidea que puede ser fatal en el ser humano. Se busca la determinación de la bacteria en el Área Natural Protegida puesto como se ha manifestado, existe un alto grado de contaminación de microorganismos entéricos en la zona [1]. Además, de forma reciente se han registrado casos de fiebre tifoidea en la zona, por lo que para garantizar su presencia se utilizará la NOM-210-SSA1-1994 que garantiza su presencia en el medio.

II. MARCO TEÓRICO

A. Las Musas

Las Musas es un Área Natural Protegida ubicada en el municipio de Manuel Doblado, Guanajuato. Cuenta con una superficie de 3 174.764 hectáreas, fue decretada como Área

Natural Protegida por el gobierno del Estado de Guanajuato el 30 de Julio de 2002. Es considerada un área de uso sustentable, cuenta con una flora de 218 especies registradas y 4 especies con estatus de protección y/o endémicas; tiene una fauna de 149 especies registradas y 42 especies con estatus de protección y/o endémicas. Presenta dos tipos de clima, semicálido con una temperatura anual de 18 a 20°C y templado con una temperatura anual de 16 a 18°C [2].

B. *Salmonella spp.*

Salmonella es un género de bacteria bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Su tamaño oscila entre los 0.3-1µm x 1.0-6.0µm; presentan movilidad gracias a flagelos peritricos a excepción de *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum*. El género *Salmonella* está asociado con enfermedades diarreicas, siendo causas importantes de una alta mortalidad en lactantes, niños y ancianos [3].

Al ser de metabolismo anaerobio facultativo reducen los nitratos a nitritos y fermentan glucosa produciendo ácido y gas; raramente fermentan lactosa o sacarosa, son citocromo-oxidasa negativas y normalmente catalasa positivas; son ureasa negativas, lisina descarboxilasa negativas y al realizar prueba de indol son negativas. *Salmonella* se multiplica bien en medios ordinarios. Las colonias crecen al cabo de 16-24 horas y su temperatura óptima de crecimiento es de unos 32-37°C, pero es capaz de desarrollarse dentro de un amplio rango de 6-46°C. A temperaturas inferiores a 10°C el crecimiento sufre un retraso considerable y a temperaturas inferiores a 7°C se podrían evitar el crecimiento de la mayoría de *Salmonella* [4].

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Muestreo

El procedimiento para el muestreo de agua en el área natural protegida “Las Musas” fue realizado en base a lo establecido por la Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA1-1993 “Procedimientos sanitarios para el muestreo de agua para uso y consumo humano en sistemas de abastecimiento de agua públicos y privados” [5].

La toma de muestras se realizó en 7 puntos representativos del cuerpo de agua (E1-E7), en los cuales tomaron 225 ml de agua a contracorriente en un frasco previamente esterilizado, enjuagando 3 veces el recipiente como lo indica la norma y que posteriormente se realizó su transporte a 2-6°C en un lapso menor a 8 horas para la determinación de *Salmonella spp.* De la misma manera en la zona con fauna (peces) se tomaron ejemplares para la determinación en estos organismos.

B. Determinación de la presencia de *Salmonella spp.* en agua

El procedimiento para la determinación de la presencia de *Salmonella spp.* en el cuerpo hídrico del área natural protegida “Las Musas” fue realizado en base a lo que establece la Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2010, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos [6].

Consta de mantener la muestra en un medio de pre-enriquecimiento, para ello se emplea como medio de pre-enriquecimiento caldo Lactosado, del cual se preparan 225 ml y se depositan en un frasco de vidrio, posterior a ello se inoculan 25 ml de muestra (por punto) y se incuban a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 2\text{h}$. Posterior a ello se realiza un enriquecimiento selectivo, el cual consta de transferir 1 ml del cultivo de pre-enriquecimiento a un tubo con 9 ml de Tetratonato (T) y 1 ml a un tubo con 9 ml de Selenito Cistina (SC). Ambos se incuban a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 3\text{h}$.

Después se llevan a cabo los pasos de aislamiento e identificación, para el aislamiento, inocular a partir de los cultivos obtenidos en el punto anterior, se tienen dos medios selectivos en placa los cuales son Agar XLD (xilosa lisina desoxicolato) y Agar *Salmonella-Shigella* (SS) para el aislamiento de colonias típicas. Se realizan estrías en las placas, y ambas se incuban a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h} \pm 3\text{h}$.

C. Determinación de *Salmonella* spp. en peces

Previo a la inoculación del medio de pre-enriquecimiento, los peces fueron molidos para la extracción de vísceras y disueltos en caldo Lactosado, agitándose vigorosamente para su mezcla homogénea. Posterior a esto, se procesó igual al punto "B" anteriormente mencionado.

IV. RESULTADOS

Las 7 muestras representativas del cuerpo de agua mostraron crecimiento de colonias negras extensas redondas en medio XLD, y algunos puntos un cambio de viraje en el medio al ser sembradas usando colonias del medio Selenito Cistina (SC) mostrado en la Figura 1. Por otra parte al ser resembradas usando caldo Tetratonato (T) se le adicionan algunas colonias cremosas puntiformes de color blanco (Figura 2).

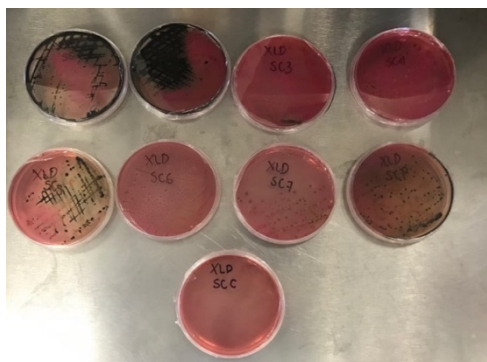


Figura 2 Crecimiento en placas XLD usando caldo T

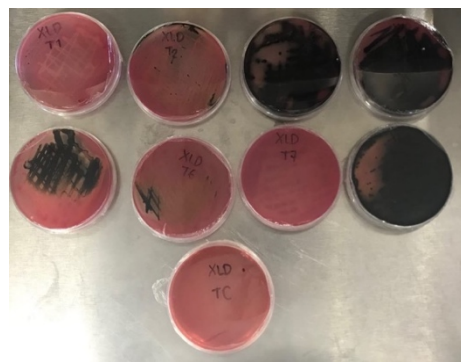


Figura 1 Crecimiento en placas XLD usando medio SC

A su vez, en las placas SS usando medio SC, el medio brindó un cambio de viraje de color rosa a color amarillo y en algunas placas existió un cambio hacia café, las colonias son amarillas, cremosas y algunas de color negro (Figura 3). Por otra parte, usando medio T, las placas mostraron el mismo cambio de viraje de color rosa hacia un color amarillo, con una mayor presencia de colonias cremosas de color negro, puntiformes (Figura 4).

Al mostrar crecimiento las muestras procedentes del cuerpo de agua junto a la muestra de peces, se cotejaron los crecimientos de colonias mostrados junto a los presuntivos de *Salmonella spp.* mostrados en la NOM-210-SSA1-2010, que se desglosaron en la Tabla 1 para cada uno de los medios y los resultados presuntivos:

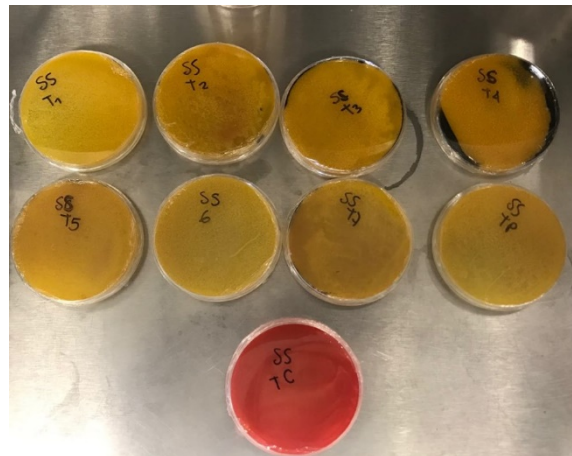
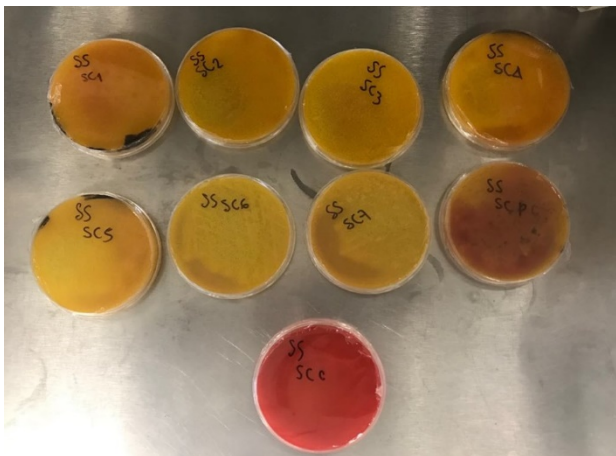


Figura 3 Crecimiento en placas SS usando medio SC **Figura 4** Crecimiento en placas SS usando medio T

Tabla 1. Cotejo de resultados obtenidos Vs resultados presuntivos de *Salmonella spp.*

Muestra	Agar SS (colonias)	Cotejo Agar SS	Agar XLD (colonias)	Cotejo Agar XLD	Resultado
E1	Translúcidas opacas	Colonias y translúcidas opacas, pueden presentar un color negro	Color negro y rosas	Colonias rosas o rojas en algunas ocasiones son de color negro	<i>Salmonella spp.</i>
E2	Translúcidas opacas		Color negro y rosas		<i>Salmonella spp.</i>
E3	Translúcidas opacas		Color negro, abundantes		<i>Salmonella spp.</i>
E4	Translúcidas opacas, centro negro		Color negro, abundantes, cremosas		<i>Salmonella spp.</i>
E5	Translúcidas opacas		Color negro, cremosas		<i>Salmonella spp.</i>
E6	Translúcidas opacas		Color rosa, cremosas		<i>Salmonella spp.</i>
E7	Translúcidas opacas, centro negro		Color rosa, cremosas,		<i>Salmonella spp.</i>
Peces	Translúcidas opacas		Color negro, abundantes		<i>Salmonella spp.</i>
Control	Sin crecimiento		Sin crecimiento		Sin crecimiento

V. DISCUSIONES

Acorde al cotejo de crecimiento de colonias en el estudio realizado respecto a los mostrados en la NOM-2010-SSA1-2010 se presenta un crecimiento generalizado en todo el cuerpo de agua de Las Musas, como se planteó en la hipótesis inicial, teniendo una mayor concentración en los puntos centrales que representan la zona de ecoturismo, siendo mayormente contaminada por el ser humano que podría explicar la contaminación y a su vez, el resto de la contaminación puede atribuirse a escorrentías fecales de diversos animales de ganado, o bien un brote importante de microorganismos patógenos que representaría un riesgo a la población de la zona y comunidades aledañas aunado a un aumento en las enfermedades entéricas en la comunidad.

VI. CONCLUSIONES

Se manifestó una presencia generalizada en el cuerpo de agua incluyendo la muestra de peces de *Salmonella spp.* a causa de contaminación antropogénica y en algunos casos de escorrentías fecales de diversos animales de ganado. A su vez, el estudio presenta una relevancia en el sector salud debido a que representa un foco de infección de enfermedades gastrointestinales en la zona.

El estudio puede ser complementado en análisis posteriores realizando una identificación bioquímica de las especies de *Salmonella spp.* Así, como de diferentes bacterias entéricas patógenas para el ser humano.

VII. RECONOCIMIENTOS

Primeramente, agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo y aceptación brindada para la realización del estudio. Agradecemos al Dr. Francisco Alejo Iturvide del Departamento de Biología del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato por su apoyo para el desarrollo de este trabajo. Finalmente agradecemos al Instituto Tecnológico Superior de Irapuato por la facilitación de las instalaciones y materiales utilizados en el presente estudio, como el apoyo brindado en diferentes tiempos para avance tecnológico y fondos brindados para la realización de la investigación como casa de estudios.

REFERENCIAS

- [1] C. A. Sánchez Galván y M. A. Márquez Lucio, «Determinación de microorganismos patógenos y su efecto en el sistema hídrico en Área Natural Protegida Las Musas,» *Jóvenes en la ciencia*, vol. 3, nº 1, pp. 124-128, 2017.
- [2] Instituto de Ecología del Estado, «Área Natural Protegida Las Musas,» IEEG, Guanajuato.
- [3] M. Parra, «Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por Salmonella,» *MVZ-Córdoba*, pp. 187-189, 2002.
- [4] A. Robledo López y R. Carbó Moliner, «Investigación de Salmonella spp en alimentos mediante el método tradicional ISO 6579 y dos métodos inmunoenzimáticos,» de *Universidad Politécnica de Catalunya*, Barcelona, Escola Superior D'Agricultura de Barcelona (ESAB), 2015, pp. 10-11.
- [5] Diario Oficial de la Federación, «Norma Oficial Mexicana. NOM-014-SSA1-1993 "Procedimientos sanitarios para el muestreo de agua para uso y consumo humano en sistemas de abastecimiento de agua públicos y privados",» Ciudad de México, 1994.

- [6] Diario Oficial de la Federación, «Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2010, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.» Ciudad de México, 2015.

Determinación del efecto antioxidante de los extractos de *Heliopsis longipes*

Marcos Fidel Arévalo González

Universidad Autónoma de Aguascalientes
Centro de Ingeniería Bioquímica
Av. Universidad #940, Ciudad Universitaria,
C.P. 20131, Aguascalientes, AGS.
al223612@edu.uaa.mx

Asesora: Aída Jimena Velarde Salcedo

Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Ciencias Químicas
Av. Dr. Salvador Nava s/n
C.P. 78290, San Luis Potosí, S.L.P.
aida.velarde@uaslp.mx

Resumen — El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto antioxidante de diversos compuestos con actividad ya conocida y de un extracto etanólico de *Heliopsis longipes*. Por medio de los métodos de captación del radical ABTS y DPPH se pudo determinar la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos resveratrol, quercetina y galato de epigalocatequina, como la del extracto de *H. longipes*. Las raíces de la planta *H. longipes* se ha utilizado en medicina tradicional como analgésico y desparasitante por sus componentes bioactivos, los cuales han generado interés sobre sus efectos benéficos, donde se ha reportado que esta planta posee actividad antioxidante. Se encontró que, de los tres compuestos fenólicos analizados y de los extractos etanólicos, la quercetina fue el de mejor potencial antioxidante, ya que obtuvo la mayor actividad antioxidante a una menor concentración. En los extractos de *H. longipes* se encontró una muy baja actividad antioxidante a concentraciones muy altas, lo que nos lleva a descartar que esta planta posee efectos antioxidantes o que los efectos previamente reportados en otros estudios no se basan en un cambio en el estado de oxidación directo sobre los radicales libres, sin embargo, se requiere realizar más estudios a esta planta para determinar si realmente tiene o no propiedades antirradicales.

Palabras clave — actividad antioxidante, *Heliopsis longipes*, resveratrol, quercetina, galato de epigalocatequina, ABTS, DPPH.

Abstract — The aim of this investigation was to evaluate the antioxidant effect of various compounds with known activity and an ethanolic extract of *Heliopsis longipes*. The antioxidant activity of the phenolic compounds resveratrol, quercetin and epigallocatechin gallate, such as that of extract *H. longipes* was determined using of the ABTS and DPPH methods. The roots of the *H. longipes* plant have been used in traditional medicine as an analgesic and dewormer for its bioactive components, which have generated interest on its beneficial effects, where it has been reported that this plant has antioxidant activity. It was found that, of the three phenolic compounds analyzed and ethanolic extracts, quercetin was the one with the best antioxidant potential, since it obtained the highest antioxidant activity at a lower concentration. In the extracts of *H. longipes* was found a very low antioxidant activity at very high concentrations, which leads us to rule out that this plant has antioxidant effects or that the effects previously reported in other studies are not based on a change in the free radicals oxidation, however more studies are required to this plant to determine whether or not it really has anti-radical properties.

Keywords — antioxidant activity, *Heliopsis longipes*, resveratrol, quercetin, epigallocatechin gallate, ABTS, DPPH.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha evidenciado que los radicales libres y especies reactivas asociadas a ellos juegan un papel muy importante en el equilibrio homeostático de nuestro organismo. Los radicales libres son átomos que tienen un electrón desapareado o libre, los cuales son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido

sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena que puede reaccionar con biomoléculas y causar daño celular. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas altamente reactivas derivadas del metabolismo del oxígeno, que se generan como subproductos de reacciones biológicas o por factores exógenos. Algunas ROS juegan un papel positivo en la fisiología celular; sin embargo, también pueden hacer un gran daño a las membranas celulares y el ADN, induciendo la oxidación que causa la peroxidación de los lípidos de membrana, la disminución de su fluidez y otras mutaciones del ADN. Esta serie de daños asociadas con los altos niveles de ROS y sus productos de oxidación se conoce como estrés oxidativo (Pinchuk et al., 2012; Pisoschi y Negulescu, 2011). Recientemente, la evidencia científica ha demostrado que el estrés oxidativo es un factor de riesgo para enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer, las enfermedades coronarias, la obesidad, la diabetes tipo 2, hipertensión y cataratas

El creciente interés de los radicales libres y la falta de terapias eficaces para la mayoría de las enfermedades crónicas han hecho que la utilidad de los antioxidantes en la protección contra estas enfermedades sea cada vez más estudiados (Lucas-Abellán et al., 2011).

Los antioxidantes son moléculas (o un ión, o un radical relativamente estable) capaces de reducir o inhibir la oxidación de otras moléculas que se produce bajo la influencia de radicales libres o especies reactivas de oxígeno. Los antioxidantes se pueden clasificar en dos grupos: los antioxidantes endógenos y los antioxidantes exógenos. Los antioxidantes endógenos son enzimas, como la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa o compuestos no enzimáticos, tales como el ácido úrico, bilirrubina, albúmina, metalotioneínas. Cuando los factores endógenos no pueden asegurar un control riguroso y una protección completa del organismo contra las especies reactivas del oxígeno, la necesidad de antioxidantes exógenos surge, como suplementos nutricionales o productos farmacéuticos, que contienen como principio activo un compuesto antioxidante. Entre los antioxidantes exógenos más importantes, que provienen de la dieta, se encuentra la vitamina E, vitamina C, β caroteno, vitamina E, flavonoides, entre otros. Estos antioxidantes exógenos pueden derivarse de fuentes naturales (vitaminas, flavonoides, antocianinas, algunos compuestos minerales), pero también pueden ser compuestos sintéticos, tales como butilhidroxianisol, butilhidroxitolueno, galatos, etc. (Pisoschi y Negulescu, 2011).

Las recomendaciones basadas en estudios epidemiológicos son tales, que las frutas, verduras y alimentos básicos menos procesados aseguran la mejor protección contra el desarrollo de enfermedades causadas por el estrés oxidativo. La explicación consiste en el efecto beneficioso para la salud, debido a los antioxidantes presentes en frutas y hortalizas. Hay numerosos antioxidantes en plantas, como: carotenoides, compuestos fenólicos, derivados de ácido benzoico, flavonoides, proantocianidinas, estilbenos, cumarinas, lignanos, y ligninas (Halvorsen et al., 2002).

Heliopsis longipes es una especie de hierba perenne endémica de la región conformada por los estados de San Luis Potosí, Guanajuato y Querétaro, que se utiliza como condimento en salsas, guisos y bebidas, ya que su raíz tiene un sabor pungente y produce una insensibilización por lo que se usa como sustituto del chile. Sin embargo también se utiliza en la medicina tradicional, pues se emplea para calmar dolores musculares y de muelas, así

como desparasitante e insecticida (Cilia-López, 2008). Se ha visto en algunos estudios que los extractos de la raíz de esta planta parecen tener propiedades antioxidantes, ya que la afinina extraída, alcaloide de mayor cantidad en las raíces de *H. longipes*, reduce el daño del ADN generado por estrés oxidativo, por lo que se le puede atribuir propiedades antioxidativas a esta planta (Arriaga et al., 2012). No obstante, aún no hay trabajos que describan de manera eficaz el mecanismo de eliminación de radicales libres que sustenten tales propiedades antioxidantes de esta planta. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es evaluar y medir la capacidad antioxidante de un extracto etanólico de la planta *H. longipes* y de diversos compuestos fenólicos (Resveratrol, Quercetina, Galato de epigallocatequina), mediante la implementación y estandarización de los métodos ABTS y DPPH

II. METODOLOGÍA

A. Preparación de muestras

Para los compuestos Resveratrol, Quercetina y Galato de epigallocatequina se prepararon seis estándares a una concentración de 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 μM partiendo de un stock de 10mM en etanol 70%. Para los extractos de *H. Longipes* se prepararon seis estándares de 100, 250, 500, 1000, 1500 y 2000 $\mu\text{g/ml}$ partiendo de un stock de 2 mg/ml en etanol 70%. El blanco para todas las muestras fue etanol 70%.

B. Método ABTS

Se utilizó el radical activado ABTS⁺ para determinar la actividad antioxidante de las diferentes muestras. Para la generación de ABTS⁺ se hizo reaccionar la sal ABTS 3mM en agua desionizada con persulfato de potasio 10mM durante 16 h a temperatura ambiente en abrigo de la luz (oscuridad). Posteriormente la solución madre se diluyó en etanol 70% hasta obtener una absorbancia inicial de $1,1 \pm 0,1$ unidades a 750nm, utilizando el iMark™ Microplate Absorbance Reader Biorad®. La cinética de reacción se determinó a 750nm durante un periodo de 1 hora mediante el control de forma continua a 25°C, colocando 200 μL de solución ABTS⁺ más 5 μL de muestra en cada pozo de la microplaca. La actividad antioxidante se expresó como equivalentes de Trolox mediante el uso de una curva de calibración Trolox preparado en un intervalo de concentración de 0-3mM. Cada muestra se analizó por triplicado.

C. Método DPPH

Las muestras fueron analizadas midiendo las pérdidas de absorción del radical DPPH cuando se reduce en presencia de un antioxidante. Se preparó una solución madre 200 μM disolviendo 7.88 mg en 100 ml de metanol, almacenándolo en refrigeración y en oscuridad hasta que su uso. La solución de trabajo se obtuvo mediante la dilución de la solución madre con metanol hasta obtener una absorbancia inicial de $1,1 \pm 0,1$ unidades a 490nm utilizando el iMark™ Microplate Absorbance Reader Biorad®. La cinética de reacción se determinó a 490nm durante un periodo de 1 hora mediante el control de forma continua a 25°C, colocando 200 μL de solución ABTS⁺ más 5 μL de muestra en cada pozo de la microplaca. La actividad antioxidante se expresó como equivalentes de Trolox mediante el uso de una curva de calibración Trolox preparado en un intervalo de concentración de 0-2 mM. Cada muestra se analizó por triplicado.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Curva estándar de Trolox

Con el fin de comparar los resultados obtenidos de la actividad antioxidante de cada muestra se realizó una curva estándar de Trolox. Se calculó la relación lineal entre la actividad antioxidante expresada en absorbancia (uabs) y el tiempo de cada concentración del antioxidante en ABTS y DPPH, como también la relación entre la actividad antioxidante expresado como %Radical Scavenging Activity (%RSA) (Ecuación 1) y la concentración del antioxidante a los 30 minutos de reacción en ambos métodos (Figura 1).

$$\%RSA = \left(1 - \frac{Abs_i}{Abs_0}\right) \times 100 \quad (1)$$

donde:

%RSA = Radical Scavenging Activity

Abs_i = Absorbancia de cada concentración

Abs₀ = Absorbancia del blanco

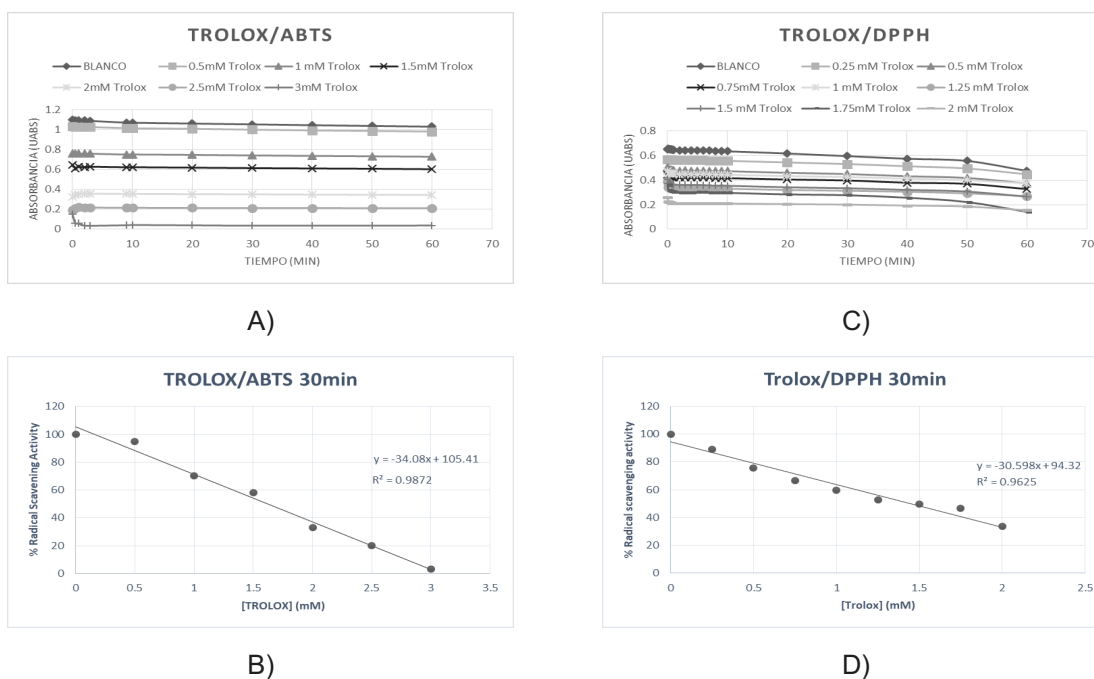


Figura 1. Curva estándar de Trolox. A) Actividad antioxidante del Trolox con respecto al tiempo en ABTS, B) %RSA de ABTS en presencia de diferentes concentraciones de Trolox (30 min), C) Actividad antioxidante con respecto al tiempo en DPPH, D) %RSA de DPPH en presencia de diferentes concentraciones de Trolox (30 min).

En el método ABTS (Figura 1A) podemos observar que entre mayor es la concentración de Trolox menor es la absorbancia, donde se perciben cambios mínimos posteriormente del minuto 1 en la cinética. Mientras que en el método DPPH (Figura 1C) se observa también que entre mayor concentración del antioxidante menor es la absorbancia, donde en los primeros 50 minutos se perciben cambios mínimos en la absorbancia pero después de este tiempo se observa una disminución. Para ambos métodos la actividad antioxidante en el tiempo de 30 minutos se expresó en %RSA en relación con la concentración de antioxidante.

En ambos casos la relación lineal tuvo un coeficiente de correlación muy cercano a uno, sin embargo en ABTS la mayor concentración (3mM) tuvo un %RSA cerca del 0%, lo que indica que a esa concentración tiene la mayor actividad de eliminación del radical (Figura 1B), mientras tanto en DPPH la mayor concentración (2mM) tuvo un %RSA cerca del 30%, lo que nos refleja que a 2mM de Trolox no tiene la mayor actividad de eliminación del radical DPPH (Figura 1D). La curva de calibración Trolox construida fue similar a los de otros trabajos, la cual tiene un coeficiente de correlación de 0.99, mismo de las curvas realizadas en la literatura revisada (Lucas-Abellán et al., 2011; Miser-Salihoglu et al., 2013), lográndose así una buena implementación ambas técnicas en el laboratorio con una buena linealidad y reproducibilidad.

B. Efecto de compuestos con una conocida actividad antioxidante sobre el radical ABTS

Se evaluó la actividad antioxidante sobre el radical ABTS de diferentes compuestos conocidos: resveratrol, quercetina, y galato de epigalocatequina (EGCG). En la figura 2 se puede observar el efecto obtenido a los 30 minutos de la reacción expresado en equivalentes de trolox.

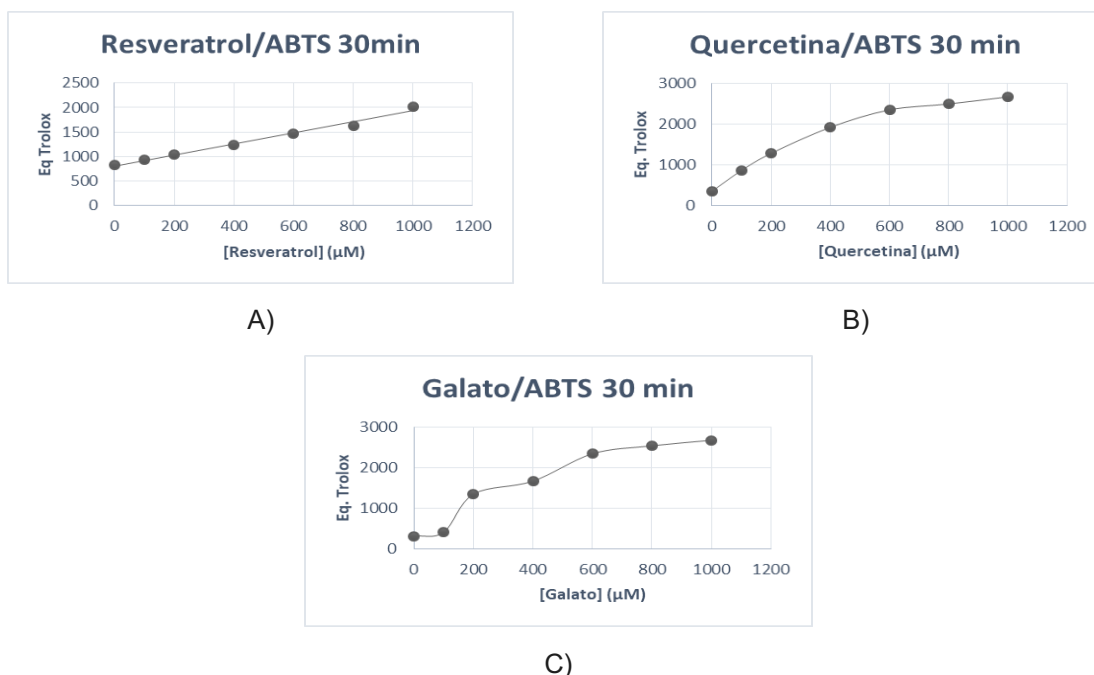


Figura 2. Capacidad antioxidante del resveratrol, quercetina y EGCG sobre el radical ABTS (30 min). A) Resveratrol, B) Quercetina, C) EGCG

En las tres gráficas podemos observar una relación dosis-respuesta, ya que entre mayor es la concentración mayor es la capacidad antioxidante, pues los equivalentes de trolox aumentaban conforme aumentaba la concentración. En cuestión del resveratrol (Figura 2A), se obtuvo una buena linealidad en la relación, donde la mayor actividad antioxidante fue de aproximadamente 2000 equivalentes de trolox en la concentración más alta (1000μM). Esta buena linealidad es muy similar a la obtenida en algunos estudios sobre la actividad antioxidante del resveratrol en el método ABTS (Lucas-Abellán et al., 2011). De igual manera, en la quercetina (Figura 2B) se obtuvo una buena linealidad en la gráfica, ya que el

crecimiento fue proporcional, sin embargo después de la concentración de $600\mu\text{M}$ el aumento de la actividad fue siendo menor, hasta llegar aproximadamente a los 2800 equivalentes de trolox en la concentración más alta de antioxidante. Estas propiedades antioxidantes encontradas han sido ya reconocidas previamente en diferentes estudios, que han convertido a la quercetina en un compuesto con gran potencial antioxidante a concentraciones no elevadas (Salazar et al., 2011). En el EGCG (Figura 2C) se obtuvo una linealidad regular, pues la relación dosis-respuesta comenzó en la concentración de $100\mu\text{M}$, pues ésta tuvo una actividad antioxidante similar a la del blanco ($0\mu\text{M}$), deduciendo un error en la lectura o mal manejo en esta concentración. Después de esto, los equivalentes de trolox fueron aumentando conforme aumentaba la concentración, hasta llegar a los 2800 equivalentes de trolox aproximadamente en la concentración más alta. Siendo la quercetina y EGCG los antioxidantes con mayor equivalentes de trolox en la concentración mas grande, sin embargo, observando la linealidad de la gráfica de ambos compuestos podemos observar que la quercetina tiene la mejor linealidad, convirtiéndose así la quercetina el compuesto con mejor actividad antioxidante de los tres utilizados. Esto último podemos corroborarlo comparando los tres compuestos en la concentración de $400\mu\text{M}$, teniendo 1250 equivalentes en resveratrol, 1800 equivalentes para EGCG y 2000 equivalentes para la quercetina, siendo este último el mejor antioxidante.

C. Efecto de compuestos con una conocida actividad antioxidante sobre el radical DPPH

Se evaluó la actividad antioxidante sobre el radical DPPH de diferentes compuestos conocidos: resveratrol, quercetina, y galato de epigallocatequina (EGCG). En la figura 3 se puede observar el efecto obtenido a los 30 minutos de la reacción expresado en equivalentes de trolox.

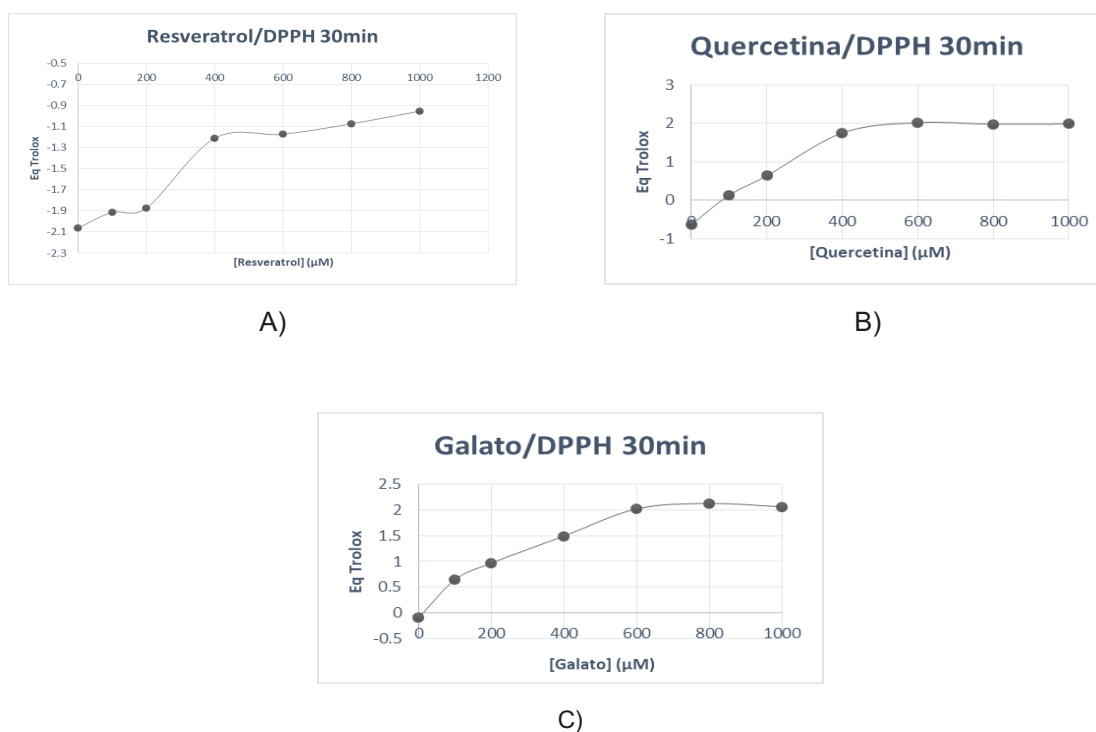


Figura 3. Capacidad antioxidante del resveratrol, quercetina y EGCG sobre el radical DPPH (30 min). A) Resveratrol, B) Quercetina, C) EGCG

En las tres gráficas podemos observar el aumento de equivalentes de trolox conforme la concentración aumenta, sin embargo no se tiene una linealidad como en el método ABTS, ya que en este método se presenta una pequeña meseta donde se encuentra la mayor actividad antioxidante, la cual es estable en las últimas tres concentraciones, viéndose de manera clara en los compuestos quercetina y EGCG, mientras que en el resveratrol no se observa claramente, pues no se presenta esa estabilidad ya que sigue aumentando los equivalentes de trolox hasta la última concentración, sin embargo este aumento es muy ligero. Se sugiere realizar una nueva evaluación de la actividad en un intervalo entre las concentraciones de 200 y 400 μ M, para obtener la linealidad esperada, ya que debajo y por arriba de estas concentraciones la linealidad es muy pobre, pues el aumento de equivalentes de trolox ves muy bajo (Figura 3A). No obstante, mediante ambos métodos podemos describir al resveratrol como un compuesto con propiedades antioxidantes las cuales han sido expuestas en diversos estudios, pero además se le ha descrito una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo antiinflamatorios, propiedades antivirales y antitumorales en ratas (Frèmont, 2000), lo que ha despertado un gran interés en la comunidad científica. Además de sus efectos antioxidantes, se le ha encontrado propiedades anticancerosas, cómo la inhibición de la proliferación celular y la inducción a apoptosis (Jang et al., 1997) y propiedades cardioprotectoras, lo que explica el gran interés mostrado en consumir uvas, vinos y productos dietéticos que contengan esta fitoalexina. En la quercetina (Figura 3B), cómo se mencionó, la actividad antioxidante se vio alcanzada por una meseta en la concentración de 600 μ M, donde se presentó la actividad más alta (2 equivalentes de trolox) y fue estable hasta la concentración más grande utilizada. Estas propiedades antioxidantes encontradas han sido ya reconocidas previamente en diferentes estudios, que han convertido a la quercetina en un compuesto con gran potencial antioxidante a concentraciones no elevadas (Salazar et al., 2011). Este polifenol perteneciente al grupo de flavonoides, ha adquirido últimamente gran interés por sus propiedades beneficiosas a la salud, pues además de poseer propiedades antioxidantes, también posee efectos anticancerígenos, cardioprotectores y antimicrobianos (Martínez-Flores et al., 2002), por lo que se recomienda ingerir en la dieta fuentes de quercetina cómo lechuga, arándanos, pimientos, cebollas, cerezas, manzanas, uva, vino y té negro, para aprovechar sus efectos benéficos a la salud (Gabriele, 2015). En el EGCG (Figura 3C) se observó un comportamiento similar a la quercetina, pues los equivalentes de trolox aumentaban conforme aumentaba la concentración, hasta llegar a una pequeña meseta que se presentó después de la concentración de 600 μ M, donde en la concentración consecuente obtuvo la mayor actividad antioxidante que fue de 2 equivalentes de trolox. Esto nos dice que EGCG tiene una buena actividad antioxidante, la cual ha sido reportado en diversos estudios, donde se ha descrito el mecanismo para eliminar radicales libres y la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad. Pero además de poseer propiedades antioxidantes, también posee efectos beneficiosos a la salud, como el control del peso corporal, la mejor absorción de nutrientes y para combatir enfermedades cardiovasculares, lo que hace crecer el interés por consumir fuentes de este compuesto fenólico, como el té verde, pues el EGCG es el flavonoide de mayor cantidad presente en esta bebida (Hérrnandez et al., 2004). Realizando una comparación entre los tres compuestos en este método, la quercetina es el compuesto con mejor actividad antioxidante. Se observa que tanto la quercetina como el EGCG tienen la mayor actividad antioxidante en los 600 μ M, que fue de 2 equivalentes de trolox, la cual se

mantuvo estable hasta la concentración más alta, sin embargo, si se toma como punto de comparación la concentración de $400\mu\text{M}$, la quercetina tiene aproximadamente 1.9 equivalentes de trolox mientras que el EGCG tuvo 1.5 equivalentes trolox, lo que nos dice que la quercetina es el mejor compuesto antioxidante de los tres, ya que tiene mayor actividad antioxidante a una baja concentración (Figura 3).

D. Actividad antioxidante de un extracto etanólico de *Heliopsis longipes*

Se evaluó la actividad antioxidante de diferentes concentraciones del extracto etanólico de *H. longipes* tanto en ABTS y DPPH, expresada en equivalentes de Trolox (Figura 4).

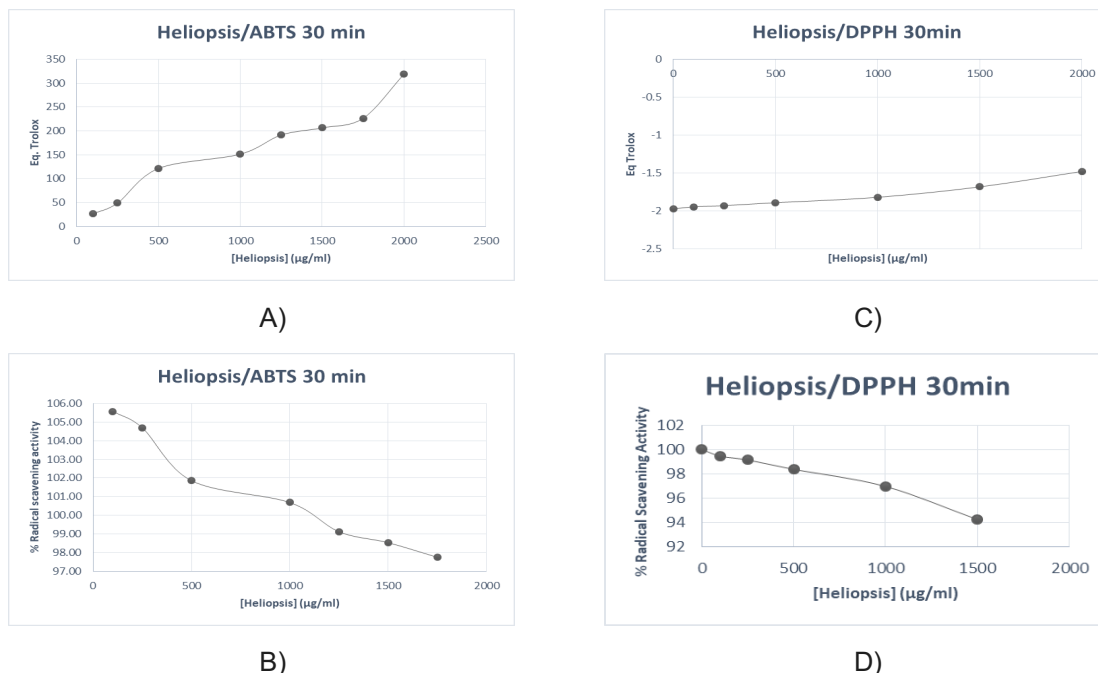


Figura 4. Capacidad antioxidante del extracto etanólico de *H. longipes* en presencia de diferentes concentraciones (30 min. A) ABTS, B) %RSA en ABTS, C) DPPH, D) %RSA en DPPH

En la evaluación de la actividad antioxidante de los extractos de *H. longipes* contra el tiempo en ambos métodos, se observa que entre mayor sea la concentración del extracto mayor será la actividad antioxidante. Se puede ver, además, que la actividad va aumentando ligeramente mientras aumenta el tiempo de reacción. En el método ABTS, la actividad antioxidante a los 30 minutos aumentaba conforme aumentaba la concentración, obteniendo un buen coeficiente de correlación, teniendo la mayor actividad antioxidante en la concentración más alta de extracto ($2000\mu\text{g/ml}$) de aproximadamente 250 equivalentes de trolox (Figura 4B). Mientras que en el método DPPH se obtuvo un aumento de actividad antioxidante muy pequeño conforme aumentaba la concentración. En las cuatro concentraciones más bajas utilizadas la actividad tuvo cambios muy mínimos, sin embargo, en las últimas concentraciones (arriba de $500\mu\text{g/ml}$) los cambios fueron mayores, ya que el aumento se nota más conforme aumentaba la concentración, no obstante, estos cambios no eran muy significativos (Figura 4D). Este último método pudo no haberse llevado a cabo de manera adecuada por la forma de la gráfica resultante, ya que el método DPPH es uno de

los ensayos más eficientes y utilizados para medir la capacidad antioxidante de extractos de plantas (Lucas-Abellán, 2011).

Además, podemos observar que el %RSA de los extractos de *H. longipes* no bajan del 90% en las concentraciones más altas utilizadas, lo que nos indica que la planta tiene una muy poca o casi nula actividad antioxidante. No obstante, hay pocos estudios que han reportado que los extractos de *H. longipes* tienen actividad antioxidante, la cual es atribuida por la capacidad de reducir el daño oxidativo y las mutaciones de ADN, sin embargo no se describe el mecanismo ni se tienen datos cuantitativos sobre la eliminación de radicales libres que sustenten estos efectos antioxidantes, ya que se interpreta que este potencial antioxidante viene en relación con los efectos antimutagénicos y anticancerígenos encontrados en los extractos de esta planta (Arriaga et al., 2012). Esta serie de propiedades y efectos biológicos son producidas por la afinina, que es una amida y el principal componente bioactivo de las raíces de esta planta, la cual es la responsable de su uso como analgésico, insecticida y desparasitante en la medicina tradicional (Ramírez et al., 2000). Sin embargo, aún no hay trabajos veraces que confirmen si esta amida es la responsable de estos pequeños efectos antioxidantes de los extractos de *H. longipes*, o si en realidad esta planta tiene potencial antioxidante, por lo que se deben realizar más estudios e implementar más métodos para confirmar lo obtenido en este proyecto. También, se sugiere que al momento de evaluar la actividad antioxidante se utilice extractos más frescos y recién extraídos, ya que se pudo observar que las condiciones de la muestra influyen mucho en los resultados, ya que entre menos frescos estaban los extractos menor poder antioxidante se tenía.

Al calcular la IC₅₀ a partir de los obtenidos con las muestras de *H. longipes* y comparándolas con los otros compuestos antioxidantes evaluados (Tabla 1) podemos concluir que la quercetina tuvo una mayor actividad antioxidante, seguido por el EGCG.

Tabla. 1. Coeficiente de inhibición 50% para las diferentes muestras utilizadas

	IC₅₀ ABTS	IC₅₀ DPPH
TROLOX	1625.88 µM	1448.46 µM
RESVERATROL	925.09 µM	2135.29 µM
QUERCETINA	347.31 µM	359.70 µM
EGCG	404.31 µM	407.93 µM
<i>H. longipes</i>	>2000 µM	>2000 µM

Esta eficacia de eliminar la mitad de los radicales libres a una concentración no elevada es dado por la estructura química de estos compuestos fenólicos. La Quercetina tiene un grupo catecol que le confiere la propiedad de captar radicales libres, incluyendo radicales libres de oxígeno y unirse a iones de metales de transición, de este modo se evita la peroxidación de lípidos responsable de enfermedades neurodegenerativas o cardiovasculares, y lo convierte en un compuesto con alto potencial antioxidante (Gabriele, 2015; Martínez et al., 2002). Por otra parte, el compuesto con la peor actividad antioxidante fue *H. longipes*, ya que se calcula que se necesita una concentración >2000µM de extracto para poder eliminar tan sólo el 50% de radical, lo que nos habla de que esta planta posee una muy baja o casi nula actividad antioxidante.

IV. CONCLUSIONES

Se implementó y llevo a cabo la estandarización de los métodos ABTS y DPPH para evaluar y medir la capacidad antioxidante de extractos etanólicos de la planta *H. longipes* y de compuestos fenólicos con actividad ya conocida. Se obtuvo que, tanto el resveratrol, quercetina y EGCG tienen un alto nivel de poder antioxidante, el cual aumenta conforme aumenta la concentración utilizada de tales compuestos, siendo la quercetina de los tres el mejor compuesto antioxidante. Por otro lado, se encontró una muy baja actividad antioxidante en los extractos etanólicos de *H. longipes* usando concentraciones muy altas, lo que nos lleva a descartar que esta planta posee efectos antioxidantes o que los efectos previamente reportados en otros estudios no se basan en un cambio en el estado de oxidación directo sobre los radicales libres, sin embargo se requiere realizar más estudios usando extractos más frescos y recién extraídos para determinar si realmente tiene o no propiedades antiradicales, o bien, analizar y determinar la naturaleza de la planta para encontrar algún compuesto que contenga y sea el responsable de estos pequeños efectos antioxidantes encontrados en este trabajo.

V. RECONOCIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por las facilidades y el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano. Además, agradezco a la Dra. Jimena y al equipo de trabajo en laboratorio por su apoyo para la realización del proyecto.

REFERENCIAS

- [1] Arriaga-Alba, M., Rios, M.Y., Déciga-Campos, M. (2013) Antimutagenic properties of affinin isolated from *Heliopsis longipes* extract. *Pharmaceutical Biology*, 51:8.
- [2] Cilia-Lopez, V., Aguirre-Rivera, J., Reyes-Agüero, J., & Juárez-Flores, B. (2008). Etnobotánica de *Heliopsis longipes* (Asteraceae: Heliantheae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (83), 81-87
- [3] Frankel, E.N., Meyer, A.S. (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.
- [4] Frèmont, L. (2000). Biological effects of resveratrol. *Life Science*, 66, 663- 673.
- [5] Gabriele, D. A. (2015). Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia*, 103, 256-271.
- [6] Halvorsen, B.L., Holte, K., Myhrstad M.C.W., Barikmo, I., Hvattum, E. (2002). A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *J Nutr* 132: 461-471.
- [7] Hernández, T., Rodríguez, E., Sánchez, F.J. (2004). El té verde ¿una buena elección para la prevención de enfermedades cardiovasculares?. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(4), 380-394.
- [8] Jang, M., Cai, L., Udenai, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W., Fong, H.H., Farnsworth, N.R., Kinghom, A.D., Mehta, R.G., Moon, R.C., Pezzuto, J.M. (1997). Cancer chemo preventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275, 218- 220.
- [9] Lucas-Abellán, C., Mercader-Ros, M.T., Zafrilla, M.P., Gabaldon, J.A, Nuñez-Delicado, E. (2011). Comparative study of different methods to measure antioxidant activity of resveratrol in the presence of cyclodextrins. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 1255-1260.

- [10] Martínez-Flores, S., González-Galego, J., Culebras, J.M., Tuñón, M.J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* 17 (6), 271-278.
- [11] Miser-Salihoglu, E., Akaydin, G., Caliskan-Can, E., Yardim-Akaydin, S. (2013). Evaluation of antioxidant activity of various herbal folk medicines. *J Nutr Food Sci*, 3:222.
- [12] Pinchuk, I., Shoval, H., Dotan, Y., Lichtenberg, D. (2012). Evaluation of antioxidants: scope, limitations and relevance of assays. *Chem Phys Lipids*, 165(6): 638-647.
- [13] Pisoschi, A.M., Negulescu, G.P. (2011) Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochem & Anal Biochem* 1:106.
- [14] Ramírez, E., Lucas, L., Virgen, G., Molina, J. (2000). Actividad fungicida de la afinina y del extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* en dos especies de *Sclerotium*. *Agrociencia*, 34 (2), 207-215.
- [15] Salazar, R., Espinoza, G., Ruiz, C., Fernandez, M.F., Rojas, R. (2011). Compuestos fenólicos, actividad antioxidante, contenido de resveratrol y componentes del aroma de 8 vinos peruanos. *Rev Soc Quím Perú*, 77 (2), 135-143.

Determinación del efecto de compuestos volátiles sintetizados por *Pseudomonas rhodesiae* GRC 140 en *Arabidopsis Thaliana*

Pamela Carolina González Rodríguez
 Universidad Autónoma de Coahuila
 Boulevard Venustiano Carranza e Ing. José
 Cárdenas Valdés. Colonia República, Saltillo,
 CP 25280, Coahuila, México
pamela-gonzalez@uadec.edu.mx

Asesor: Alejandro Hernández Morales
 Universidad Autónoma de San Luis Potosí
 Romualdo del Campo #501 Fracc. Rafael Curiel,
 Cd. Valles, CP 79060, SLP, México
alejandro.hernandez@uaslp.mx

Resumen — En este trabajo se evaluó el efecto de los compuestos orgánicos volátiles (COV) sintetizados por *Pseudomonas rhodesiae* cepas GRC065, GRC066 y GRC140 en el crecimiento y desarrollo en plántulas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas *in vitro*. Se utilizó un sistema de placa dividida, en un extremo se colocaron las plántulas y el otro extremo se inoculó con las cepas. Se evaluaron diversos parámetros: longitud de la raíz primaria (LRP), formación de raíces laterales (FRL), peso fresco, y densidad de raíces. GRC140, mostró ser más eficiente en la LRP, efecto que se observó correlacionado con la FRL; sin embargo, no tuvo un aumento significativo en el peso fresco total, ni la densidad de raíces comparado con el control y con GRC065, GRC066.

Palabras clave — *Pseudomonas rhodesiae*, *Arabidopsis thaliana*, compuestos orgánicos volátiles.

Abstract — In this work we evaluated the effect of volatile organic compounds (VOCs) synthesized by *Pseudomonas rhodesiae* strains GRC065, GRC066 and GRC140 on the growth and development of *Arabidopsis thaliana* seedlings grown *in vitro*. A split plate system was used, at one end the plants were placed, and the other end was inoculated with the strains under study. Some parameters were evaluated: primary root length, lateral root formation, fresh weight, and root density. GRC140, showed to be more efficient in the primary root length, an effect that was correlated with the lateral root formation; however, it did not have a significant increase in total fresh weight, nor root density compared to the control and with GRC065, GRC066.

Keywords — *Pseudomonas rhodesiae*, *Arabidopsis thaliana*, volatile organic compounds.

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas son capaces de reconocer compuestos derivados de microbios y ajustar sus respuestas de defensa y crecimiento de acuerdo con el tipo de microorganismo encontrado [1]. En la naturaleza existen diferentes clases de asociaciones entre plantas y microorganismos de acuerdo con el grado de especificidad, las señales moleculares implicadas y las consecuencias que resultan de ellas. La porción de suelo bajo la influencia directa de las raíces de las plantas se denomina rizósfera, en ella existe una gran actividad microbiana y la interacción entre plantas y microorganismos juega un papel importante en la nutrición y la salud vegetal, así como en la composición de las comunidades microbianas. Entre los microorganismos que habitan en este espacio encontramos las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR que entre los géneros cultivables incluyen a *Bacillus*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Pantoea*, *Burkholderia* y *Streptomyces* [2]. Los miembros del género *Pseudomonas* son un importante componente en la comunidad microbiana del suelo, una de las principales

características que presenta este género es la facilidad para colonizar las raíces de las plantas. La colonización de las raíces por microorganismos estimula el desarrollo vegetal (p. ej., promoción del crecimiento de la planta por la producción de hormonas) [3]. Se ha encontrado algunas especies de *Bacillus* producen COV que se han considerado como desencadenantes de la promoción del crecimiento vegetal. Las especies microbianas pueden emitir volátiles para diferentes propósitos, como la comunicación y la defensa y pueden participar tanto en la promoción del crecimiento de las plantas como en la remodelación de la arquitectura de la raíz[1]. En este trabajo se realizó la inoculación con tres cepas bacterianas pertenecientes a la misma especie para determinar si son responsables o no de provocar algún cambio en el crecimiento en plántulas de *A. thaliana* bajo el efecto de COV sintetizados por las mismas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se esterilizaron semillas de *A. thaliana* con una solución de cloro comercial al 50% + Triton x-100 al 0.02%, las semillas se colocaron en microtubos estériles que contenían 500 µL de la solución preparada, se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y en agitación rotatoria, se removió la solución por aspiración y se realizaron seis lavados sucesivos con agua estéril. Para la germinación de las semillas, se sembraron sobre placas que contenían agar agua (1.5 %), se incubaron a 4 °C durante 48 horas y a partir del tercer día se incubaron a temperatura ambiente con un fotoperíodo de 16 horas luz 8 horas oscuridad durante 5 días.

B. Cultivo de *P. rhodesiae* GRC065, GRC066, y GRC140

Las cepas de *Pseudomonas* GRC065, GRC066 y GRC140 se cultivaron en placas que contenían agar Lb 1/5 y se incubaron durante 24 horas a 33°C. A partir de una colonia aislada, se realizaron pre-inóculos en caldo LB 1/5 incubados a 33 °C por 24 horas. Posteriormente, los cultivos se ajustaron a una D.O. de 0.2 en solución salina y se comprobó la carga microbiana realizando diluciones seriadas de cada cultivo.

C. Evaluación de los efectos de los compuestos orgánicos volátiles en el crecimiento de las plántulas de *A. thaliana*

Para evaluar el efecto de los COV en el crecimiento vegetal, se utilizaron placas Petri divididas que contenían agar MS 0.2x suplementado con sacarosa 0.75% y buffer MES pH 5.7. En una mitad de la placa se transfirieron 5 plántulas de *A. thaliana* en una línea horizontal y la otra mitad se inoculó el cultivo bacteriano previamente ajustado en una línea vertical. Las placas se incubaron durante 10 días a temperatura ambiente y ciclos de 16 horas luz, 8 horas oscuridad. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada una de las cepas de *P. rhodesiae* en estudio.

III. RESULTADOS

A. P. rhodesiae estimula el crecimiento en plántulas de *A. thaliana*

Los resultados del peso fresco total al término de los diez días de incubación mostraron que las tres cepas de *P. rhodesiae* promovieron el crecimiento en las plántulas de *A. thaliana* (Figura 1). Se observó que, la inoculación con GRC066 mostró ser la más favorecedora al triplicar el peso fresco total comparado con el control no inoculado, en cambio las cepas GRC065 y GRC140 lograron casi duplicar el peso fresco de las plántulas con respecto al control no inoculadas con cultivo bacteriano observándose un comportamiento similar entre ellas (Figura 1). Lo anterior nos mostró que las tres cepas bacterianas de *P. rhodesiae* son efectivas en la promoción del crecimiento y desarrollo de plantas de *A. thaliana* (Figura 2).

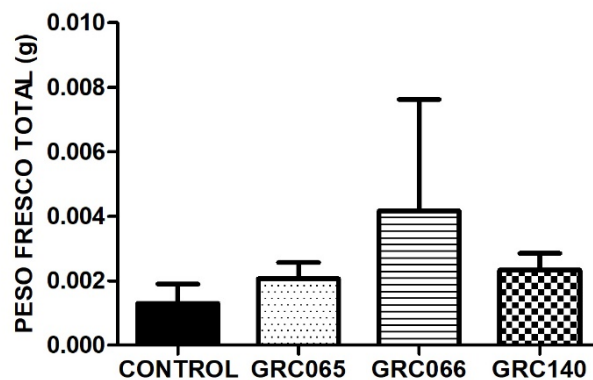


Fig. 1. Peso fresco total de plántulas de *A. thaliana* no inoculadas (control) e inoculadas con GRC065, GRC066 y, GRC140

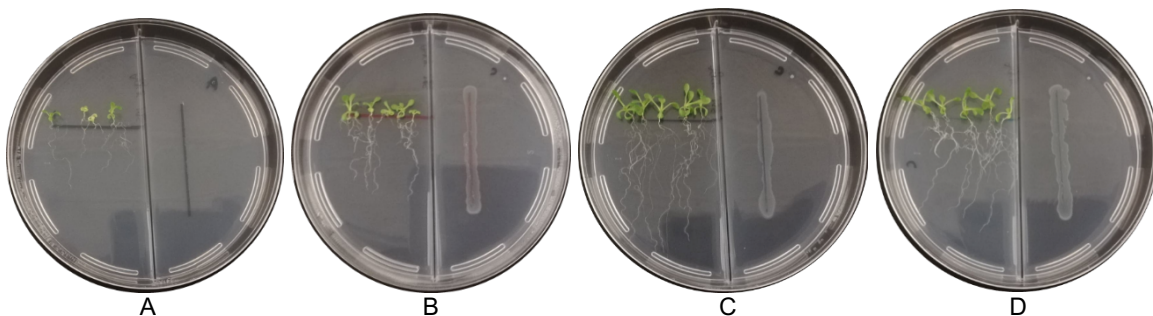


Fig. 2. Efecto de la inoculación con cepas de *P. rhodesiae* en *A. thaliana*. A= control no inoculado, B=GRC065, C=GRC066, D=GRC140

B. Efecto de los COV sintetizados por P. rhodesiae en la arquitectura de raíces de A. thaliana

Para evaluar los efectos de las tres cepas bacterianas en la arquitectura del sistema radicular se utilizaron parámetros como longitud de la raíz primaria (LRP), formación de raíces laterales (FRL), longitud de los hipocótilos y densidad radicular. Se realizó una comparación entre la raíz primaria de las plántulas al día cero y al día diez, después

inoculadas las bacterias, en el día cero se observó que las plantas inoculadas con las bacterias mostraban una longitud de la raíz primaria similar al de las plantas control (Figura 3A), sin embargo al día diez se observó que las plántulas de las placas inoculadas con las tres cepas de *P. rhodesiae*, mostraron una mayor elongación de la raíz primaria con respecto a las plántulas de las placas sin el inóculo bacteriano (Figura 3B). Se encontró que GRC140 estimuló el crecimiento de la raíz primaria con mayor eficacia en comparación con las demás cepas, al ser las plántulas inoculadas con esta cepa las que registraron mayor longitud y lograron duplicar la longitud de las raíces de las plántulas no inoculadas (control) (Figura 3B).

Otros de los parámetros que se evaluaron en las plántulas de *A. thaliana* inoculadas con las cepas bacterianas, fue la formación de raíces laterales y la densidad de raíces. Se observó que las tres cepas de *P. rhodesiae* incrementan de manera considerable tanto la formación de raíces laterales como la densidad radicular (Figura 4). A los 10 días posterior a la interacción con las cepas bacterianas, se observó que GRC066 y GRC140 propician la mayor formación de raíces laterales en *A. thaliana* con respecto a las plantas control (Figura 4A). Con respecto a la densidad radicular, se encontró que las tres cepas incrementaron la densidad de raíces, sin embargo, GR066 mostró ser la más eficiente para este parámetro (Figura 4B).

En el efecto sobre el crecimiento de los hipocótilos de las plántulas de *A. thaliana* no se registró un aumento significativo en ninguna de las tres cepas en estudio, al observarse longitudes muy similares a los controles no inoculados. A pesar de que no se observaron diferencias significativas en la longitud de los hipocótilos entre cepas, se observó que GRC065 y GRC140 fueron las cepas que provocaron la mayor elongación de los hipocótilos con respecto a las plántulas no inoculadas y a las inoculadas con GRC066 (Figura 5).

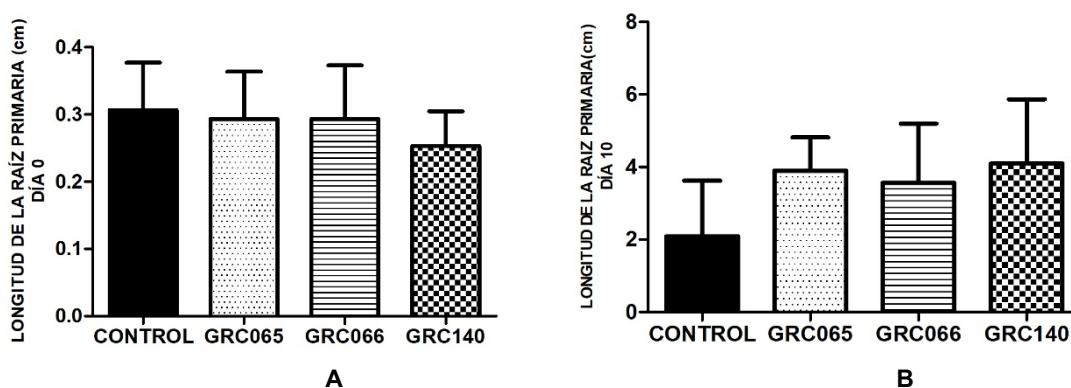


Fig. 3. Efecto de GRC065, GRC066 y GRC140 en la longitud de la raíz primaria de *A. thaliana* al día 0 (A) y día 10 (B)

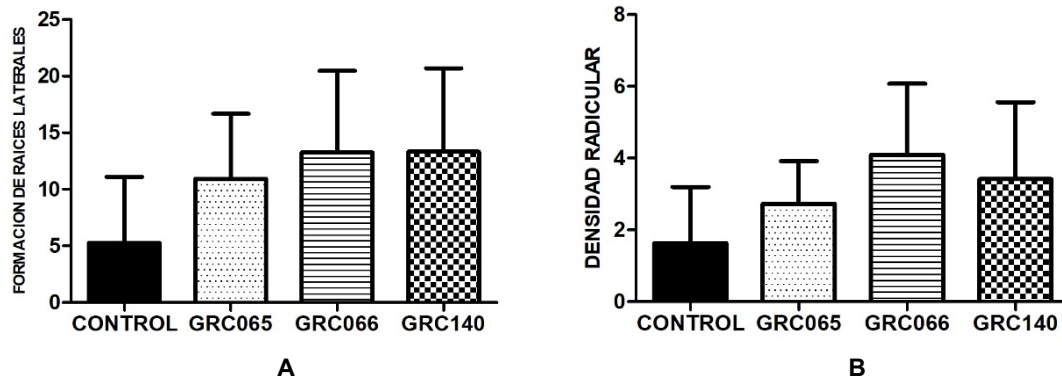


Fig. 4. Efecto de GRC065, GRC066 y GRC140 en la formación de raíces laterales (A) y la densidad radicular (B) de plantas de *A. thaliana*.

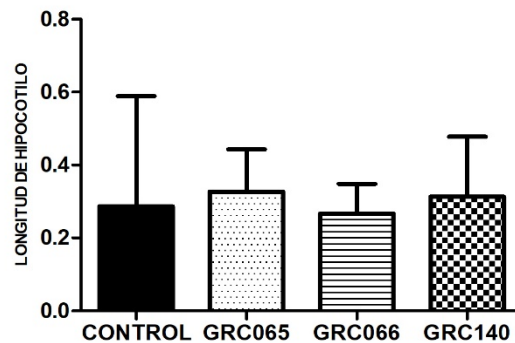


Fig. 5. Efecto de GRC065, GRC066 y GRC140 en la elongación de los hipocótilos de plántulas de *A. thaliana*.

IV. DISCUSIÓN

En la actualidad se han desarrollado numerosas técnicas con la intención de inocular bacterias a plantas, ya sea para aumentar su resistencia contra fitopatógenos o para ser utilizadas en la fitorremediación de suelos contaminados con compuestos químicos, como hidrocarburos, residuos de plaguicidas, entre otros[3]. En este trabajo se realizó la inoculación con tres cepas bacterianas en plántulas de *A. thaliana* cultivadas in vitro para determinar el efecto provocado por los COV producidos por las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*. Los resultados mostraron que al realizar los experimentos en placas Petri divididas se puede asociar la producción de los COV producidos por las cepas de *P. rhodesiae* en estudio con la producción de biomasa vegetal en plántulas de *A. thaliana*, así como la modificación en la arquitectura radicular; sin embargo, hay que reconocer que no todas las cepas inoculadas en la planta modelo para los experimentos in vitro, provocaron los mismos efectos, por lo que no se puede generalizar la idea de que las tres bacterias estudiadas sean efectivas en el crecimiento y desarrollo de la planta, la inoculación con GRC066 mostró los valores más altos en el peso fresco de las plántulas de *A. thaliana*, lo cual puede indicar que las plantas seleccionan de manera específica aquellas cepas que son beneficiosas[2]. Se demostró que GRC066 y GRC140 estimularon fuertemente la producción de biomasa vegetal (Figuras 2C y 2D), así como la

FRL (Figura 4A) en conjunto con GRC065. Puede deducirse que las tres cepas bacterianas promovieron altamente el crecimiento en la LRP, aunque entre las tres bacterias se observaron valores similares entre ellas, mostraron valores que duplicaron la longitud del control que contenía las plántulas no inoculadas con cultivo bacteriano. Los resultados obtenidos en el efecto causado en la densidad radicular demostraron que GRC065, GRC066 y GRC140 participaron en el desarrollo de la arquitectura del sistema de raíces. Los valores registrados en la longitud de los hipocótilos no tuvieron significancia por lo que se puede especular que los compuestos orgánicos volátiles no influyen en el crecimiento de estos. Aunque se desconoce la exactitud de los compuestos que intervienen en el desarrollo y crecimiento en las plántulas de *A. thaliana* los datos obtenidos en este trabajo, así como la literatura de estudios previos relacionados con bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*, se puede sugerir que las tres cepas participantes en este estudio, siendo GRC065, GRC066 y GRC140, debido a la metodología experimental llevada a cabo, muy posiblemente los compuestos sintetizados por estas bacterias están involucrados en el crecimiento y desarrollo, así como el sistema radicular de *A.thaliana*.

V. CONCLUSIONES

P. rhodesiae GRC065, GRC066 y GRC140 incrementan el peso fresco y modifican la arquitectura radicular de plantas de *A. thaliana* por la emisión de compuestos orgánicos volátiles.

VI. RECONOCIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, a mi casa de estudios la Universidad Autónoma de Coahuila y 21 ° Verano de la Ciencia de la Región Centro por permitir la colaboración para desarrollar este proyecto de investigación.

REFERENCIAS

- [1] F. M. Gutiérrez-Luna, J. López-Bucio, J. Altamirano-Hernández, E. Valencia-Cantero, H. R. De La Cruz, and L. Macías-Rodríguez, "Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission," *Symbiosis*, vol. 51, no. 1, pp. 75–83, 2010.
- [2] M. A. Marrero, B. Agaras, L.G. Wall, C. Valverde, "Enriquecimiento diferencial de *Pseudomonas spp.* en el rizoplasma de distintas especies cultivadas", *Revista Argentina de Microbiología*, vol. 47, no. 2, pp. 132-137. Disponible en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213039768009> [consultado en julio 2019].
- [3] F. G. Zuno-Floriano, P. Estrada-de los Santos, J. A. Gallegos-Infante, N. E. Rocha-Gúzman, M. L. Aldana-Madrid, G. Virgen-Calleros, M. G. Miller, C.V. Muñoz-Ruiz," PRODUCCIÓN *in vitro* DE PLÁNTULA DE PAPA INOCULADA CON *Pseudomonas sp*", *Tierra Latinoamericana*, vol. 27 núm. 3, pp. 207-217. Disponible en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57313037005> [consultado en julio 2019].

Determinar la concentración máxima en ppm a la que crecen los microorganismos tolerantes y/o resistentes a manganeso aislados de sedimentos provenientes de La presa de La Purísima, Guanajuato

Jorge Alberto Negrete Ortiz

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Carr. Irapuato-Silao Km 12.5, col. El Copal,
C.P.3682, Irapuato, Gto.
albertngret@gmail.com

Asesora: María Azucena Márquez Lucio

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Carr. Irapuato-Silao Km 12.5, col. El Copal,
C.P.3682, Irapuato, Gto.
zucet01@gmail.com

Resumen - El presente documento describe los ensayos llevados a cabo para determinar la concentración máxima en ppm (partes por millón), a la que crece un microorganismo tolerante y/o resistente a manganeso. En este proyecto se le dio una continuidad al aislamiento de microorganismos provenientes de la presa de la Purísima, Guanajuato, en el cual se realizaron ensayos a diferentes concentraciones de Cloruro Manganoso ($MnCl_2$) en un medio de cultivo definido, para evaluar el crecimiento que presentan los microorganismos aislados en condiciones de estrés metálico.

Palabras clave: Concentración máxima, tolerante, resistente, crecimiento, estrés.

Abstract - This document describes the tests carried out to determine the maximum concentration in ppm (parts per million), at which a tolerant and / or manganese resistant microorganism grows. This project gave continuity to the isolation of microorganisms from the Purísima dam, Guanajuato, in which tests were carried out at different concentrations of manganous chloride ($MnCl_2$) in a defined culture medium, to evaluate the growth that the microorganisms presents in conditions of metallic stress.

Keywords: Maximum concentration, tolerant, resistant, growth, stress.

I. INTRODUCCIÓN

Con el crecimiento de la industria, se ha presentado un aumento considerable en la descarga de desechos industriales al medio ambiente, principalmente suelo y agua, lo que conllevado a la acumulación de metales pesados, especialmente en áreas urbanas.^[10]

La contaminación en sedimentos y cuerpos receptores de aguas con metales pesados es un problema ambiental importante en todo el mundo. Estas perturbaciones son liberadas en efluentes generados por diversas industrias, como lo son: industrias de galvanoplastia y acabado de metales, la metalurgia, la curtiembre, fabricación de baterías, entre otras. La presencia de metales pesados en el ambiente, generalmente induce a cambios morfológicos y fisiológicos en las comunidades microbianas. No obstante, los ambientes contaminados, son fuentes de microorganismos metal-resistentes.^[4]

Los metales juegan un rol integral en los procesos de vida de los microorganismos. Alguno de estos metales fungen como nutrientes esenciales, por otro lado existen metales que simplemente no cuentan con un rol biológico en la célula. El calcio, cobalto, cromo,

cobre, hierro, potasio, magnesio, manganeso, sodio, níquel y zinc juegan roles biológicos esenciales en la célula. Sin embargo, a altas concentraciones, cualquier metal es considerado como tóxico para los microorganismos.^[2]

La mayoría de los metales pesados son elementos de transición con orbitales completamente llenos. Estos orbitales, les proporcionan cationes con capacidad de formar compuestos complejos, de manera que, el metal puede desempeñar un papel en reacciones bioquímicas sofisticadas, como “elemento traza”. Sin embargo la concentración intracelular de iones de metales pesados debe controlarse estrechamente, y la resistencia a metales pesados es solo un caso específico de la demanda general de cada célula viva de algún sistema de homeostasis de metales pesados. No obstante para tener cualquier efecto fisiológico o tóxico, la mayoría de los iones de metales pesados tienen que entrar en la célula.^[8]

El manganeso (Mn) es un abundante metal de transición que se sabe experimenta ciclos de oxidación y reducción bioquímicos en sistemas de agua dulce y marinos. El manganeso soluble, Mn (II), se puede encontrar en fuentes de agua dulce debido a las reacciones de intercambio de electrones que tienen lugar en presencia de bacterias reductoras de metales en condiciones anóxicas en la interfaz agua/sedimento.^[5] Por otro lado, el manganeso es uno de los contaminantes más abundantes en aguas superficiales y subterráneas, teniendo mayor presencia en estas últimas.^[7]

A pesar de los procesos biológicos en los cuales se encuentra involucrado el manganeso, el exceso de este metal desordenará inevitablemente el metabolismo celular. Su toxicidad puede estar indicada por la concentración inhibitoria mínima (CIM), que se define como la concentración mas baja para inhibir completamente el crecimiento celular. Existe información reportada que la CIM de Mn^{2+} es inferior a 30 mM, por ejemplo, en algunos microorganismos; como *Escherichia coli* es de 20 mM, para un *Bacillus circulans* se tiene una concentración de 24 mM y para *Sacharomyces cerevisiae* se tiene reportado 10 mM.^[11]

En México existen pocos estudios relacionados a procesos que toman lugar en sedimentos y agua, juntos o de manera individual. Lo cual realizar un estudio de este rubro en el estado de Guanajuato genera un parteaguas en el área de la calidad de agua en los cuerpos hídricos receptores del estado, así como en la investigación de microorganismos autóctonos con la capacidad de tolerar y/o resistir ambientes perturbados.

II. MARCO TEÓRICO

Los iones metálicos son esenciales para la vida y son indispensables para casi todos los aspectos del metabolismo. De hecho, muchos procesos bioenergéticos y biogeoquímicos centrales en la Tierra, incluida la respiración, la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno, dependen totalmente de los cofactores de iones metálicos.^[3]

El manganeso (Mn), un metal gris rojizo es el duodécimo elemento más abundante con una concentración estimada de 0.095% en la corteza terrestre. El nombre de este elemento se deriva de la palabra latina, magnesio, que significa imán, en referencia a las propiedades magnéticas de su pirolusita mineral. El manganeso tiene un número atómico de 25 con un

peso atómico de 54.938 y una configuración electrónica $4s^23d^7$. Pertenece al cuarto período, bloque d y al subgrupo VIIB de la tabla periódica. Existe en cuatro modificaciones alotrópicas: formas alfa, beta, gamma y delta. El manganeso es un metal de transición. Aunque la forma elemental (metal) del manganeso no se produce naturalmente en el medio ambiente, el manganeso es un componente de más de 100 minerales. Las formas minerales más comunes incluyen dióxido de manganeso, carbonato de manganeso y silicato de manganeso.^[9]

Los óxidos de Mn (III, IV) (óxidos de Mn) y los complejos de Mn (III) solubles son los agentes oxidantes más fuertes en el medio ambiente después del oxígeno y desempeñan un papel importante en muchos ciclos biogeoquímicos. A pH 7 pueden oxidar metales, catalizar la formación de sustancias húmicas y complejos orgánicos de nitrógeno, y degradar oxidativamente los ácidos húmicos fúlvicos a compuestos orgánicos biodisponibles de bajo peso molecular. En rangos de pH que poseen las aguas neutrales (pH 6 a 8), la oxidación química de Mn (II) es lenta, pero en presencia de microorganismos oxidantes de Mn (II) la tasa puede ser de 4 a 5 órdenes de magnitud más alta.^[1]

La forma divalente, Mn (II), predomina en la mayoría de las aguas a pH 4-7, pero pueden aparecer formas más altamente oxidadas a valores de pH más altos o como resultado de la oxidación microbiana. Aunque Mn puede existir en hasta 11 estados de oxidación, Mn (II) y Mn (III) son los más relevantes para los sistemas biológicos. El estado de oxidación de Mn parece ser un determinante clave de su distribución, acumulación y excreción. Mientras que el Mn (II) se elimina rápidamente de la sangre y se excreta de manera eficiente en la bilis, el Mn (III) se transporta a través de las membranas y tiene una tasa de eliminación más lenta. Por lo tanto, el intercambio y el equilibrio de los estados de Mn (II) (que se absorbe) a Mn (III) es un factor importante en la distribución de Mn en el cuerpo y, por lo tanto, para cualquier efecto neurotóxico. Son posibles otros estados de oxidación, pero Mn (III) solo es estable como complejo, Mn (V) y Mn (VI) no son estables en soluciones neutras y Mn (VII), en forma de ion morado de permanganato (MnO_4^-), es fuertemente oxidante y no se forma en la mayoría de las aguas naturales.^[9]

El manganeso es importante para la defensa contra el estrés oxidativo, especialmente en bacterias gram-positivas, y la adquisición de manganeso ha demostrado ser crucial para la supervivencia y la virulencia de algunos géneros de *Streptococcus*. En exceso los iones de metales de transición son tóxicos para la célula y, por lo tanto, las bacterias han desarrollado sistemas sofisticados que detectan el exceso de iones de metales de transición y los eliminan por el flujo de la célula o el secuestro del exceso de iones metálicos dentro de la célula. El manganeso se considera generalmente bien tolerado por las bacterias y puede acumularse en concentraciones milimolares dentro de *Escherichia coli* y muchos *lactobacilos* sin ningún efecto perjudicial en la célula. Recientes observaciones demostraron que el alto nivel de sensibilidad de *Neisseria gonorrhoeae* al manganeso en comparación con *Neisseria meningitidis* se correlacionó con la ausencia de una bomba de flujo de manganeso funcional. Esto sugiere que las bacterias internas, el flujo de manganeso y la homeostasis son importantes para la supervivencia celular.^[12]

III. METODOLÓGIA

A. Obtención de la cepa

Las cepas con las que se trabajó se aislaron previamente de muestras de sedimento, tomados de cuatro puntos de la presa de la Purísima, Guanajuato. Se usó un medio definido para el aislamiento, denominado medio YBG por (Hurst, y otros, 2007), y se continuó usando para los ensayos a diferentes concentraciones de manganeso. Sin embargo al medio YBG en los ensayos se le modificó la concentración de la sal, adicionando los mililitros correspondientes al aumento de concentración de una solución Stock de $MnCl_2$.

B. Ensayos de tolerancia y/o resistencia

Se realizó una resiembra de los aislados en nuevas placas con medio YBG, el cual contenía una concentración de 183.1 ppm de Mn. Se evaluó crecimiento y modificación morfológica. Se continuó aumentando la concentración de Mn hasta lograr una Concentración Mínima Inhibidora (CMI) en los aislados.

IV. RESULTADOS

A. Obtención de la cepa

La Figura 1 muestra las cepas con la cuales se trabajó, estas se obtuvieron de muestras de sedimento de cuatro puntos de la Presa de la Purísima. Guanajuato. Las cepas obtenidas muestran una morfología colonial lisa, forma circular, mucosa, de color blanco.

B. Ensayos de tolerancia y/o resistencia

El primer ensayo que se realizó fue a una concentración de Mn equivalente a 183 ppm. Se realizó una resiembra de todos los puntos considerando una placa como control, tal como se muestra en la Figura 2. La morfología colonial, no se ve modificada sigue mostrando un color blanco, es lisa, y mucosa. Sin embargo al paso de las 48 horas se observó un color marrón en la placa tal como muestra la Figura 3.

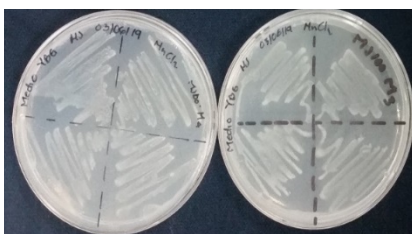


Fig. 3 Cepas aisladas de sedimentos de la Presa de la Purísima, Guanajuato en medio YBG

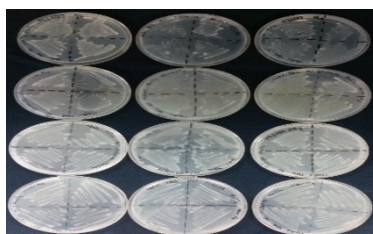


Fig. 2 Primer ensayo de tolerancia a Mn a una concentración de 183.1 ppm

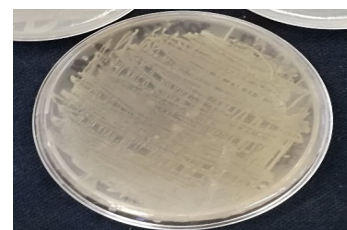


Fig. 1 Placa con aislados con 48 horas de inoculo

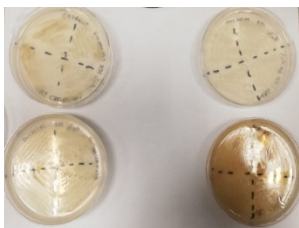


Fig. 6 Ensayo a una concentración de 300 ppm de Mn

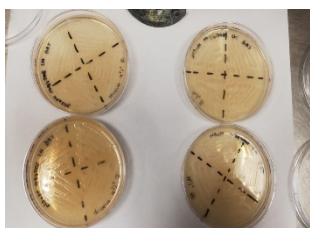


Fig. 5 Ensayo a una concentración de 500 ppm de Mn

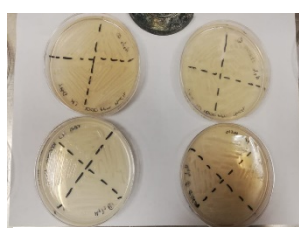


Fig. 4 Ensayo a una concentración de 1000 ppm de Mn

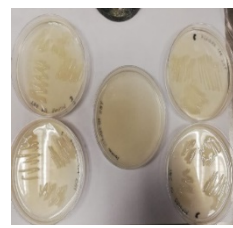


Fig. 7 Ensayo a una concentración de 2000 ppm de Mn

La presencia del color marrón en placa, podría estar indicando que existe una oxidación del metal o que la bacteria esta excretando alguna sustancia en el medio.

Las figuras 4, 5 y 6 muestran una aceptación a 500, 1000 y 2000 ppm de Mn. En esta última concentración se vio una modificación en la morfología colonial de la cepa, siendo caracterizada por tener una superficie convexa, con un color blanco y el color marrón se presento a las 24 horas de ser inoculada.

Cabe destacar que en todos los tratamientos pasadas las 48 horas el color marrón se presentaba con excepción de este último que se menciona.

Al mismo tiempo que se iba aumentando la concentración de decidió continuar con el trabajo únicamente con los aislados de las muestras 3 y 4, ya que estos presentaban un color marrón en toda la placa.

Por lo tanto se cree que los aislados de estas muestras poseen algún mecanismo que tiene la capacidad de oxidar concentraciones altas de Mn en un medio. A pesar de que los aislados de las muestras 1 y 2 también resistieron concentraciones de hasta 1000 ppm estos al paso del tiempo no mostraban la coloración que se estaba presentando en el resto de las placas.

V. CONCLUSIONES

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) para los aislados, tolerando 2000 ppm de Mn en un medio definido.

Se observó una coloración marrón en las placas de los ensayos lo cual nos indica que existe una respuesta a estrés y por ende una adaptación.

REFERENCIAS

1. Anderson, C. R., Johnson, H. A., Caputo, N., Davis, R. E., Torpey, J. W., & Tebo, B. M. (2009). Mn (II) Oxidation is Catalyzed by Heme Peroxidases in "Aurantimonas manganoxydans" Strain S185-9Al and "Erythrobacter sp. Strain SD-21. *Applied and Environmental Microbiology*, 4130-4138.
2. Bruins, M. R., Kapil, S., & Oehme, F. W. (2000). Microbial Resistance to Metals in the Environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 198-207.
3. Chandransgu, P., Rensing, C., & Helman, J. D. (2017). Metal Homeostasis and Resistance in Bacteria. *Nature Reviews: Microbiology*.

4. Ezzouhri, L., Castro, E., Moya, M., Espinola, F., & Lairini, K. (2009). Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. *African Journal of Microbiology Research*, 35-48.
5. Falkinham, J. O., Dietrich, A. M., Knocke, W. R., Cerrato, J. M., McKinney, C. W., & Pruden, A. (2010). Manganese-oxidizing and -reducing microorganism isolated from biofilms in chlorinated drinking water systems. *Water Research*, 3935-3945.
6. Hurst, C. J., Crawford, R. L., Mills, A. L., Garland, J. L., Stetzenbach, L. D., & Lipson, D. A. (2007). *Manual of Environmental Microbiology: Third Edition*. Washington, DC. USA: ASM Press.
7. Kouzbou, S., Azher, N. E., Gourich, B., Gros, F., Vial, C., & Stiriba, Y. (2017). Remova of manganese (II) from drinking water by aeration process using an airlift reactor. *Journal of Water Process Engineering*, 233-239.
8. Nies, D. H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Springer-Verlag*, 730-750.
9. Patil, D. S., Chavan, S. M., & Kennedy Oubagaranadin, J. U. (2016). A review of technologies for manganese removal from wastewaters. *Environmental Chemical Engineering*, 468-487.
10. Ruchita Dixit, W., Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U. B., Sahu, A., Shukla, R., . . . Paul, D. (2015). Bioremediation of Heavy Metals from Soil and Aquatic Enviroment: An Overview of Principles and Criteria of Fundamental Processes. *Sustainability*, 2189-2212.
11. Shao, Z., & Sun, F. (2007). Intracellular sequestration of manganese and phosphorous in a metal-resistant fungus *Cladosporium cladosporioides* from deep-sea sediment . *Springer*, 435-443.
12. Turner, A. G., Ong, C.-I. Y., Gillen, C. M., Davies, M. R., West, N. P., McEwan, A. G., & Walker, M. J. (2015). Manganese Homeostasis in Group A *Streptococcus* Is Critical for Resistance to Oxidative Stress and Virulence. *mBio*.

Diseño de hidrogeles basados en colágeno/quitosano/poliuretano para aplicación en la remoción de iones Pb (II)

Maria Teresa Banda del Bosque

Universidad Autónoma de Coahuila.
Facultad de Ciencias Químicas
Blvd. Venustiano Carranza s/n esquina Ing. José
Cárdenas Valdés, Colonia República.
Saltillo, Coahuila, México.
mariabanda@uadec.edu.mx

Asesora: Lucía Fabiola Cano Salazar

Universidad Autónoma de Coahuila.
Facultad de Ciencias Químicas
Blvd. Venustiano Carranza s/n esquina Ing. José
Cárdenas Valdés, Colonia República.
Saltillo, Coahuila, México.
lucia.cano@uadec.edu.mx

Resumen — En este trabajo se presenta el diseño de un hidrogel basado en colágeno/quitosano/poliuretano el cual se propone en la aplicación de adsorción de iones contaminantes de Pb (II), metal tóxico para la salud humana. Se llevó a cabo la síntesis del hidrogel así como pruebas de cinética de hinchamiento y degradación para conocer que tanto resiste el material y si es viable para remediación ambiental, así como pruebas de entrecruzamiento y adsorción. Se realizaron 5 formulaciones, dando como resultado que la formulación Col+PPU 20 es la que presenta mejores características de adsorción y entrecruzamiento obteniéndose valores de 30% y 66% respectivamente, lo cual lo hace candidato para su aplicación en la remediación de aguas contaminadas con Pb(II).

Palabras clave — Hidrogel, colágeno, adsorción.

Abstract — This work presents the design of a collagen / chitosan / polyurethane based hydrogel which is proposed in the adsorption application of contaminating ions of Pb (II), a toxic metal for human health. Hydrogel synthesis was carried out as well as tests of swelling and degradation kinetics to know how much the material resists and if it is viable for environmental remediation, as well as cross-linking and adsorption tests. Five formulations were made, giving as a result that the Col + PPU 20 formulation has the best adsorption and crosslinking characteristics, obtaining values of 30% and 66% respectively, which makes it a candidate for its application in the remediation of water contaminated with Pb (II).

Keywords — Hydrogel, collagen, adsorption.

I. INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso de gran importancia para la vida ya que sin él es imposible su preservación, por tal motivo es necesario cuidar de ella. Existen factores que propician la contaminación del agua y uno de los principales es el desarrollo industrial ya que los desechos que se generan en estas empresas presentan altos contenidos de sustancias tóxicas que vuelven al ambiente por medio de las descargas contaminando así, cuerpos de agua cercanos[1].

Las sustancias tóxicas que se encuentran en aguas residuales, suelen contener metales pesados como cromo, mercurio, arsénico y plomo. El plomo presente en el agua causa preocupación ya que es altamente tóxico para la salud humana y una exposición prolongada puede causar cáncer, problemas renales, daño al sistema nervioso y anemia[2], [3]. De acuerdo a la NOM-127-SSA1-1994 los límites máximos permisibles de plomo en agua son de 0.025 mg/L, y una concentración superior a estos valores podría ser peligroso.

No obstante existen tecnologías útiles para la remoción de metales pesados como precipitación química, extracción con solventes, osmosis inversa y adsorción[4]. La

adsorción es la técnica más popular entre las mencionadas, ya que es muy efectiva en cuanto a remoción de iones contaminantes, a su flexibilidad, y a su bajo costo en el diseño y operación de materiales adsorbentes[2].

Existe una gran diversidad de materiales adsorbentes y en la actualidad la síntesis y desarrollo de hidrogeles está teniendo una amplia gama de aplicaciones en bioingeniería, medicina y estudios medioambientales. Debido a la alta capacidad que tienen para encapsular la muestra en la que se encuentran [5].

Los hidrogeles son materiales poliméricos entrecruzados en forma de red tridimensional obtenidos de fuentes naturales como el colágeno, quitosano, entre otros o de matrices como oxido de polietileno y ácido polivinílico. Se hinchan al entrar en contacto con el agua y forman materiales blandos, ya que retienen hasta mil veces su peso seco en agua. Posen un carácter hidrófilo debido a la presencia en la estructura de grupos solubles en agua como OH-, COOH, SO₃H, etc [6].

Su comportamiento particular les brinda la capacidad de cambiar drásticamente de estado sólido al estado gel ante un estímulo en el cambio de temperatura y pH [6]. Su amplia aplicabilidad para ajustar las propiedades lo hace un excelente candidato para la eliminación de iones de metales pesados del agua contaminada.

Por tal motivo en el presente trabajo se propone la síntesis y diseño de hidrogeles basados en colágeno-poliuretano-quitosano para así, mejorar las propiedades individuales de cada uno de ellos y funcionalizarlos, para adquirir características de una gran área superficial que permita posicionarse como un excelente material adsorbente en cuanto a la remoción de iones Pb (II) de aguas contaminadas.

II. METODOLOGÍA

1. *Extracción de colágeno.* La extracción de colágeno se lleva a cabo utilizando pata de res, que se coloca en agitación constante durante 24 h con una solución de EDTA, etanol y trietanolamina. Al término de este tiempo se agrega ácido clorhídrico y se deja durante 24 h. Pasado este tiempo se obtiene el colágeno y se almacena a temperatura de 5°C.
2. *Preparación de hidrogeles.* Para la preparación de hidrogeles se utilizó el colágeno de tendón de res obtenido anteriormente, quitosano (extraído por Claudio y colaboradores 2019), entrecruzante y PBS. Los cuales se colocaron en una placa Elisa de 6 columnas por 4 filas (las proporciones de cada compuesto utilizado se muestran en la Tabla 1), se mezclaron hasta obtener una suspensión homogénea. Las placas se colocaron en una estufa a 37° C durante 4 horas.
3. *Prueba de cinética de degradación e hinchamiento.* Para la llevar a cabo las cinéticas de los materiales fue necesario preparar soluciones de HCl y NaOH 1M, así como papaína y PBS al 10%. Se tomaron tubos ependor a los cuales se les agregó 15 mL de cada una de las soluciones en un tubo diferente para después colocarse dentro de ellos 3 hidrogeles, los cuales se pesaron previamente y posterior a ello se pesaron diariamente hasta la desaparición completa de los hidrogeles.
4. *Prueba de Ninhidrina.* Se colocó un hidrogel en un tubo y se agregaron 5 mL de una solución de Ninhidrina al 1% para después ser colocada en un baño seco a 90°C durante

2 horas, al término de este tiempo se determinó la absorbancia en un equipo espectrofotómetro UV-visible.

5. *Determinación del porcentaje de adsorción de plomo.* La determinación de adsorción de plomo (II) se llevó a cabo colocando 5 mL de una solución de 50 ppm en tubos (5) y después de le agrego un hidrogel de cada formulación en cada tubo y se dejó reposar durante 24 horas. Al día siguiente el hidrogel fue extraído de la solución y se le agregaron 5 mL de una solución de yoduro de sodio, se colocó la solución con el precipitado amarillo en crisoles previamente tarados y se colocaron en una estufa a 50° C durante 24 horas. La determinación de adsorción se llevó a cabo por el método de precipitación por la diferencia de pesos.

Tabla 1. Proporción de componente utilizado en la preparación de hidrogeles

Muestra	Colágeno mL	Entrecruzante μL	Quitosano μL	PBS μL
Blanco	1	0	0	0
Col + PBS	1	0	0	200
Col + Q + PBS	1	0	20	200
Col + PPU10	1	10	20	200
Col + PPU20	1	20	20	200
Col + PPU40	1	40	20	200

III. RESULTADOS

A. Cinética de degradación e hinchamiento

La cinética de degradación e hinchamiento se muestran en las Fig. 1 para la formulación PPU10, Fig. 2 para la formulación PPU 20 y la Fig. 3 para la formulación PPU 40, en las cuales se observa que el hidrogel se degrada rápidamente a pH de 2 y 14 respectivamente debido a los radicales que son fácilmente dissociables en iones hidronio e hidroxilo.

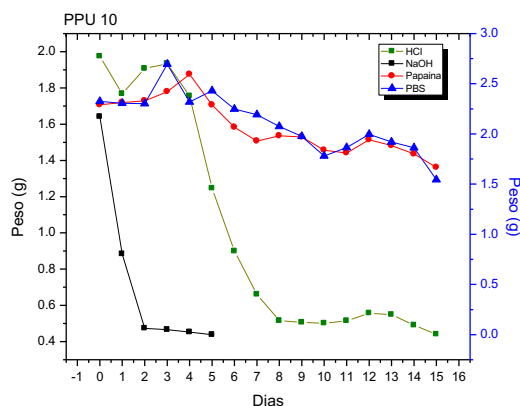


Fig. 1 Formulación PPU 10

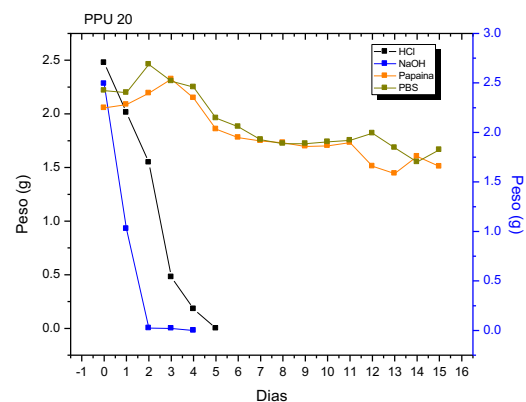


Fig. 2 Formulación PPU 20

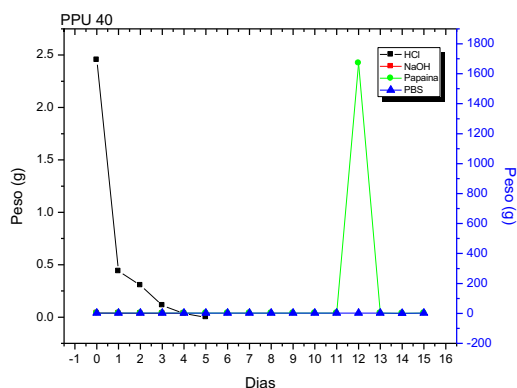


Fig. 3 Formulación PPU 10

B. Prueba de Ninhidrina

La prueba de ninhidrina se realiza para conocer el entrecruzamiento que hubo entre el colágeno con los otros componentes de la formulación y en la tabla 2 se observa que el hidrogel con 20 micro litros de entrecruzante es el que presenta mejor entrecruzamiento debido a la cantidad de poliuretano (entrecruzante) que contiene y si aumenta la cantidad de entrecruzante disminuye el valor de entrecruzamiento ya que la molécula tendría todos sus enlaces completos y no existiría lugar para sustituir átomos del entrecruzante en el colágeno.

$$\% \text{ entrecruzamiento} = \left(\frac{\text{Abs promedio}}{\text{Abs Blanco}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Tabla 2. Porcentaje de entrecruzamiento

Muestra	Abs (565 nm)	% de entrecruzamiento
Blanco	0	0
Col + PBS	0.978	-----
Col + Q + PBS	0.7785	20.399
Col + PPU10	0.399	59.203
Col + PPU20	0.3265	66.616
Col + PPU40	0.3475	64.469

C. Prueba de adsorción por precipitación

En la Fig. 4 se observa el porcentaje de adsorción de los hidrogeles y se aprecia que la formulación con 20 micro litros de entrecruzante es el que adsorbe mas Pb (II), ya que dicha formulación presenta el mejor entrecruzamiento dejando así sitios activos en donde se pueden adsorber los iones de dicho contaminante y si existe más cantidad de entrecruzante sería más difícil contener el plomo en los espacios libres de las moléculas del hidrogel.

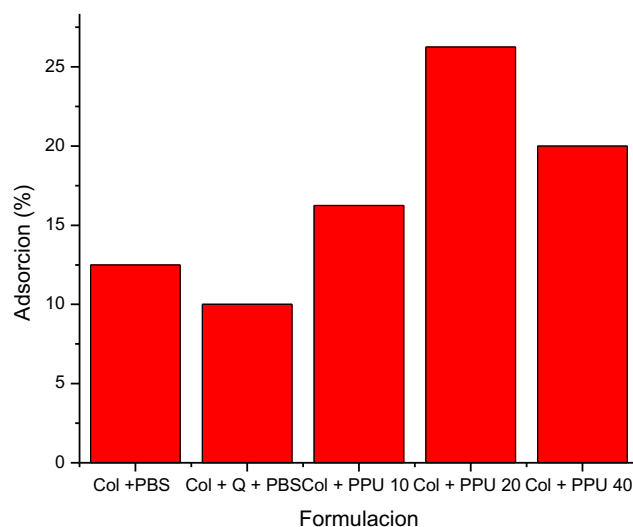


Fig. 4 Porcentaje de adsorción de hidrogeles

D. CONCLUSIONES

En este proyecto se propuso el diseño de un hidrogel basado en colágeno/quitosano/poliuretano para la remoción de iones Pb (II) un contaminante muy tóxico para la salud humana que si sobrepasa los límites permisibles podría ocasionar una serie de complicaciones para las personas.

Se evaluó el porcentaje de adsorción de Pb (II) de cada formulación diseñada y los resultados obtenidos mostraron que la formulación óptima es la que contiene 20 μ L de entrecruzante (poliuretano) ya que esta tiene más sitios activos donde puede situarse dicho ion, ya que la molécula no esta tan cargada en sus enlaces.

Este proyecto resulta innovador, económico y fácil de realizarse y sería una gran contribución a la ciencia para el cuidado del medio ambiente.

E. RECONOCIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento al departamento de Materiales Avanzados de la Facultad de Ciencias Químicas, en el cuál estuve realizando la estancia del verano, a la Dra. Lucia Cano Salazar por brindarme apoyo y ampliar mis conocimientos en esta rama de la ciencia y al CONACyT por las facilidades y el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano.

REFERENCIAS

- [1] Cano, "Obtención de Manganita, Pirrolusita y Magnetita y de sus Compositos con Sílice: Evaluación como Materiales Adsorbentes de Cobre y Arsénico", UAdeC, Saltillo, Coahuila, 2014.
- [2] C. Tejada-Tovar, Á. Villabona-Ortiz, y L. Garcés-Jaraba, "Adsorción de metales pesados en aguas residuales usando materiales de origen biológico", *Tecnología*, vol. 18, N.º 34, p. 109, ene. 2015.

- [3] Y. C. Reyes, I. Vergara, O. E. Torres, M. Díaz, y E. E. González, "CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS: IMPLICACIONES EN SALUD, AMBIENTE Y SEGURIDAD ALIMENTARIA", *Ing. Investig. Desarro.* vol. 16, n.º 2, Sep. 2016.
- [4] N. Abdullah, N. Yusof, W. J. Lau, J. Jaafar, y A. F. Ismail, "Recent trends of heavy metal removal from water/wastewater by membrane technologies", *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 76, pp. 17-38, ago. 2019.
- [5] M. Zuber, F. Zia, K. M. Zia, S. Tabasum, M. Salman, y N. Sultan, "Collagen based polyurethanes—A review of recent advances and perspective", *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 80, pp. 366-374, Sep. 2015.
- [6] J. A. Claudio-Rizo, L. Espíndola-Serna, J. J. Becerra-Rodríguez, L. F. Cano-Salazar, y F. Guía, "Recent Advances in the Synthesis and Applications of Collagen Based Hydrogels: A Review", vol. 3, N.º 2, p. 45, 2019.

Diseño de hidrogeles de colágeno para aplicación en la remoción de iones Pb (II)

Carlos Alejandro González Carbajal
 Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de
 Ciencias Químicas
 Ing. J. Cardenas Valdez S/N, República, 25280
 Saltillo, Coah.
gonzalez-carlos@uadec.edu.mx

Asesora: Lucía Fabiola Cano Salazar
 Universidad Autónoma de Coahuila,
 Facultad de Ciencias Químicas
 Ing. J. Cardenas Valdez S/N, República, 25280
 Saltillo, Coah.
lucia.cano@uadec.edu.mx

Resumen — Se realizaron extracciones de colágeno a partir de matrices de residuales de la industria alimentaria para la elaboración de hidrogeles para la adsorción de iones Pb^{+2} . Se realizaron cinco tipos de formulación de hidrogeles los cuales fueron sometidos a un tratamiento por 24 horas con una solución estándar de Pb^{2+} . Posteriormente con una precipitación con yoduro de sodio, se obtuvo la masa del plomo no adsorbido por cada formulación de hidrogel. Se realizaron además cinéticas de hinchamiento y degradación de las formulaciones de los hidrogeles con entrecruzante sometiéndolas a tratamientos con soluciones de NaOH, HCl, PBS y papaína por 15 días. Se obtuvo además el porcentaje de entrecruzamiento mediante la reacción de cada formulación de hidrogel con ninhidrina, la cual fue leída en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 565 nm.

Palabras clave — Colágeno, Adsorción, Plomo, Precipitación.

Abstract — Collagen extractions were made from matrices of residues of the food industry for the preparation of hydrogels for the adsorption of $Pb + 2$ ions. Five types of hydrogel formulation were performed which were subjected to a 24-hour treatment with a standard solution of Pb^{2+} . Subsequently with a precipitation with sodium iodide, the mass of unadsorbed lead was obtained for each hydrogel formulation. Swelling and degradation kinetics of hydrogel formulations with crosslinking were also performed by subjecting them to treatments with NaOH, HCl, PBS and papain solutions for 15 days. The cross-linking percentage was also obtained by reacting each hydrogel formulation with ninhydrin, which was read on a UV-Vis spectrophotometer at a wavelength of 565 nm.

Keywords — Collagen, Adsorption, Lead, Precipitation.

I. INTRODUCCIÓN

Se denomina contaminación a la acción de deposición de sustancias, compuestos o elementos que en un medio determinado, provocan que este no sea seguro o apto para su uso, dejándolo en estado peligroso para quien lo consuma o inservible. Entre los medios más susceptibles a la contaminación y más utilizados por el ser humano se encuentra el agua, compuesto que se utiliza, no solo para el consumo humano, sino que también para la producción de bienes, entre ellos la industria. Prácticamente todas las actividades productoras de bienes generan subproductos no deseados que terminan generando contaminación en el agua. Entre algunos de estos contaminantes se encuentran microorganismos patógenos, materia orgánica y metales pesados. (UNESCO, 2017).

Los metales pesados son aquellos elementos que poseen densidades muy altas. Estos metales se consideran contaminantes debido a que no son biodegradables y tienden a acumularse en los organismos vivos. La presencia de estos metales en agua se puede deber a fenómenos de dilución, suspensión y acumulación en cantidades muy pequeñas. Entre los metales pesados destacan por su toxicidad el mercurio, el cadmio y el plomo. El plomo es utilizado en la fabricación de tanques de almacenamiento, pipas, tuberías, soldaduras,

pinturas y equipos resistentes a la corrosión. También se utilizaba antes para la fabricación de gasolinas pero actualmente se encuentran prohibidas. (González M. et. al 2004)

Se puede encontrar plomo en el agua de la lluvia por arrastre de contaminantes atmosféricos como la combustión de combustibles que lo contengan, y en depósitos de agua al desecharse residuos de industrias. (Jiménez B. et. al 2001)

El plomo es considerado como un veneno fuerte y acumulativo en los seres humanos, pues afecta los sistemas hematopoyético y nervioso. En concentraciones de 2 a 4 mg/L resulta dañino a la larga y concentraciones de 15 mg/L resulta fatal durante varias semanas. (Jiménez B. et. al 2001)

De manera que para poder eliminar residuos de metales pesados en el agua, se ha incrementado la importancia del desarrollo de tecnología para eliminar metales pesados. Se ha proporcionado mediante la literatura las tecnologías de tratamiento de aguas segundas de su capacidad de captura de metales pesados a partir de efluentes industriales además del desempeño del tratamiento, su capacidad de remediación y los probables impactos ambientales y de salud. (Femina C. et. al 2017)

Por ejemplo se ha considerado el uso de nanotubos de carbono (CNT), un miembro de la familia estructural de fullereno, para la remoción de los metales pesados en el agua, considerando variables como el pH, dosis de tratamiento, temperaturas y tiempo. (Ihsanullah et. al 2016)

Se ha probado por ejemplo también el uso de hidrogeles a partir de quitosano para la extracción de metales como el cobre en soluciones acuosas mediante la adsorción. (Sánchez R. et. al 2017)

Un hidrogel es un tipo de material de base polimérica caracterizado por su extraordinaria capacidad para absorber agua y diferentes fluidos. La hidrofilia de estos es debido a grupos como: -OH, -COOH, -CO-NH₂, y -SO₃H afines al agua. Esta propiedad de absorber agua les convierten en materiales de enorme interés. Estos hidrogeles se obtienen mediante polimerización y entrecruzamiento simultáneo de uno o varios monómeros mono o polifuncionales. (J.L. Escobar. et. al 2002).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. *Materias primas*

El colágeno se extrajo de la matriz de fuentes naturales, provenientes de desechos de la industria alimenticia

Para la extracción del quitosano se sometió a un proceso de descelularización el exoesqueleto de camarón comercial, obteniendo quitina que posteriormente fue sometida a un proceso de desacetilación en medio básico.

B. Soluciones y reactivos

Se prepararon soluciones de buffer de fosfatos a pH de 7.4 (PBS), Papaína, NaOH y HCl a concentraciones de 1M respectivamente.

Se sintetizó un entrecruzante con grupos uretano con HDI (Hexaetilendiisocianato) y Polietilenglicol.

C. Formulación de los hidrogeles

Para la formulación de los hidrogeles se tomaron 1 ml de colágeno extraído y se colocaron en placas de cultivo de 24 pozos, donde se agregaron 20 μ L del quitosano obtenido, se le agregaron también 200 μ L de PBS y se adicione también un entrecruzante con grupos uretano, las cuales sus cantidades variaron de 10, 20 y 40 μ L. Se formularon también hidrogeles sin entrecruzante, solo con colágeno y PBS y otra más con colágeno, PBS y quitosano. Los hidrogeles se dejaron reposar en una incubadora a 38 °C por 24 horas.

D. Pruebas de degradación e hinchamiento

Se tomaron tres hidrogeles de cada cantidad de entrecruzante y se pesaron en una balanza analítica, una vez registrado su masa, los hidrogeles se colocaron en tubos de ensaye graduados de 50 mL con tapa y se les agregaron 15 mL de las soluciones de NaOH, HCl, PBS y Papaína.

Se dejaron reposar por 24 horas y se volvían a pesar, se le quitaba la solución anterior y se le ponía una nueva cantidad. Esto se repitió por 15 días, registrando la variación de la masa de los hidrogeles, de acuerdo a su concentración de entrecruzante y la solución que contenía.

E. Porcentaje de entrecruzamiento

Se tomó un hidrogel de cada formulación y se colocó en un tubo de ensayo en el cual se le adicionaron 1 mL de ninhidrina al 1% y se dejaron en baño de temperatura a 90°C por 2 horas. La solución resultante se filtró y se diluyó en 2 mL de agua, posteriormente se agitaron los tubos y se llevaron a leer en un espectro UV-Vis a una longitud de onda de 565 nm.

F. Adsorción de plomo

Se tomó un hidrogel y se colocó en un tubo de ensaye de 15 mL y se le agregó 5 mL de una solución estándar de Nitrato de plomo, esto se realizó por duplicado para las cinco formulaciones de hidrogel. Se dejaron reposar los tubos por 24 horas y posteriormente se le agregó a cada tubo 5 mL de yoduro de potasio, se agito el tubo y el líquido obtenido fue filtrado del hidrogel y depositado en un crisol previamente tarado. El crisol se dejó secar en una estufa a 80°C por 24 horas. Después de haberse secado el líquido, los crisoles se pesaron y por diferencia de masa se obtuvo cuanto plomo no fue adsorbido por el hidrogel.

III. RESULTADOS

A. Pruebas de degradación e hinchamiento

En las figuras 1, 2,3 y 4 se muestran gráficamente la degradación de los hidrogeles con diferente concentración de entrecruzante a diferentes soluciones por 15 días, siendo el eje de las y el cambio de masa en el transcurso de los días.

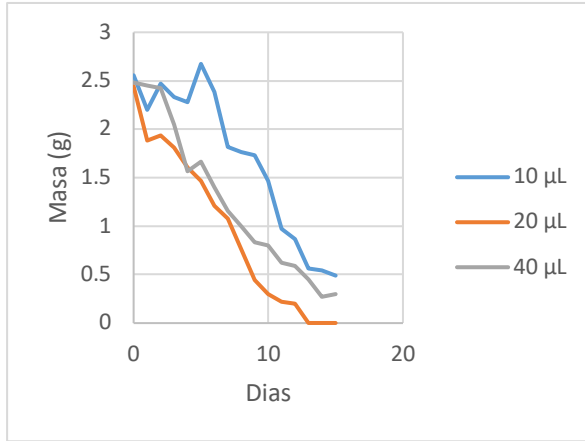


Fig. 2 Degradación e hinchamiento con HCl

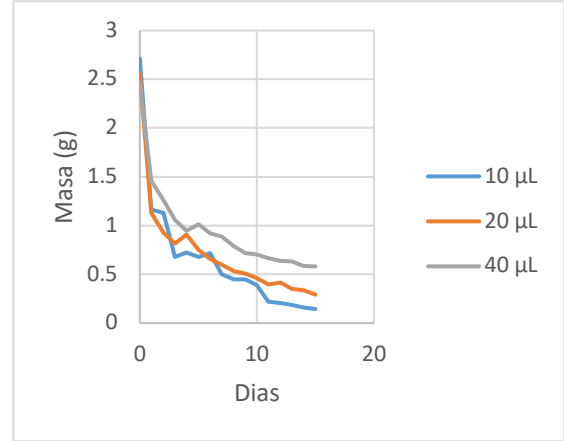


Fig. 1 Degradación e hinchamiento con NaOH

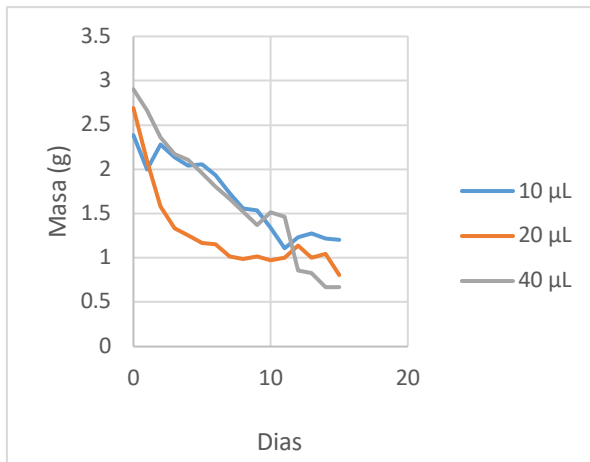


Fig. 3 Degradación e hinchamiento con PBS

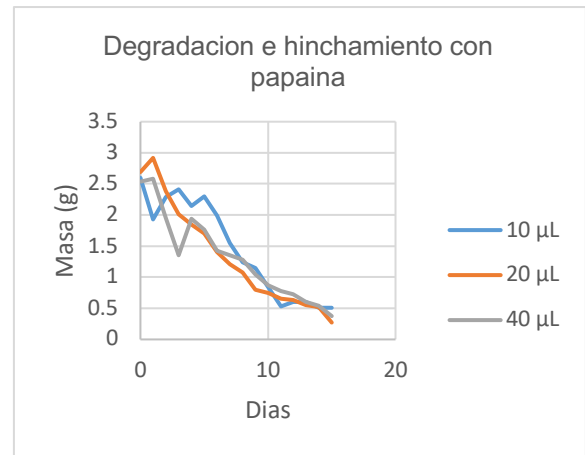


Fig. 4 Degradación e hinchamiento con papaína

B. Porcentaje de entrecruzamiento

El porcentaje de entrecruzamiento del hidrogel se calculó con la ecuación (1).

$$\%Entrecruzamiento = \left(\frac{Absorbancia\ del\ gel}{Absorbancia\ del\ blanco} \times 100 \right) - 100 \quad (1)$$

donde:

La absorbancia del blanco corresponde a la del hidrogel solo con colágeno y PBS

Se le resta 100 a la formula pues sin esto solo se consigue el porcentaje de grupos amino libres. Con esta corrección se obtiene el porcentaje de grupos amino entrecruzado del gel.

Como el hidrogel elaborado con colágeno y PBS se toma como blanco y no presenta entrecruzamiento al ser solo esa formulación

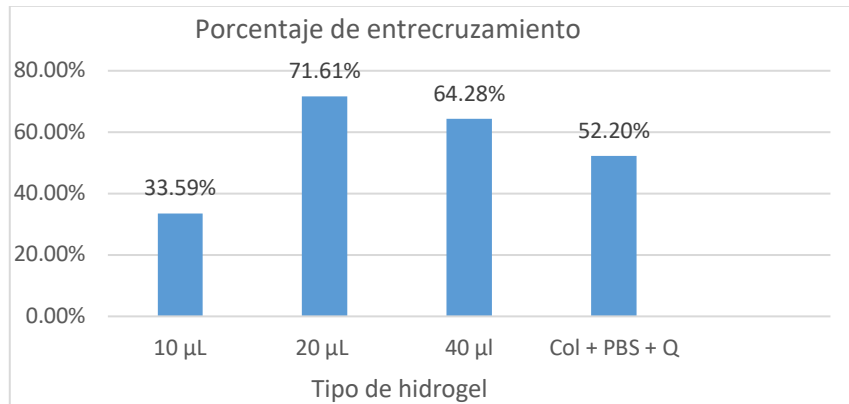


Fig. 5 Porcentaje de entrecruzamiento de los hidrogeles

C. Adsorción de plomo

El porcentaje de adsorción de plomo se calculó con la ecuación (2)

$$\% \text{Adsorción de plomo} = \left(\frac{\Delta}{40} \times 100 \right) - 100 \quad (2)$$

donde:

Δ es el promedio de la masa de plomo precipitada que no se adsorbió al hidrogel, 40 corresponde a una corrección de masa por las sales producidas que no contienen plomo y la resta de 100 corresponde a una corrección para obtener el plomo adsorbido, sin esta se obtendría el porcentaje de plomo precipitado.

Los porcentajes de adsorción se presentan en la siguiente figura.

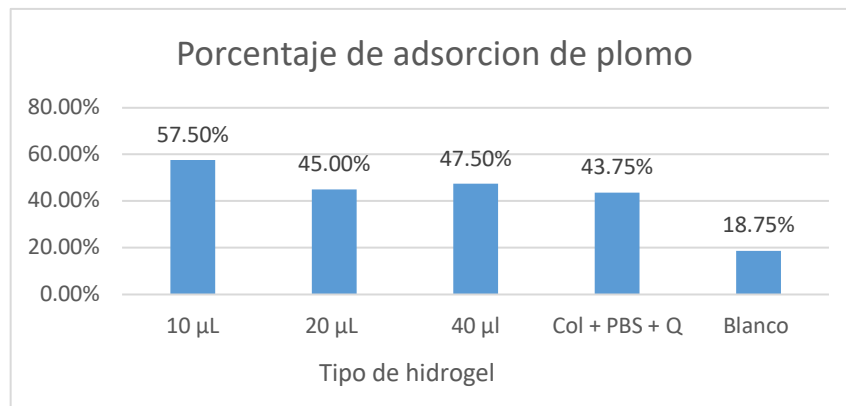


Fig. 6 Porcentaje de adsorción de plomo de cada hidrogel

IV. ANALISIS DE RESULTADOS

A. Pruebas de degradación e hinchamiento

Como se muestra en las figuras 1, 2, 3 y 4 todas las formulaciones de hidrogeles con sus respectivas soluciones exceptuando la de NaOH sufrieron al inicio un aumento de masa, que al pasar de los días fue gradualmente bajando.

Se pudo observar una mayor estabilidad de los hidrogeles en las soluciones de PBS y Papaína donde la masa aumentaba al inicio un poco para que en el transcurso de los días fuera degradándose continuamente. Exceptuando la formulación de hidrogel de 20 μL de entrecruzante que muestra una caída de masa considerable, probablemente por errores al momento de manipular ocasionando pérdidas de masa considerables y no por degradación.

Por el otro lado los hidrogeles en las soluciones de HCl y NaOH presentan degradaciones distintas, la del ácido presenta una parecida a la papaína pero con mayor pérdida de masa, llegando una de sus formulaciones a la degradación total antes de los 15 días. La del NaOH presenta una degradación inmediata en sus primeros días, y no es hasta los 6 días que empieza a degradarse con más lentitud.

B. Porcentaje de entrecruzamiento

Al ser la ninhidrina un agente que reacciona con los aminoácidos presentes en el colágeno, este da una coloración que es violeta o azulada, cómo reacciona con los grupos amino libres, es decir los no entrecruzados, la espectrofotometría UV-Vis permite detectarlos.

El hidrogel que presenta el mayor porcentaje de entrecruzamiento es el que tiene la formulación de 20 μL con un 71.61 % siendo seguido por la formulación de 40 μL , luego la formulación sin entrecruzante y con quitosano y finalmente la formulación con 10 μL de entrecruzante. Se encuentra entonces que no es necesaria una mayor cantidad de entrecruzante para que las moléculas del colágeno queden entrecruzadas, pues con cantidades de 20 a 40 μL no cambia mucho el porcentaje de entrecruzamiento.

C. Adsorción de plomo

Se encontró que no todo el plomo pudo ser adsorbido por los hidrogeles, sin embargo al menos casi la mitad sí que se retuvo en el hidrogel, siendo la formulación de 10 μL la que más plomo pudo retener comparado con las demás formulaciones.

Muy seguramente esto tenga relación con los porcentajes de entrecruzamiento de los hidrogeles, al tener la formulación de 10 μL un menor porcentaje de entrecruzamiento, tiene más grupos amino libre que pueden retener al plomo, mientras que las formulaciones de 20, 40 μL y la que tiene quitosano sin entrecruzante que presentan porcentajes de entrecruzamiento cercanos, también presentan porcentajes de retención de plomo similares por esta misma razón de los grupos amino libres.

Por otro lado el blanco retiene una baja cantidad de plomo, quizás por el hecho de que no esté entrecruzado lo suficiente para poder retener al plomo, careciendo de resistencia para esto pese a tener grupos amino libres. Esto se refuerza aún más con los resultados de la prueba de degradación, donde la formulación de 10 μL tiene una resistencia mayor a las

demás formulaciones, por lo que así el hidrogel es más resistente, a diferencia de uno sin entrecruzante.

V. CONCLUSIONES

De todas las formulaciones de hidrogeles realizadas, la que tiene solo 10 μL de entrecruzante es la que resulta con mayor adsorción de plomo y con mayor estabilidad a degradarse exceptuando soluciones alcalinas, el resto de formulaciones no presenta una menor adsorción respecto a la de 10 μL , sin embargo el que tengan más cantidad de entrecruzante no aumenta la adsorción del plomo.

Por lo que la formulación de hidrogel con 10 μL de entrecruzante resulta la más óptima para remover Pb^{+2}

VI. RECONOCIMIENTOS

A los doctores Jesús Alejandro Claudio Rizo, Lucia Fabiola Cano Salazar y Tirso Emmanuel Flores Guía por apoyarnos y brindarnos apoyo durante la estancia a mí y a mis compañeras, además de recibirnos abiertamente.

A la Ing. Nidia Guadalupe Burciaga Montemayor de igual manera por guiarnos y apoyarnos durante la estancia de buena manera.

A mis compañeras de estancia Grecia y Teresa por apoyarme también y brindarme ayuda cuando tenía dudas

REFERENCIAS

- UNESCO. (2017). Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos (WWAP). 13/08/2019, de UNESCO Sitio web: <http://www.unesco.org/new/es/natural-sciences/environment/water/wwap/facts-and-figures/all-facts-wwdr3/fact-15-water-pollution/>
- González M., Pérez A., Rodríguez F., (2004). Contaminación ambiental: una visión desde la química. España: Paraninfo.
- Jiménez B. (2001). La Contaminación Ambiental en México. México: Limusa.
- Femina C., Senthil P., Saravanana Janet G., Naushadb Mu.. (2017). Efficient techniques for the removal of toxic heavy metals from aquatic environment: A review. Journal of Environmental Chemical Engineering, 5, 2782-2799. 13/08/2019, De ScienceDirect Base de datos.
- Ihsanullah., A. Abbas., M. Adnan., T. Laoui., J. Mohammed., S. Mustafa., K Majeda., M. Ali. (2016). Heavy metal removal from aqueous solution by advanced carbon nanotubes: Critical review of adsorption applications. Separation and Purification Technology, 157, 141-161. 13/08/2019, De ScienceDirect Base de datos.
- Sánchez R., Martínez M., Correa M., Saldívar J., Sánchez D., & López, J.. (2017). SÍNTESIS DE HIDROGELES DE QUITOSANO A PARTIR DE CÁSCARA DE CAMARÓN PARA ENSAYOS DE ADSORCIÓN DE COBRE. Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 33, 93-98. 13/08/2019, De Google Académico Base de datos.
- J.L. Escobar., D.M. García., D. Zaldivar., I. Katime . (2002). HIDROGELES. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS EN EL DISEÑO DE SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS. Revista Iberoamericana Polímeros, 33, 25.

Diseño de hidrogeles de colágeno y quitosano para aplicación en la remoción de iones Pb (II)

Grecia Daniela Ortiz Hernández

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
Departamento de Botánica
Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, 25315
Saltillo, Coah.
grecia.ortiz99@gmail.com

Asesora: Lucía Fabiola Cano Salazar

Universidad Autónoma de Coahuila
Facultad de Ciencias Químicas
Ing. Cárdenas Valdez S/N, República, 25280
Saltillo, Coah.
lucia.cano@uadec.edu.mx

Resumen — La contaminación por metales pesados es un problema creciente en el mundo y en México causando enfermedades crónicas y degenerativas en niños y adultos que están en contacto frecuente con fuentes de ellos, es por eso que en este trabajo se implementaron hidrogeles de colágeno (obtenidos de tendón de cerdo) con quitosano para su estudio como posibles adsorbentes de iones de Pb^{+2} , una nueva formulación para probar en el sector de remediación ambiental. Se trabajó con 5 formulaciones de las cuales 2 tuvieron la capacidad de adsorber hasta 65% de Pb^{+2} . Se realizaron pruebas de hinchamiento y degradación para probar la resistencia de la matriz polimérica en diferente pH: 1, 7, 7.4 y 14, siendo el más susceptible el medio con mayor concentración de radicales OH^{-1} .

Palabras clave — hidrogeles de colágeno y quitosano, técnicas de remoción de Pb^{+2} , adsorción

Abstract — Pollution for heavy metals is a growing problem in the world and in Mexico causing chronic and degenerative diseases in children and adults who are in frequent contact with sources of them, that is why in this work collagen hydrogels (obtained from tendon were implemented of pork) with chitosan for its study as possible adsorbents of $Pb + 2$ ions, a new formulation to be tested in the environmental remediation sector. We worked with 5 formulations of which 2 had the capacity to absorb up to 65% of $Pb + 2$. Swelling and degradation tests were performed to test the resistance of the polymer matrix at different pH: 1, 7, 7.4 and 14, the medium with the highest concentration of OH^{-1} radicals being the most susceptible.

Keywords — collagen and chitosan hydrogels, Pb^{+2} removal techniques, adsorption

I. INTRODUCCIÓN

La contaminación por metales pesados en México es uno de los grandes retos por enfrentar actualmente, por lo que se buscan estrategias sostenibles para contrarrestar los efectos nocivos en seres humanos y el ecosistema en general.

Como definición de metales pesados podemos decir que son aquellos que tienen una densidad cinco veces mayor que el agua, aunado a esto (en concentraciones altas) tienen efectos tóxicos en los organismos vivos, ya que algunos no cumplen ninguna función fisiológica, no son degradables y pueden ser bioacumulados[1].

Las principales fuentes de contaminación por metales pesados provienen de la agricultura, la metalúrgica, los automóviles y la minería, siendo esta última la causa primordial ya que no se tiene un buen manejo de los residuos. Los estados más afectados son Zacatecas, San Luis Potosí, Guerrero y Sonora, sin embargo, se especula que podrían ser miles de toneladas de residuos que aún se desconoce su ubicación y las consecuencias que podrían implicar en el ecosistema.[2]

El plomo (Pb) es un metal del bloque p, se encuentra naturalmente en la corteza terrestre en forma de minerales como galena (PbS) y curocita (PbCO₃).

Al ser un catión divalente se une fácilmente a los grupos sulfhidrilos causando la desnaturalización de las proteínas. Además, promueve la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), dando lugar a grupos OH⁻¹.

Al estar en contacto con los acuíferos y las actividades agrícolas el plomo entra a la cadena trófica, pasando desde los productores primarios hasta los consumidores cuaternarios. Al tener una concentración igual o mayor de 5 µg/dL en niños y 10 µg/dL en adultos, se presentan daños en los sistemas inmunológico, nervioso y reproductivo, afectando principalmente la espermatogénesis, disminución del desarrollo cognitivo, además de producir preeclampsia potenciando el aborto [3], [4].

Al conocer las consecuencias del plomo en el ambiente se han desarrollado técnicas de remediación, algunas de ellas son: fitorremediación, ósmosis inversa, nanofiltración y adsorción.

Los hidrogeles de colágeno son una nueva alternativa para su aplicación como removedores de metales pesados debido a su eficiencia, bajo costo y amplia gama de fuentes para su extracción (huesos y tejido conectivo de mamíferos)[5].

Sin embargo, en la literatura consultada no existen materiales a base de colágeno reportados con aplicaciones ambientales, es por eso que en este proyecto se plantea el diseño de hidrogeles de colágeno y quitosano entrecruzado con poliuretano para la remoción de Pb⁺², pues se espera que los compositos formados presenten características que le permitan posicionarse como un buen material adsorbente.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. *Obtención de biopolímeros.*

Se extrajo colágeno proveniente de tendón de cerdo (CTC) por procesos de descelularización e hidrólisis ácida.

Para la extracción del quitosano, igualmente, se sometió a un proceso de descelularización el exoesqueleto de camarón comercial, obteniendo de esta forma la quitina, que posteriormente fue sometida a un proceso de desacetilización en medio básico.

B. *Síntesis de hidrogeles.*

Se trabajó con 5 placas de cultivo celular de 24 pozos con las siguientes formulaciones.

Tabla 1. Formulaciones de hidrogeles

Muestra	Colágeno mL	Entrecruzante μL	Quitosano (10%) μL	PBS μL
C+PBS	1	0	0	200
C+Q+PBS	1	0	20	200
C+PPU10	1	10	20	200
C+PPU20	1	20	20	200
C+PPU40	1	40	20	200

Después de agregar cada componente (excepto el colágeno) se agitó en zig-zag y entre las paredes del pozo para que quedara lo más homogéneo posible. Luego se procedió a meterlo en la incubadora por 4 horas a una temperatura de 38°C para posteriormente utilizarlos en las pruebas.

C. Caracterización

Entrecruzamiento. Se pusieron 10 tubos cónicos en baño seco con las 5 formulaciones mencionadas anteriormente agregando 5 ml de Ninhidrina al 1% a 90°C por 2 horas. Después se analizó en un espectrofotómetro de UV visible a una longitud de onda de 565 nm.

D. Pruebas de hinchamiento y degradación

Se tomó el peso por 14 días cada 24 horas de 3 formulaciones de hidrogeles sometidos en 4 tratamientos de: Ácido Clorhídrico 1M (AC), Hidróxido de Sodio 1M (NaOH), Papaína 140 unidades (P) y Buffer Fosfato Salino al 10% (PBS), agregando 15 ml en cada una de las formulaciones correspondientes.

E. Prueba de adsorción

Se agregaron 5 ml de solución de plomo a una concentración de 50 ppm en 10 tubos cónicos, haciendo por duplicado cada formulación y dejándolos reposar por 24 horas. Pasado el tiempo, se le agregó 5 ml de Yoduro de Sodio (NaI) a cada tubo y se filtró para después pasar la muestra de líquido a cápsulas de porcelana que se dejaron calentar por 24 horas en una estufa

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Entrecruzamiento

En la figura 1 se muestra el porcentaje de entrecruzamiento de 3 formulaciones, utilizando la ecuación (1) para obtener los resultados:

$$\% H/D = \frac{PI}{PF} \times 100 \quad (1)$$

donde %H/D = Porcentaje de Hinchamiento/Degradación en términos porcentuales, PI = Peso Inicial en gramos, PF = Peso Final en gramos.

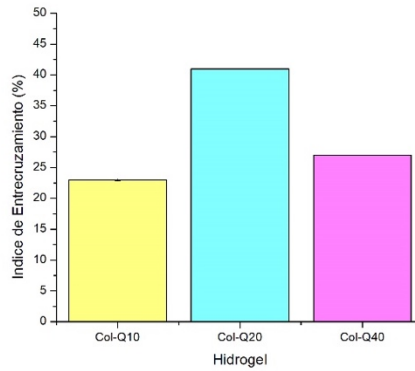


Figura 1. Porcentaje de Entrecruzamiento

Como se aprecia en la figura 1, la formulación Col-Q20 es la que obtuvo mayor índice de entrecruzamiento, esto quiere decir que tiene menos radicales aminos libres primarios (NH_2^-) por lo que la matriz está fuertemente conjugada. Un vire de color morado indica que hay mayor cantidad de radicales amino libres, por lo que el material tiene menor porcentaje de entrecruzamiento.

B. Hinchamiento y degradación.

En las figuras 2, 3, 4 y 5 se muestra el comportamiento de las formulaciones de hidrogeles en diferente pH. Se obtuvieron los resultados a partir de la ecuación (2).

$$\%E = \left(\frac{A \bar{X}}{A B} \times 100 \right) - 100 \quad (2)$$

donde: %E = Porcentaje de Entrecruzamiento en términos porcentuales, $A \bar{X}$ = Absorbancia promedio, AB = Absorbancia

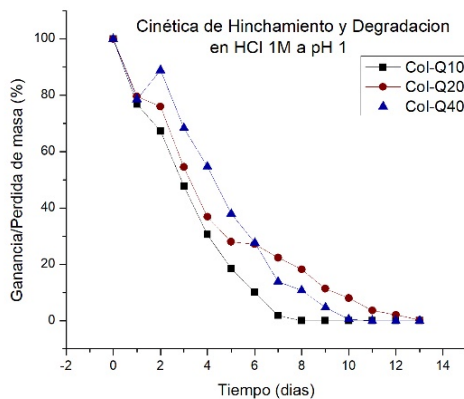


Figura 2. Hidrogeles en HCl

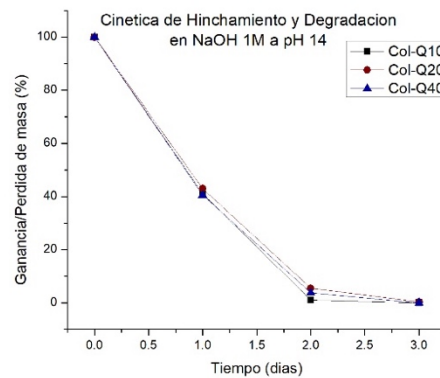


Figura 3. Hidrogeles en NaOH

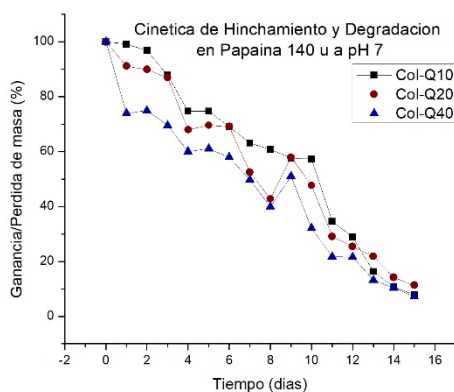


Figura 4. Hidrogeles en Papaina

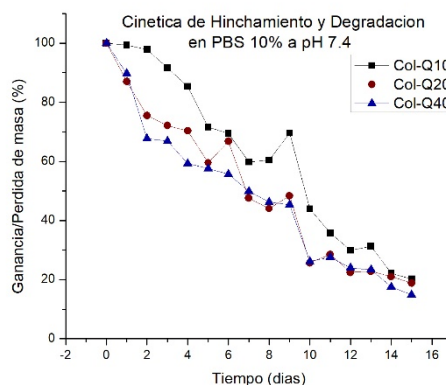


Figura 5. Hidrogeles en PBS

En la figura 2 se observa el comportamiento de los hidrogeles en el tratamiento de AC, en el día 2 la formulación Col-Q40 obtuvo su Capacidad de Hinchamiento Máximo (CHM) aumentando 219 mg. El tiempo de degradación de Col-Q10 fue de 8 días, de Col-Q20 fue de 14 días y de 11 días para Col-Q40.

En la figura 3 los hidrogeles se degradaron más rápido en NaOH que en los otros tratamientos ya que a pH 14 hay una alta concentración de iones OH⁻, los cuales aceleran la hidrólisis alcalina generando la degradación del colágeno. Las formulaciones Col-Q10 y Col-Q40 se degradaron en 3 días a diferencia de Col-Q20 que su tiempo fue de 4 días.

En la figura 4 el tratamiento con P Col-Q10 al cabo de 15 días su peso quedó en 159 mg, Col-Q20 en 229 mg y Col-Q40 en 168 mg. La segunda formulación obtuvo CHM en el día 9 aumentando 305 mg y la tercera formulación la obtuvo en el mismo día con 257 mg a favor.

En la figura 5 con PBS, las formulaciones Col+PPU10 y Col+PPU20 obtuvieron CHM en el día 9.

C. Adsorción.

En la figura 6 se muestra el porcentaje de adsorción de las 5 formulaciones, derivado de la utilización de la ecuación (3):

$$\% \text{ de APb} = \frac{40 - Pb R}{40} \times 100 \quad (3)$$

donde: % de APb= Porcentaje de Adsorción de Plomo (II), % Pb R= Plomo remanente, mg

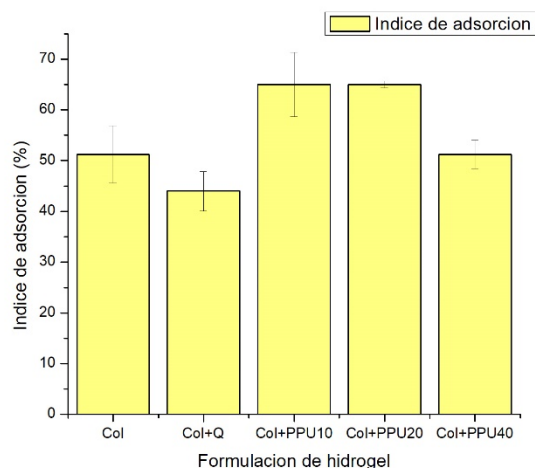


Figura 6. Porcentaje de adsorción

En la figura se puede observar que las formulaciones Col+PPU10 y Col+PPU20 presentan un 65% de adsorción y la formulación que presenta menor porcentaje de adsorción es la Col+Q con 44%.

IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La utilización de colágeno y quitosano para la composición de hidrogeles con aplicaciones ambientales puede ser una solución viable para la remoción de iones Pb^{+2} , ya que en las formulaciones PPU10 y PPU20 obtuvieron un 65% de adsorción. Los hidrogeles son más susceptibles a degradarse en medio básico por lo que se debe cuidar la concentración de iones OH^- en el ambiente de aplicación.

Los resultados obtenidos son prometedores para el área de remediación ambiental, pues los hidrogeles podrían ser utilizados en el tratamiento de aguas y suelo contaminado.

V. AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Alejandro Claudio, por su apoyo en la realización y entendimiento del proyecto desarrollado. A la Ing, Nidia Burciaga por guiarnos en los procedimientos y transmitirnos su experiencia. A la Dra. Lucía Cano por su amabilidad, acogimiento y enseñanzas en el ámbito químico. En general a la Universidad Autónoma de Coahuila por los equipos y materiales utilizados a lo largo de la estancia.

REFERENCIAS

- [1] N. Abdullah, N. Yusof, W. J. Lau, J. Jaafar, and A. F. Ismail, "Recent trends of heavy metal removal from water/wastewater by membrane technologies," *J. Ind. Eng. Chem.*, pp. 2–26, 2019.
- [2] S. A. Covarrubias and J. J. Peña Cabriaes, "CONTAMINACIÓN AMBIENTAL POR METALES PESADOS EN MÉXICO: PROBLEMÁTICA Y ESTRATEGIAS DE FITORREMEDIACIÓN," *Rev. Int. Contam. Ambient.*, vol. 33, pp. 7–21, 2017.

- [3] M. I. Azcona Cruz, R. Ramírez y Ayala, and G. Vicente Flores, "Efectos tóxicos del plomo," *Rev. Espec. Médico- Quirúrgicas*, vol. 20, no. 1, pp. 72–77, 2015.
- [4] J. Prieto Méndez, C. A. González Ramírez, A. D. Román Gutiérrez, and F. Prieto García, "Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua," *Trop. Subtrop. Agroecosystems*, vol. 10, no. 1, pp. 29–44, 2009.
- [5] J. A. Claudio Rizo, L. Espíndola Serna, J. J. Becerra Rodríguez, L. F. Cano Salazar, and T. E. Flores Guía, "Recent Advances in the Synthesis and Applications of Collagen Based Hydrogels : A Review," *Mediterr. J. Basic Appl. Sci.*, vol. 3, no. 2, pp. 54–98, 2019.

Diversidad de arañas sinantrópicas en la zona de Guadalupe-Zacatecas, Zacatecas, México

Fernández Domínguez Jessica Beatriz
Universidad Autónoma de Zacatecas
Unidad Académica de Ciencias Biológicas.
Lab. Colecciones Biológicas y Sistemática Molecular
Av. Preparatoria s/n, Col. Agronómica, C.P. 98066.
Zacatecas, Zacatecas.
jessica.fdzd@gmail.com

Asesor: Martínez Salazar Elizabeth Aurelia
Universidad Autónoma de Zacatecas
Unidad Académica de Ciencias Biológicas.
Lab. Colecciones Biológicas y Sistemática Molecular
Av. Preparatoria s/n, Col. Agronómica, C.P. 98066.
Zacatecas, Zacatecas.
eamsuaz@gmail.com

Resumen - El sinantropismo es la habilidad de los taxa en adaptarse, desarrollarse y reproducirse en ecosistemas antropizados. Las arañas han llegado a colonizar micro hábitats urbanos. Se desconoce esta diversidad en la zona de Guadalupe-Zacatecas, de ahí surge este trabajo, que es parte de estudio de biodiversidad de invertebrados del Laboratorio de Colecciones Biológicas y Sistemática Molecular de UAZ. Se procesó un total de 57 individuos, proporcionados por los habitantes de la zona, donde el 63% son juveniles, 23% hembras y 14% machos. La biodiversidad corresponde con 11 familias, 12 géneros y 6 morfotipos. El 26.3 % está representada por el género *Physocyclus*. Se sugiere explorar la diversidad de arañas en otras localidades del estado.

Palabras clave - Arácnidos, fauna urbana, taxonomía.

Abstract - Synantropism is the ability of taxa to adapt, develop and reproduce in anthropized ecosystems. Spiders have come to colonize urban micro habitats. This diversity is unknown in the Guadalupe-Zacatecas area, hence this work is part of the study of biodiversity of invertebrates of the Laboratory of Biological and Molecular Systematic Collections of UAZ. A total of 57 individuals were processed, provided by the inhabitants of the area, where 63% are juveniles, 23% females and 14% males. Biodiversity corresponds to 11 families, 12 genera and 6 morphotypes. 26.3% is represented by the genus *Physocyclus*. It is suggested to explore the diversity of spiders in other locations in the state.

Key words - Arachnids, urban fauna, taxonomy.

I. INTRODUCCIÓN

El proceso de urbanización transforma los sistemas naturales de una manera drástica e irreversible, reemplazando los componentes bióticos y abióticos creando nuevos hábitats artificiales para que muchas especies puedan cohabitar con el hombre (Desales-Lara et al., 2013). El fenómeno de sinantropismo se define como la habilidad que posee un organismo de adaptarse, desarrollarse y reproducirse, tanto en entorno silvestre, como en un ambiente con efecto antropogénico (Torres-Castro, 2017).

Los arácnidos están presentes en todos los biotipos terrestres y son potenciales bioindicadores (Ibarra, 2013; Melic, et al., 2015). Estos artrópodos han llegado a colonizar micro hábitats urbanos, adaptándose y sobreviviendo por las ventajas que encuentran, como no tener depredadores ni competidores en territorio y alimento (Duran-Barrón et al., 2009; Salazar-Olivo et al., 2015). Por sus características, las arañas son un taxa adecuado para el estudio del fenómeno de sinantropismo.

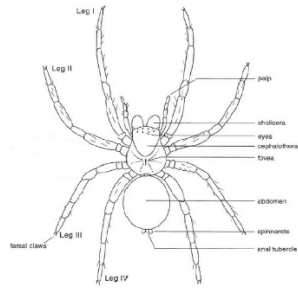


Figura 1 Morfología general de una araña. Vista dorsal (Jocqué et al., 2006).

Las arañas se caracterizan por un cuerpo dividido en dos segmentos; el cefalotórax (anterior) y el opistosoma (posterior), y la presencia de quelíceros terminados en uñas, comunicados con una glándula venenosa (Ubick et al., 2005) (Figura 1).

Existen poco más de 48,000 especies de arañas a nivel mundial (WSC, 2019), y en México se han registrado 2,300 especies, distribuidas en 534 géneros y 66 familias (Gonzales-Castillo et al., 2014).

Hasta el momento son pocos los trabajos que mencionan la diversidad de arañas sinantrópicas en el estado de Zacatecas (por ejemplo Hoffman, 1976; Richman et al., 2012). Como parte de un estudio de biodiversidad de invertebrados que se conduce en el Laboratorio de Colecciones Biológicas y Sistemática Molecular de UAZ se deriva este trabajo, que tiene como finalidad explorar la diversidad taxonómica de arañas en la zona conurbada de los municipios de Guadalupe-Zacatecas, Zacatecas México.

II. MATERIAL Y MÉTODO

Zacatecas es un estado que se ubica políticamente en la región centro norte de los Estados Unidos Mexicanos (INEGI, 2013). El municipio de Zacatecas se ubica en el sureste del estado, colindando con los municipios de Calera, Morelos, Vetagrande, Guadalupe, Genaro Codina, Villanueva y Jerez. Su clima es semiseco templado. El suelo está cubierto principalmente por pastizal y matorral (INEGI, 2001). El municipio de Guadalupe colinda principalmente con el municipio de Zacatecas, Genaro Codina, Vetagrande, Pánuco, Villa de Cos, General Pánfilo Natera y Trancoso. Su clima es semiseco templado. En este municipio el territorio para agricultura es el predominante con casi el 50% del territorio, seguido de matorral, pastizal y bosque (INEGI, 2001) (figura 2).

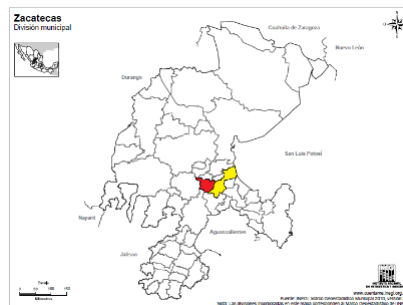


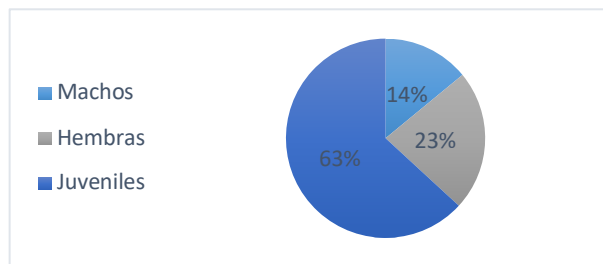
Figura 2 Área de estudio (Municipio de Guadalupe en color amarillo y Zacatecas en color rojo).

Se procesó un total de 57 individuos (arañas) recuperado y proporcionado por los habitantes de la zona conurbada de los municipios de Guadalupe-Zacatecas y donado al Laboratorio de Colecciones Biológicas y Sistemática Molecular de la UACB de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

El material biológico fue revisado morfológicamente con ayuda de un microscopio estereoscópico LABOMED CZM6 para su identificación taxonómica. Los caracteres morfológicos se compararon con el manual de identificación de Ubick et al. (2005) para determinar la familia y su nivel genérico. Se tomaron fotografías del material biológico con vista dorsal y de cuerpo completo en una cámara fotográfica marca Nikon modelo coolpix L830. Se presenta una breve descripción taxonómica del material identificado a nivel supraespecífico (Durán-Barrón, 2004; Ubick et al. 2005).

III. RESULTADOS

El material biológico procesado pertenece al suborden Araneomorphae, el cual tiene tanto hábitos diurnos y nocturnos (Ubick et al., 2005). El total de arañas revisadas fue 57 individuos, de las cuales en su mayoría son de estadio juvenil (Gráfica 1).



Gráfica 1. Distribución proporcional de estadios de desarrollo del material biológico.

Se identificó taxonómicamente un total de 11 familias, que corresponden con 12 géneros y 6 morfotipos (Listado biótico en tabla 1). Se presenta listado biótico de las arañas sinantrópicas de la zona conurbada de Guadalupe-Zacatecas, Zacatecas y posteriormente una breve descripción taxonómica (Tabla 1).

Tabla 1 Listado sistemático de diversidad encontrada.

AGELENIDAE CL Koch, 1837
<i>Agelenidae</i> sp. ¹ (♀=0, ♂=0, J=3).
<i>Tegenaria</i> Latreille, 1804 (♀=1, ♂=0, J=3) (figura 3k)
<i>Rualena</i> Chamberlin & Nie, 1942 (♀=0, ♂=1, J=0) (figura 3i)
ANYPHAENIDAE Bertkau, 1878
<i>Lupettiana</i> Brescovit, 1997 (♀=0, ♂=0, J=1) (figura 3f)
DYSDERIDAE CL Koch, 1837
<i>Dysdera</i> Latreille, 1804 (♀=0, ♂=2, J=0) (figura 3b)
GNAPHOSIDAE Pocock, 1898
<i>Gnaphosidae</i> sp. ¹ (♀=0, ♂=0, J=3)
<i>Herpyllus</i> Hentz, 1832 (♀=0, ♂=2, J=5) (figura 3d)
LYCOSIDAE Sundevall, 1833
<i>Lycosidae</i> sp. ¹ (♀=0, ♂=0, J=2) (figura 3m)
NESTICIDAE Simon, 1894
<i>Gaucelmus</i> Keyserling, 1884 (♀=0, ♂=2, J=7) (figura 3c)

Tabla 1 Listado sistemático de diversidad encontrada (continuación).

PHOLCIDAE CL Koch, 1850
<i>Pholcidae</i> sp. ¹ (♀=0, ♂=0, J=1)
<i>Physocyclus</i> Simon, 1893 (♀=5, ♂=6, J=4) (figura 3g)
<i>Psilochorus</i> Simon, 1893 (♀=1, ♂=0, J=0) (figura 3h)
SALTICIDAE Blackwall, 1841
<i>Salticidae</i> sp. ¹ (♀=0, ♂=0, J=2)
<i>Chalcoscirtus</i> Bertkau, 1880 (♀=1, ♂=0, J=0) (figura 3a)
THERIDIIDAE Sundevall, 1833
<i>Theridiidae</i> sp. ¹ (♀=0, ♂=0, J=2)
<i>Latrodectus</i> Walckenaer, 1805 (♀=0, ♂=0, J=1) (figura 3e)
THERIDIOSOMATIDAE Simon, 1881
<i>Theridiosoma</i> O. Pickard-Cambridge, 1879 (♀=0, ♂=0, J=1) (figura 3l)
THOMSIDAE Sundevall, 1833
<i>Synema</i> Simon, 1864 (♀=0, ♂=0, J=1) (figura 3j)

- Familia **Agelenidae** Koch, 1835: Son arañas con ocho ojos. Sus patas están fuertemente espinadas y con tres uñas (Durán-Barrón, 2004).
- Familia **Anypheidae** Bertkau, 1878: Son arañas de tamaños muy diversos, se les conoce como “arañas fantasma” por sus rápidos movimientos. Estas arañas tienen ocho ojos (Durán-Barrón, 2004).
- Familia **Dysderidae** Koch, 1837: Son arañas aproximadamente de 25 mm, presentan seis ojos. De colores blancuzcos y sin marcas o patrones de manchas. Tienen patas largas y con dos uñas (Durán-Barrón, 2004).
- Familia **Gnaphosidae** Pocock, 1898: La mayoría de color café claro a negro, presentan ocho ojos del mismo tamaño. Son de hábitos nocturnos y durante el día permanecen refugiadas en sus telarañas (Durán-Barrón, 2004).
- Familia **Lycosidae** Sundevall, 1833: Son mejor conocidas como “arañas lobo”, de entre 3.5 a 35 mm. Tienen ocho ojos dispuestos en tres filas. Se alimentan principalmente de insectos (Durán-Barrón, 2004).
- Familia **Nesticidae** Kock, 1847: Son arañas de entre 1.8 y 10 mm. De colores grisáceos y con ocho ojos (Ubick et al. 2005).
- Familia **Pholcidae** Koch, 1850: Conocidas coloquialmente como “arañas patonas”, su principal característica son sus patas muy largas, delgadas y flexibles. Son de color café amarillizo (Durán-Barrón, 2004).
- Familia **Salticidae** Blackwall, 1841: Son de las arañas más diversas y cosmopolitas. Tienen cuatro pares de ojos; los anteriores medios son muy grandes y están proyectados hacia el frente. Estas arañas tienen una característica forma de desplazarse mediante “saltos” (Durán-Barrón, 2004).
- Familia **Theridiidae** Sundevall, 1833: Poseen ocho ojos, con los laterales generalmente en diadas. Estas arañas pueden ser encontradas en el suelo, encima o debajo de rocas, entre la vegetación, la hojarasca, sobre la corteza de los árboles, en lugares sombríos o colgando en posición invertida sobre su telaraña irregular (Durán-Barrón, 2004).
- Familia **Theridiosomatidae** Simon, 1881: Arañas pequeñas de entre 1.3 y 2.4 mm. Con patrones de diferentes colores en el abdomen y presentan ocho ojos (Ubick et al. 2005).
- Familia **Thomsidae** Sundevall, 1833: Estas arañas son de diversas formas y colores. Son mejor conocidas como arañas “cangrejo” y presentan ocho ojos de diferente tamaño dispuestos en dos filas. Los dos primeros pares de patas son más largas que el resto (Durán-Barrón, 2004).



Figura 3 Diversidad genérica. a. *Chalcoscirtus* b. *Dysdera* c. *Gaucelmus* d. *Herpyllus* e. *Latrodectus* f. *Lupettiana* g. *Physocyclus* h. *Psilochorus*. i. *Rualena* j. *Synema* k. *Tegenaria* l. *Theridiosoma* m. *Lycosidae* sp.¹.

IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La familia con mayor número de géneros son Agelenidae y Pholcidae con 2 géneros, el género con mayor número de organismos es *Physocyclus* con 15 organismos. Las familias con el menor número de representantes son Anyphaenidae, Theridiosomatidae y Thomsidae con solo un individuo juvenil. No fue posible la identificación de 13 organismos a género ya que las claves taxonómicas en estas familias se basan mayormente en los rasgos sexuales, como es el caso para Lycosidae.

V. CONCLUSIÓN

De las 13 familias, Pholcidae representa el 30% del total revisado. La diversidad taxonómica encontrada coincide con la diversidad sinantrópica de arañas reportadas en México. Se sugiere explorar la diversidad de arañas sinantrópicas en otras localidades del estado, lo que permitirá conocer la riqueza biótica en Zacatecas.

VI. AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Zacatecas y al Comité Organizador del 21° Verano de la Ciencia de la Región Centro (2019), por el apoyo otorgado a esta estancia de investigación. A los habitantes de los municipios de Guadalupe y Zacatecas por proporcionar el material biológico. Este trabajo forma parte del proyecto UAZ- UAZ-2016-37096, responsable EAMS.

REFERENCIAS

- Durán-Barrón, C. G. 2004. Diversidad de arañas (Arachnida: Araneae) asociadas a viviendas de la Ciudad de México (Área Metropolitana). Tesis de maestría. Distrito Federal, México. 242 p.
- Gonzales-Castillo, M. P., G. Pérez-Santiago y M. M. Correa-Ramírez. 2014. Inventario preliminar sobre el orden *Araneae* (Arachnida) en comunidades semiáridas de los valles de Durango, Dgo. México. *Entomología Mexicana* 1: 26-31.
- Hoffmann, A. 1976. Relación Bibliográfica Preliminar de las Arañas de México (Arachnida, Araneae). Publicaciones Especiales no. 3. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 117p.
- Ibarra, G. 2013. La diversidad en Chiapas: Estudio de Estado Volumen II. Editorial Impresora Apolo, S. A. de C. V., México D.F., 431 p.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2001. Cuaderno Estadístico Municipal, Zacatecas, Zacatecas. INEGI, México. 163 p.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2001. Cuaderno Estadístico Municipal, Guadalupe, Zacatecas. INEGI, México. 163 p.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2013. Conociendo Zacatecas. INEGI, México. 31 p.
- Melic, A, J. A. Barrientos, E. Morano y C. Urones. 2015. Orden Araneae. *Revista IDE@-SEA* 11: 1-13.
- Richman, D. B., B. Cutler y D. E. Hill. 2012. Salticidae of North America, including Mexico. *Peckamia* 95.3. 1-88.
- Salazar-Olivo, C. A. y C. Solís-Rojas. 2015. Araneofauna urbana (Arachnida: Araneae) de Ciudad Victoria, Tamaulipas, México. *Acta Zoológica Mexicana* 31(1): 55-66.
- Torres-Castro, M. A. 2017. ¿Son los roedores sinantrópicos una amenaza para la salud pública en Yucatán?. *Revista Biomédica* 28:1793-186.
- Ubick, D., P. Paquin, P.E. Cushing and V. Roth. 2005. Spiders of North America: an identification manual. American Arachnological Society. 377p.
- World Spider Catalog (2019). World Spider Catalog. Version 20.5. Natural History Museum Bern, online at <http://wsc.nmbe.ch>, accessed on august 2019. doi: 10.24436/2

Efecto alelopático de *Cyperus rotundus* L. (Cyperaceae) sobre plantas arvenses

María del Rocío Martínez Miranda

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato,
Departamento de Licenciatura en Biología.

Carretera Irapuato-Silao km 12.5,

Colonia El Copal, CP. 36821, Irapuato, Guanajuato.

IS15110225@es.itesi.edu.mx

Asesora: Victoria Hernández Hernández

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato,
Departamento de Licenciatura en Biología.

Carretera Irapuato-Silao km 12.5,

Colonia El Copal, CP. 36821, Irapuato, Guanajuato.

vihernandez@itesi.edu.mx

Resumen — *Cyperus rotundus* es una planta arvense que crece en cultivos y ocasiona daños por su alelopatía. Este trabajo evaluó el efecto alelopático en diferentes concentraciones de extractos de hoja y raíz-tubérculo a 25%, 50% y 100%, con un grupo control. Se obtuvieron semillas de cinco plantas arvenses *Taraxacum officinale*, *Sonchus oleraceus*, *Rumex triangulivalvis*, *Convolvulus arvensis* y *Malva parviflora*, se aplicaron los extractos durante 15 días, y al grupo control se agregó agua destilada. Los resultados mostraron que los extractos con efecto alelopático fueron T3H y T4H que corresponde a hoja, debido a que inhibió la germinación de casi el 50% de las semillas. La germinación fue diferente entre las especies, probablemente se debe la composición de la semilla y dormancia.

Palabras clave — aleloquímico, extractos, inhibición.

Summary — *Cyperus rotundus* is a weed plant that grows in crops and causes damage due to its allelopathy. This work evaluated the allelopathic effect in different concentrations of leaf and root-tuber extracts at 25%, 50% and 100%, and a control group. Seeds from five *Taraxacum officinale*, *Sonchus oleraceus*, *Rumex triangulivalvis*, *Convolvulus arvensis* and *Malva parviflora* weeds were obtained, the extracts were applied for 15 days, and distilled water was added to the control group. The results showed that the extracts with allelopathic effect were T3H and T4H corresponding to leaf, because it inhibited the germination of almost 50% of the seeds. Germination was different between species, probably due to seed composition and dormancy.

Keywords — allelochemical, inhibition, extracts

I. INTRODUCCIÓN

La alelopatía es aquel individuo que tiene una dominancia sobre otro, y que puede aportar un beneficio o perjudicarlo, esto por efecto de biomoléculas (aleloquímicos) que son producidas por una planta y son expulsadas al ambiente de forma acuosa o gaseosa volatilizada en el aire (1).

Las principales sustancias alelopáticas son compuestos aromáticos que está conformado por fenoles, derivados del ácido benzoico, ácido cinámico, quinonas, cumarinas, flavonoides y taninos, así como terpenos los sesquiterpenos y la fitohormona el ácido abscísico (2).

Las arvenses o malezas en el sentido agronómico son plantas nativas sin valor económico, que compiten por agua, nutrientes, CO₂, O₂ y cuando se encuentra en un terreno de cultivo afecta al sistema de producción. Además, estas plantas son capaces de estar en ecosistemas naturales no perturbados, por lo cual resultan dinámicas (3).

II. MARCO TEÓRICO

El taxón *Cyperus rotundus* pertenece a la familia Cyperaceae, es una planta arvense, herbácea, perenne, cuya reproducción es principalmente por medio de tubérculos, ya que la producción de semillas viables es menor al 5% (4); esta especie es considerada como planta termófila, por lo que requiere de temperaturas elevadas para su propagación y regularmente habita en climas templados y tropicales, además se ve restringida a regiones que presentan frecuentemente temperaturas frías como son -1°C , por lo anterior la temperatura adecuada para que brote y crezcan las plantas es de 20°C (5).

Cyperus rotundus frecuentemente crece entre los cultivos y como otras plantas existe competitividad entre ellas, pero debido a su toxicidad esta especie ocasiona problemas, aún más importantes para la agricultura por la liberación de sustancias alelopáticas, como son polifenoles, sesquiterpenos y ácido abscísico, cabe mencionar este último al ser el que mayormente influye en el rendimiento y crecimiento inicial de los cultivos. Existen estudios que demuestran los efectos alelopáticos de ciertas especies vegetales, en experimentos de campo y laboratorio en cultivos de algodón, frijol, maíz y arroz (2).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Trabajo de campo

Se realizó la recolecta de plantas de *Cyperus rotundus* y semillas de las especies arvenses *Taraxacum officinale* Weber ex Wigg., *Sonchus oleraceus* L., *Rumex triangulivalvis* (Danser) Rech., *Convolvulus arvensis* L. y *Malva parviflora* L., en el campo agrícola de la División de Ciencias de la Vida (DICIVA) de la Universidad de Guanajuato, ubicado en la comunidad "El Copal" en Irapuato, Gto. (Fig. 1).

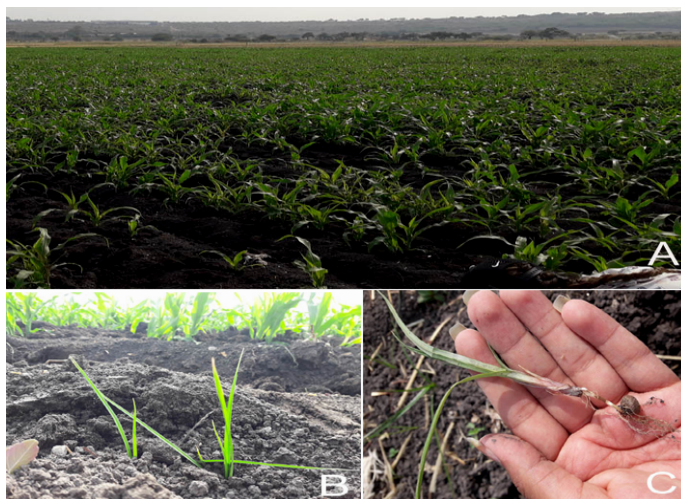


Fig. 1. A. Cultivo de maíz. B. Planta de *Cyperus rotundus*. C. Tubérculo de la planta.

B. Preparación de los extractos acuosos

Las plantas de *Cyperus rotundus* se lavaron con agua corriente y secaron con una toalla de papel, después se separó raíz - tubérculo y las hojas y se trituraron en un montero la cantidad de 10 gramos. Al material pulverizado se añadió 200 ml de agua destilada para la

preparación de los extractos acuosos e incorporo en frascos de color ámbar y se dejó macerar por 24 h en refrigeración, después se filtró para elaborar las concentraciones al 25%, 50% y 100% tanto de raíz-tubérculo y hoja (6).

C. Siembra de semillas de plantas arvenses

Las semillas de las cinco especies se sembraron en vasos de plástico de 3.2 cm de alto X 3 cm de ancho, se colocó algodón aproximadamente a 1 cm de altura y una semilla en cada vaso. En cada tratamiento se incluyó 10 semillas es decir para hoja T2H=25%, T3H=50% T4H=100% y raíz-tubérculo T5T=25%, T6T=50% y T7T=100% y en el grupo control 15 semillas. Se realizó el riego una vez al día con las diferentes concentraciones del estrato (7).

IV. RESULTADOS

Se presenta la morfología de las diferentes semillas, *Convolvulus arvensis* tiene forma ovoide-triangular, oscuras, con textura áspera de 3 a 5 mm de largo; *Malva parviflora* son reniformes irregular de color castaño-negruzco de 1.2 a 2.2 mm; *Rumex triangulivalvis* es ovalada con la parte terminal aguda con 3 costillas, color café oscuro o negro, brillante, aproximadamente de 3 mm; *Sonchus oleraceus* es plana lisa, café, con vilano blanco y de 3.5 mm y *Taraxacum officinale* las semillas son alargadas con costillas longitudinales y espinas, café amarillento de 5 mm y vilano (Fig. 2A-E). Además, se presenta la semilla germinada de *C. arvensis* (Fig. 2F).

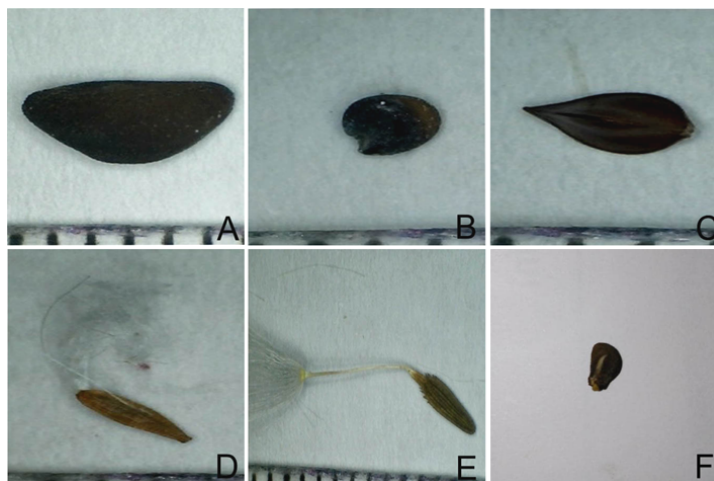


Fig 2. Semillas colectadas. **A** *Convolvulus arvensis*, **B** *Malva parviflora*, **C** *Rumex triangulivalvis*, **D** *Sonchus oleraceus*, **E** *Taraxacum officinale*, **F**. Semilla germinada de *Convolvulus arvensis*.

La germinación inicio al tercer día en *C. arvensis* y *T. officinale*; sin embargo, la toma de datos fue a los cinco días. Las semillas de las cinco especies germinaron y fue menor en la concentración de extractos al 100%. El grupo control presento una mayor germinación a excepción de *M. parviflora* con cero y solo en T2H germino una semilla. Las especies que tuvieron una mayor germinación fueron *C. arvensis* en el tratamiento T2H con 7 semillas, *T. officinale* y *C. arvensis* con 5 germinaciones en ambas; en el T3H las especies *T. officinale* y *C. arvensis* 5 semillas, mientras que *S. oleraceus* con 4 y *R. triangulivalvis*

Tuvieron el menor número de germinación con solo 2; para el tratamiento T4H la inhibición fue mayor en *C. arvensis* con 3, mientras *T. officinale*, *S. oleraceus* y *R. triangulivalvis* fueron 2 semillas.

Para el extracto de raíz-tubérculo el tratamiento T5T en *T. officinale* fue de 6 semillas germinadas, y solo una semilla en *S. oleraceus* y T6T fue igual en *T. officinale* y *C. arvensis* con 6 germinaciones, y *S. oleraceus* solo una (Figura 3).

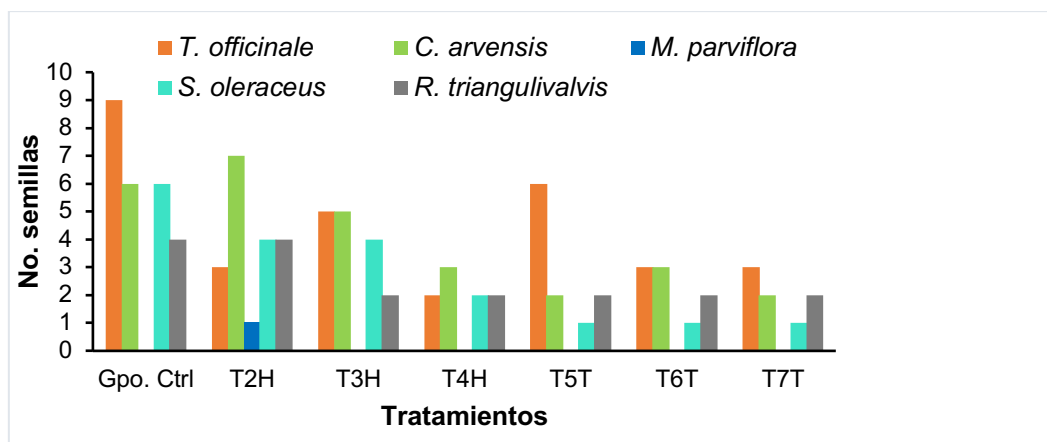


Figura 3. Germinación de semillas al quinto día, en los tratamientos Control, Hoja= T2H=25%, T3H=50% T4H=100% y Tratamientos de Raíz-tubérculo T5T=25%, T6T=50% y T7T=100%.

A los quince días la germinación en el grupo control se observó en las cuatro especies *S. oleraceus* con 15, *T. officinale* (12), *C. arvensis* y *R. triangulivalvis* (10) y ninguna en *M. parviflora* esta especie se comportó igual que a los 5 días. En los tratamientos de hoja en el T2H la germinación en *C. arvensis* fue de 9 semillas, *T. officinale* y *S. oleraceus* (6) y *M. parviflora* solo una semilla; en T3H para *C. arvensis* (8), *T. officinale* y *S. oleraceus* (5) y una en *R. triangulivalvis*; el tratamiento T4H para *T. officinale* y *C. arvensis* (6), *S. oleraceus* y *R. triangulivalvis* con 3.

En raíz-tubérculo en tratamiento T5T hubo mayor germinación en *R. triangulivalvis* con 9, *S. oleraceus* (7) y *M. parviflora* (1); en T6T fue en *R. triangulivalvis* y *S. oleraceus* (8) y en *T. officinale* (5) y por último el tratamiento T7T para *R. triangulivalvis* con 7, *C. arvensis* y *S. oleraceus* (6) y *M. parviflora* nuevamente solo una (Figura 4).

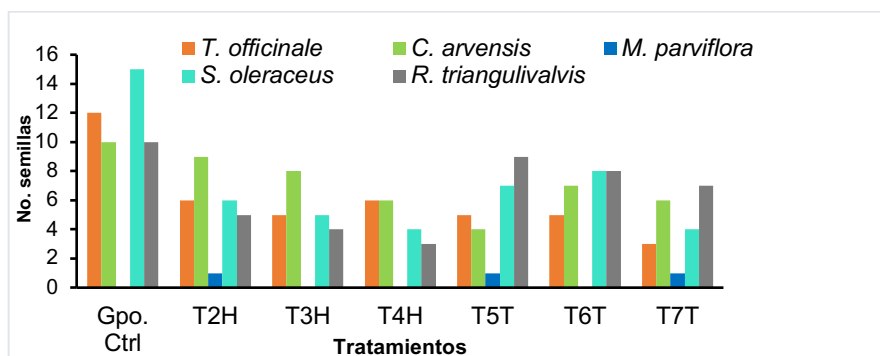


Figura 4. Número de semillas germinadas en las diferentes concentraciones de los extractos a los quince días.

V. DISCUSIÓN

Souza y colaboradores (2003) (8) indican la presencia de sustancias aleloquímicas en las hojas de *C. rotundus*, en nuestro trabajo no se identificaron los compuestos, pero los extractos de hojas tuvieron el mayor efecto alelopático en la germinación de semillas arvenses. Además, existen estudios que reconocen el efecto de alopatía de *Cyperus rotundus* y se ha mostrado que al aplicar un extracto foliar a la vegetación arvense se tiene repercusiones físicas en el crecimiento (9). En el presente estudio se observó mejores resultados con el extracto de hoja en los tratamientos T3H=50%, donde inhiben el 50% de la germinación en *T. officinale*, *S. oleraceus* y *R. triangulivalvis* y el T4H=100% fue del 40% y 30% en *S. oleraceus* y *R. triangulivalvis*. Así mismo, también estos autores (9) sugieren la posible acción bioherbicida de los extractos de *C. rotundus*, ya que lo aplicaron sobre semillas y vieron que podría utilizarse para el control de plantas arvenses puesto que se redujo el tamaño de las plántulas, aquí también se comprobó la eficacia de la inhibición en la germinación de semillas de plantas arvenses y puede ser un producto favorable para erradicar dichas plantas en los cultivos.

Layne-Garsaball y Méndez-Natera (2007) (10) muestran que los extractos foliares provocan una mayor inhibición de germinación con relación a la mayor concentración; lo mismo ocurrió en los extractos de hoja del presente trabajo, es decir a mayor concentración de extracto mayor inhibición en la germinación de semillas; sin embargo, para los tratamientos de raíz-tubérculo no se cumplió esto ya que en el T6T=50% aumento la germinación en *S. oleraceus* y *C. arvensis*, cabe mencionar que depende de la especie puesto que en raíz-tubérculo hubo menor inhibición en *R. triangulivalvis*.

Las semillas de *Malva palviflora* presentan dormancia, ya que la cubierta seminal de esta especie es impermeable, además con el tiempo la permeabilidad de las semillas aumenta (11), en dicha especie se observó en los tratamientos una germinación de solo una semilla, a diferencia de las otras especies de estudio.

VI. CONCLUSIÓN

Se tiene una mayor actividad inhibitoria de los extractos acuosos de la hoja de *Cyperus rotundus* que de la raíz-tubérculo, además la germinación de las semillas fue diferente en las cinco plantas arvenses asociadas a cultivos de maíz y en *M. palviflora* fue casi nula.

VII. AGRADECIMIENTOS

Agradezco al programa Verano de la Ciencia región Centro por la oportunidad de participar en este evento, a la Dra. Victoria Hernández Hernández por su apoyo brindado para realizar el proyecto en el Instituto Tecnológico Superior de Irapuato y a la M.C. Akira Torreblanca Ponce por todas sus atenciones.

REFERENCIAS

- [1] Segura, N. C. y Agüero, A. R. (1997). Combate de coyolillo (*Cyperus rotundus* L.) en caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.): hacia un manejo integral. *Agronomía mesoamericana* 8(2), 101-106.

- [2] Sampietro, D.A. (2010). Aleopatía: Conceptos, características, metodología de estudio e importancia. Facultad de Bioquímica, química y farmacia. Universidad Nacional de Tecumán. San Miguel de Tecumán Fecha de consulta: 9/03/18. Sitio web: <https://w3.ual.es/personal/edana/bot/mh/complemento/docufijos/revalelo.htm>
- [3] Gómez, A. A. y Rivera, P. H. (1995). Descripción de arvenses en plantaciones de café. CENICAFE. 490 pp.
- [4] Rizvi, S.J.H. y Rizvi, V. (1992). Exploitation of allelochemicals in improving crop productivity. Allelopathy: Basic and applied aspects. London, Chapman & Hall, pp. 443-472.
- [5] Zaragoza, C., Albar, J., Borja, M., Cavero, C., López, C., Montserrat, A., Saavedra, M., Taberner, A. y Tiebas, A. (1994). Malas hierbas-La juncia *Cyperus rotundus* L. Ministerio de agricultura pesca y alimentación. 1-7 pp.
- [6] Pereira-Fanti, F. (2008). Aplicação de extratos de folhas e de tubérculos de *Cyperus rotundus* L. (Cyperaceae) e de auxinas sintéticas na estaquia caular de *Duranta repens* L. (Verbenaceae). CURITIBA. pp. 26-28.
- [7] Laynez-Garsaball, J. A. y Méndez-Natera, J.R. (2006). Efectos de extractos acuosos del follaje del corocillo (*Cyperus rotundus* L.) sobre la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) Cv. Arapatol s-15. IDESIA (Chile), 24, 61-75.
- [8] Souza, L. S., Velini, E. D. y Maiomonl-Rodella, R. C. S. (2003). Efeito alelopático de plantas daninhas e concentrações de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) no desenvolvimento inicial de eucalipto (*Eucalyptus grandis*). Planta Daninha, Viçosa, 21 (3), 343-354.
- [9] Jarma, A.J., Angulo, A., Jaramillo, J. y Hernández J. (2004). Efecto alelopático de extractos de crotalaria (*Crotalaria juncea* L.) y coquito (*Cyperus rotundus* L.) sobre malezas y cultivos anuales. Universidad de Córdoba, Facultad de Ciencias Agrícolas. 9 (2), 23-31.
- [10] Laynez Garsaball, J. A. y Méndez Natera, J. (2013). Efectos de extractos acuosos de la maleza *Cyperus rotundus* L. (Cyperaceae) sobre la germinación de semillas y crecimiento de plántulas de maíz (*Zea Mays* L.) Cv. Pioneer 303. *Revista Peruana de Biología* 14 (1), 55-060.
- [11] Makowski, R.M.D y Morrison, I.N. (1989). The biology of Canadian weeds *Malva pusilla* (= *M. rotundifolia* L.) Can. J. Plant Sci. 69, 861-879.

Efecto de la estimulación con campos magnéticos sobre la polimerización *in vitro* del péptido β -amiloide

Iván Andrés Lara Ibarra

Universidad Autónoma de Aguascalientes
Centro de Ciencias de la Salud
Av. Universidad 940, C. U.,
C.P. 20130, Aguascalientes, Ags.
al20590@edu.uaa.mx

Asesor: Gustavo Basurto Islas

Universidad de Guanajuato Campus León
División de Ciencias e Ingenierías
Loma del Bosque 103, Lomas del Campestre
C.P. 37150, León, Gto.
gustavo.basurto@ugto.mx

Resumen — El propósito del presente trabajo fue determinar el efecto de la estimulación de baja frecuencia sobre la polimerización *in vitro* del péptido beta-amiloide (P β A), evaluado mediante el ensayo MTT. Se encontró que la estimulación y la pre-estimulación magnética de baja frecuencia por 24 horas estimula la supervivencia de las células SH-SY5Y. Sin embargo, se requieren más estudios para demostrar el efecto de los campos magnéticos sobre la polimerización del P β A por medio de ensayos más específicos. Los tiempos y tipo de estimulación se siguen investigando. Ésta es una propuesta de metodología que puede contribuir al conocimiento para determinar las causas y posibles tratamientos de la enfermedad de Alzheimer.

Palabras clave — Enfermedad de Alzheimer, Péptidos beta-Amiloides, Campos Magnéticos, Células SH-SY5Y.

Abstract — The purpose of this study was to determine the effect of low frequency stimulation *in vitro* polymerization on amyloid beta peptide (P β A), analyzed by the MTT assay. We found that low frequency magnetic stimulation and pre-stimulation for 24 hours exerts a positive effect on the survival of SH-SY5Y cells. However, more studies are required to demonstrate the effect of electromagnetic fields on P β A polymerization through more specific assays. The timing and type of stimulation are still under research. This study is a proposed strategy that may contribute to the knowledge to determine the causes and possible treatments of Alzheimer's disease.

Keywords — Alzheimer Disease, Amyloid Beta-Peptides, Magnetic Fields, SH-SY5Y cells.

I. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia, se estima que cerca de 47 millones de personas en el mundo viven con demencia y se proyecta que este número se triplicara para el 2050 (1,2). A nivel neuropatológico, la enfermedad, se caracteriza por lesiones en el cerebro y muerte celular, causadas por la presencia de dos tipos de proteínas anormales: tau en forma de marañas neurofibrilares intracelulares y el péptido β -amiloide (P β A), que forma placas extracelulares (3). A la fecha la etiología de la enfermedad parece incierta, numerosos estudios apoyan la importancia de los agregados de P β A en la fase inicial de la patogénesis de la EA (4).

Actualmente, no existe un tratamiento para prevenir o curar la enfermedad, algunos fármacos y terapias han demostrado un efecto positivo en el manejo de las manifestaciones, sin embargo, todavía son inefectivos disminuyendo, deteniendo o revirtiendo su progreso (2). Dado que la edad es el principal factor de riesgo para desarrollar la EA y a que la población está envejeciendo, resulta necesario explorar nuevas alternativas en el tratamiento. Recientemente se explora un procedimiento no invasivo donde se estimula

eléctricamente al sistema biológico sin la necesidad de un contacto directo, sin fármacos ni cirugías, mediante un campo magnético (CM) generado por un electroimán, la estimulación magnética (EM) (5,6,7). Este método permite interactuar con sistemas, órganos y tejidos internos como no lo haría otra técnica (8).

Investigaciones epidemiológicas han sugerido que la exposición a CMs pudiera contribuir a la etiología de la EA, sin ser concluyentes (9). Por otro lado, los CMs pudieran tener un efecto positivo en los sistemas biológicos (10,11,12). En búsqueda de clarificar esto, en este trabajo, se investigó el efecto que tiene la estimulación magnética de baja frecuencia (EM-BF) sobre la polimerización *in vitro* del P β A, midiendo el grado de supervivencia que tienen las células SH-SY5Y por medio del ensayo MTT.

II. MARCO TEÓRICO

La generación del P β A inicia con la escisión de la proteína precursora de amiloide (PPA). La PPA es una proteína intermembrana, se metaboliza mediante dos vías diferentes: la vía no amiloidogénica y la vía amiloidogénica. En esta última, la escisión por la β -secretasa, y la subsecuente acción de la γ -secretasa resulta en la formación de monómeros de P β A de 42 residuos de aminoácidos (P β A₄₂) que resulta ser más propensa a formar agregados. Estos monómeros se agregan progresivamente en oligómeros de bajo peso molecular, oligómeros de alto peso molecular: protofibrillas, fibrillas y finalmente placas de β A. La conversión espontánea de los monómeros de P β A en agregados se encontró asociada al desarrollo de la patogénesis en la EA: disminución de la función sináptica, activación de la microglía y astrocitos, daño oxidativo, disfunción mitocondrial, etc., otras teorías sugieren una asociación fuerte entre la formación de oligómeros y la toxicidad (3,13,14). La formación de amiloide, en cultivos celulares, puede ser iniciada por una fibrilla preformada. Así mismo, un mal plegamiento del P β A en ensamblajes solubles e insolubles inducen la agregación y toxicidad (13).

La EM se basa en los principios de inducción electromagnéticos, descubiertos por Michael Faraday en el siglo XIX. Un pulso de corriente fluyendo a través de un hilo conductor genera un campo magnético. La frecuencia de cambio de este campo magnético determina la inducción de una corriente secundaria en cualquier conductor cercano. El campo eléctrico generado y, por lo tanto, la focalidad y penetración del estímulo, dependen de la geometría de la bobina (7).

III. METODOLOGÍA

A. Cultivo celular

La línea celular SH-SY5Y crece en medio D-MEM/F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) al 1% de antibiótico (penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 mg/ml), se mantiene en incubación a 37°C con 5% de CO₂. (15) Las células se siembran por triplicado en 4 microplacas de 96 pozos a una densidad de 6x10³ cel./pozo, las microplacas se cortan y se ajustan al número de pozos que vamos a utilizar (4x3) y se cultivan durante 24 horas antes de cualquier tratamiento para permitir su adherencia (fig. 1).



Fig. 1. Grupos experimentales

B. Grupos experimentales

Células wild-type (WT): crecen en medio de cultivo y sin exposición a agente estresante y sin exposición a CM.

Células WT+CM: crecen en medio de cultivo, sin exposición a agente estresante, expuestas a CM durante 24 h.

Células H₂O₂: crecen en medio de cultivo, antes de realizar ensayo MTT son expuestas a H₂O₂ que de antemano se conoce su capacidad citotóxica, en este caso, H₂O₂ (100mM/medio) por 30' para inducir muerte celular.

Células H₂O₂+CM: crecen en medio de cultivo, expuestas a CM durante 24 h, antes de realizar ensayo MTT son expuestas a H₂O₂ (100mM/medio) por 30' para inducir muerte celular.

Células PβA: expuestas a diferentes concentraciones de PβA (20 y 40 mM + medio) durante 24 h, sin exposición a CM.

Células PβA + CM: células expuestas a diferentes concentraciones de PβA (20 y 40 mM) y CM durante 24 horas

Células PβA + Pre-CM: expuestas a CM durante 24 h antes de ser expuestas a PβA a diferentes concentraciones (20 y 40 mM + medio).

C. Estimulación

1) Células pre-estimuladas durante 24 horas

Al término de las primeras 24 horas de cultivo y antes de cualquier tratamiento una de las microplacas se estimula en bobina de Rodin (estrella con diámetro interno de ~ 7 cm) parámetros; 75 Hz y ~2.5 mT, durante 24 horas (pre-estimulación). Al término, se siembra el PβA (20 mM y 30 mM + medio), se incuba durante 24 horas y al final se realiza ensayo MTT (fig. 2).

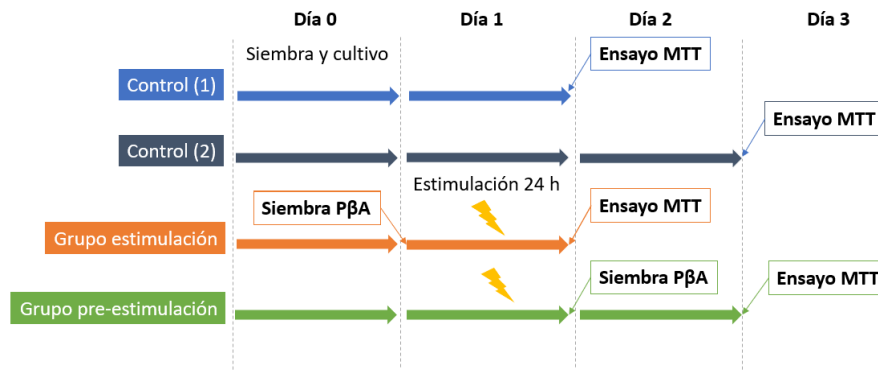


Fig. 2. Protocolo de siembra celular, incubación del P β A y estimulación

2) Células estimuladas durante 24 horas

Después de las primeras 24 horas de cultivo, se incuba el P β A (20 mM y 40mM + medio) durante 24 horas y se estimula una de las microplacas (4x3) (estrella con diámetro interno de ~ 7 cm) a 75 Hz y ~2.5 mT, durante 24 horas. Al término, se realiza el ensayo MTT (fig. 2).

D. Ensayo MTT

Al finalizar los tratamientos, se retira el medio de cultivo de todos los pozos, se añaden 100 μ l de MTT en cada pozo y se incuba en oscuridad a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad, durante 4 h.

Posteriormente se retira el MTT cuidando de no eliminar los cristales morados (formazán) que se forman en el fondo. Los cristales se disuelven en 100 μ l de isopropanol, agitando muy bien la placa para que los cristales se disuelvan por completo. Se colocan 100 μ l de esta disolución en una nueva placa de 96 pozos, para tomar lectura de la absorbancia resultante a 560 nm en un espectrofotómetro.

IV. RESULTADOS

Investigamos los efectos en la supervivencia de las células SH-SY5Y con estimulación y pre-estimulación magnética continua de baja frecuencia (EM-BF y Pre-EM-BF) por 24 horas. Como controles tenemos células idénticas que crecieron en condiciones estándar de cultivo en ausencia de estimulación. Los resultados no son concluyentes, la EM-BF por 24 horas no demostró tener un efecto en la supervivencia de las células en los grupos H₂O₂ y P β A 40 mM, mientras que en el grupo P β A 20 mM parece haber un efecto protector (Fig. 3). La Pre-EM-BF por 24 horas demostró no tener un efecto en la supervivencia de las células H₂O₂, mientras que parece tener un efecto positivo en las células P β A 40 mM, el análisis de las células P β A 20 mM en la Pre-EM-BF fue descartado debido a que no se incubó la cantidad adecuada de P β A (Fig. 3).

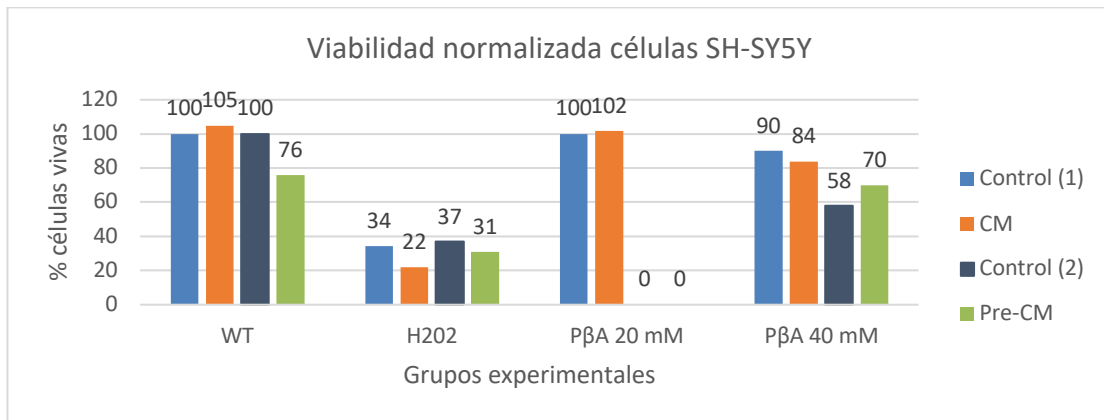


Fig. 3. Gráfica normalizada de viabilidad celular en células SH-SY5Y con diferentes tratamientos.

V. DISCUSIONES

La línea celular SH-SY5Y representa un modelo experimental válido para estudios que involucran diferenciación y metabolismo neuronal, desordenes neurodegenerativos y procesos de neuro adaptación. (12) La exposición a CM-BF pudieran tener un efecto positivo en los sistemas biológicos, ejerciendo un efecto citoprotector en el que bajas dosis de un estímulo químico o físico mejoran la habilidad de las células y tejidos para resistir ante un estímulo adverso (10,11). En el presente estudio, investigamos los efectos de la EM-BF y la Pre-EM-BF por 24 horas sobre la polimerización *in vitro* del PβA. Específicamente buscamos la capacidad de las células para sobrevivir a la exposición de agentes nocivos (H₂O₂, PβA 20 y 40 mM). Debe de hacerse notar que dependiendo de la dosis y la duración del tratamiento la EM se puede ejercer una respuesta celular citoprotectiva (11,10,12), de acuerdo a esto, nosotros usamos parámetros de estimulación similares a otros estudios y buscamos demostrar el efecto de EM durante 24 h. Encontramos en el grupo PβA 20mM + CM y en el grupo PβA 40 mM + Pre-CM, un aparente efecto positivo, mientras que en el resto de los grupos no se observó ningún efecto. Por los resultados y siendo este el primer experimento, creemos que se necesitan más ensayos para poder demostrar un efecto significativo en la supervivencia de las células SH-SY5Y, además es necesario realizar ensayos específicos para determinar el efecto sobre la polimerización del PβA.

VI. CONCLUSIONES

La exposición continua a CM-BF antes y después de la siembra del PβA podría inducir la supervivencia de las células SH-SY5Y. Los tiempos y el tipo de estimulación se siguen estudiando, nuestro trabajo constituye una propuesta de los parámetros que podrían considerarse en futuros estudios. Además del efecto de la EM-BF en la supervivencia de las células, es necesario investigar el efecto sobre la polimerización *in vitro* del PβA por medio de ensayos más específicos. Ésta es una propuesta que puede contribuir al conocimiento para determinar las causas y cura de la EA.

VII. RECONOCIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad de Guanajuato y a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por las facilidades y el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano.

REFERENCIAS

1. Alzheimer's Association. Alzheimer's Association. 2019 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimers Dement* 2019;15(3):321-87.
2. Livingston G. et. al. (2017) Dementia prevention, intervention, and care. *Lancet*. 2017; 390(10113): p. 2673 - 734.
3. Kumar S, Walter J. (2011) Phosphorylation of amyloid beta (A β) peptides - a trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease. *Aging*. 2011; 3(8): p. 803 - 12.
4. Butterfield D, Boyd-Kimball D. (2018). Redox proteomics and amyloid β -peptide: insights into Alzheimer disease. *J Neurochem*. 2018.
5. Alcalá Lozano R. et. al. (2017) An overview of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) in Alzheimer's disease. *Salud Ment*. 2017; 40(4): p. 171 - 8.
6. Avirame K, Stehberg J, Todder D. (2016). Benefits of Deep Transcranial Magnetic Stimulation in Alzheimer Disease: Case Series. *The Journal of Ect*. 2016; 32(2).
7. Pascual Leone A, Tormos Muñoz JM. (2008) Estimulación magnética transcraneal: fundamentos y potencial de la modulación de redes neurales específicas. *Revista de Neurología (Rev Neurol)*. 2008 Septiembre; 46(S01): p. S3-S10.
8. Pethig R, Kell D. (1987) The passive electrical properties of biological systems: their significance in physiology, biophysics and biotechnology. *Physics in Medicine and Biology*. 1987; 32(8): p. 933 - 70.
9. García AM, Sisternas A, Pérez-Hoyos S. (2008). Occupational exposure to extremely low frequency electric and magnetic fields and Alzheimer disease: a meta-analysis. *International Journal of Epidemiology*. 2008 April; 37(2): p. 329 - 340.
10. Osera C, Fassina L, Amadio M, Venturini L, Buoso E, Magenes G, et al. (2011). Cytoprotective Response Induced by Electromagnetic Stimulation on SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *Tissue Engineering Part A*. 2011; 17(19-20): p. 2573 - 82.
11. Marchesi N, Osera C, Fassina L, Amadio ML, Angeletti F, Morini M, et al. (2014) Autophagy Is Modulated in Human Neuroblastoma Cells Through Direct Exposition to Low Frequency Electromagnetic Fields. *Journal of Cellular Physiology*. 2014; 229(11): p. 1776 - 86.
12. Osera C, Amadio S, Falone S, Fassina L, Magenes G, Amicarelli F, et al. (2015). Pre-exposure of neuroblastoma cell line to pulsed electromagnetic field prevents H₂O₂ -induced ROS production by increasing MnSOD activity. *Bioelectromagnetics*. 2015 Abril; 36(3): p. 219 - 232.
13. Dayeh M, Livadiotis G, Elaydi S. (2018). A discrete mathematical model for the aggregation of β -Amyloid. *Plos One*. 2018 May; 13(5): p. e0196402.
14. Mondragón-Rodríguez S, Basurto-Islas G, Lee , Perry G, Zhu X, Castellani R, et al. (2010). Causes versus effects: the increasing complexities of Alzheimer's disease pathogenesis. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2010 May; 10(5): p. 683 - 91.
15. Kovalevich J, Lanford D. (2013). Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. *Neuronal Cell Culture. Methods in Molecular Biology*. 2013; 1078: p. 9 -21.
16. Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983; 65(1 - 2): p. 55 - 63.

Efecto de la hiperglucemia sobre la expresión de proteínas de estrés del retículo endoplásmico y migración de células de músculo liso vascular obtenidas de ratas diabéticas

Enelu Monsserrat Nava Velasco
Universidad Autónoma de Zacatecas
Unidad Académica de física
Solidaridad, Hidráulica, C.P. 98068 Zacatecas,
Zacatecas, México
enelu.nava@fisica.uaz.edu.mx

Asesor: Ricardo Espinosa Tanguma
Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de medicina
Av. Venustiano Carranza, No. 2405, C.P. 78210,
San Luis Potosí, S.L.P., México
espinosr@uaslp.mx

Resumen — Este trabajo tiene estudio de mecanismos moleculares y celulares debido a altas concentraciones de glucosa extracelular que se asocian a estrés del retículo endoplásmico y a una mayor velocidad de migración de CMLV. Fue una investigación experimental, realizada en ratas macho wistar, con diabetes mellitus y normales. Se extrajo aorta para obtener cultivo primario de células de músculo liso vascular. Se sembraron experimentos y las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de glucosa y manitol para medir migración celular por el método herida-cicatrización, así como westernblot para evaluar la expresión de proteínas de estrés. Los resultados obtenidos sugieren que las CMLV de ratas diabéticas muestran una mayor migración y más expresión de proteínas de estrés que sus controles, pero, en éstas últimas expuestas a altas concentraciones de glucosa los cambios no son observables.

Palabras clave — Diabetes mellitus, proteínas de estrés del retículo endoplásmico.

Abstract — This work has studied molecular and cellular mechanisms due to high concentrations of extracellular glucose that are associated with endoplasmic reticulum stress and with a faster migration rate of CMLV. It was an experimental investigation, conducted in male wistar rats, with diabetes mellitus and normal. Aorta was extracted to obtain primary culture of vascular smooth muscle cells. Experiments were seeded and the cells were exposed to different concentrations of glucose and mannitol to measure cell migration by the wound-healing method, as well as westernblot to assess the expression of stress proteins. The results obtained suggest that CMLV of diabetic rats show greater migration and more expression of stress proteins than their controls, but, in the latter exposed to high concentrations of glucose, the changes are not observable.

Keywords — Diabetes mellitus, endoplasmic reticulum stress proteins.

I. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es un factor de riesgo importante para la enfermedad cardiovascular ya sea micro o macro dependiendo del nivel de los vasos sanguíneos a los que afecta. El síndrome metabólico y la obesidad abdominal constituyen un problema de salud creciente, ligado a menudo a la diabetes. Los depósitos de grasa intraabdominal ponen en marcha una serie de mecanismos celulares y moleculares nocivos, como la liberación de marcadores inflamatorios que contribuyen a producir la elevada incidencia de enfermedad cardiovascular en la población [1].

Se sabe que la hiperglucemia, característica de la DM, causa estrés del retículo endoplásmico (ERE) conocido así por el desbalance en la homeostasis de la concentración de calcio, la maquinaria de glicosilación de proteínas así como del correcto plegamiento de proteínas [5].

Para que el retículo endoplásmico (RE) pueda cumplir con unas de sus funciones más importantes que es la regulación de la síntesis y plegamiento de proteínas requiere de un correcto balance de los niveles de calcio, chaperones moleculares, maquinaria de glicosilación de proteínas y un estado REDOX adecuado en el lumen. Sin embargo la privación o sobreabundancia de nutrientes, infecciones, estrés oxidativo, isquemia, hipoxia entre otros provocan el ERE. Durante este proceso las células inducen estrategias para protegerse induciendo la expresión de las proteínas en respuesta a proteínas mal plegadas mejor conocidas como UPR por sus siglas en inglés (Unfolded Protein Response) [4].

En este trabajo nos enfocamos a observar los cambios que ocurren en CMLV provenientes de ratas diabéticas y expuesta in vitro a altas concentraciones de glucosa. La hiperglucemia se corroboró a través de medir la expresión mediante la técnica de western blot de las UPR, que se ha reportado aumentan su expresión en estas condiciones. Entre las UPR que estudiaremos esta la proteína XBP-1 que define una ruta de señalización del receptor de insulina previamente desconocida y proporcionan mecanismos en el desarrollo de ERE durante la obesidad; así como la proteína ATF-6 que se ha descrito está involucrada en el ERE en condiciones de DM tipo 2 [8]. Además estudiaremos cambios en la migración celular mediante el método de herida-cicatrización, lo que nos permitirá conocer los mecanismos por los cuales las CMLV modifican su velocidad de migración ya que esto podría estar relacionado con cambios en actividad de este tejido en condiciones de hiperglucemia [3].

II. METODOLOGÍA

A. Inducción de Diabetes mellitus crónica en ratas Wistar mediante la administración intravenosa de estreptozotocina

Este fármaco provoca la destrucción selectiva de las células β de los islotes pancreáticos, única fuente de insulina en el organismo, el momento, dosis y vía de administración resultan determinantes para el tipo de diabetes que se desee inducir. Se hicieron dos grupos de rata macho Wistar, el grupo control, no recibió tratamiento previo al sacrificio. En el segundo grupo se indujo DM con estreptozotocina (60 mg/kg de peso) de la marca SIGMA-ALDRICH a través de la aplicación intravenosa se realizó insertando un catéter G24 (amarillo) en la vena caudal lateral localizada en la cola.

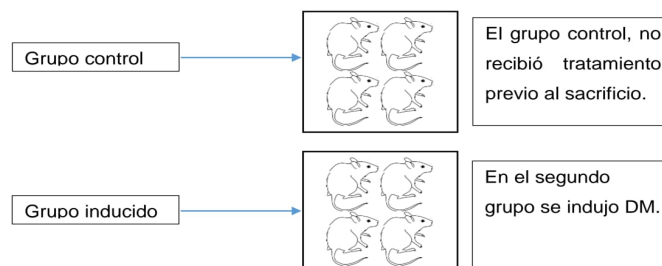


Fig 1. Modelo de cultivo celular de aorta de ratas normales y diabéticas

B. Obtención del tejido aórtico

Inmediatamente después del sacrificio se realizó una toracotomía que consistió en la extracción del bloque cardiopulmonar, el cual se colocó en una caja de Petri con solución salina. Todo el procedimiento fue realizado en condiciones de asepsia. En seguida, en una campana de flujo laminar, con la ayuda de un microscopio estereoscópico y con el

uso de instrumental quirúrgico fino, se disecó la aorta torácica y el exceso de tejido graso y conjuntivo, se descartó junto con las arterias colaterales y se eliminó la túnica adventicia. Posteriormente se realizó un corte longitudinal a lo largo de toda la aorta, exponiendo el endotelio, el cual se eliminó raspando suavemente con un hisopo de algodón.

C. Obtención de células de músculo liso vascular

Para la obtención del cultivo primario de músculo liso vascular se cortaron varios segmentos de tejido muscular de aproximadamente 1-2 mm x 1-2 mm. De cada aorta torácica se obtuvieron aproximadamente 40 segmentos, y se colocaron en cajas de cultivo de 100 mm, con el lado luminal hacia arriba y el lado de la túnica adventicia adherido a la superficie de la caja, separándolos de forma uniforme en toda la superficie de la caja. Posteriormente se dejaron reposar tres horas para permitir adherencia del tejido al sustrato. Entonces se colocaron 10 ml de medio de cultivo DMEM con glucosa 5 mM, y suplementado con 10 000 unidades de penicilina y 10 mg de estreptomina por ml, y Suero Fetal Bovino al 10%. Finalmente el plato de cultivo se colocó en una incubadora a 37°C y CO₂ al 5%.

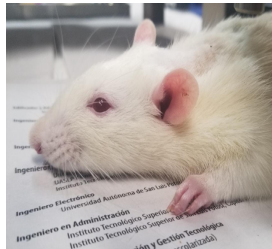


Fig 2. Muestra rata macho wistar

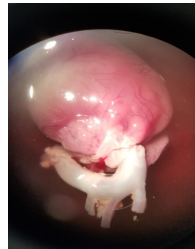


Fig 3. Bloque cardiovascular



Fig 4. Aorta

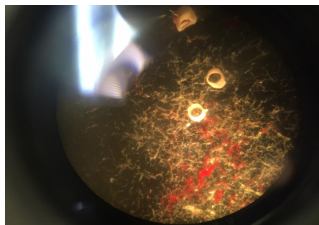


Fig 5. Corte histológico de la aorta

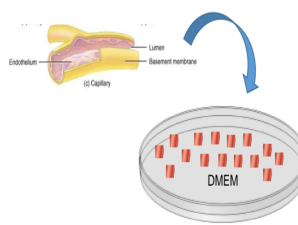


Fig 6. Cultivo primario



Fig 7. Células en incubadora

D. Caracterización del cultivo celular

Para confirmar que las células obtenidas provenían de músculo liso llevamos a cabo su caracterización con la técnica de inmunofluorescencia usando anticuerpos contra alfa actina y cadena pesada de miosina de músculo liso. Una vez que las células alcanzaron confluencia se levantaron con una solución de tripsina/EDTA al 0.25% y se resembraron para los diferentes experimentos.

E. Obtención de los lisados celulares

Pasando la exposición de 48 horas el medio se removió de los cultivos y se lavaron con PBS 1x frío dos veces. Después las cajas se pusieron sobre hielo y se les adicionaron 500 μ l de buffer Laemli 2x adicionado con β -mercaptoetanol como agente reductor. Los cultivos se mantuvieron durante 30 minutos en agitación y después de

este tiempo y con ayuda de una punta de micro pipeta se levantaron las células re suspendiéndolas para favorecer la ruptura de la mono capa de células cultivadas hasta obtener un lisado total homogéneo.

F. Electroforesis, transferencia e inmunodetección

Los geles se corrieron a 100V durante aproximadamente una hora y una vez terminada la electroforesis se continuó a realizar su electro transferencia del gel a la membrana para poder realizar el western blot. La transferencia se corrió en una cámara semihúmeda marca BIO-RAD a un amperaje constante de 120 mA por gel durante una hora. Posteriormente las membranas se enjuagaron y se bloquearon con solución de leche sin grasa al 5% durante una hora. Después del bloqueo las membranas se lavaron a chorro de agua, y se preparó una solución de leche al 2% en TBS-T. Finalmente las membranas se incubaron a 4C durante toda la noche con los anticuerpos primarios correspondiente.

G. Medición de la migración de CMLV usando el modelo de herida-cicatrización (Wound-Healing)

Para estos experimentos se sembraron por duplicado cajas de 35 mm con aproximadamente 10,000 células por caja. Tanto para las células provenientes de ratas control y diabéticas se permitió que llegaran a una confluencia del 70-80% y a esa condición se le llamó tiempo cero (T0). A partir de ahí se pusieron los diferentes tratamientos exponiendo a los cultivos a 5 y 15 mM de glucosa así como a 15 mM de manitol como control de os molaridad durante 48 horas. Pasado el tiempo de incubación se realizó una herida de norte a sur con la punta de un micro pipeta de 200 μ l a un ángulo de 45°. Se tomó una fotografía al término de este procedimiento que nombramos T0 así como a las 12 y 24 horas de haber hecho la herida utilizando un microscopio invertido con cámara integrada. El porcentaje de migración de cada fotografía se analizó con el programa Image J.

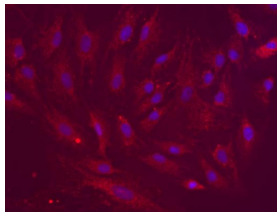


Fig 8. Imagen de inmunofluorescencia

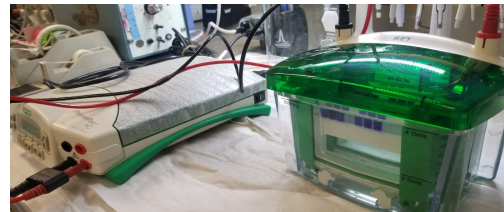


Fig 9. Desplazamiento de proteínas por el gel

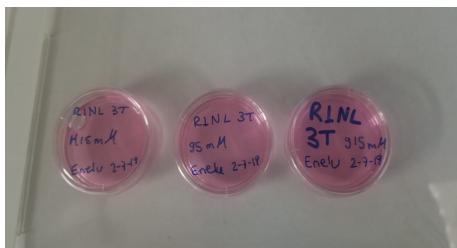


Fig 10. Experimento sembrado en cajas de 35mm

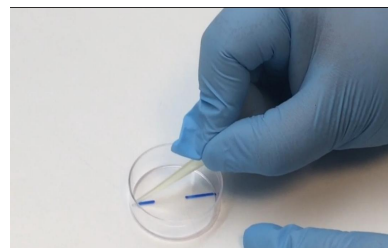


Fig 11. Técnica para realizar herida

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evaluación de estrés del retículo endoplásmico la realizamos utilizando la técnica de western blot utilizando anticuerpos específicos para algunas de las UPR más importantes de la vía como son ATF-6 y XBP-1. Todas las membranas fueron además retadas con beta-actina como control de carga. La Fig. 14 muestra una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% teñida con azul de Coomassie en donde podemos observar como el patrón de bandas cambia en los diferentes tratamientos los que nos sugiere cambios en la expresión de proteínas con los diferentes tratamientos. La Fig. 15 muestra la expresión de proteínas involucradas con estrés de retículo endoplásmico en CMLV provenientes de ratas control tratadas durante 48 horas con los tratamientos indicados.

Estos resultados son preliminares ya que aún falta analizar los lisados provenientes de ratas diabéticas así como ambos grupos de ratas dejando los tratamientos durante una semana, sin embargo sugieren que la exposición de las células control a altas concentraciones de glucosa en periodos de tiempo corto comienza a activar la vía de las UPR ya que la proteína ATF-6 se encuentra aumentada en su expresión en esta condición.

Para la medición de la migración las CMLV se llevaron a confluencia y a esa condición se le llamó tiempo cero (T0), y a partir de ahí se realizó el cambio de condiciones en donde los cultivos fueron expuestos a 5 y 15 mM de glucosa así como a 15 mM de manitol durante 48 horas. Pasado el tiempo se realizó una herida de norte a sur y se tomaron fotografía al T0 y a las 12 y 24 horas. El porcentaje de migración de cada fotografía lo analizamos con el programa Image J y posteriormente se analizaron los resultados. Las Figs. 16 y 17 muestran los ensayos de herida-cicatrización de CMLV proveniente de una rata control y una rata diabética tratada con 5 mM de glucosa durante 48 horas respectivamente. Las imágenes fueron tomadas utilizando el objetivo 10X de un microscopio óptico invertido. De izquierda a derecha las imágenes corresponden a la toma de fotografías al tiempo cero, 12 y 24 horas en las que se va observando en mayor medida la polarización de las células en relación con el tiempo que van avanzando.

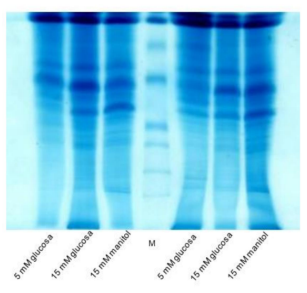


Fig 12. PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie muestra el patrón de bandas característico de dos muestras de lisado celular total obtenidas de CMLV de dos ratas diabéticas sometidas a los diversos tratamientos durante 48 horas.

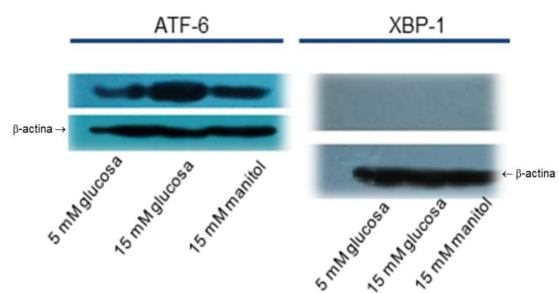


Fig 13. Western blot contra ATF-6 y XBP-1 realizado en lisados celulares totales provenientes de ratas control expuestas durante 48 horas a los diferentes tratamientos.

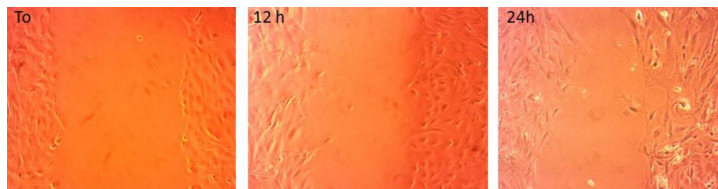


Fig 14. Migración celular en RATA CONTROL tratadas con 5mM de glucosa durante 48 h.

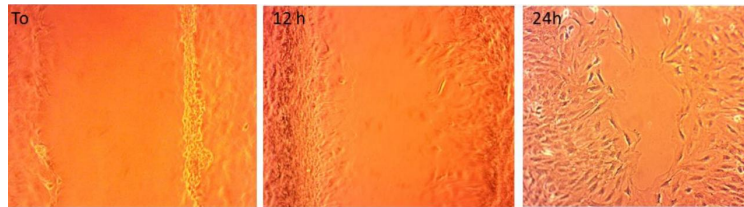


Fig 15. Migración celular en RATA DIABÉTICA tratada con 5mM de glucosa durante 48 h.

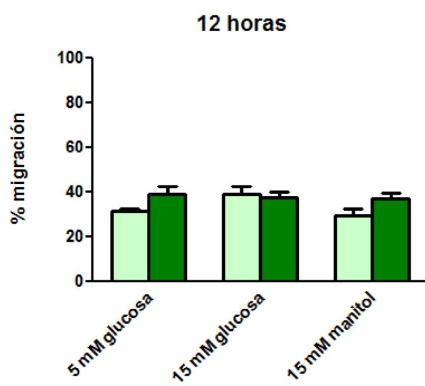


Fig. 16. Representación gráfica del porcentaje de migración a las 12 horas de haber hecho la herida en CMLV provenientes de ratas controles y diabéticas con diferentes tratamientos durante 48 horas.

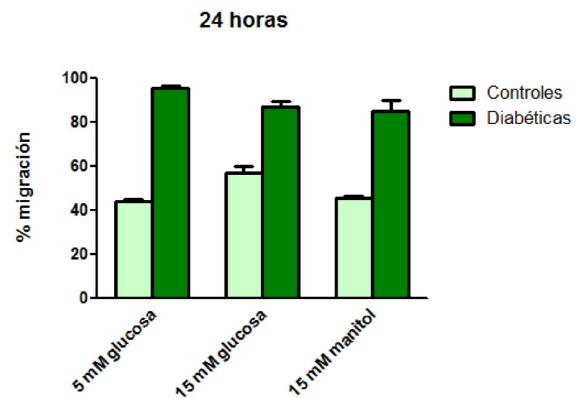


Fig. 17. Representación gráfica del porcentaje de migración a las 24 horas de haber hecho la herida en CMLV provenientes de ratas controles y diabéticas con diferentes tratamientos durante 48 horas.

IV. CONCLUSIONES

Estos resultados nos muestran un aumento en la migración de las células provenientes de ratas diabéticas comparadas con las controles a las 24 horas de haber sido hecha la herida. Los resultados son aún preliminares ya que nos falta repetir los mismos experimentos pero en ratas expuestas durante 1 semana a los diferentes tratamientos. Sin embargo hasta el momento parecen mostrar que la condición de hiperglucemia en ratas aumenta de manera significativa la migración de estas células

REFERENCIAS

- [1] C. D. Vásquez Quiñones, "Efecto de la hiperglucemia sobre la expresión de proteínas de estrés del retículo endoplásmico y migración de células de músculo liso vascular obtenidas de ratas diabéticas.", tesis de licenciatura, Facultad de medicina departamento de fisiología y biofísica, UASLP. San Luis Potosí, SLP, septiembre 2017.
- [2] S. Islas Andrade, M. Revilla Monsalve, *Diabetes Mellitus: Actualizaciones*, 2013. 1 Ed. México. Aniversario de la Academia Mexicana de Cirugía IMSS.
- [3] Nota descriptiva OMS. Madrid España. OMS. Disponible en: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/.

- [4] Informe Mundial Sobre Diabetes. Resumen de orientación. 2016. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204877/1/WHO_NMH_NVI_16.3_spa.pdf.
- [5] J. J. Mediavilla Bravo, *Complicaciones en la diabetes mellitus, diagnóstico y tratamiento*. SEMERGEN, 2001, Vol. 27. No 3.
- [6] L. Jaemin and O. Umut, "Unfolded Protein Response Signaling and Metabolic Diseases.", Division of Endocrinology, Boston Children's Hospital, Harvard .Medical School, Boston, Massachusetts.2013.

Efecto de la inflamación intestinal sobre los receptores p2x3 en neuronas del ganglio de la raíz dorsal

María Fernanda Durán Vázquez

Universidad Autónoma de Aguascalientes
Departamento de Fisiología y Farmacología
Av. Universidad 940, C.U.,
C.P. 20130 Aguascalientes, Ags.
fernanda.duran25@hotmail.com

Asesora: Raquel Guerrero Alba

Universidad Autónoma de Aguascalientes
Departamento de Fisiología y Farmacología
Av. Universidad 940, C.U.,
C.P. 20130 Aguascalientes, Ags.
bioraquelgro@gmail.com

Resumen — En este trabajo se evaluó el efecto anti-inflamatorio del fármaco A-317491 un antagonista selectivo de los receptores P2X3, durante un modelo de colitis aguda inducida por el químico DNBS en ratones BALB/c. Los resultados no mostraron diferencias significativas de las interleucinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6) evaluadas de los grupos con colitis y tratados cuando son comparados con el grupo control.

Palabras clave — TNF- α , IL-1 β , IL-6, colitis y receptor P2X3.

(Ayudan a a identificar los temas o aspectos principales del trabajo y son importantes para su indexación en bases bibliográficas. Deben ser de tres a cinco palabras clave, y pueden incluirse frases cortas que describan tópicos significativos del documento.)

Abstract — In this work the anti-inflammatory effect of the drug A-317491, a selective antagonist of the P2X3 receptors, was evaluated during a model of acute colitis induced by the chemical DNBS in BALB/c mice. The results did not show significant differences of the interleukins (TNF- α , IL-1 β , IL-6) evaluated in the groups with colitis and treated when compared to the control group.

Keywords — TNF- α , IL-1 β , IL-6, colitis and P2X3 receptor.

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU) son las dos formas en las cuales se clasifican las enfermedades intestinales inflamatorias (EII), están acompañadas por lesiones tipo crónico recurrentes, las cuales destruyen los tejidos del tracto gastrointestinal [1,2]. Se piensa que este padecimiento se debe en gran medida a la activación descontrolada o desequilibrada del sistema inmune innato y adaptativo, ya que las células como: neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células mesenquimatosas y epiteliales producen pequeñas proteínas llamadas citocinas [2]. Estas citocinas desempeñan un papel fundamental en la regulación de la inflamación de la mucosa, ya que promueven la migración de las células del sistema inmune a los sitios de inflamación [1].

En este trabajo se evaluó el posible efecto terapéutico del fármaco A-317491 sobre la expresión de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6 por medio de PCR-semicuantitativo utilizando muestras de colon provenientes de ratones BALB/c, a los cuales se les indujo colitis mediante la administración intrarrectal del químico ácido dinitrobenzenosulfónico (DNBS, por sus siglas en inglés). El fármaco A-317491 es un antagonista de los receptores P2X3, los cuales están involucrados en mediar la respuesta inflamatoria visceral.

II. MARCO TEÓRICO (OPCIONAL)

Diversos estudios muestran que el grado de inflamación en pacientes con CU se puede medir por el nivel de expresión de las citocinas proinflamatorias como TNF- α y IL-6, siendo la IL-6 un mediador proinflamatorio clásico para la respuesta de fase aguda [3], y es considerada como el mejor marcador de inflamación intestinal debido a que su expresión se ve correlacionada con la histología [4]. Estudios recientes sugieren un vínculo entre el aumento de los niveles de quimiocinas, citocinas y la patogénesis de las EII. Sin embargo, los estudios en humanos disponibles están limitados por el tamaño de la muestra del paciente y el número de quimiocinas/citocinas medidas [1].

Por otro lado, se han observado concentraciones altas de Adenosina trifosfato (ATP) extracelular en el sitio de la inflamación aguda, y se ha establecido como una molécula clave en la generación del dolor abdominal y la progresión de las EII. Se ha observado que la administración de ATP excacerba la inflamación durante una colitis experimental a través de la regulación de la producción de IL-17 de los linfocitos Th17 y a través de la activación de receptores P2X3 en neuronas sensoriales nociceptivas del ganglio de la raíz dorsal [5]. Además, en muestras de tejidos de colon inflamado de pacientes con EII se determinó un incremento en la expresión de los receptores P2X3 [7,8]. También se ha demostrado que estos receptores participan en la hiperalgesia visceral durante una fase aguda de la colitis y aún después de que la inflamación ha sido remitida [9]. Esta información ha llevado a considerar a los receptores P2X3 como un nuevo blanco terapéutico para el tratamiento del dolor crónico visceral. Los antagonistas del P2X3R podrían ser una alternativa en el tratamiento de la hipersensibilidad y procesos anti-inflamatorios viscerales [10]. el compuesto A-317491 es un antagonista para bloquear los receptores P2X3 homoméricos o receptores P2X2/3 heteroméricos. La administración subcutánea de este antagonista reduce la nocicepción en una manera dependiente de la dosis en modelos animales de dolor neuropático e inflamatorio [11]. Sin embargo, casi no se ha estudiado el potencial terapéutico del A-317491 en modelos experimentales de colitis. Además, los mecanismos moleculares por el cual el receptor P2X3 induce hiperalgesia visceral en la colitis no son claros. Una posibilidad es que la activación de los receptores P2X3 por el ATP endógeno contribuya a la hiperalgesia visceral a través de un mecanismo indirecto de sensibilización de los nociceptores mediante la liberación de citocinas pro-inflamatorias. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo es investigar si el tratamiento con el antagonista selectivo de los receptores P2X3, A-317491, reduce la liberación endógena de citocinas pro-inflamatorias, las cuales tienen un rol importante en el desarrollo de la hiperalgesia inflamatoria en un modelo de colitis aguda inducido por DNBS en ratones Balb/c.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Roedores

Se obtuvieron ratones BALB/c hembra (19-24 g) provenientes del bioterio central de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Los roedores se mantuvieron en cuatro grupos seleccionados al azar (Control, A-317491, DNBS, DNBS+A-317491) con una n=3, a una temperatura ambiente constante (26 ± 2 °C), en un ciclo de 12 h: 12 h día-noche y alimento *ad libitum*. Los animales se aclimataron a las condiciones de vivienda durante 1 semana

antes de la experimentación. Los procedimientos con los ratones de experimentación fueron aprobados por el comité de ética de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (2010–18). Todos los procedimientos se realizaron bajo anestesia con isoflurano 1.5 % para minimizar el sufrimiento de los animales.

B. *Fármaco*

Se administró una dosis única del fármaco A-317491 Sigma-Aldrich (10 mg/kg de peso de ratón) 30 minutos antes de la inducción de CU vía i.p. a los grupos A-317491 y DNBS+A-317491.

C. *Inducción de colitis*

La colitis fue inducida por vía intrarrectal de 100 µl que contenía 2-6 mg de DNBS disuelto en etanol al 50% a los grupos DNBS y DNBS+A-317491. A los ratones del grupo Control se les administró un enema etanólico al 50%. Todo el procedimiento se llevó a cabo bajo anestesia con isoflurano 1.5% para evitar el sufrimiento del animal.

D. *Indicadores de colitis in vivo y post-mortem*

Para asegurar que la sintomatología de la CU se indujo de manera adecuada se midieron los Scores de Melgar et al. (2005). El daño macroscópico del colon *post-mortem* fue analizado tomando en cuenta la escala de Morris (1989) [13,14]. Estos parámetros son descritos en la Tabla 1.

Tabla 1. Puntaje de diarrea, sangrado rectal fecal y daño macroscópico [13,14].

Score	Score de diarrea	Sangre fecal o anal	Daño macroscópico
0	Heces duras	Sin sangre	Sin sangrado, ni úlceras y/o edemas
1	Heces pastosas	Ligero sangrado	Sangrado leve, edema leve o erosión de la mucosa leve
2	Heces aguadas	Adherencias de sangre alrededor del ano	Edema moderado, úlceras y erosiones sangrantes
3	Diarrea líquida	Sangrado a través del ano	Edema, necrosis tisular y perforación del intestino

E. *Análisis de la expresión del ARNm de las citocinas TNF- α , IL-1 β y IL-6 en tejidos colónicos de ratones Control, A-317491, DNBS y A-317491+DNBS*

El ARN fue aislado por el método de TRIzol™ usando 50-100 mg de tejido colónico y las muestras fueron resuspendidas en 1 ml de TRIzol™. El tejido fue homogenizado con la ayuda de un politron (IKA T 18 digital ULTRA-TURRAX®). Una vez homogenizado el tejido, el ARN fue aislado con cloroformo, fue precipitado con 2-propanol, se lavó con ETOH 75% y se disolvió en H₂O libre de RNasas. Las muestras de ARN obtenidas fueron cuantificadas en un espectrofotómetro BioDrop Biochrom™ 80-3006-51. Se determinó la pureza del ARN en cada muestra por medio de las relaciones de absorbancia A260/A280 y A260/A230. Las muestras fueron tratadas con el kit DNase I (RNasa free) de Ambion® para eliminar DNA genómico. El ARN fue cauntificado como antes y se utilizó 1 µg de ARN para la síntesis de

ADN complementario (ADNc) siguiendo el protocolo iScript™ cDNA Synthesis Kit de BIO-RAD.

El ADNc obtenido se utilizó para realizar la técnica de PCR-semicuantitativo. La mezcla de reacción para el PCR de cada muestra se llevó a cabo utilizando 1 µl de ADNc, 1X de Buffer PCR, 1.5 mM de MgCl₂, 10 µM de dNTPs, 10 µM de oligos sentido y antisentido y 5U/µl de Taq Polimerasa y H₂O para ajustar a un volumen final de 12.5 µl. Las secuencias y temperaturas de alineamiento de los oligos utilizados en los ensayos de PCR-semicuantitativo se muestran en la tabla 2. Para cada gen, la desnaturalización inicial fue a 94°C durante 3 min, 22-40 ciclos de 1 min a 94°C y 20-50 sec de alineamiento a 55°C y una extensión de 1 min a 72°C. Los productos de PCR obtenidos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa.

F. Gel de agarosa

Los geles de agarosa fueron preparados al 1.2% para los fragmentos de β-Actina, GAPDH, TNF-α, IL-1β y al 2.0% para el fragmento de IL-6 con Buffer TAE 1X. La agarosa se calentó en el microondas hasta disolverse completamente, se dejó enfriar brevemente y se agregaron 5 µL de bromuro de etidio (10 mg/ml). Posteriormente fue vertida sobre un molde y con el peine adecuado se dejó polimerizar a temperatura ambiente.

G. Electroforesis

Las muestras de PCR (12.5 µL) se mezclaron con 2 µL de buffer de carga Cyan yellow-blue (6X). Las muestras fueron colocadas en los pocillos generados en el gel y la separación de los fragmentos fue realizada aplicando una corriente de 75 Volts en la cámara de electroforesis durante 45 minutos. Los amplicones fueron visualizados en un transiluminador de luz UV (MiniBis Pro, DNR) y la imagen generada fue digitalizada para su posterior análisis.

H. Análisis estadístico

Las imágenes digitalizadas fueron analizadas con el software ImageJ (NIH) y los datos generados fueron analizados estadísticamente con el software Graphpad Prism 7.0 (San Diego, CA, USA). Para probar diferencias entre los grupos se usó un análisis de varianza, one-way-ANOVA con una prueba *post-hoc* de Bonferroni. Los datos son considerados estadísticamente significativos cuando los valores de *p* fueron menores a 0.05.

Tabla 2. Secuencias de los oligos utilizados en el RT-PCR semicuantitativo

Gen	Secuencia 5' - 3'	Temperatura de alineamiento (°C)	Tamaño (pb)
GAPDH	FW CCATCACCATCTTCCAGGAG RV CCTGCTTACCACCTTCTTG	55	576
β -Actina	FW AGCTGAGAGGGAAATCGTGC RV AAAACGCAGCTCAGTAACAGTC	55	545
IL-1β	FW TGATGAGAATGACCTCTTCT RV CTTCTTCAAAGATGAAGGAAA	55	251
IL-6	FW TAGTCCTTCTACCCCAATTTCC RV TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC	55	76
TNF-α	FW AACTAGTGGTGCCAGCCGAT RV CTTACAGAGCAATGACTCC	50	334

IV. RESULTADOS

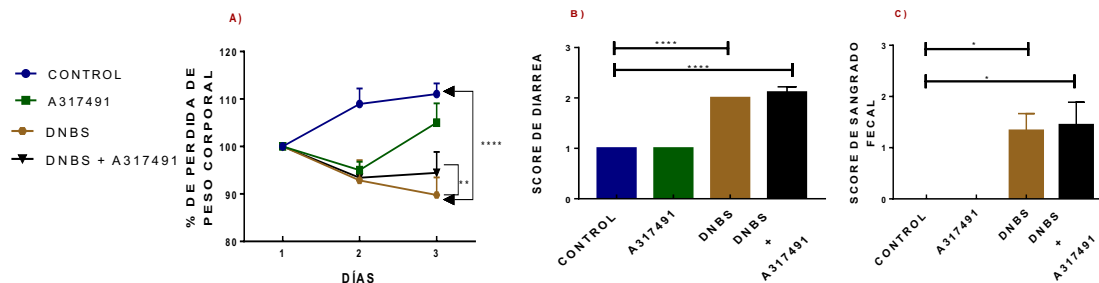


Fig. 1. Indicadores de colitis *in vivo*.

La Figura A) muestra el porcentaje de pérdida en peso. Se muestra un pico máximo de descenso para el día 3 en grupo DNBS en comparación con el grupo control. El porcentaje (%) de pérdida de peso corporal fue estimado con respecto al peso inicial del ratón en el día 1. En la gráfica B) se muestra el score de diarrea, se observa significancia entre los grupos DNBS y DNBS + A-317491 en comparación con el grupo control. El score de sangre en heces C) muestra diferencias estadísticas entre los grupos con DNBS en comparación con el grupo Control. El daño macroscópico Las Figuras B) y C) se evaluaron según lo descrito por Melgar et. al. (2005) Las barras representan el valor promedio y las líneas verticales los errores estándar del promedio (S.E.M) obtenidos de 3-4 ratones. El * denota estadísticamente significativo por la prueba de Bonferroni (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.005$ y **** $P \leq 0.0005$).

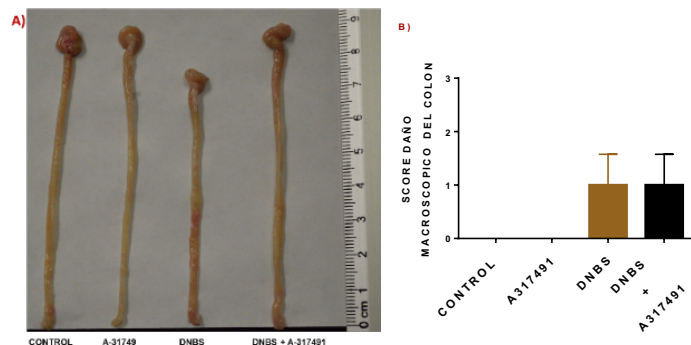


Fig. 2. Indicadores de colitis *post-mortem*.

En la Figura 2 A) se muestran cólores representativos de cada grupo en estudio. Como se puede apreciar, el colon DNBS es el que presenta alteraciones macroscópicas del tejido, como son sangrado leve, erosión de la mucosa leve y reducción en su longitud comparado con el grupo Control. En la Figura 2 B) se muestran los datos de la escala de Morris (1989), el grupo DNBS y el grupo DNBS tratado con el fármaco A-317491 tienen un score más alto de daño macroscópico del tejido en comparación con el grupo control. Las barras representan el valor promedio y las líneas verticales los errores estándar del promedio (S.E.M) obtenidos de 3-4 ratones. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos DNBS y los tratados con A-31749.

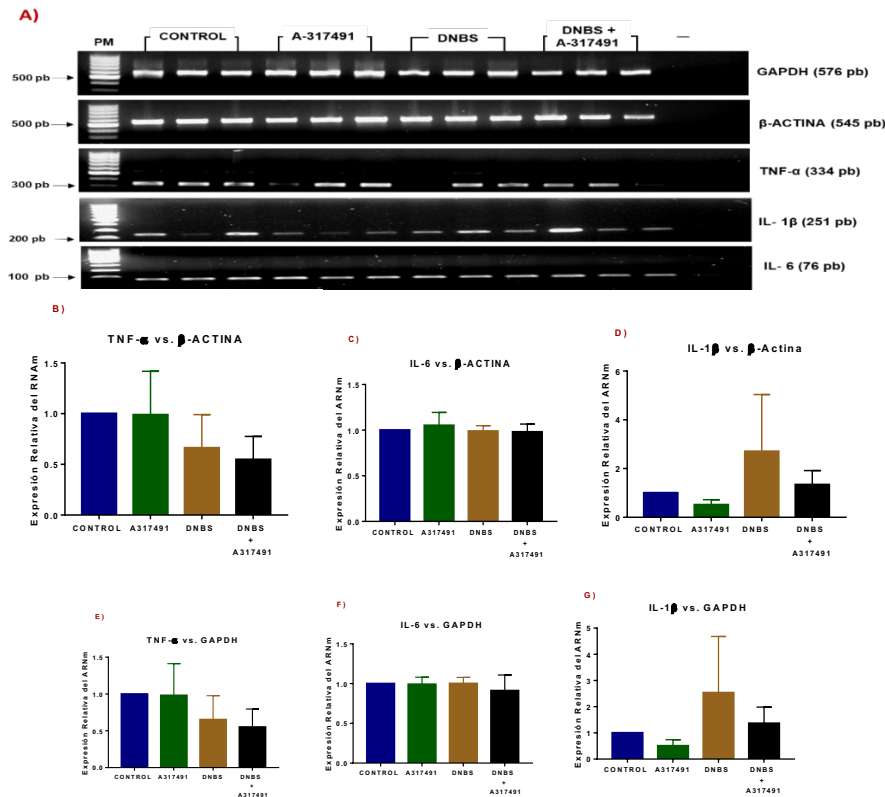


Fig. 3. Efecto del A-317491 sobre la expresión de ARNm de algunas citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1 β) en tejido colónico de ratones control y con colitis.

En la Figura 3 A) se muestran Geles de agarosa al 1.2% teñidos con bromuro de etidio. Se muestran los productos de PCR de los genes GAPDH (576 pb), β -Actina (545 pb), TNF- α (334 pb), IL-1 β (251 pb), e IL-6 (76 pb). Carril 1, Escalera de ADN de 100 pb (PM); carriles 2 al 4 grupo Control, carril 5 al 7 grupo tratado con A-317491, carril 8-10 grupo DNBS (colitis), carril 11-13 grupo colitis tratado con A-317491 (10 mg/Kg), carril 14 control negativo (sin templado). Las Figuras B) a G) se muestra el análisis semicuantitativo de la expresión de los genes IL-6, TNF- α y IL-1 β vs β -Actina (B-D) y GAPDH (E-G). Las barras representan el valor promedio y las líneas verticales los S.E.M obtenidos de una n=3 por grupo. No hubo diferencias estadísticas entre los grupos.

V. DISCUSIÓN (O ANÁLISIS DE RESULTADOS)

En este estudio se evaluó el efecto del fármaco A-317491 sobre la inflamación visceral inducida por el químico DNBS en un modelo murino. Se sabe que el fármaco A-317491 media su acción anti-nociceptiva a través de los receptores P2X3 presentes en el intestino [9]. Los resultados muestran que los ratones que recibieron el DNBS intrarrectal mostrarán mayor pérdida de peso (Fig 1A), diarrea (Fig 1B) y sangre fecal visible (Fig 1C). El tratamiento con A-317491 no atenúo los síntomas de la colitis. De acuerdo con la escala de Morris (1989), no hubo un daño severo en el tejido colónico de los ratones Balb/c que recibieron intrarrectalmente el DNBS (Fig. 2A y B), esto nos indica que la inflamación en el colón no fue severa. En apoyo a esta observación, los niveles de ARNm de TNF- α e IL-6 no fueron diferentes en los ratones que recibieron el DNBS en comparación con los controles,

aún cuando se utilizaron dos genes constitutivos (Actina y GAPDH) para determinar su expresión. El tratamiento con el antagonista del receptor P2X3, A-317491, no alteró esta expresión (Fig 3 B, C, E y F). Sin embargo, se puede observar un ligero incremento en los niveles de ARNm de IL-1 β en los ratones DNBS en comparación con los controles (Figura 3 D y G), aunque éste no fue estadísticamente diferente. En la misma figura también se puede observar que los niveles de ARNm de IL-1 β en los ratones DNBS que recibieron el A-317491 regresan a niveles muy parecidos a los controles, quizás habrá que aumentar el número de experimentos para determinar la significancia.

Todos estos resultados nos indican que el grado de inflamación en el colon de los ratones Balb/c tratados con DNBS fue ligero, habrá que realizar más experimentos para inducir una colitis más severa en estos ratones y de esta forma poder establecer si hay un aumento de TNF- α , IL-6 y IL-1 β durante la colitis y determinar si el antagonista del receptor P2X3, A-317491 inhibió la liberación de citocinas proinflamatorias.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El modelo de colitis por administración intrarrectal de DNBS en ratones Balb/c induce un ligero grado de inflamación y lesión tisular en el colon. Lo más probable es que no se pudieron detectar diferencias en los niveles de expresión de ARNm de TNF- α , IL-6 y IL-1 β de las interleucinas proinflamatorias por la baja resolución que tiene el método de RT-PCR. Con estos resultados, es difícil determinar si el antagonista del receptor P2X3, A-317491 inhibió la liberación de citocinas proinflamatorias.

VII. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

En agradecimiento con la Universidad Autónoma de Aguascalientes por proporcionar la infraestructura y recursos necesarios para llevar a cabo este proyecto. En especial gratitud con los investigadores por el apoyo y su confianza, Raquel Guerrero Alba, Tonatiuh Barrios García, Eduardo Valdez Morales.

REFERENCIAS

- [1] U. P. Singh *et al.*, "Chemokine and cytokine levels in inflammatory bowel disease patients," *Cytokine*, vol. 77, pp. 44–49, 2016. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.10.008>. [consultado en 2019].
- [2] J. H. Park, L. Peyrin-Biroulet, M. Eisenhut, and J. Il Shin, "IBD immunopathogenesis: A comprehensive review of inflammatory molecules," *Autoimmun. Rev.*, vol. 16, no. 4, pp. 416–426, Apr. 2017. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.02.013> [consultado en 2019].
- [3] C. Soendergaard, F. H. Bergenheim, J. T. Bjerrum, and O. H. Nielsen, "Targeting JAK-STAT signal transduction in IBD," *Pharmacol. Ther.*, vol. 192, pp. 100–111, 2018. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.07.003> [consultado en 2019].
- [4] G. C. Fonseca-Camarillo *et al.*, "Expresión del gen de IL-6 y TNF- α en la mucosa rectal de pacientes con colitis ulcerosa crónica idiopática y controles," *Rev. Gastroenterol. Mex.*, vol. 74, no. 4, pp. 334–340, 2009.
- [5] Y. Ding, P. Cesare, L. Drew, D. Nikitaki, and J. N. Wood, "ATP, P2X receptors and pain pathways," *J. Auton. Nerv. Syst.*, vol. 81, no. 1–3, pp. 289–294, Jul. 2000. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0165-1838\(00\)00131-4](https://doi.org/10.1016/S0165-1838(00)00131-4) [consultado en 2019].
- [6] E. R. Lazarowski and P. J. Schwarzbaum, "Señales Purinérgicas," *Med. (Buenos Aires)*, vol. 69, pp. 298–304, 2009.

- pp. 267–276, 2009.
- [7] M. Cattaneo, “The platelet P2 receptors in inflammation,” 2015. Disponible en <https://doi.org/10.5482/HAMO-14-09-0044>. [consultado en 2019].
- [8] G. Burnstock, “Physiology and Pathophysiology of Purinergic Neurotransmission,” *Physiol. Rev.*, vol. 87, no. 2, pp. 659–797, 2007. Disponible en: <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2006> [consultado en 2019].
- [9] A. Deiteren *et al.*, “P2X3 receptors mediate visceral hypersensitivity during acute chemically-induced colitis and in the post-inflammatory phase via different mechanisms of sensitization.,” *PLoS One*, vol. 10, no. 4, p. e0123810, 2015. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123810> [consultado en 2019].
- [10] A. P. Ford, “In pursuit of P2X3 antagonists: novel therapeutics for chronic pain and afferent sensitization.,” *Purinergic Signal.*, vol. 8, no. Suppl 1, pp. 3–26, Feb. 2012. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11302-011-9271-6>. [consultado en 2019].
- [11] Jarvis, M. F. *et al.* A-3174911, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X3 and P2X2/3 receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 17179–84. 2002.
- [12] Y. L. Hsieh, H. Chiang, J. H. Lue, and S. T. Hsieh, “P2X3-mediated peripheral sensitization of neuropathic pain in resiniferatoxin-induced neuropathy,” *Exp. Neurol.*, 2012. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.02.013>. [consultado en 2019].
- [13] S. Melgar, A. Karlsson, and E. Michaëlsson, “Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation,” *Am. J. Physiol. Liver Physiol.*, 2005. Disponible en: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00467.2004> [consultado en 2019].
- [14] G. P. Morris, P. L. Beck, M. S. Herridge, W. T. Depew, M. R. Szewczuk, and J. L. Wallace, “Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon.,” *Gastroenterology*, vol. 96, no. 3, pp. 795–803, Mar. 1989.

Efecto de solventes sobre la producción y separación de la mezcla ABE producida por *Clostridium acetobutylicum* (A)

María Fernanda Cano Aguilera
Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Carretera Irapuato-Silao Km.12.5,
Irapuato, Gto., México 36821
feer_aguilera11@hotmail.com

Asesor: Ricardo Morales Rodríguez
Universidad de Guanajuato
División de Ciencias Naturales y Exactas
Noria Alta s/n Noria Alta,
C.P 36050 Guanajuato, Gto.
ricardo.morales@ugto.mx

Resumen — Los biocombustibles se han vuelto atractivos en los últimos años debido a diversas características que los hacen buenos candidatos para la sustitución de combustibles fósiles. Es por esto, que el objetivo fue evaluar el efecto del disobutil adipato para aumentar el crecimiento de *Clostridium acetobutylicum* y la producción de ABE mediante su metabolismo. Se empleo un medio de cultivo específico que en su mayoría contenía glucosa y extracto de levadura. Los resultados fueron mejores en el caso de la fermentación sin solvente ya que se observó que este inhibía el crecimiento de la bacteria, por lo tanto, la producción de ABE. Finalmente, este solvente no presenta buenos resultados para la separación de la mezcla ABE, ya que la producción de esta se disminuyó notablemente.

Palabras clave — Biocombustibles, fermentación, disobutil adipato, solvente.

Abstract — Biofuels have become attractive in recent years due to various characteristics that make them good candidates for fossil fuel replacement. Therefore, the objective was to evaluate the effect of disobutyl adipate to increase the growth of *Clostridium acetobutylicum* and the production of ABE through its metabolism. A specific culture medium was used that mostly contained glucose and yeast extract. The results were better in the case of solvent-free fermentation since it was observed that this inhibited the growth of the bacteria, therefore, the production of ABE. Finally, this solvent does not show good results for the separation of the ABE mixture, since the production of this mixture was significantly reduced.

Keywords — Biofuels, fermentation, disobutil adipato, solvent.

I. INTRODUCCIÓN

En este trabajo se pretende evaluar el efecto de un solvente utilizado para el crecimiento y la producción de ABE por la cepa *Clostridium acetobutylicum* con el fin de elevar los rendimientos que se obtienen en la fermentación, ya que, se ha reportado que el biobutanol es un biocombustible atractivo debido a varias características, como el potencial para sustituir al etanol y al biodiesel al momento de utilizarse como aditivos de la gasolina. ^[1]

Debido al rápido crecimiento de la población en el mundo, el consumo de los combustibles fósiles ha incrementado de manera preocupante.^[2] Además, la crisis ecológica que se ha presentado en los últimos años nos brinda la responsabilidad de buscar alternativas mas viables para que el uso de combustibles no siga dañando nuestro medio ambiente. ^[3]

II. MARCO TEÓRICO

La fermentación ABE (acetona-butanol-etanol) es un proceso biocatalítico que utiliza un microorganismo para procesar los hidratos de carbono (fructosa, sacarosa, glucosa, etc.) y generar productos finales de solventes como la acetona, butanol y etanol. ^[4,7] En el proceso de fermentación generalmente se involucra dos principales fases, en la primera etapa existe la producción de ácidos, acetatos y butirato, normalmente en esta primera fase comienza el crecimiento celular. Mientras que en la segunda fase se forman solventes (acetona, n-butanol y etanol) gracias a los metabolitos que fueron producidos en la primera etapa. ^[5] La extracción de los productos de la fermentación es una técnica complicada debido a la aglomeración de estos, es por ello que utilizar un solvente puede generar una mejor separación mediante una extracción líquido-líquido. ^[6]

Para favorecer la producción de biomasa, es necesario mantener las condiciones del medio de cultivo como, un pH de 5, una temperatura de 37°C, anaerobiosis y una agitación constante de aproximadamente 100rpm. ^[7,8]

Los biocombustibles se generan a partir de materiales y/o desechos naturales y son la principal fuente de energía renovable debido a que han logrado sustituir una gran parte del consumo de los combustibles fósiles tradicionales, como el petróleo y el carbón. Existen combustibles altamente usados a nivel industrial, entre ellos se encuentran principalmente: bioetanol y biodiesel. Sin embargo, existen alternativas diferentes para el uso de biocombustibles como lo son el biobutanol y biopropanol. ^[9]

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. PREPARACIÓN DEL INÓCULO

La cepa *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 [Concentración 10% v/v], proporcionada por el laboratorio de diversidad e interacción microbiana (LDIM) del Instituto tecnológico superior de Irapuato.

El microorganismo se sembró en tubos con caldo tioglicolato, con 1ml de aceite mineral para generar un medio anaerobio y se incubó a 37°C y una agitación constante de 100 rpm.

B. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Se prepararon tres botellas serológicas con 50ml de medio de cultivo cada una. Cada botella contenía 40 g/L de glucosa, 3 g/L de extracto de levadura, solución de sales (0.5 g/L K_2HPO_4 , 0.5 g/L KH_2PO_4 , 0.2 g/L $MgSO_4$, 7 H_2O , 0.01 g/L $MgSO_4$, H_2O , 0.01 g/L de NaOH Y 0.01 g/L $FeSO_4$, 7 H_2O) y se aforo con agua destilada. Al término de la preparación, se midió el pH en potenciómetro y después se esterilizó en autoclave por 15 min a 121°C y 15 psi. ^[8]

Posteriormente, en condiciones asépticas se sellaron las botellas serológicas con tapones de goma y se le añadieron vitaminas (P-amino benzoico (PABA) 0.001 g/L y biotina 0.0001 g/L a un pH ajustado de 5).

C. FERMENTACIÓN CONTROL

Se le adicionó 5mL de inóculo a cada botella. Debido a las condiciones necesarias de la bacteria, se le agregó flux de nitrógeno por 10 min cada tercer día a cada botella para mantener el sistema anaerobio. Posteriormente, se mantuvo en una incubadora por 3 días con una temperatura de 37°C y agitación constante a 100 rpm. (Fig. 1)

D. FERMENTACIÓN CON SOLVENTE

Se siguió nuevamente la preparación del medio de cultivo descrito anteriormente, pero variando la concentración de glucosa (10, 30 y 40 g/L, respectivamente) y en esta ocasión se le añadió 0.5ml del disobutil adipato a cada una de las botellas. (Fig. 2)

E. MUESTREO

Se establecieron nueve tiempos de muestreo, en donde se evaluó el crecimiento microbiano. En cada tiempo, se tomó 3mL de muestra de cada botella en condiciones asépticas y se colocaron en tubos Falcon de 15mL. Se midió el cambio de pH en potenciómetro calibrado. Posteriormente, se realizó la técnica de peso seco. Finalmente, se midió la absorbancia en espectrofotómetro de micro placa a una longitud de 540nm.

IV. RESULTADOS

A. FERMENTACIÓN CONTROL

Se realizó una cinética para evaluar el crecimiento de la bacteria con las condiciones de la fermentación control. Primeramente, se evaluó el crecimiento del microorganismo en la fig. 1. Se tomaron 3 botellas como referencia (1, 2 y 3). La bacteria tuvo una fase de latencia de 6 horas, por lo que a partir de estas comenzó a elevarse el crecimiento terminando su fase exponencial aproximadamente entre las 22 y las 28hrs.

La figura 2, representa el cambio de pH que se tuvo durante la fermentación. Se observa un claro decremento de las tres botellas control pasando por una fase de acidogénesis natural de la bacteria, sin embargo, no llegó a su fase de solventogénesis lo cual genera una inhibición en la producción de los metabolitos.

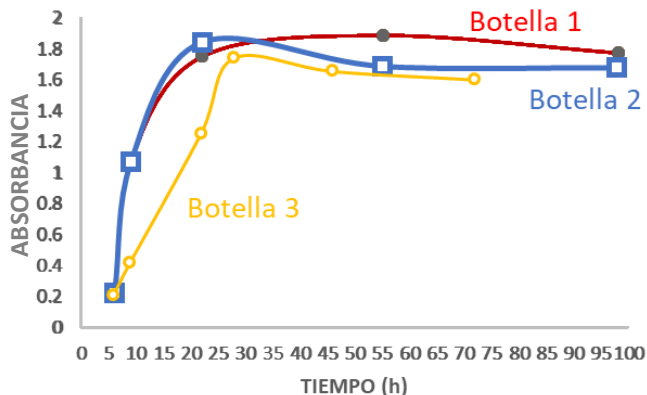


Fig. 1: Cinética de crecimiento CONTROL. Tiempo (h) vs absorbancia.

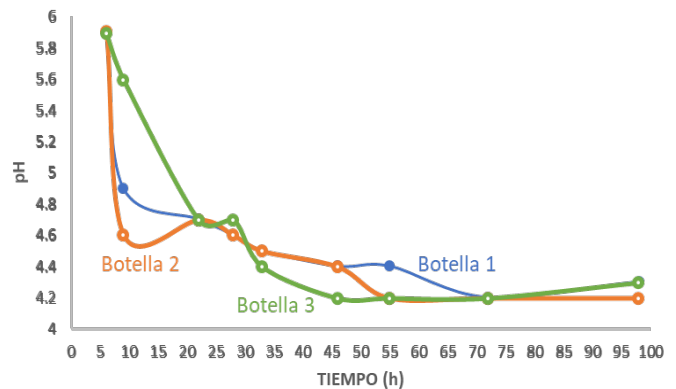


Fig. 2: Cambio de pH vs tiempo (h). CONTROL.

B. FERMENTACIÓN CON SOLVENTE

Durante la fermentación con solvente que se muestra en la fig. 3, se observó una inhibición en el crecimiento de la bacteria y, por ende, en la producción de ABE.

La fig. 4 muestra el comportamiento del pH, el cual denota una baja actividad en la producción de los metabolitos de interés al mostrarse casi constante durante las 96 h de fermentación. Al igual que en la fermentación control, esta se mantuvo en fase de acidogénesis

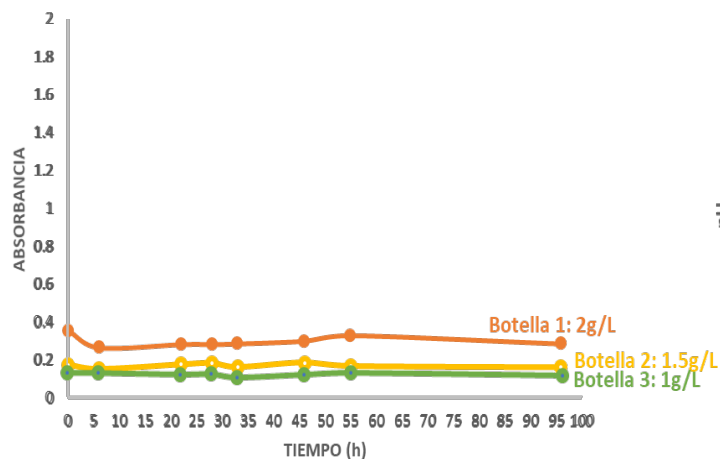


Fig. 3: Cinética de crecimiento SOLVENTE. Tiempo (h) vs absorbancia 540nm.

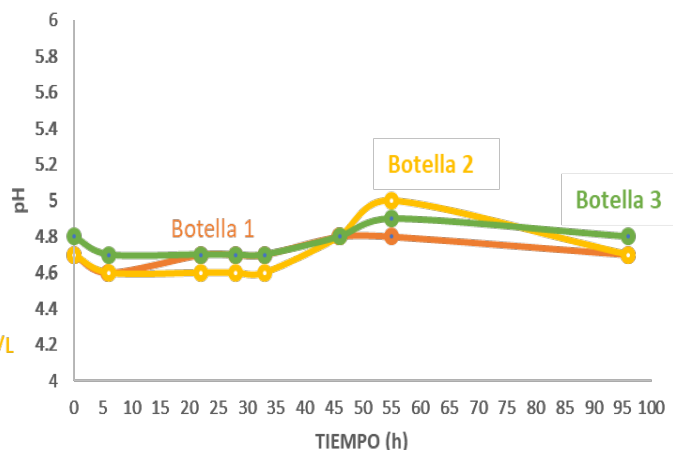


Fig. 4: Cambio de pH vs tiempo (h). SOLVENTE.

V. DISCUSIÓN (O ANÁLISIS DE RESULTADOS)

Los resultados obtenidos en la fermentación control, corresponden a lo esperado, de acuerdo a la bibliografía. Las figuras 3 y 4 muestran un buen crecimiento de *Clostridium acetobutylicum*, aunque los cambios de pH durante las 96h no corresponden a lo encontrado en la literatura. Por otro lado, en la fermentación con solvente, la producción de ABE no fue favorable debido a la inhibición provocada por el disobutil adipato en el crecimiento de la bacteria y, por ende, la generación del metabolito. Se considera que el pH tuvo una gran influencia en estos resultados.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Finalmente, el disobutil adipato no es un buen candidato para la separación de la mezcla ABE ya que inhibe el crecimiento de la bacteria y la formación de los productos puede llegar a ser mínima. Se recomendaría utilizar otro tipo de solvente con una mayor disolución en el medio, ya que puede que esta sea la causa de la inhibición. También se recomienda buscar una estrategia diferente a la de agregar el solvente en presencia de biomasa para la separación del producto.

VII. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Primordialmente, a la Dra. Divanery Rodríguez Gómez, por la guía brindada incondicionalmente durante el verano. Al Dr. Ricardo Morales Rodríguez, por la oportunidad de desarrollar este proyecto y finalmente, al laboratorio de la Universidad de Guanajuato.

REFERENCIAS

- [1] Butamax. Página web. www.butamax.com. Fecha de consulta 09-julio-2019.
- [2] Samarti-Rios, L., Sanchez-Morales, M., Avalos-Farfan, S. Diseño de una planta para la producción de Acetona, Butanol y Etanol a través de una ruta biológica [Tesis]. UAM Iztapalapa. 2014.
- [3] Rajchenberg-Ceceña, E., Rodríguez-Ruiz, J. A., Juárez, K., Martínez, A., & Morales, S. (2009). Producción Microbiológica de Butanol. *BioTecnología*, 13(3).
- [4] Al-Tabib, A. I., Al-Shorgani, N. K., Hassan, H. A., Hamid, A. A., & Kalil, M. S. (2017). Production of acetone, butanol, and ethanol (ABE) by *Clostridium acetobutylicum* YM1 from pretreated palm kernel cake in batch culture fermentation. *BioResources*, 12(2), 33713386.
- [5] Medina Sandoval, Y. M. Evaluación de la concentración de *clostridium acetobutylicum* ATCC 824 para la producción de butanol a partir de glucosa (Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias).
- [6] Henley, E.J. y Seader, J.D. "Operaciones de separación por etapas de equilibrio en Ingeniería Química". Reverté, Barcelona. 1988.
- [7] Henao, Lessa V. (2014). Modelado matemático y simulación para mejor la producción de butanol en la fermentación ABE (Tesis de fin de Máster). Universidad de Valladolid, España.
- [8] L. Samarti. Diseño de una planta para la producción de Acetona, Butanol y Etanol a través de una ruta biológica [Tesis]. Universidad Autónoma Metropolitana, 2014.
- [9] Maddox, I. S., Qureshi, N., & Roberts-Thomson, K. (1995). Production of acetone-butanol-ethanol from concentrated substrate using *clostridium acetobutylicum* in an integrated fermentation-product removal process. *Process Biochemistry*, 30(3), 209-215.

Efecto de solventes sobre la producción y separación de la mezcla de ABE producida por *Clostridium acetobutylicum* (B)

María Fernanda Pulido López

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Carretera Irapuato-Silao km. 12.5 Col. El Copal
C.P. 36821 Irapuato, Gto.
fernandapulido27@outlook.es

Asesor: Ricardo Morales Rodríguez

Universidad de Guanajuato
División de Ciencias Naturales y Exactas
Noria Alta s/n, Noria Alta,
C.P. 36050 Guanajuato, Gto.
ricardo.morales@ugto.mx

Resumen — La fermentación de acetona-butanol-etanol (ABE) por *Clostridium* ha demostrado ser prometedora para la producción a escala industrial de biobutanol. En la actualidad, la tecnología y aplicación de la fermentación ABE es un objeto de investigación debido a las propiedades que presentan estos compuestos para disminuir el uso de combustibles fósiles. Sin embargo, la fermentación ABE sufre de bajo rendimiento y productividad debido al proceso para llevar a cabo la separación de la mezcla. El presente trabajo se realizó con el fin de determinar el efecto que tiene un solvente al ser utilizado como agente de extracción de butanol proveniente de la fermentación llevada a cabo por *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.

Palabras clave — Fermentación ABE, solvente, *Clostridium acetobutylicum*.

Abstract — The fermentation of acetone-butanol-ethanol (ABE) by *Clostridium* has proven promising for the industrial scale production of biobutanol. At present, the technology and application of ABE fermentation is an object of investigation due to the properties of these compounds to reduce the use of fossil fuels. However, ABE fermentation suffers from poor performance and productivity due to the process for carrying out the mixing separation process. This work was carried out in order to determine the effect that a solvent has when used as a butanol extraction agent from fermentation carried out by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.

Keywords — ABE fermentation, solvent, *Clostridium acetobutylicum*.

I. INTRODUCCIÓN

A través de los años, el consumo de energía se ha incrementado debido principalmente al crecimiento de la población y la industrialización de muchas ciudades generando graves consecuencias como el cambio de las condiciones ambientales, la dificultad de acceso a yacimientos de combustibles fósiles y, por ende, una alta demanda de energía. [1]

Actualmente se han realizado búsquedas que generen alternativas para la obtención de energía, por ejemplo, estudios recientes demuestran que con el desarrollo de nuevas tecnologías se han logrado producir biocombustibles de segunda generación tales como el biobutanol, bioetanol y biometanol. [2]

En la producción biotecnológica de butanol a partir de materias primas renovables se han empleado microorganismos del género *Clostridium*.

Estas bacterias presentan una serie de características particulares ya que son: gram positivas, estrictamente anaerobias, su crecimiento se favorece a pH ligeramente ácido y a una temperatura de 37°C. Además, pueden utilizar una gran variedad de sustratos como

monosacáridos, principalmente glucosa y polisacáridos que son metabolizados y convertidos en solventes, tales como: acetona, butanol y etanol. [2,3]

Anteriormente, el butanol era producido industrialmente por fermentación, sin embargo, este proceso no pudo competir económicamente y fue reemplazado por la síntesis petroquímica.

Hoy en día, las investigaciones se han enfocado en procesos de fermentación que sean viables para la obtención de butanol ya que puede ser utilizado como aditivo de los combustibles líquidos (gasolina) debido a sus diversas ventajas como son: su alta capacidad de mezclado, mayor contenido energético y es menos peligroso a diferencia de otros. [4]

II. MARCO TEÓRICO

El butanol es miscible en solventes orgánicos comunes y parcialmente en agua. Hasta hoy, el butanol es considerado una mejor alternativa que el etanol como biocombustible. El biobutanol puede ser producido por bacterias del género *Clostridium* en un proceso conocido como fermentación de acetona-butanol-etanol (ABE). La fermentación ABE es un proceso bifásico que convierte los azúcares en ácidos (acetato, butirato) y solventes (acetona, butanol, etanol) tal como lo indica la figura 1. [4-6]

Durante la primera fase, la acidogénesis, los productos primarios son los metabolitos ácidos. Como consecuencia de esta fase se presenta una disminución en el pH, lo cual es crucial para el crecimiento de los microorganismos.

El pH aumenta durante la fase solventogénica, en donde, los ácidos (butírico y acético) son nuevamente asimilados, dando lugar a la formación de acetona, etanol y butanol. [3]

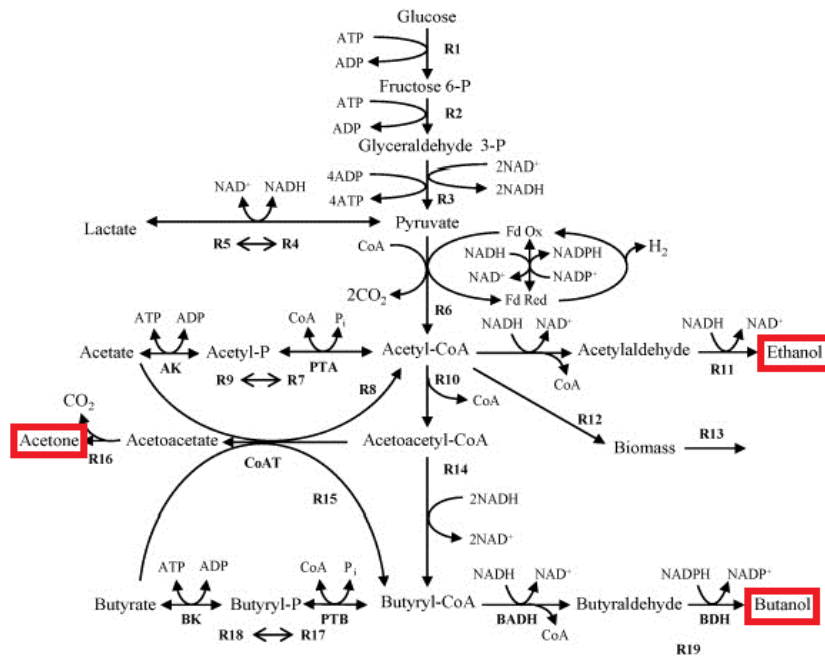


Fig. 1. Vía metabólica de *C. acetobutylicum* para la producción de ABE.

Durante la fermentación ABE variables como el pH, temperatura, concentración del sustrato y la concentración de productos finales, pueden afectar la producción de butanol. Un pH de 5 y una temperatura de 37°C, favorecen el crecimiento de *C. acetobutylicum* y mayor obtención de butanol. [4]

III. METODOLOGÍA

A. Preparación del inóculo

Para llevar a cabo la preparación del inóculo se utilizó la cepa *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 [Concentración 10% v/v], proporcionada por el Laboratorio de Diversidad e Interacción Microbiana (LDIM) del Instituto tecnológico Superior de Irapuato. El microorganismo se inoculó en tubos que contenían caldo tioglicolato, 1ml de aceite mineral estéril para generar un medio anaerobio y se colocó en incubadora a 37°C y una agitación constante de 100 rpm.

B. Preparación del medio de cultivo

Se prepararon 3 botellas serológicas a un volumen de 50 ml cada una. Las botellas contenían como medio de cultivo 40 g/L de glucosa, 3 g/L de extracto de levadura, solución de sales que contenían (0.5 g/L K_2HPO_4 , 0.5 g/L KH_2PO_4 , 0.2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 g/L $MgSO_4 \cdot H_2O$, 0.01 g/L NaOH y 0.01 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$) y se aforo con agua destilada. Al término de la preparación, se midió el pH con un potenciómetro y se esterilizó en autoclave por 15 min a 121°C y 15 psi [1]. Posteriormente, en condiciones asépticas se sellaron las botellas serológicas con tapones de goma.

Posteriormente se inoculó 5 ml de muestra a cada botella y se les añadieron vitaminas (P-amino benzoico (PABA) 0.001 g/L y biotina 0.0001 g/L a un pH ajustado de 5). Por último, se le agrego flux de nitrógeno por 10 min cada tercer día a cada botella para eliminar el oxígeno y conservar el medio en condiciones anaerobias.

Para la fermentación control, se tomaron 3 botellas (B1, B2 y B3) y se dejaron por 3 días en incubación a 37°C y con una agitación constante de 100 rpm.

C. Fermentación con presencia de solvente

Para llevar a cabo la fermentación con el solvente se siguió la misma metodología para la preparación del medio de cultivo y la inoculación del microorganismo ya antes descrita, sin embargo, en esta experimentación se agregaron 0.5 ml de disobutil adipato a cada una de las botellas y se variaron 3 distintas concentraciones de glucosa las cuales fueron (40, 30 y 10 g/L respectivamente).

D. Muestreo

Se establecieron 9 tiempos de muestreo (de 6-96 horas) con tiempos intermedios con la finalidad de evaluar el crecimiento del microorganismo en presencia del solvente. De acuerdo a los tiempos establecidos, se extrajeron 3 ml de muestra de cada una de las 3 botellas en condiciones asépticas con ayuda de una jeringa, se colocaron en tubos Falcón de 15 ml y se midió el pH de cada muestra recolectada con un potenciómetro calibrado. Después, se realizó la técnica de peso seco.

Finalmente, se midió la absorbancia en espectrofotómetro de microplaca a una longitud de 540 nm.

IV. RESULTADOS

a) Fermentación control

En la figura 2 se observa la cinética de crecimiento del microorganismo en la fermentación control en la cual, se pueden apreciar claramente cada una de las fases. Para el caso de las 3 botellas la fase de latencia se ve representada entre las 0 y 6 horas y la fase exponencial del microorganismo termina entre las 22 y 28 horas.

El cambio de pH que se tuvo durante la fermentación control se muestra en la figura 3. Se observa un claro decremento de las tres botellas pasando por una fase de acidogénesis natural de la bacteria, sin embargo, no llegó a su fase de solventogénesis lo cual genera una inhibición en la producción de los metabolitos (segunda fase de la fermentación de acetona, butanol y etanol).

b) Fermentación con solvente

En la figura 4 se representa la fermentación con solvente, se puede observar que al agregar disobutil adipato se inhibe el crecimiento de la bacteria y como consecuencia la producción de ABE.

El comportamiento del pH se ve reflejado en la figura 5 en el cual se pueden apreciar valores constantes en las 3 botellas y al igual que en la fermentación control solo se mantuvo en fase de acidogénesis ya que solo se mantiene en intervalos de pH entre 4.6 y 4.8.

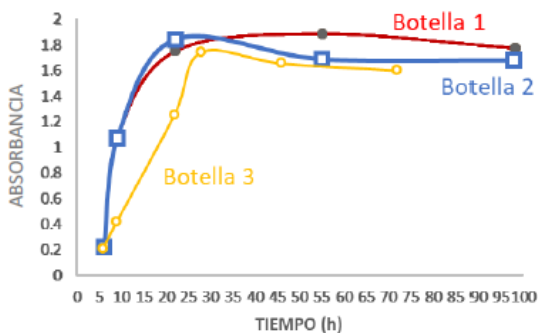


Fig. 2. Cinética de crecimiento (control). Tiempo (h) vs absorbancia.

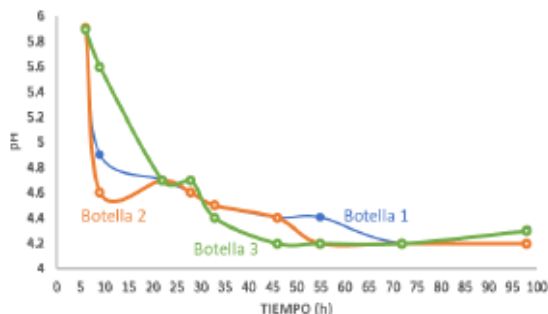


Fig. 3. Cambio de pH vs tiempo (h).

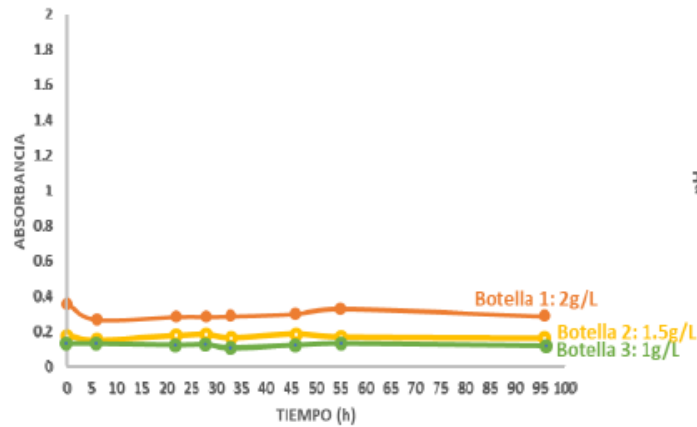


Fig. 4. Cinética de crecimiento (con solvente). Tiempo (h) vs absorbancia.

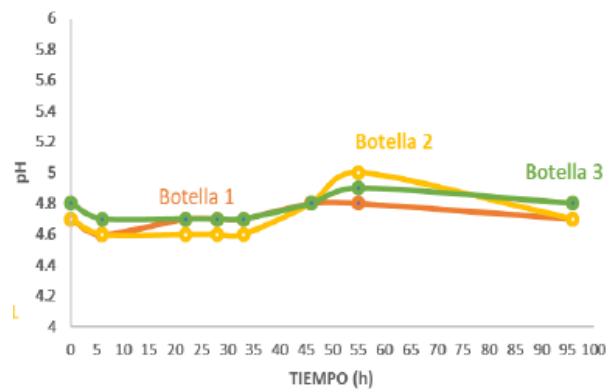


Fig. 5. Cambio de pH vs tiempo (h).

V. CONCLUSIONES

Para el caso de la fermentación control se obtuvieron resultados favorables en el crecimiento de *Clostridium acetobutylicum*. Sin embargo, los cambios de pH no corresponden a los datos revisados en la literatura de acuerdo a la vía metabólica que sigue el microorganismo.

En cuanto a la fermentación con disobutil adipato se encontró que, cuando existe presencia del solvente el crecimiento del microorganismo se inhibe y no existen cambios de pH significativos ni la formación de los productos de interés. El crecimiento de la bacteria se mantiene constante en comparación con la fermentación control en donde se encuentran buenos valores de crecimiento.

En estudios previos se encontró que hay una mayor producción de biomasa al agregar disobutil adipato, sin embargo, se recomienda que al terminar la fermentación se agregue el solvente con el fin de obtener una mejor extracción líquido-líquido de lo contrario se puede inhibir el crecimiento del microorganismo y, por ende, no haya presencia de ABE.

VI. RECONOCIMIENTOS

Al Dr. Ricardo Morales Rodríguez (Universidad de Guanajuato) y Dra. Divanery Rodríguez Gómez (ITESI) por la asesoría y apoyo.

A la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato por el material y equipo para poder llevar a cabo el proyecto durante la estancia de verano.

REFERENCIAS

- [1] L. Samarti, Diseño de una planta para la producción de Acetona, Butanol y Etanol a través de una ruta biológica [Tesis]. Universidad Autónoma Metropolitana, 2014.
- [2] C. Arellano, Obtención de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos sometidos a hidrólisis enzimática [Tesis]. Universidad Veracruzana, 2015.
- [3] Y. Medina, Evaluación de la concentración de Clostridium acetobutylicum ATCC 824 para la producción de butanol a partir de glucosa [Tesis]. Pontificia Universidad Javeriana, 2013.
- [4] E. A. Buehler & A. Mesbah "Kinetic Study of Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation in Continuous Culture", PLoS ONE 11(8).
- [5] Maddox, I. S., Qureshi, N., & Roberts-Thomson, K. (1995). Production of acetone-butanol-ethanol from concentrated substrate using clostridium acetobutylicum in an integrated fermentation-product removal process. *Process Biochemistry*, 30(3), 209-215.
- [6] Rajchenberg-Ceceña, E., Rodríguez-Ruiz, J. A., Juárez, K., Martínez, A., & Morales, S. (2009). Producción Microbiológica de Butanol. *BioTecnología*, 13(3).

Efecto promotor de crecimiento en plantas de huizache (*Acacia farnesiana*) y lenteja (*Lens culinaris*) con uso de rizobacterias

Daniela Galindo Rocha

Universidad de Guanajuato
Departamento de Biología Experimental
Noria Alta s/n, Col. Noria Alta, C.P. 36050,
Guanajuato, Gto.
d.galindorocha@ugto.mx

Asesora: Blanca Estela Gómez Luna

Universidad de Guanajuato
Departamento de Ingeniería Agroindustrial
Prolongación Río Lerma s/n, C.P. 38060
Celaya, Gto.
be.gomez@ugto.mx

Resumen — El huizache (*Acacia farnesiana*) es una especie nativa y con una amplia distribución en México, debido a su fácil propagación y efectiva capacidad de adaptación al sustrato, juega un papel importante como materia prima en diferentes actividades humanas. La explotación inadecuada ha provocado una constante disminución de la población. El objetivo del estudio es determinar aquellas cepas que tengan un efecto positivo en el desarrollo de la plántula para su germinación y dispersión en un medio controlado. Las rizobacterias fueron resembradas en medio PDA, para posteriormente inocularse con las semillas de interés y registrar sus medidas biométricas ante la interacción de los individuos. La cepa que muestra un mayor efecto promotor para huizache y lenteja es 265.

Palabras clave — Fitohormonas, conservación de especies y germinación.

Abstract — Huizache (*Acacia farnesiana*) is a native specie with a wide spread in Mexico, due to it is easily propagation have an effective capacity of adaptation to the substrate plays an important role as raw material in different human activities. Inadequate exploitation has caused a constant decline in the population of the plant. The study's objective is to determine those microbial strains that have a positive effect on the development of the seedling for germination and dispersion in a controlled environment. The rhizobacteria were reseeded in PDA medium and then inoculate with the seeds and record their biometric measurements, product of the interaction with the species. The strain that shows a best promoter effect for huizache and lentil is 265.

Keywords — Phytohormones, wildlife conservation and germination.

I. INTRODUCCIÓN

El huizache (*A. farnesiana*) es una especie nativa y con una amplia distribución a lo largo de la república que abarca distintos estados, desde Sonora a Chiapas e incluye a otros estados representativos como Guanajuato. El huizache es un arbusto espinoso, perennifolio o subcaducifolio, de uno a dos metros de altura, flores amarillas y vainas rojizas y subcilíndricas [1]. Debido a su fácil propagación y efectiva capacidad de adaptación al sustrato, este arbusto juega un papel importante como materia prima en diferentes actividades humanas. El hecho de que las distintas partes del arbusto (flor, raíz, tallo, corteza y fruto) sean aprovechadas para actividades económicas, ha provocado una constante disminución de su población en zonas específicas del territorio mexicano. Esta disminución provoca cambios estructurales a nivel ecológico del hábitat; por ejemplo, el fenómeno de insularización. El conocimiento de conservación y uso adecuado de la materia prima, programas de fomento y explotación responsable, permitiría mejorar la calidad de vida de las comunidades que hacen uso de éste recurso natural [2].

Las rizobacterias son microorganismos que mantienen una relación simbiótica con la raíz de la planta. Esta interacción ecológica puede proveer beneficios mutuos para los organismos; mientras las bacterias utilizan los exudados de la raíz, ricos en sustancias fundamentales para el crecimiento, éstas proveen otro tipo de sustancias útiles a la planta como compuestos necesarios para el desarrollo vegetal. Aquellos procesos que benefician directamente a la planta, son llamados efectos directos, dentro de los cuales encontramos fijación de nitrógeno y fosfatos, producción de sustancias nutritivas y fitorreguladores [3].

El objetivo del estudio es determinar a partir de una colección de cepas, aquellas cepas que tengan un efecto positivo en el desarrollo de la plántula de huizache para su germinación y dispersión en un medio controlado. La semilla de huizache es representativa por su dureza, lo que impide una reproducción efectiva del material vegetal y menos uniforme.

II. MARCO TEÓRICO

El proceso de crecimiento vegetal con rizobacterias se rige ampliamente bajo cuatro conceptos: fisiología microbiana, quimiorreceptores, quimiotaxis y sistemas de regulación codificados genéticamente. El sistema de quimiotaxis es basado en la fisiología de la rizobacterias (flagelos bacterianos) y las reacciones de fosforilación (quimiorreceptores en la membrana citoplasmática) que provocan un desplazamiento en el sustrato hacia los pelos radiculares o cofia de la raíz [4]. El reconocimiento genético entre los organismos es específico para cada planta y bacteria.

Los posibles compuestos a analizar en esta revisión buscan únicamente cambios favorables a nivel celular, bioquímico y por ende morfológico. La clasificación de fitohormonas es diversa dependiendo del autor, sin embargo, sólo se mencionaran aquellas implicadas en el crecimiento vegetal principalmente. Las auxinas son compuestos reguladores a nivel de crecimiento, dominancia apical, y enraizamiento, la formación de este compuesto es generado a través de tres rutas metabólicas donde el precursor es triptófano: ácido indol-3-piruvico (IpyA), formación de la triptamina a partir del precursor y vía indol-3-acetamida (IAM) [4]. Las giberelinas características por el alargamiento del tallo y por interrumpir el periodo de latencia en semillas, presentan similitudes en comparación las auxinas, sin embargo, las giberelinas son producidas por rizobacterias muy específicas y presentan un número de enzimas menor para su producción activa. Por último, las citocinas son producidas directamente por los microorganismos de una manera biológicamente activa.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1) *Obtención de las cepas de rizobacterias*

Se utilizó la colección de rizobacterias de suelo del Área Natural Protegida “El Cerro del Culiacán” para posteriormente resembrar las cepas en medio PDA (Papa dextrosa agar) e incubar a una temperatura de 28 °C y con un tiempo de 24 a 72 h dependiendo de su fase de crecimiento exponencial.

2) *Propagación de material microbiano en medio líquido*

Las cepas se inocularon en 10 mL de caldo de papa y dextrosa mediante un inóculo tomado con la punta de un palillo de madera para después incubar con agitación a 28 °C por 24 h.

3) *Preparación de material vegetal*

Las semillas de huizache (*A. farnesiana*) fueron donadas para la experimentación y propagación de la especie. Se seleccionaron aquellas semillas factibles para su reproducción y como tratamiento pregerminativo se utilizó el método físico de escarificación en las semillas. Se escarifico cada semilla con lija tipo agua en el eje hipocótilo hasta visualizar un cambio de coloración comparada con el tegumento café característico de la semilla. Las semillas fueron colocadas en extracto de papa con cada cepa para después ser agitadas constantemente por 30 minutos antes de ser transferidas a placas de Petri de vidrio. Las semillas de lenteja recibieron un tratamiento similar a excepción de que no se utilizó ningún tratamiento pregerminativo y fueron lavadas con etanol al 70%.

4) *Germinación de material vegetal*

Las semillas con el tratamiento anterior se colocaron en placas Petri de vidrio con papel humedecido, 25 semillas en cada placa se incubaron a temperatura ambiente por 96 h y se revisaron en periodos de 24 h.

5) *Evaluación de material vegetal*

Al concluir el período de incubación de las semillas, fueron seleccionados cinco ejemplares representativos de cada caja para su registro fotográfico y posterior medición. La medición de la radícula comprende toda la raíz principal, es decir desde el cuello de la plántula hasta la cofia. Las plántulas fueron tratadas con pinzas de acero inoxidable para reducir en la mayor medida el daño mecánico por manipulación y fueron hidratadas en la placa Petri con agua de garrafón después de ser manipuladas. Posteriormente a las 48 h, las plántulas se sembraron en vasos perforados de plástico con sustrato estéril. Cada vaso debió mantener una humedad constante por lo que se regó cada 24 h las plántulas con agua tratada del sistema municipal. Al término de la siembra en el sustrato, los tubos Falcón se aforaron a 50 mL con el inóculo restante y agua estéril para aplicar 1 mL de inóculo con una jeringa a cada vaso individualmente. Después de 15 días de trasplantarse a sustrato, se realizaron las mediciones semanales comprendidas desde el tallo de la planta desde el cuello de la raíz a la yema apical.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se trabajaron con un total de 38 cepas para huizache y sus respectivos controles de agua y caldo de papa y dextrosa (Tabla 1). Las cepas 112, 264.1 y 265 demuestran un mayor porcentaje de germinación a las 24 h y las cepas 113, 114, 116, 117, 202, 221, 253, 258, 263, 265 y 265-B respectivamente a las 96 h. Respecto a longitud total, las cinco cepas representativas son 109, 265, 270, 301 y 317. Las cepas para biomasa promedio de peso fresco; 111, 123, 264.1, 275 y 304. Las cepas para biomasa promedio de peso seco;

102, 111, 123, 304 y 306. Las cepas para longitud del tallo final; 112, 263, 270, 304 y 313. Por últimos las cepas correspondientes a longitud de raíz; 111, 123, 270, 275 y 317.

Tabla 1. Compendio de datos obtenidos de huizache (*A. farnesiana*)

Cepa	PG		LG	PF	PS	PMT	PTR
	24 h	96 h	96 h				
Control agua	4	100	2.30	0.3	0.10	5.97	3.17
Control caldo	20	92	3.20	0.24	0.08	4.57	4.67
102	16	92	3.70	0.56	0.25	11.63	9.50
106	0	96	3.30	0.35	0.12	8.83	11.73
109	40	80	5.40	0.49	0.22	11.00	12.17
111	12	60	4.00	0.62	0.26	11.13	13.17
112	36	96	5.00	0.49	0.18	11.67	12.33
113	0	100	2.70	0.35	0.11	8.63	9.90
114	12	100	4.70	0.36	0.10	11.40	10.10
116	8	100	4.50	0.30	0.10	9.63	9.27
117	16	100	3.90	0.24	0.08	6.10	6.37
123	16	84	3.40	0.60	0.25	11.53	12.97
202	0	100	4.00	0.33	0.10	7.87	9.97
203	16	96	4.10	0.37	0.10	8.73	9.83
205	0	96	3.90	0.30	0.10	8.53	6.20
208	16	92	4.40	0.36	0.11	8.23	10.50
210	4	96	5.20	0.32	0.10	7.70	8.33
213	0	96	4.30	0.56	0.22	11.37	11.10
214	0	96	3.60	0.38	0.15	10.50	11.13
221	0	100	4.50	0.43	0.16	11.07	10.73
253	0	100	3.90	0.48	0.15	8.77	10.37
256	20	92	4.90	0.42	0.15	10.67	12.10
258	0	100	3.60	0.43	0.13	9.53	11.53
263	0	100	5.10	0.40	0.14	12.10	9.17
264	24	96	4.60	0.39	0.13	8.70	8.33
264.1	36	94	4.90	0.58	0.24	11.47	11.40
265	48	100	5.70	0.46	0.17	11.17	8.17
265-B	16	100	4.30	0.43	0.16	10.03	10.00
265-B2	0	96	2.60	0.39	0.12	8.70	7.77
270	0	84	5.30	0.51	0.20	12.03	13.57
275	20	92	3.70	0.62	0.24	11.33	15.20
301	16	96	5.80	0.47	0.18	9.80	9.90
302	0	64	4.30	0.37	0.13	7.77	9.83
304	16	92	4.70	0.58	0.27	11.77	12.27
305	16	72	4.00	0.31	0.11	7.73	7.57
306	12	68	4.40	0.44	0.40	9.57	9.40
308	0	92	4.10	0.38	0.14	8.77	8.43
313	0	92	4.30	0.50	0.21	11.83	11.27
317	8	96	5.30	0.48	0.17	10.97	14.00
318	16	96	4.00	0.47	0.18	9.93	11.43

Abreviaciones: (PG)-Porcentaje de germinación, (LG)- Longitud (cm) de la radícula, (PF)- Biomasa promedio de peso fresco (g), (PS) Biomasa total peso seco (g), (PMT) Promedio de longitud del tallo final (cm) y (PMR) Promedio de longitud de raíz final (cm).

Se trabajaron con un total de 25 cepas para lenteja y sus respectivos controles de agua y caldo de papa y dextrosa (Tabla 2). Las cepas 213, 221 y 253 demuestran un mayor

porcentaje de germinación a las 24 h, las cepas 114, 265, 213, 221, 253 y 265 a 48 h y respectivamente 213, 221 y 265 a las 72 h.

Tabla 2. Compendio de datos obtenidos de lenteja (*Lens culinaris*)

Cepa	PG			LG	PF	PS	PMT	PTR
	24 h	48 h	72 h	96 h				
Control agua	0	36	56	56	1.43	0.86	18.48	11.00
Control caldo	0	68	72	72	1.76	1.09	18.58	11.08
106	0	36	56	56	0.24	0.12	21.16	6.96
109	8	28	28	28	1.22	0.73	20.00	14.62
111	4	40	40	40	0.56	0.33	23.94	8.42
112	8	24	36	36	0.27	0.22	19.38	7.18
114	8	60	60	60	0.30	0.17	20.10	6.58
202	4	12	64	64	0.75	0.42	20.00	12.80
208	4	48	48	48	0.97	0.60	17.76	13.60
210	12	28	38	38	0.41	0.29	21.16	8.14
213	32	56	72	72	1.94	1.37	22.20	13.86
214	16	36	44	44	0.24	0.17	19.76	7.58
221	20	56	76	76	0.18	0.11	17.78	7.20
253	20	56	60	60	0.79	0.44	22.68	11.75
263	8	48	52	52	0.50	0.34	19.16	9.18
264	8	44	64	64	0.45	0.26	21.36	10.76
264.1	12	56	60	60	0.78	0.45	21.66	10.26
265	4	64	76	76	1.26	0.78	19.58	14.10
275	4	24	32	32	0.63	0.40	23.22	9.04
301	12	40	40	40	1.91	1.11	18.84	14.30
304	0	28	36	36	1.82	1.04	20.30	13.40
318	16	52	64	64	0.27	0.21	20	8.86

Abreviaciones: (PG)-Porcentaje de germinación, (LG)- Longitud (cm) de la radícula, (PF)- Biomasa promedio de peso fresco (g), (PS) Biomasa total peso seco (g), (PMT) Promedio de longitud del tallo final (cm) y (PMR) Promedio de longitud de raíz final (cm).

Se trabajaron con un total de 25 cepas para lenteja y sus respectivos controles de agua y caldo de papa y dextrosa (Tabla 2). Las cepas 213, 221 y 253 demuestran un mayor porcentaje de germinación a las 24 h, las cepas 114, 265, 213, 221, 253 y 265 a 48 h y respectivamente 213, 221 y 265 a las 72 h. Respecto a longitud total, las tres cepas representativas son 213, 221 y 265. Las cepas para biomasa promedio de peso fresco: 213, 301 y 304. Las cepas para biomasa promedio de peso seco: 213, 301 y 304. Las cepas para longitud del tallo final: 111, 253 y 275. Por últimos las cepas correspondientes a longitud de raíz: 109, 213 y 301.

Las cepas de lenteja 123, 208, 265-B2, 302, 304, 305, 306, 317 y 318 presentan una radícula corta comparada con el resto de las cepas. Esta disminución significativa puede ser debida a la deficiencia de nutrientes esenciales para la planta, como por ejemplo cobre.

V. CONCLUSIONES

La cepa que muestra un mejor efecto promotor para ambas especies es 265. En base a los resultados anteriores se deduce que las rizobacterias presentan en general una actividad promotora benéfica para huizache lo que indica que es factible utilizarlas para su dispersión y reforestación.

Las variaciones obtenidas como cada planta radican en la base de las concentraciones de compuestos orgánicos benéficos para la planta y dependerán de la sensibilidad del tejido y estructura molecular por lo que se sugiere continuar con estudios futuros respecto al tema.

VI. RECONOCIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad de Guanajuato por el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano y de manera especial la doctora Blanca Estela por su constante apoyo.

REFERENCIAS

- [1] Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad (CONABIO). *Acacia farnesiana*. [En línea]. Disponible en: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/38-legum4m.pdf. [Último acceso el 22 de julio 2019].
- [2] A. H. Dávila, “La distribución del mezquite en México. Segunda reunión sobre ecología, manejo y domesticación de las plantas útiles del desierto”. *Memorias*, 1982.
- [3] D. Molina-Romero, Ma. del Rocío Bustillos-Cristales, O. Rodríguez-Andrade, Y. E. Morales-García, Y. Santiago-Saenz, M. Castañeda-Lucio, J. Muñoz-Rojas, “*Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico*” *Biológicas*, 17(2): 24–3, Diciembre 2015.
- [4] Camelo R. M., Vera M. S. P., Bonilla B. R. R., “*Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal*”, *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria* (2011) 12(2), 159-166.

El DNA exógeno afecta la regeneración y la conidiación de *Trichoderma atroviride*

Mariana Fernanda Pimentel González

Facultad de ciencias Químicas, U. A. de C.
Ing. Cárdenas Valdez S/N, República,
25280 Saltillo, Coah.

marianapimentel@uadec.edu.mx

Asesor: Alfredo Heriberto Herrera Estrella

Unidad de Genómica Avanzada,
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional.

Libr. Norte carr. León Km 9.6, Irapuato, Gto.
alfredo.herrera@cinvestav.mx

Resumen – En el hongo filamentoso *Trichoderma atroviride*, se ha observado la activación de un sistema inmune innato en respuesta al daño mecánico como sucede en otros organismos pluricelulares, describiéndose la participación del ATP extracelular (eATP) como un patrón molecular asociado al daño (DAMPs). En este trabajo se evaluó el papel del ADN extracelular (eADN) como otra posible molécula señal percibida por *T. atroviride*. Cepas de *T. atroviride* fueron expuestas a daño añadiendo ADN propio de *Trichoderma* o de varios hongos fitopatógenos. Concluyendo que el eADN propio induce la regeneración y la conidiación. Por lo que se propone que, en *Trichoderma atroviride*, el eADN es percibido como un DAMP por el sistema inmune innato como sucede en las plantas y los animales.

Palabras clave – eDNA, DAMP, daño.

Abstract – In the filamentous fungus *Trichoderma atroviride*, activation of an innate immune system has been observed in response to mechanical damage as in other multicellular organisms, describing the involvement of extracellular ATP (eATP) as a molecular pattern associated with damage (DAMPs). In this work, the role of extracellular DNA (eADN) was evaluated as another possible signal molecule perceived by *T. atroviride*. Strains of *T. atroviride* were exposed to damage by adding *Trichoderma*'s own DNA or DNA of various phytopathogenic fungi. Allowing to conclude that eADN induces regeneration and conidiation. Therefore, it is proposed that, in *Trichoderma atroviride*, the eADN is perceived as a DAMP by the innate immune system as it happens in plants and animals.

Keywords – eDNA, DAMP, damage.

I. INTRODUCCIÓN

Todos los organismos al exponerse a un daño mecánico perciben material del exterior que se libera de las células rotas. Tanto las plantas como los animales poseen un mecanismo de defensa común que involucra una serie de procesos biológicos (Villalobos-Escobedo, 2019) donde se reconoce y discrimina material exógeno propio del extraño respondiendo a través de vías de señalización que incluyen la acumulación de iones de calcio, liberación y percepción de moléculas como el ATP, señalización por cascadas de fosforilación, incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y producción oxilipinas (Oñate-Hernández, et. al., 2015). El conocimiento de cómo responden los hongos al daño es limitado, varios estudios indican que se desencadenan procesos reproductivos (Hernández-Oñate, et. al., 2015). El hongo filamentoso *Trichoderma atroviride* ha sido utilizado como modelo para entender los mecanismos de respuesta al daño (Villalobos-Escobedo, 2019). Está publicado que en *T. atroviride* después de un daño se produce un incremento de la concentración de Ca^{2+} citosólico promovido por ATP extracelular liberado de células rotas (Medina-Castellanos, et. al., 2018) y se demostró que la activación de la enzima NADPH oxidasa y la vía de señalización de las MAPK's (*Mitogen-Activated Protein Kinases*, por sus siglas en inglés) juegan un rol importante mediando la cascada de

señalización en respuesta al daño (Medina-Castellanos, et. al., 2018). La activación de estas vías de señalización resulta en la regeneración de las hifas y la producción de estructuras de reproducción asexual llamadas conidias.

El material liberado por las células rotas, percibido por células sanas, es reconocido como un Patrón Molecular Asociado al Daño (DAMP, por sus siglas en inglés) que funcionan como señales de alerta (Villalobos-Escobedo, 2019). En los animales y las plantas los DAMPs son moléculas que permiten al organismo reconocer el daño y si este es de origen abiótico (Heil, 2009), así como reconocer cuando es causado por un patógeno PAMP's (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos, por sus siglas en inglés). El ATP y el ADN extracelular (ADNe) son parte de estas moléculas asociadas al daño y son percibidas a través de receptores (Villalobos-Escobedo, 2019). Sin embargo, solo son percibidas en señal de peligro como infecciones, ruptura mecánica y disfunción celular en caso de pérdida de la integridad del núcleo, mitocondria o de la célula completa (Heil, 2018). Las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) también juegan un papel importante en procesos que incluyen la proliferación celular, transporte de iones, diferenciación celular, señales de transducción y respuestas al daño (Hernández-Oñate, 2015). En las plantas y los animales se ha reportado que la producción de estas especies se da en la zona del daño y estas dependen de la activación de la enzima NADPH oxidasa. En el 2012, Hernández-Oñate y colaboradores demostraron que la producción de ROS también juega un rol importante en el mecanismo de respuesta al daño en hongos filamentosos. Además, en el 2018 Medina-Castellanos y colaboradores demostraron que una serie de genes involucrados en la percepción de material genético extraño (un sistema inmune innato) se activan durante el daño y que la regeneración parece depender de la activación de estos genes. Estas investigaciones dan pie a la hipótesis que el DNA exógeno actúa como un DAMP, desencadenando una respuesta en *Trichoderma atroviride* ante lesiones, afectando la regeneración de sus hifas y la formación de estructuras asexuales.

II. MATERIALES Y MÉTODO

A. ADN de cepas

Las cepas de los patógenos *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Rizoctonia solani ag2* y *Rizoctonia solani ag5*, y de *Trichoderma atroviride* en su estado silvestre se cultivaron en medio PDA con celofán. Se llevó a cabo la extracción de DNA siguiendo el protocolo de extracción de DNA para hongos filamentosos. Se corrió un gel de agarosa al 1.5% con SYBRsafe para comprobar la presencia de ácidos nucleicos y su integridad.

B. Fragmentación del ADN

El DNA fue sonicado en un procesador ultrasónico (Branson sonifier 150) siguiendo la metodología reportada por Duran-Flores (2017) con modificaciones para obtener fragmentos entre 300 y 1000 pb. Se sonicaron a un poder de 55% durante un tiempo efectivo de 30 segundos (1s sonificado x 1s descanso durante 1 minuto).

C. Efecto del DNA propio y extraño sobre la regeneración de *T. atroviride*

A partir de la solución inicial de DNA fragmentado de *T. atroviride*, se prepararon soluciones conteniendo distintas concentraciones (5, 10, 20, 50, 100 y 200 ng/μL). En cuanto al DNA fragmentado de los patógenos, se llevó solo a la concentración de 50ng/μL.

Se prepararon porta objetos con medio PDB 1/2X en los cuales se inoculó la cepa de *T. atroviride* en estado silvestre. A las 24 h, con un bisturí estéril se dañó el micelio de las colonias y a los 2 minutos se añadió 100 μL del respectivo ADN sobre las heridas, en la obscuridad para evitar la inducción de la conidiación por la luz. Se llevaron a incubar durante 3 h a 27°C y se tiñeron las cepas con azul de bromofenol. Se llevaron a observación en microscopio óptico de campo claro (Leica DM6000B).

D. Efecto del DNA propio y extraño sobre la conidiación de *T. atroviride*

El efecto en la conidiación se llevó a cabo en medio PDA donde se inocularon preinóculos de *T. atroviride* previamente incubados. Al trascurrir 36 h a 27°C, se les realizó un corte en oscuridad con un bisturí estéril; a los 2 minutos se añadieron 500 μL de la solución de ADN exógeno indicada y se volvieron a incubar en oscuridad durante 36 h. Se observó el fenotipo y se colectaron las conidias para su próxima cuantificación.

III. RESULTADOS

A. Efecto del DNA propio en *T. atroviride*

Al exponer a cepas de *T. atroviride* a diferentes concentraciones de ADN propio, se observó el fenotipo cuando no se le realizó un daño (Fig. 1A) y cuando se realizó el daño (Fig. 1B). Identificando, de entrada, una respuesta diferente a cada condición. Se colectó el material y se cuantificó la conidiación (Fig. 1C) en un microscopio de campo claro con una cámara Neubauer, mostrando claramente una diferencia entre los tratamientos con y sin la adición de ADN.

La regeneración de las hifas de *T. atroviride* (Fig. 2) también mostró una diferencia significativa en cuanto a los tratamientos sin eDNA y frente a ADN.

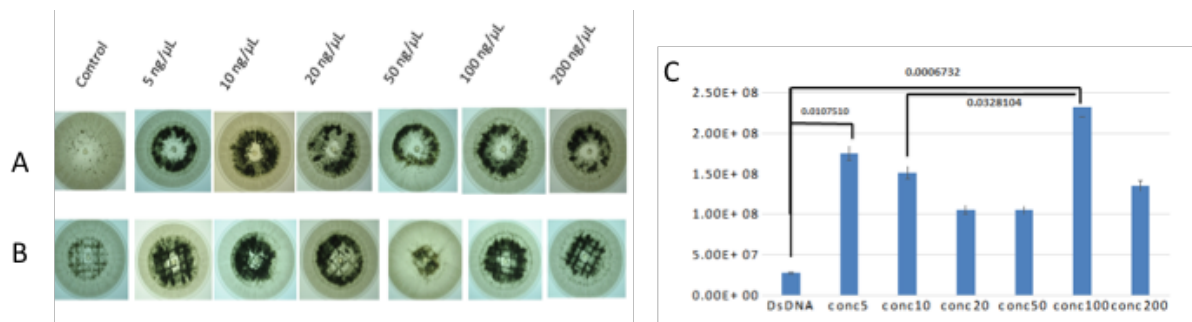


Fig. 1 Efecto de DNA propio en diferentes concentraciones sobre la conidiación de *T. atroviride*. A) Fenotipo de conidiación sin daño, B) fenotipo de conidiación con daño y C) Grafica de cuantificación con diferencia de medias en programa R.

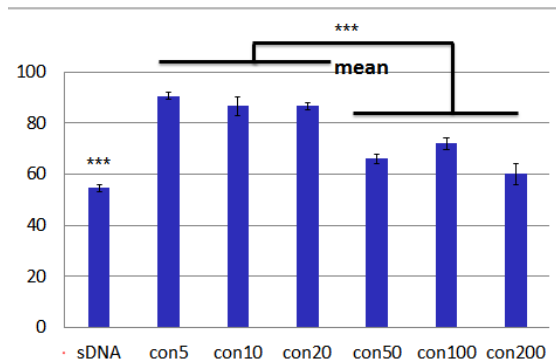


Fig. 2 Efecto de DNA propio en diferentes concentraciones sobre la regeneración de *T. atroviride*. Grafica de cuantificación de hifas con diferencia de medias en programa R.

B. Efecto del DNA extraño en *T. atroviride*

Los experimentos de regeneración y conidiación de *T. atroviride* frente a DNA extraño se llevaron a cabo a la par con el experimento con DNA propio, utilizando para estos una sola concentración de 50ng/μL.

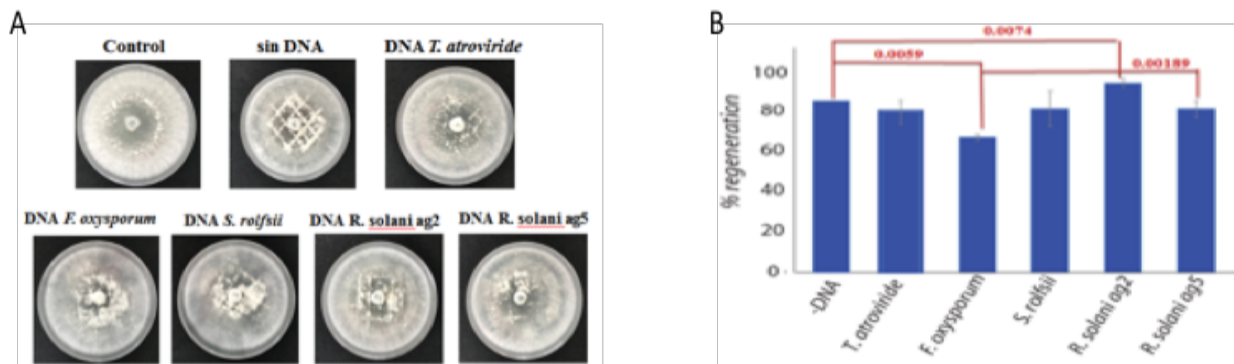


Fig. 3 Tratamiento de *Trichoderma atroviride* con daño en exposición a DNA extraño a 50 ng/μL. Se utilizó un control de *T. atroviride* sin daño y sin DNA exógeno y una segunda prueba de *T. atroviride* con daño pero sin DNA. A) Fenotipos de conidiación para cada condición y B) Estadística del experimento realizada con diferencia de medias en programa R.

IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En estos resultados se puede observar que el añadir ADN propio a *T. atroviride* con daño y sin daño tuvo un efecto muy notorio a partir de una concentración de 5 ng/μL. La conidiación y la regeneración tuvieron un aumento significativo en comparación de la cepa con daño pero sin ADN exógeno añadido. Fue interesante que al añadir ADN propio a 50 ng/μL, tanto la conidiación como la regeneración disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) y con ADN a 100 ng/μL la conidiación aumentó. Sin embargo, a estas mismas concentraciones altas la regeneración disminuyó, lo que sugiere una respuesta de estrés por un exceso de material exógeno, más que la percepción, ya que, en respuesta a un estrés como cambios de pH o presión osmótica, *T. atroviride* suele conidiar como mecanismo de defensa (Carreras-Villaseñor *et al.*, 2012). Esta misma especificidad a la

cantidad de DNA fue observada por Durán-Flores y Heil M en 2017 al experimentar con ADN propio sobre la planta del frijol, Lo que da una señal de interés para seguir investigando un mecanismo de respuesta al daño común entre animales, plantas y ahora hongos.

Al añadir ADN de hongos fitopatógenos, la cuantificación de regeneración y conidiación de *Trichoderma atroviride* mostró una diferencia significativa donde se puede observar que *T. atroviride* tiene la capacidad de reconocer frente a qué material exógeno está expuesto, en este caso el ADN propio o ADN extraño.

Utilizando la misma concentración de ADN, en este experimento se aprecia que *Trichoderma atroviride* si tiene especificidad ante el ADN de cada especie de hongos fitopatógenos.

Medina-castellanos y colaboradores demostraron que el ATP exógeno actúa como un DAMP que activa un sistema inmune que puede dar camino a la muerte celular o a la proliferación celular y la regeneración del tejido perdido, lo que permite pensar que el ADN también puede ser detectado como un Patrón Molecular Asociado al Daño, que dispara la misma respuesta.

V. CONCLUSIONES

Este trabajo permite ampliar las investigaciones acerca de un sistema inmune innato en *Trichoderma atroviride*, donde se comprobó que frente a un daño mecánico *T. atroviride* reconoce el ADN exógeno a partir de concentraciones muy bajas y éste actúa como una molécula señal permitiendo que *T. atroviride* dispare la conidiación y la regeneración como un mecanismo de defensa. Comprobando que, además de censar el ADN exógeno, *T. atroviride* reconoce si está frente a ADN propio o ADN extraño; y frente a ADN extraño tiene especificidad por cada especie al probar con hongos fitopatógenos.

Como perspectiva se plantea probar con ADN de especies más alejadas filogenéticamente y se propone analizar la expresión de genes involucrados en el sistema inmune y ciclo celular de *T. atroviride*, propuestos por Villalobos-Escobedo, 2019, al momento de la respuesta al daño con DNA exógeno.

VI. AGRADECIMIENTOS

Ofrezco mis agradecimientos a la Universidad Autónoma de Coahuila y al CONACyT por brindarme el apoyo para realizar mi estancia de verano; al Dr. Gerardo de Jesús Sosa Santillán por su recomendación para ser aceptada; Al Dr. Alfredo Heriberto Herrera Estrella por abrirme las puertas de su laboratorio “expresión génica y desarrollo de hongos” y al Dr. José Manuel Villalobos Escobedo que me brindo todo el conocimiento, herramientas y fuerza para concluir con éxito mi estancia de verano, ayudándome a crecer profesional y personalmente.

REFERENCIAS

- Duran-Flores D., Heil M., “*Extracellular self-DNA as a damage-associated molecular pattern (DAMP) that triggers self-specific immunity induction in plants*”. Brain, Behavior, and Immunity xxx. 1-3. Jul. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.10.010>.
- Heil M., Vega-Muñoz I., “*Nucleic Acid Sensing in Mammals and Plants: Facts and Caveats*”. International Review of Cell and Molecular Biology. ISSN 1937-6448. Elsevier Inc. 2018. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.10.003>.
- Heil, M., “*Damaged-self recognition in plant herbivore defence*”. Trends Plant Sci 14, 136-363. Jul. 2009. DOI: [10.1016/j.tplants.2009.04.002](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.04.002).
- Hernández-Oñate, M. y Herrera-Estrella, A. “*Damage response involves mechanisms conserved across plants, animals and fungi*”. Springer. Curr Genet 61:359-372. Ene., 2015. DOI [10.1007/s00294-014-0467-5](https://doi.org/10.1007/s00294-014-0467-5).
- Medina-Castellanos E., Villalobos-Escobedo JM, Riquelme M., Read, ND., Abreu-Goodger C, Herrera-Estrella A. “*Danger signals activate a putative innate immune system during regeneration in a filamentous fungus*”. PLoS Genet 14(11): e1007390. May, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007390>
- Villalobos-Escobedo JM., “*La regeneración de hifas de un hongo filamentoso depende de RNAs pequeños y de la activación del sistema inmune innato*” (Tesis PhD). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Unidad de Genómica Avanzada. Irapuato, Guanajuato, 2019.
- Carreras-Villaseñor N., Herrera-Estrella A., Hernández M. “*Trichoderma sensing the environment for survival and dispersa*”. FEBS journal 279. Sep. 2012.

Electrofitorremediación de suelos a escala laboratorio para la remoción de Cr(VI)

María Isabel Romero Cervantes

Instituto Tecnológico Superior de Abasolo
Blvd. Cuitzeo de los Naranjos 401
C.P.36970, Col. Cuitzeo de los Naranjos,
Abasolo, Gto.

izabelacervantes97@gmail.com

Asesor: Erick Rodolfo López Almanza

Instituto Tecnológico Superior de Abasolo
Blvd. Cuitzeo de los Naranjos 401
C.P. 36970 Col. Cuitzeo de los Naranjos,
Abasolo, Gto.

erick.almanza@tecabasolo.edu.mx

Resumen — La industria curtidora en la ciudad de León Gto. es causante de la contaminación de suelos con cromo (VI). El proceso de curtido al cromo es utilizado desde tiempos remotos en la industria ocasionando impactos en suelo y agua. El objetivo de esta investigación consistió en demostrar que la técnica de electrofitorremediación es una tecnología idónea en la remoción de cromo (VI) presente en suelos. Se consideró trabajar con la planta nativa del área de estudio identificada como *Solanum elaeagnifolium*. Para la electroremediación se consideraron placas de grafito como electrodos aplicándose una corriente de 20V durante 24 horas. Los tratamientos se llevaron a cabo con $K_2Cr_2O_7$ a concentraciones conocidas de 140, 395 y 620 ppm teniendo como referencia la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. Se demostró que los procesos de electrofitorremediación a 140 y 620 ppm son eficaces en la remediación de suelos contaminados con cromo (VI), teniendo un porcentaje de remoción del 98.02% en el tratamiento a 140 ppm y un 98.86% en el tratamiento a 620 ppm.

Palabras clave — metales pesados, remediación, suelos contaminados.

Abstract — The tanning industry in the city of León Gto. is the cause of the contamination of soils with chromium (VI). The chrome tanning process has been used since ancient times in the industry causing impacts on soil and water. The objective of this research was to demonstrate that the electrophytoremediation technique is an ideal technology for the removal of chromium (VI) present in soils. It was considered to work with the native plant of the study area identified as *Solanum elaeagnifolium*. For electroremediation graphite plates were considered as electrodes, applying a current of 20V for 24 hours. The treatments were carried out with $K_2Cr_2O_7$ at known concentrations of 140, 395 and 620 ppm based on NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. It was demonstrated that the electrophytoremediation processes at 140 and 620 ppm are effective in the remediation of soils contaminated with chromium (VI), with a removal percentage of 98.02% in the treatment at 140 ppm and 98.86% in the treatment at 620 ppm.

Keywords — heavy metals, remediation, contaminated floors.

I. INTRODUCCIÓN

La contaminación por metales pesados en suelos puede estar presente de una manera natural o a causa de diversas actividades antropogénicas, como son procesos industriales. En la naturaleza, los metales pesados se encuentran en la corteza terrestre, en forma de minerales, sales u otros compuestos y, en pequeñas concentraciones, algunos de ellos son esenciales para el desarrollo de las actividades metabólicas de algunos organismos (Mendez, Ramírez, Gutiérrez, & García, 2008; Molina, Aguilar, & Cordovez, 2010).

Procesos como los que lleva a cabo la industria curtidora contribuyen a la contaminación de suelos con metales pesados, especialmente con cromo. En el tratado de pieles y cuero se lleva a cabo el curtido, también conocido como curtido al cromo (Porrás, 2010).

De acuerdo a datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), hasta el año 2012 se tiene el registro que la ciudad de León aporta el 57.8% del valor total de la producción en la industria, contribuyendo en los 8 municipios que generan el 85.4% de la producción total de calzado del país. Por ello, el insumo de piel y cuero son de importancia para la industria, su producción también es presente en la ciudad pues concentra el 12.3% del total de las unidades económicas que llegan a generarlo. León llega a ocupar el primer lugar a nivel nacional en la producción de calzado, de curtido y acabado de cuero y piel y en la fabricación de otros productos de cuero, piel y materiales sucedáneos. Y con ello, la consecuencia de la contribución a la contaminación de suelos y agua con cromo. (AMIA & INEGI, 2016)

Existen diversas tecnologías para la remediación de suelos contaminados con metales pesados que muestran resultados benéficos: la solidificación/estabilización, fitorremediación y la remediación electrocinética o también conocida como electrorremediación, son algunas de ellas (García, Ramírez, & Reyes, 2011; Guamán Seis, 2015).

La electrorremediación aprovecha las propiedades conductivas del suelo para separar y extraer contaminantes orgánicos e inorgánicos (metales) de suelos, lodos y sedimentos, con la aplicación de una corriente eléctrica entre electrodos (ánodo y cátodo). En la mejoría de este tipo de técnicas se trata con procesos híbridos, por ejemplo la aplicación en conjunto con la fitorremediación, esta consiste en utilizar plantas para eliminar contaminantes de los suelos, considerando tolerancia a metales y capacidad de acumulación (De la Rosa, Teutli, & Ramírez, 2007; García et al., 2011; Orrono, 2002).

El proceso híbrido conocido como electrofitorremediación consiste en la aplicación del campo eléctrico que hace migrar los contaminantes a través de una zona cultivada con las especies vegetales capaces de transformar o integrar el contaminante a su fisiología (De la Rosa et al., 2007).

II. MARCO TEÓRICO

Contaminación de suelos con Cromo

El curtido es el proceso químico mediante el cual se imparte estabilidad fisicoquímica a la piel para evitar la putrefacción, consiste en convertir las pieles de los animales en cuero garantizando la calidad de este además de rapidez en el proceso con la ayuda de sales de cromo. La dificultad que presenta el uso de sales de Cr en el curtido es la cantidad de curtiente que no se fija, y que llega a causar un impacto en el ambiente y en la salud humana (Institucional & Vigueros, 2003; Michael McCann, 2010; Porras, 2010).

El cromo presente en agua y suelos se puede encontrar en sus dos estados de oxidación comunes: Cr (III) o Cr (VI), también puede encontrarse como óxido de cromo, sulfato de cromo, trióxido de cromo, ácido crómico y dicromato. Los derivados del cromo hexavalente (cromatos y dicromatos), normalmente son de origen antropogénico, y en altas concentraciones son tóxicos para algunas plantas, además de causar daños a la salud humana, considerado como elemento cancerígeno (exponiéndose de manera directa con este) (Porras, 2010; Sierra Severiche & Gonzalez García, 2013).

El Cr (III) presente en suelos es relativamente inmóvil debido a su gran capacidad de adsorción en los suelos, pero el Cr (VI) es demasiado inestable. Presente a reacciones redox de Fe y Mg, en suelos frescos y con buena humedad (anaeróbicos) y en condiciones levemente acidas. La reducción puede ocurrir en presencia de sulfuros de Fe (III) y se acelera en presencia de materia orgánica. Debido a esto, el Cr (VI) es un elemento no esencial y tóxico en concentraciones bajas (Porras, 2010).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A.- Ubicación del sitio de muestreo.

El área de estudio está situada en el Parque Industrial de León (Parque Ecológico de León), ubicado en el libramiento carretera León-Aguascalientes con coordenadas: 21.082646° latitud, -101.716395° longitud y con una elevación de 1,778 msnm.

- 1) *Muestreo de suelo.* La recolección de la muestra se realizó en base a la NMX-AA-132-SCFI-2016 Muestreo de suelos para la identificación y la cuantificación de metales y metaloides, y manejo de la muestra.

El tipo de muestreo realizado es compuesto, se tomaron 5 muestras simples de 1 kg con profundidad de 10 cm y después se realizó la muestra representativa mezclando todas las muestras simples, además el método de distribución de puntos de muestreo fue aleatorio simple, considerado así ya que en un estudio anterior de registro presencia de cromo hexavalente en el sitio.

Tabla 1. Ubicación de puntos de muestreo

Punto de muestreo	Longitud	Latitud
1	-101.717368	21.085401
2	-101.717294	21.084670
3	-101.717683	21.084845
4	-101.718190	21.085026
5	-101.718022	21.084305



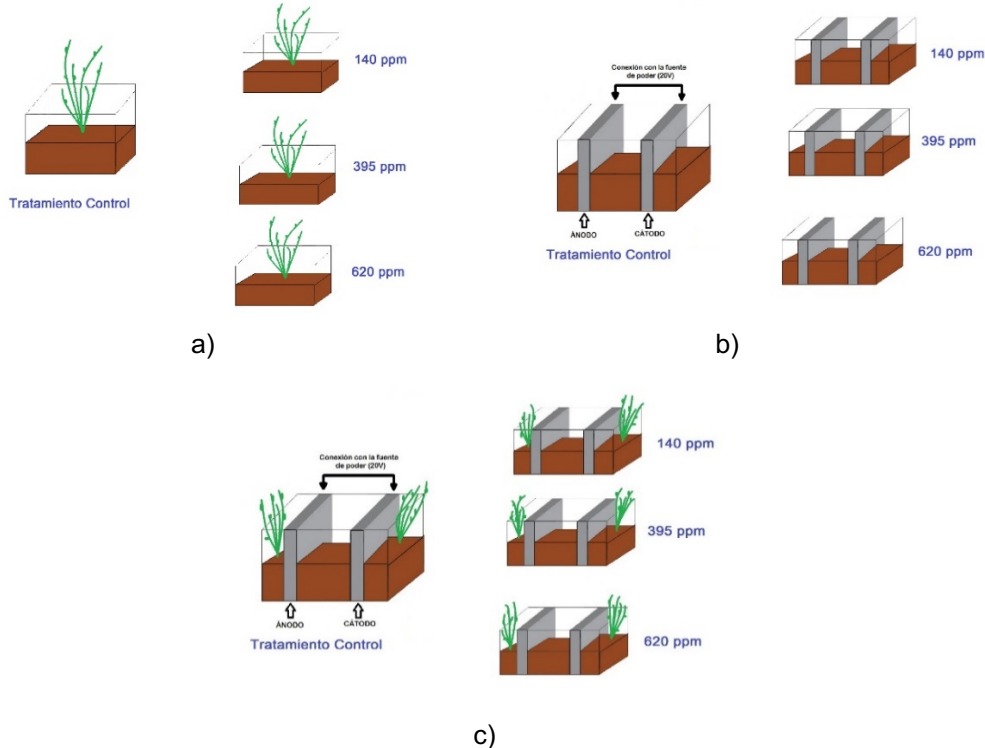
Fig. 1. Mapa de localización de puntos de muestreo elaborado en QGIS.

- 2) *Muestreo de plantas.* La recolección de plantas para llevar a cabo la Fitorremediación se realizó tomando muestras de plantas de la misma especie, se consideró tomar aquella especie que abundara en el sitio de muestreo.
- 3) *Diseño de tratamientos.* Tomando como referencia la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 en la cual se indica que para suelo de uso industrial la concentración límite de cromo hexavalente es de 510 mg/kg (SEMARNAT, 2006). Es por ello que se usaron tres diferentes tratamientos con Cr^{+6} a 140, 395 y 620 ppm con tres repeticiones además del control, se utilizó dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) como solución madre.

Tabla 2. Descripción de tratamientos.

Tratamiento	Descripción		
	Concentraciones		
	C1 140 ppm	C2 395 ppm	C3 620 ppm
T1 <i>Fitorremediación</i>	+Plantas -Electrodos	+Plantas -Electrodos	+Plantas -Electrodos
T2 <i>Electrorremediación</i>	-Plantas +Electrodos	-Plantas +Electrodos	-Plantas +Electrodos
T3 <i>Electrofitorremediación</i>	+Plantas +Electrodos	+Plantas +Electrodos	+Plantas +Electrodos

Todos los tratamientos se realizaron con 300 g de muestra tamizada y humectada. En la electrorremediación y electrofitorremediación se utilizaron placas de grafito de 6x6x1 cm como electrodos para aplicar 20V durante 24 h.

**Fig. 2.** Diseño de tratamientos: a) Fitorremediación, b) Electrorremediación, c) Electrofitorremediación.

B.- Análisis fisicoquímico de los tratamientos.

- 1) *Determinación de humedad.* Se colocaron a peso constante las cápsulas de porcelana en la estufa durante 1 hora, posteriormente se pasaron a desecadores durante 1 hora. Se pesó la cápsula vacía, después se agregaron 5 gramos de muestra y se registró el dato. Se colocó la cápsula en la estufa durante 2 horas a 105 °C. Se sacó la cápsula y se colocó en el desecador durante 1 hora y después se pesó. Después aplicar la Ec. (1) para obtener el porcentaje de humedad:

$$\% \text{ Humedad de la muestra } (\%H) = \frac{A-B}{A} \times 100 \quad (1)$$

donde:

A= Peso de la muestra con humedad de campo (g).

B= Peso de la muestra seca (g).

- 2) *Determinación de pH.* Se pesaron 10 g de suelo y se agregaron 20 ml de agua destilada en intervalos de 5 minutos durante media hora, se mantuvo en constante agitación. Posteriormente, se dejó reposar la mezcla durante 15 minutos. Se calibro el potenciómetro y se sumergió en el vaso con la muestra.
- 3) *Digestión alcalina para cromo hexavalente en suelos.* Es el método para extraer cromo (VI) en su forma soluble, adsorbida y precipitada de compuestos de cromo en suelos. En el proceso se tomaron 2.5 g de suelo humectado y se agregaron a un vaso de digestión. Se disolvió con 50 ml de la solución de digestión, 400 mg de cloruro de magnesio ($MgCl_2$) y 0.5 ml de solución amortiguadora de fosfato 1 M. se cubrió con un vidrio de reloj y se calentó con agitación a 90-95 °C durante 60 minutos. Después de enfriar gradualmente a temperatura ambiente se vació la mezcla a tubos Eppendorf y se centrifugo durante 10 minutos a 5500 rpm. Se vació el contenido a un vaso de precipitado limpio y con agitación se ajustó el pH a 7.5. después, se centrifugo por otros 10 minutos a 6000 rpm y el contenido se vació a un matraz volumétrico de 100 ml para aforar hasta la marca.
- 4) *Determinación colorimétrica de cromo hexavalente.* Es utilizado para determinar la concentración de cromo (VI) disuelto, previo tratamiento de la muestra (digestión extracción). Es determinado colorimétricamente por reacción de difenilcarbazida en solución acida, una coloración rojo-violeta se desarrolla en las muestras y se mide su absorbancia fotométricamente a 540 nm. En el proceso se prepararon los estándares para la curva de calibración en concentraciones de 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.65, 0.75 mg/L a partir de una solución patrón de cromo (VI) de 5 mg/L. Para el análisis de los tratamientos se agregaron 2 ml de solución de difenilcarbazida y se mezcló, posteriormente se ajustó el pH a 2 y se aforo en un matraz volumétrico de 100 ml, mezclando muy bien. Se esperaron 10 minutos y se transfirió una porción de cada muestra a celdas de 1 cm de paso de luz para medir la absorción en el espectrofotómetro.

Para calcular la concentración de cromo (VI) en mg/L a partir de digestiones alcalinas se aplica la Ec. (2):

$$\frac{mg}{kg} Cr(VI) \text{ en base húmeda} = \frac{\left(\frac{mg}{L} Cr(VI) \text{ leídos en la curva de calibración}\right)(\text{volumen de aforo}(0.100 L))}{\text{Peso muestra (Kg) utilizado en la digestión}} \quad (2)$$

El resultado final se expresa en base seca de acuerdo con la humedad de la muestra, entonces se utiliza la Ec. (3):

$$\frac{mg}{kg} Cr(VI) \text{ en base seca} = \frac{\frac{mg}{L} Cr(VI) \times 100\%}{(100\% - \% \text{ Humedad de la muestra})} \quad (3)$$

IV. RESULTADOS

A.- *Identificación de plantas en el área de estudio.* Utilizando la aplicación móvil de PlantSnap (PlantSnap Inc., 2016) se logró identificar la planta de mayor abundancia en la zona. Los resultados arrojaron que se trata de *Solanum elaeagnifolium*, también conocida como Tomatillo amarillo.



Fig. 3. Identificación de plantas: a) Plantas en el área de estudio, b) Resultado arrojado en la App PlantSnap.

B.- *Resultados de los análisis fisicoquímicos.*

1) Humedad.

$$\% \text{ Humedad} = 0.1878$$

2) Determinación de pH.

Tabla. 3. Promedio de pH antes y después de aplicar remediación.

	Tratamiento	pH antes de remediación	pH después de remediación
Fitorremediación	Control	9.13	9.05
	140 ppm	9.35	8.35
	395 ppm	9.45	8.65
	620 ppm	9.50	8.60
Electrorremediación	Control	9.13	8.51
	140 ppm	9.35	8.15
	395 ppm	9.45	8.44
	620 ppm	9.50	8.49
Electrofitorremediación	Control	9.13	7.90
	140 ppm	9.35	9.3
	395 ppm	9.45	7.13
	620 ppm	9.50	8.72

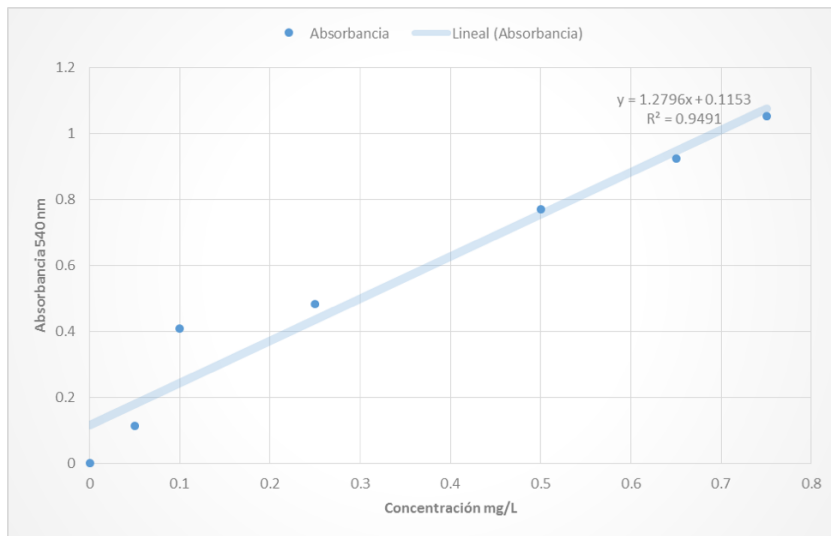


Fig. 4. Curva de calibración para la cuantificación de cromo (VI).

Tabla. 4. Resultados de remoción de cromo (VI) de los tratamientos.

	Tratamiento	Absorbancia	mg/kg Cr(VI) base húmeda	mg/kg Cr(VI) base seca
Fitorremediación	Control	0.163	6.496	6.508
	140 ppm	0.099	3.875	3.882
	395 ppm	2.718	108.442	108.646
	620 ppm	1.253	48.404	48.495
Electrorremediación	Control	0.074	2.884	2.889
	140 ppm	0.160	6.394	6.406
	395 ppm	0.158	6.294	6.305
	620 ppm	1.920	75.748	75.890
Electrofitorremediación	Control	0.112	4.415	4.423
	140 ppm	0.070	2.777	2.782
	395 ppm	0.169	6.643	6.655
	620 ppm	0.178	7.056	7.069

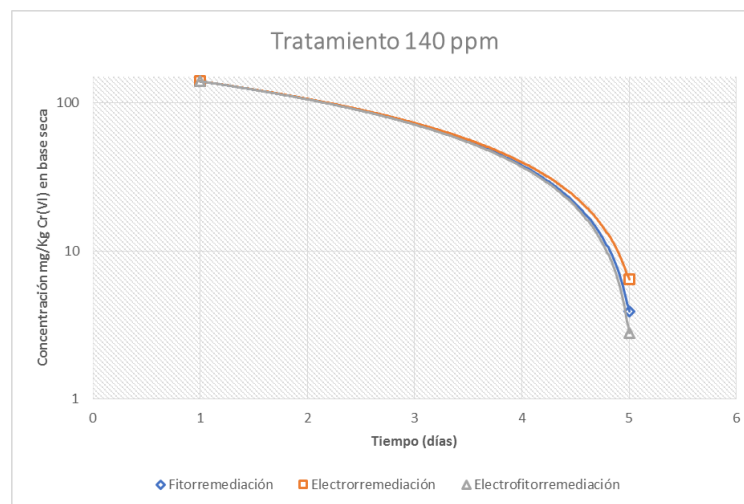


Fig. 5. Remoción de cromo (VI) en tratamiento con concentración inicial de 140 ppm.

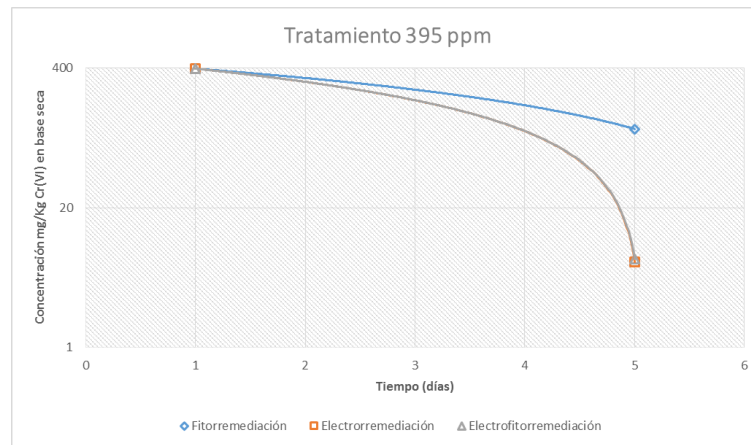


Fig. 6. Remoción de cromo (VI) en tratamiento con concentración inicial de 395 ppm.

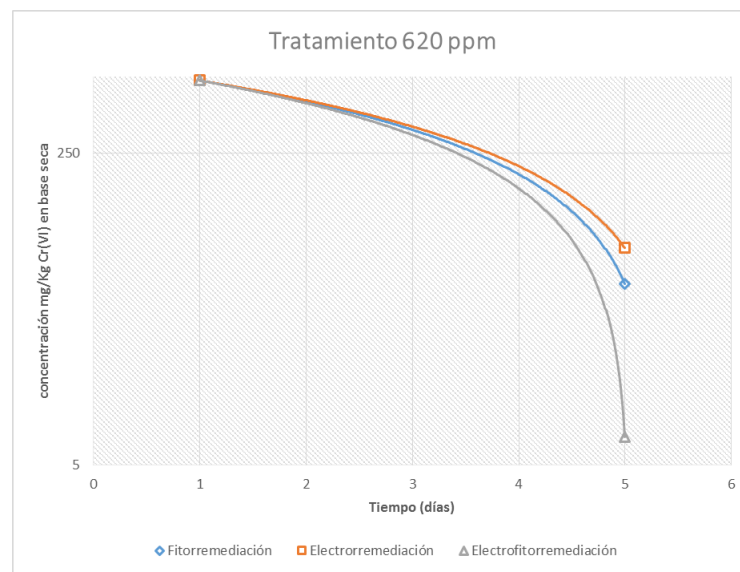


Fig. 7. Remoción de cromo (VI) con concentración inicial de 620 ppm.

V. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Teniendo un pH alcalino en el suelo, el cromo (VI) se presenta con mayor biodisponibilidad para lograr una remoción. Todos los tratamientos mostraron una reducción en cuanto al valor de pH. En el caso del tratamiento de electrofitorremediación 395 ppm se obtuvo una diferencia de 2.32.

La Fig. 5 muestra que en el tratamiento con concentración inicial de 140 la técnica de remediación que presentó una mayor remoción de cromo (VI) es la electrofitorremediación y de manera similar en el tratamiento a 620 ppm como lo muestra la Fig. 7.

En el tratamiento con concentración inicial de 395 ppm la técnica más factible fue la de electrorremediación seguida de la técnica de electrofitorremediación.

VI. CONCLUSIONES

La planta *Solanum elaeagnifolium* logra remover parte del cromo (VI) presente en suelos, llevándose a cabo una fitorremediación de forma natural en el área de estudio.

El pH en el tratamiento de electrofitorremediación 395 ppm disminuyó al grado de tener un suelo con pH relativamente estable, además de presentar remoción de cromo (VI).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el tratamiento de electrofitorremediación a 140 y 620 se considera la técnica de electrofitorremediación como una manera viable en la remediación de suelos contaminados con cromo (VI) teniendo un 98.02% y 98.86% de remoción del contaminante.

REFERENCIAS

- AMIA, & INEGI. (2016). Estadísticas a propósito de... la Industria automotriz. Recuperado de: http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/estudios/economico/a_proposi_de/Papel.pdf
- De la Rosa, D. A., Teutli, M. M. M., & Ramírez, M. E. (2007). Electrorremediación de suelos contaminados, una revisión técnica para su aplicación en campo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 23(3), 129–138. Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992007000300003
- García, L., Ramírez, M., & Reyes, V. (2011). Electrorremediación de suelos arenosos contaminados por Pb, Cd y As provenientes de residuos mineros, utilizando agua y ácido acético como electrolitos. *Sociedad Mexicana de Ciencias y Tecnología de Superficies y Materiales*, 24(1), 24–29.
- Guamán Seis, J. A. (2015). *Diseño a Escalas Laboratorio Y Piloto De Un Sistema De Remediación Electrocinética De Suelos Contaminados Con Metales Pesados*. <https://doi.org/10.1103/PhysRevX.7.041008>
- Institucional, R., & Vigueros, L. C. (2003). Tecnología para la remoción y recuperación del cromo trivalente en efluentes de curtido de pieles.
- Mendez, J. P., Ramírez, C. A. G., Gutiérrez, A. D. R., & Garcia, F. P. (2008). Plant Contamination and Phytotoxicity Due To Heavy Metals From Soil and Water. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(1), 19–44. <https://doi.org/1870-0462>
- Michael McCann. (2010). Cuero, Pieles Y Calzado. *Enciclopedia De Salud Y Seguridad En El Trabajo*, 14. Recuperado de: <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo3/88.pdf>
- Molina, N., Aguilar, P., & Cordovez, C. (2010). Plomo, cromo III y cromo VI y sus efectos sobre la salud humana. *Ciencia & Tecnología Para La Salud Visual y Ocular*, 8(1), 77–88. <https://doi.org/10.19052/SV.831>
- Orrono, D. I. (2002). Acumulación de metales (cadmio, zinc, cobre, cromo, níquel y plomo) en especies del género *Pelargonium*: suministro desde el suelo, ubicación en la planta y toxicidad, 118. Recuperado de: <http://ri.agro.uba.ar/files/download/tesis/doctorado/2011orronodanielaines.pdf>
- PlantSnap Inc. (2016). PlantSnap (Versión 2.02.04) [Aplicación Móvil]. Recuperado de: <https://www.plantsnap.com/>
- Porras, Á. C. (2010). Descripción De La Nocividad Del Cromo Proveniente De La Industria Curtiembre Y De Las Posibles Formas De Removerlo Description of Chrome Toxicity From the Tannery Industry and Possible Ways of Removing It. *Revista Ingenierías Universidad de Medellín*, 9228(17), 41–50.
- SEMARNAT. (2006). *NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, Que establece criterios para determinar las*

concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio. Diario Oficial de la Federación. Recuperado de: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/147ssa16.html>

Sierra Severiche, C. A., & Gonzalez García, H. (2013). Assesment of an Analytical Method for Determining Hexavalent Chromiun in Water Using Spectrophotometry. *Ing. USBMed.*, 4(1), 22–26.

Estado de conservación de manantiales en el sur de Querétaro

Andrea Guadalupe Celestino Hernández

Universidad Autónoma de Querétaro
Campus UAQ-Aeropuerto. Carretera a
Chichimequillas, Ejido Bolaños
20andy.hernandez@gmail.com

Asesor: Raúl Francisco Pineda López

Universidad Autónoma de Querétaro
Campus UAQ-Aeropuerto. Carretera a
Chichimequillas, Ejido Bolaños
rufuspinedal@gmail.com

Resumen — En este trabajo se realizó la determinación del estado de conservación, la calidad del agua y la estructura de las familias de macroinvertebrados en 15 manantiales del sur del estado de Querétaro y se comparó con datos obtenidos en los mismos sitios en el 2002. Mediante el registro de características fisicoquímicas, la evaluación de la zona donde se encuentra el manantial, la colecta de muestras de agua, sustrato e invertebrados se determinó que el estado de conservación se ha deteriorado drásticamente en los manantiales que se encuentran en la cuenca Lerma-Chapala; mientras que, los que pertenecen a la cuenca del Pánuco la degradación del estado ambiental aumentó ligeramente. Se requiere de propuestas innovadoras para recuperación y mantenimiento de estos importantes cuerpos de agua.

Palabras clave: Manantiales, Estado de conservación, Cuencas.

Abstract — In this work the conservation status, water quality and structure of the macroinvertebrate families in 15 springs in the state of Querétaro was analyzed and compared with data obtained in the same springs in 2002. Through sampling of physicochemical characteristics, the evaluation of the spring surrounding areas and the analysis of macroinvertebrate communities, the state of environmental conservation (EC) was determined for each spring. EC values shown that springs in the Lerma-Chapala basin are dramatically altered, meanwhile those from the Pánuco basin, their degradation are slightly increased. Innovative proposals are required for recovery and maintenance of these important waáter bodies.

Keywords — Springs, Conservation status, Basin.

I. INTRODUCCIÓN

Los manantiales son emergencias de agua subterránea que pueden aparecen en cualquier ecosistema y con variaciones de volumen de agua, por lo que pueden llegar a generarse desde pequeñas filtraciones hasta ríos extensos y dependiendo de la profundidad desde la que fluye el agua tienen características particulares como temperatura y la cantidad de minerales [3,4]. Los manantiales son sensibles al impacto antrópico, por lo cual, monitorear las condiciones en las que se encuentran da una visión generalizada de los ecosistemas cercanos [5]. Además, juegan un papel importante como hábitat al ser enriquecidos por diversos tipos de familias de vertebrados e invertebrados que nos permiten conocer el estado de calidad del agua [6].

El estado de conservación de los manantiales puede determinarse mediante el análisis de características cuantitativas y cualitativas, con lo cual se puede forjar una propuesta para su conservación en caso de presentar condiciones óptimas; o bien, generar propuestas de recuperación [2,5]. Las condiciones hidrogeológicas del manantial y de la cuenca de recarga de la que depende, influyen en el estatus de conservación; sin embargo, los impactos antrópicos son los factores más importantes; como ser abastecimientos de agua para las

poblaciones, la expansión urbana, las actividades de uso, la contaminación y, sobre todo, el desconocimiento de su importancia.

En el estado de Querétaro se hizo una revisión de 28 manantiales, de los cuales se determinaron los problemas relativos a su uso y/o desuso, se analizaron los invertebrados bioindicadores de calidad del agua y se propuso una metodología para determinar su estatus de conservación [1] y las propuestas para lograr su recuperación y preservación [2]. En nuestro proyecto se pretende re-evaluar (1) el estado de las comunidades de invertebrados, (2) la calidad de agua y (3) el estatus de conservación de 15 manantiales de los 28 manantiales que fueron previamente analizados por Morales Tovar [1].

En este artículo se pretende comparar el estado de conservación de los manantiales previamente analizados, teniendo como objetivos; (1) evaluar el estado de conservación mediante los parámetros establecidos por Morales Tovar [1] determinar la situación actual de cada manantial (2); y comparar los estados de conservación y determinar las posibles causas de sus fluctuaciones con respecto a las condiciones imperantes hace 17 años.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Los muestreos de campo para el análisis de los manantiales se hicieron durante el mes de junio, durante el final de la estación seca (aunque se habían sucedido algunas lluvias dispersas); en cada manantial se hizo un análisis de calidad del agua [12] y otro de las comunidades de macroinvertebrados [11].

En este estudio se empleó el índice para determinar el grado de conservación de manantiales propuesto por Morales [1]. Este índice está compuesto por diversas métricas que involucran la calidad ambiental y el efecto de los impactos antrópicos sobre los manantiales. Se determinaron los parámetros cualitativos y cuantitativos que se evalúan con un puntaje de 0 a 10, siendo 0 la condición óptima y 10 la más afectada. Las métricas consideradas fueron: tipo de manantial; uso de suelo circundante; actividades de uso; alteración del flujo de agua; familias de macroinvertebrados indicadores de calidad de agua; diversidad biótica, e importancia de la cuenca de la ubicación del manantial (Fig. 1).

El parámetro de familias indicadoras se evaluó mediante las ya establecidas sugeridas por Morales 2002 [1] y además, se agregaron otros bioindicadores de alta integridad ecológica como: Heptageniidae, Leptoperidae, Driopidae, Staphylinidae, Hebridae, Hydrophilidae, Helicopsychidae, Hydropsychidae, Depodomatidae, Calamoceratidae, Naididae, Cyprinidae, Notodrominae y Asellidae. De acuerdo con los puntajes obtenidos, se reevaluó el estatus de conservación de cada manantial, considerando la categoría de hábitat en peligro de 44 a 60 puntos, hábitat amenazado de 27 a 43 y hábitat en óptimas condiciones de 0 a 26 puntos.

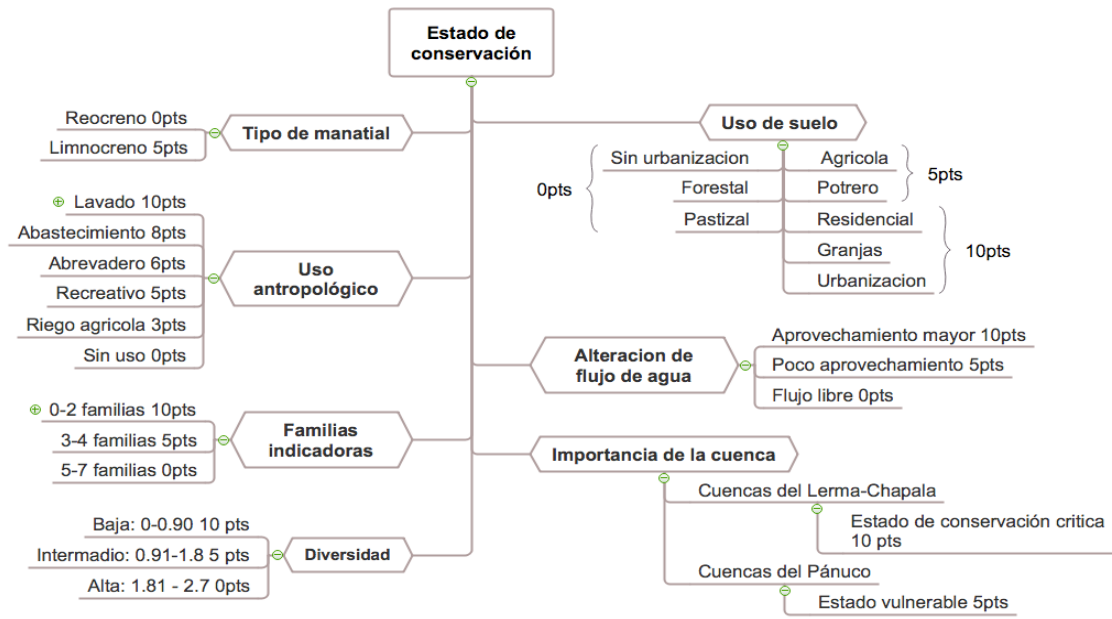


Figura 1. Descripción metodológica para determinar el estado de conservación

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizó el 53.5% de los manantiales estudiados por Morales Tovar [1] y de este porcentaje desapareció el 20% (Fig.2), debido al incremento del desarrollo urbano y actividades antropogénicas que han deteriorado estos cuerpos de agua, ello a su vez, tiene consecuencias ecológicas debido a la desaparición de diversidad de familias de macroinvertebrados y vertebrados pequeños que se refugian en estos cuerpos de agua durante la época de secas. Los manantiales en estado óptimo y en amenaza se han disminuido alrededor de un 50%, debido al incremento de manantiales que ahora están en peligro de desaparición y pérdida de su funcionalidad.

En la cuenca Lerma-Chapala calificada en estado crítico de integridad ambiental desaparecieron los manantiales La Alberca y Lobo 1 que en el 2002 mostraban los EC con categoría en peligro y amenazado, respectivamente (Fig. 2, Cuadro 1). Dentro de la cuenca del Pánuco que es considerada de manera general, como en un estado ambiental vulnerable, desapareció el manantial La Campanita. Los dos primeros manantiales se encontraban con estructuras conteniendo totalmente la zona de filtración; sin embargo, la estructura encontrada en el lobo 1 permite el abasteciendo agua para la comunidad debido a que el manantial no presentaba problemas de fluctuación ya que es de naturaleza reocrena; hace 17 años el impacto antrópico no era tan agresivo, el manantial no presentaba ningún tipo de construcción para contener o alterar el flujo del agua y su uso se limitaba a ser abrevadero para animales de pastoreo. La Campanita presentaba alta diversidad de macroinvertebrados y familias indicadoras de buenas de condiciones, aunque no había registro de uso del manantial, éste presentaba complicaciones de fluctuación de agua por ser limnocreno con asentamientos de arcilla y su desaparición tienen que ver con la construcción de calles y remozamiento urbano.

De acuerdo con el Cuadro 1 se observa un patrón donde los manantiales que se encuentran en la cuenca Lerma-Chapala en 2002 presentaban estados de conservación amenazados y en peligro; mientras que al transcurrir 17 años dos de sus manantiales desaparecieron y los que permanecen, se siguen degradando hasta ser categorizados casi en su totalidad en estado de peligro, con excepción del manantial Los Vázquez puesto que su indicador disminuyó 0.5 puntos y ha mantenido su estatus en amenaza.

El deterioro de los manantiales ubicados dentro de la región de la cuenca del Pánuco no ha aumentado rápidamente, puesto que el estudio preliminar de los manantiales nos indica que en 2002 ningún manantial se encontraba en estado de peligro, la mayoría se presentó estados de amenaza y tres en condiciones óptimas, los estatus aún permanecen, con excepción de San Bartolo, que perdió su estatus óptimo y ahora se encuentra amenazado; sin embargo, los puntajes de los indicadores del resto de los manantiales han incrementado ligeramente con un máximo de dos puntos, por lo tanto tienden a su deterioro.

Los manantiales de La Cueva, La Huerta-Boyé y la Beata han mantenido el indicador de conservación en el mismo valor; sin embargo, bajo condiciones y características diferentes, por lo que los puntajes entre el 2002 y 2019 varían dependiendo de la categoría y no comparten ningún patrón de comportamiento. Los manantiales Tashai, El Pocito y Los Vázquez redujeron el valor de su indicador, lo que implica un mejoramiento ecológico. En los dos primeros disminuyó 8 puntos debido al desuso del manantial que en el estudio preliminar se indicó que el uso principal era abastecimiento de agua, lo que guarda relación con el incremento de viviendas que cuentan con agua entubada, según la encuesta intercensal del 2015 en Querétaro cada 99.1 de 100 viviendas cuenta con este recurso [7].

En el manantial Los Vázquez el EC se redujo 0.5 puntos y se debe al cambio de cinco parámetros. Se incrementó el impacto en uso de suelo y la alteración en el flujo de agua; sin embargo, se compensó con la disminución de su uso, incremento de diversidad y fue el único manantial donde aumentaron las familias indicadoras. De acuerdo con la reducción de fuentes estresantes, la disminución del pH y el incremento de 3°C se pudieron establecer un mayor número de familias que se refleja directamente en el incremento de la diversidad, dentro de las cuales se sumaron familias que indican que la calidad del agua es excelente [8]. Incluso, se registró la aparición de isópodos de la familia Asellidae que son catalogados como buenos bioindicadores de la calidad del agua [9].

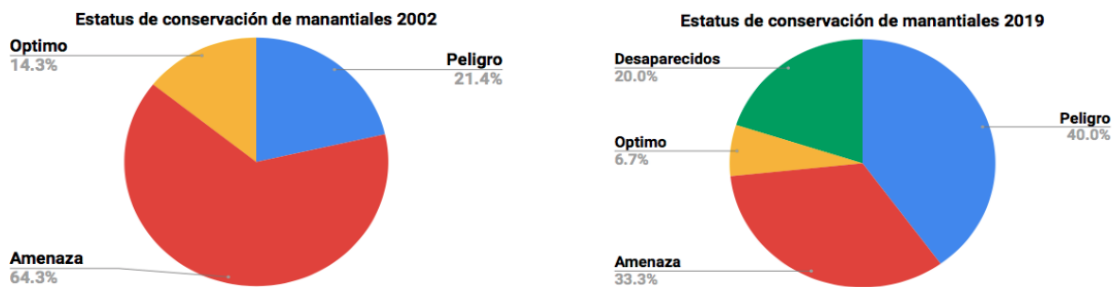


Figura 2. Gráficas comparativas de los estados de conservación de manantiales queretanos (2002-2019).

Cuadro 1. Determinación del estado de conservación y comparación del mismo en manantiales analizados en el año 2002 y 2019 estatus de conservación 2002 – 2019.

No.	Manantial	Año	Tipo de manantial	Uso de suelo circundante	Uso de manantial	Alteración de flujo	Familias indicadoras	Importancia de la cuenca	Diversidad	Indicador	Estatus
2	La Canoa	2019	0	5	5	10	10	5	5	40	Amenazado
		1999	0	5	8	5	10	5	5	38	Amenazado
4	Tashai	2019	0	10	0	0	10	5	10	35	Amenazado
		1999	0	10	8	0	10	5	10	43	Amenazado
5	La Zorra	2019	0	5	8	10	10	10	5	48	Peligro
		1999	0	0	8	0	10	10	5	33	Amenazado
7	Los Vazquez	2019	5	7.5	3	10	0	10	0	35.5	Amenazado
		1999	5	5	6	0	5	10	5	36	Amenazado
15	Lobo 2	2019	0	5	6	5	10	10	10	46	Peligro
		1999	0	5	6	0	10	10	10	41	Amenazado
18	La Huerta	2019	5	10	10	10	10	10	5	60	Peligro
		1999	5	5	3	5	5	10	0	33	Amenazado
20	La Cueva	2019	0	10	0	5	10	10	10	45	Peligro
		1999	0	10	10	0	5	10	10	45	Peligro
21	El Pocito	2019	0	10	0	10	10	10	5	45	Peligro
		1999	0	10	8	5	10	10	10	53	Peligro
23	La Huerta	2019	0	5	5	5	10	5	5	35	Amenazado
		1999	0	5	0	5	10	5	10	35	Amenazado
25	San Bartolo	2019	0	5	0	5	5	5	10	30	Amenazado
		1999	0	5	0	5	0	5	5	20	Óptimo
28	La Beata	2019	0	0	0	0	5	5	0	10	Óptimo
		1999	0	5	0	0	0	5	0	10	Óptimo
29	El Bordo	2019	0	10	0	10	5	10	5	40	Amenazado

IV. CONCLUSIONES

De acuerdo con The Nature Conservancy se espera que el medio ambiente siga deteriorándose poniendo en riesgo de desaparición caudales ecológicos y acuíferos no sólo de la Cuenca del Pánuco, sino de otras regiones por la alteración de características como temperatura y precipitación. Se hace una proyección a futuro donde juega de manera importante la evapotranspiración se estima que se puede llegar a temporadas muy secas [10]. Además de una baja disponibilidad de agua, el desabastecimiento poblacional de agua pone en riesgo el estatus de los manantiales, por lo que es posible que los manantiales que se mostraron una leve reducción de su EC por desuso puedan revertirse y mejorarse su papel como proveedor de hábitat para zonas áridas y mantener su estatus de refugio. En otro, es necesario que las autoridades y los pobladores de las cercanías de los manantiales sean concientizados de su importancia y establecer formas innovadoras para su conservación, inclusive incorporándolos en la planeación e infraestructura urbana.

V. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro y al Verano de la Ciencia por permitirme participar en esta experiencia.

REFERENCIAS

- [1] C. Morales Tovar 'Valoración biótica rápida de los manantiales de la zona templada y semiárida de Querétaro'. *Tesis para obtener grado de licenciatura*, Querétaro, Qro. Noviembre 2002.
- [2] C. Morales Tovar 'Pautas para la conservación y manejo para cuatro manantiales de las zonas templadas y semiáridas de Querétaro'. *Tesis para obtener grado de maestría en ciencias - recursos bióticos*, Querétaro, Qro. Noviembre 2005.
- [3] Instituto Estatal de Energía y Cambio Climático: Manantiales. Disponible en: <http://ieecc.edomex.gob.mx/manantiales> [consultado en julio de 2019]
- [4] J. Barquín Ortiz Revista Locustella, 'Patrones de biodiversidad en manantiales: implicaciones para la gestión de las aguas subterráneas'. Disponible en: <https://studylib.es/doc/4835329/patrones-de-biodiversidad-en-manantiales> [consultado en julio de 2019]
- [5] Springs Stewardship Institute, 'Springs Ecosystem'. Disponible en: <http://springstewardshipinstitute.org/springs-ecosystems> [consultado en julio de 2019]
- [6] Springs Stewardship Institute, 'Springs Life'. Disponible en: <http://springstewardshipinstitute.org/spring-life?rq=invert> [consultado en julio de 2019]
- [7] INEGI 'Hogar y Viviendas'. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/temas/vivienda/> [consultado en julio de 2019]
- [8] 'Macroinvertebrados bentónicos como indicadores de calidad de agua de ríos del sur de Chile'. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-078X2003000200012. [consultado en julio 2019]
- [9] <http://bioteca.biodiversidad.gob.mx/janium/Documentos/7060.pdf> [consultado en julio de 2019]
- [10] The nature conservancy, 'Water funds'. Disponible en: <https://www.nature.org/media/freshwater/latin-america-water-funds> [consultado en julio de 2019]
- [11] L. Y. García Miranda 'Comunidades de macroinvertebrados en manantiales áridos y templados de Querétaro'. 21º Verano de la ciencia
- [12] J. Palafox García 'Monitoreo de calidad de agua en algunos manantiales de Queretaro '. 21º Verano de la ciencia

Estandarización del cultivo *in vitro* de *Asphodelus fistulosus* de interés en el ámbito de la fitoestabilización de suelos mineros de Zacatecas, México

Juan Alberto Ríos Castro

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Cerro de las Campanas S/N, Centro Universitario
C.P. 76010, Santiago de Querétaro, Qro.
juan_rios_375@hotmail.com

Asesor: Juan Armando Flores de la Torre

Universidad Autónoma de Zacatecas
Carr. Zacatecas-Guadalajara, Km. 6, Ejido La Escondida
C.P.98160, Zacatecas, Zac.
armando.flores@uaz.edu.mx

Resumen — Derivado de problemas de contaminación ambiental, proveniente de la industria minera, se realiza la estandarización de cultivo *in vitro* de *Asphodelus fistulosus*, planta encontrada en la Mina El Bote del Estado de Zacatecas, México, capaz de realizar fitoestabilización en suelos mineros contaminados por metales como Pb y Zn. Se evaluó el crecimiento modificando las concentraciones de agar (6% y 8%) así como la relación auxina/citocinina modificando las concentraciones de Ácido α -naftalenacético (ANA) y 6-benciaminopurina (BAP) y evaluando a su vez los periodos de lavado y desinfección de los explantes de la planta.

Palabras clave— Fitoestabilización, *in vitro*, estandarización..

Abstract —Derived from environmental pollution problems, coming from the mining industry, the *in vitro* culture standardization of *Asphodelus fistulosus* is carried out, a plant found in the El Bote Mine in Zacatecas State, Mexico, capable of carrying out phytostabilization in mining soils contaminated by metals such as Pb and Zn. Growth was evaluated by modifying agar concentrations (6% and 8%) as well as the auxin / cytokinin ratio by modifying the concentrations of α -naphthalenacetic acid (ANA) and 6-benciaminopurine (BAP) and evaluating in turn the washing periods and disinfection of plant explants.

Keywords—Phytostabilization, *in vitro*, standardization.

I. INTRODUCCIÓN

Zacatecas, México se ha caracterizado por ser uno de los estados con mayor actividad minera a lo largo de su historia; siendo incluso una de las actividades comerciales que aún se realizan en la actualidad. A pesar de ser una de las principales actividades económicas que se llevan a cabo en la ciudad, el manejo de los desechos que se producen no ha sido bien manejado, generando de esta forma la contaminación de suelos con metales pesados como Pb, Cd y Zn. Esto aunado al crecimiento poblacional que sufre la ciudad se vuelve un factor importante para la salud de la población, por lo que se vuelve relevante el tomar medidas para controlar esta situación. A pesar de la alta concentración de metales pesados presentes en los suelos se han observado la presencia de diversas plantas que son capaces de sobrevivir en estos lugares, siendo incluso capaces de poder acumular en su biomasa parte de los metales pesados presentes en la rizosfera del suelo, siendo así que tomen importancia como plantas que ayuden a la fitoestabilización del suelo. Entre las especies que se encuentran están *S. airoides* Torr., *C. selloana* Asch & Graebn., *A. linaria*

Cav., *D. bicolor* Ex. Willd, *B. salicifolius* H. Rob. & Bretell y *A. fistulosus* Hook.[1] A pesar de su amplia distribución en la zona, resulta difícil obtener nuevas plantas de dichas especies, es por eso que este trabajo se dedicó a desarrollar un método en el que a partir de tejidos como tallo y raíz de dichas especies se pueda llevar a cabo un cultivo *in vitro* y así reproducir dichas especies.

II. MARCO TEÓRICO

A. *Relación de reguladores de crecimiento en el medio*

Uno de los principales factores que afectan el cultivo *in vitro* de un tejido vegetal es la concentración de reguladores del crecimiento presentes en el medio; así como su relación que mantienen entre ellas. Entre los reguladores de crecimiento tenemos a cinco tipos de compuestos, que a su vez se caracterizan por ejercer una función en la planta, ya sea promoviendo o inhibiendo su crecimiento. Este grupo está formado por las auxinas, citocininas y giberelinas; las cuales tienen un efecto positivo en el crecimiento de la planta; en los inhibidores tenemos al ácido abscísico, relacionado con el proceso de senescencia y muerte de la planta y por último tenemos al etileno, molécula importante relacionada con la maduración de frutos en algunas plantas. Para el caso del cultivo *in vitro* resultan importantes los promotores de crecimiento, a que estos nos ayudarán a obtener nuevas plantas. [2]. En lo que respecta a este trabajo se enfocó en evaluar la relación del contenido de auxinas y citocininas; ya que como se ha reportado en trabajos anteriores de cultivo *in vitro* de otras especies, la relación de estos dos reguladores influyen en el crecimiento de forma en que las auxinas ayudan a la formación de brotes, callos y raíces por su efecto sobre la división celular, mientras que las citocininas afectan al tejido mediante la división celular, elongación y diferenciación celular en conjunto con las auxinas [2].

B. *Influencia de las soluciones de desinfección y lavado*

Otro de los factores importantes que se debe considerar son los procesos de desinfección y lavado, ya que al momento de extraer el tejido que se desea sembrar, este posee una gran diversidad microbiana en su superficie, por lo que es un factor latente de contaminación en el cultivo; es por esto que previo a realizar el cultivo se realizan lavados de desinfección, utilizando diversas soluciones con agentes desinfectantes, como lo son soluciones de blanqueador casero (hipoclorito de calcio o sodio) entre otros; para así eliminar todo microorganismo que pueda contaminar nuestro cultivo. Se eliminan los restos de la solución desinfectante mediante lavados con agua destilada o estéril, dependiendo del paso de lavado. Es importante tomar en consideración los tiempos de desinfección entre cada una de las soluciones ya que puede suceder que ciertas especies sean más susceptibles al ataque químico de cierto agente desinfectante, por lo que no todas las soluciones son aplicables a todas las plantas [2].

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Obtención de las plantas muestra

Los especímenes de *Asphodelus fistulosus* utilizados para realizar el cultivo in vitro fueron recolectadas a las faldas de los que es la mina abandonada de El Bote en el estado de Zacatecas, México. Se seccionaron en tallo y raíz, tejidos lo cuales se utilizarían para el cultivo. De igual forma se colectó semilla de *S. airoides* para evaluar su germinación en cultivo in vitro.

B. Preparación de medios para cultivo in vitro

El medio utilizado para el cultivo fue el medio comercial MS pH 5.7 ± 0.1 , realizando cuatro unidades experimentales, siendo cada una formada por 6 tratamientos y dos repeticiones de este, evaluando en cada tratamiento de las unidades la concentración de auxinas y citocininas en el medio de acuerdo a la Tabla I. La auxina utilizada en este experimento fue el ácido α -naftalenacético (ANA) y la citocinina utilizada fue la 6-bencilaminopurina (BAP), ambas partiendo de una solución madre de 5 mg/L. Otra variable que se midió fue el porcentaje de agar presente en el medio (5% y 6%). De igual forma se prepararon duplicados de los tratamientos Tx4 y Tx5 en las unidades experimentales 1 y 2 para evaluar la germinación de *S. airoides*.

Tabla I. Composición de los medios utilizados de acuerdo a cada unidad experimental.

Unidad Experimental	Porcentaje de agar	Tratamiento	mg/L ANA	mg/L BAP
1	5%	Tx1	0.137	0.027
		Tx2	0.027	0.137
		Tx3	0.147	0.147
		Tx4	0.221	0.221
		Tx5	0.213	0.152
		Tx6	0.152	0.213
		Tx4s	0.221	0.221
		Tx5s	0.213	0.152
2	5%	Tx1	0.5	0.1
		Tx2	0.1	0.5
		Tx3	0.5	0.5
		Tx4	0.7	0.7
		Tx5	0.7	0.5
		Tx6	0.5	0.7
		Tx4s	0.7	0.7
		Tx5s	0.7	0.5
3	6%	Tx1	0.5	0.1
		Tx2	0.1	0.5
		Tx3	0.5	0.5
		Tx4	0.7	0.7

		Tx5	0.7	0.5
		Tx6	0.5	0.7
4	6%	Tx1	0.7	0.3
		Tx2	0.3	0.7
		Tx3	0.7	0.7
		Tx4	0.9	0.9
		Tx5	0.9	0.7
		Tx6	0.7	0.9

C. Lavados y desinfección del tejido

Se utilizaron tres soluciones de lavado, las cuales fueron etanol al 70%, solución de blanqueador comercial (hipoclorito de sodio) y solución de peróxido de hidrógeno. Debido a que se observó que en algunas plantas los procesos de lavado se mostraban muy agresivos se evaluó la concentración de los agentes desinfectantes así como el tiempo en el que se dejaban los tejidos. Los procesos de lavado siguen el siguiente orden: Lavado con agua corriente, lavado con agua destilada, enjuague con agua estéril (en ambiente estéril y con el tejido ya seccionado), sumergir en etanol 70% por 3 minutos, lavado con solución de hipoclorito de sodio, lavado con solución de peróxido de hidrógeno y enjuague con agua estéril. En la Tabla II se describen los lavados y tiempos que se utilizaron por unidad experimental. En la unidad experimental 3 se realizaron dos tratamientos, uno a cada duplicado.

Tabla II. Concentraciones y tiempos de lavados usados.

Unidad	Concentración hipoclorito (%)	Tiempo (min.)	Concentración peróxido (%)	Tiempo (min.)
1	3	30	7	15
2	3	15	7	15
3	1	10	6	5
		5		10
4	1	3	6	3

D. Siembra de semillas y explantes de plantas

Previo a la siembra y después de los lavados con agua destilada, se cortaron los tejidos de tallo y raíz de *A. fistulosus* con un bisturí estéril y se cortaron de una medida aproximada de 1 cm de largo. En las unidades experimentales 3 y 4 se realizaron cortes transversales a los tejidos, de forma que el tejido bascular quedara más expuesto al medio. Una vez cortados y desinfectados los tejidos se sembraron en frascos de vidrio que contenían el medio (20 mL con su respectivo tratamiento) en forma de pentágono, colocando cinco explantes por frasco. Estos se colocaron en un cuarto con una lámpara de luz blanca y se dejaron crecer durante dos semanas. Para los tratamientos con semillas se colocó una semilla por frasco, ubicándolos en el mismo lugar que los tejidos anteriormente mencionados.

IV. RESULTADOS

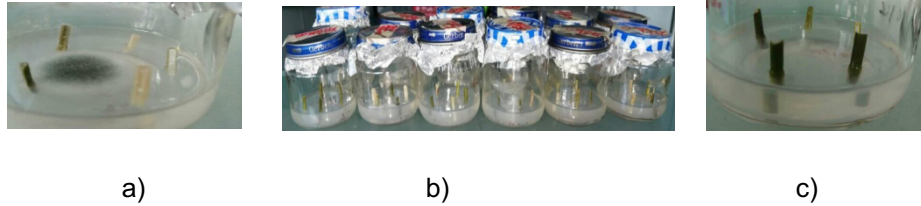


Fig.1. a) Cultivo contaminado de la U.1 con Tx3 b) Tratamientos Tx1-Tx6 de la U.2 c) Cultivo no contaminado Tx6 de la U.3.

No se observó crecimiento en ninguno de los tratamientos de las 4 unidades analizadas, sin embargo se observó que los tiempos de lavado de las unidades 1 y 2 con las soluciones de hipoclorito y peróxido oxidaban de manera importante la superficie del tejido, por lo que al evaluar la unidad 3 con la disminución de la concentración en la unidad 3 se observó una disminución de la oxidación en el tejido, sin embargo se seguía presentando. En la unidad 4 se observó que los tejidos presentaban mínima oxidación a que se conservaban verdes aun después de una semana, por lo que fue la unidad con el lavado más óptimo para *A. fistulosus*. No se obtuvo germinación de las semillas de *S. airoides*.

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La falta de crecimiento sucedida en este experimento se pudo justificar directamente a la relación de auxinas/citocininas ya que en el caso de la unidad 1 y unidad 2 se encontraban en concentraciones bajas, por lo que no fueron suficientes para estimular el desarrollo vegetativo del tejido. La oxidación presente en los tejidos se justifica por la acción del hipoclorito de sodio y el peróxido de hidrógeno que genera daños en la pared celular de la epidermis del tejido, generando que las células mueran y se necrose el tejido, por lo que los tiempos utilizados en la unidad 4 resultaron ser los que generaban menos daño a comparación de los tiempos en las otras unidades. Para el caso de las semillas uno de los factores que influenciaron su germinación es la viabilidad de la semilla, ya que esta tenía 1 año que se había colectado de una planta silvestre nativa de la misma zona de la mina.

VI. CONCLUSIONES

No se logró obtener crecimiento in vitro de los tejidos de *A. fistulosus*, sin embargo se logró obtener las condiciones adecuadas para un lavado óptimo para el cultivo in vitro de esta especie, siendo la desinfección con etanol al 70%, seguida de NaHClO al 1% y después H₂O₂ al 6%, cada uno por 3 minutos.

VII. RECONOCIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Querétaro y a la Universidad Autónoma de Zacatecas por el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano, así como las facilidades para poder realizar el verano de investigación.

REFERENCIAS

- [1] J.A. Flores-de la Torre, K. Mitchell, M. S. Ramos-López, et al., "Effect of plant growth on Pb and Zn geoaccumulation in 300-years-old mine tailings of Zacatecas, México", *Environ Earth Sci* (2018) 77:386, pp 385-386. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s12665-018-7563-7> [consultado en 2019]
- [2] D.V. Hurtado, M. E. Merino, *Cultivo de Tejidos Vegetales*, Ed. Trillas. México, 1987.

Estandarización del cultivo *in vitro* de *Sporobolus airoides* de interés en el ámbito de la fitoestabilización de suelos mineros de Zacatecas, México

Jaime Alberto Solís Ojeda

Universidad Autónoma de Aguascalientes
Departamento de Ciencias Básicas
Avenida Universidad 940, C.U., 20130,
Aguascalientes, Ags.
albertosoj21@gmail.com

Asesor: Juan Armando Flores de la Torre

Universidad Autónoma de Zacatecas
Ciencias de la Salud
Carretera Zacatecas – Guadalajara, Km 6, La
Escondida, 98160, Zacatecas, Zac.
armando.flores@uaz.edu.mx

Resumen — Derivado de la contaminación ambiental provocada por los residuos mineros se trabajó con la estandarización de un cultivo *in vitro* de *Sporobolus airoides*, planta presente en residuos de la Mina “El Bote” en Zacatecas, esto con el fin de poder ser empleada en el área de la fitorremediación. El protocolo se llevó a cabo mediante la realización de distintos tratamientos, los cuales fueron preparados en diferentes concentraciones de agar, medio MS y fitohormonas como las auxinas y citocininas. Se pudo observar que en medios con menor concentración de agar no hubo crecimiento de ningún tipo de planta, sin embargo, utilizando una mayor concentración de agar y una parte distinta de la planta, como la raíz, se observó un ligero crecimiento.

Palabras clave — Cultivo *in vitro*, *Sporobolus airoides*, fitorremediación.

Abstract — Derived from the environmental pollution caused by the mining waste was worked with the standardization of an *in vitro* culture of *Sporobolus airoides*, plant present in residues of the “El Bote” Mine in Zacatecas, this in order to be used in the area of phytoremediation. The protocol was carried out by performing different treatments, which were prepared in different concentrations of agar, medium MS and phytohormones such as auxins and cytokinins. It was observed that in media with lower concentration of agar there was no growth of any type of plant, however, using a higher concentration of agar and a different part of the plant, such as the root, a slight growth was observed.

Keywords — *in vitro* culture, *Sporobolus airoides*, phytoremediation.

I. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, Zacatecas ha sido considerado un estado minero por excelencia, siendo una de las actividades que hoy en día siguen realizándose. Sin embargo, dicha actividad representa una fuente de contaminación para zonas aledañas a las mineras puesto que los suelos generalmente presentan contaminación con metales pesados, siendo necesario tomar cartas en el asunto, pues son cada vez más las poblaciones que se establecen en regiones en donde antes se llevaba a cabo la minería.

Como parte de las alternativas para combatir dicho problema, ha surgido la fitorremediación, que no es más que el conjunto de tecnologías que reducen *in situ* o *ex situ* la concentración de diversos compuestos a partir de procesos bioquímicos realizados por las plantas y microorganismos asociados a ellas [1].

En específico, en la mina “El Bote” ubicada en el municipio de Zacatecas, se producen gran variedad de plantas de interés en la fitorremediación, entre las que destacan *Asclepias linaria*, *Asphodelus fistulosus*, *Barkleyanthus salicifolius*, *Dalea bicolor*,

Cortadella selloana y *Sporobolus airoides* [2], siendo esta última objeto de estudio en el presente trabajo, en el que se pretende generar propagación de esta misma mediante medios de cultivo *in vitro*.

II. MARCO TEÓRICO

A. *Cultivo in vitro*

El cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una técnica de reproducción en condiciones totalmente asépticas, en la que a partir de un pequeño segmento inicial de tejido es posible regenerar en poco tiempo miles o millones de plantas genéticamente iguales a la planta madre, esto se logra mediante la aplicación a un tejido vegetal de estímulos físicos y químicos controlados en un medio de cultivo [3].

Los objetivos perseguidos con la utilización del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales son bastantes y distintos, entre ellos destacan estudios básicos de fisiología, genética y ciencias afines, bioconversión y producción de compuestos útiles, pero en el interés de la presente investigación, la propagación de plantas [4].

Es por todo lo anterior, se ha optado a utilizar el cultivo *in vitro*, como técnica principal para la propagación de plantas como *Sporobolus airoides*.

B. *Plantas de interés en el área de fitorremediación*

Existen algunas plantas capaces de absorber metales pesados, que constituyen una opción barata de descontaminación del suelo, siempre y cuando dicha biomasa pudiera ser utilizada de alguna manera. Está técnica requiere la selección previa de la planta a utilizar de acuerdo con las condiciones climáticas del sitio [5].

Sporobolus airoides. Es vulgarmente conocido como zacatón alcalino, habitante común de los pastizales, potreros y matorrales del norte-centro del país. Generalmente crece en sitios donde hay agua, por lo menos temporalmente. Se utiliza para el control de erosión de suelos degradados, sobre todo alcalinos, también es prometedor para la fitorremediación en suelos con algunos metales pesados y otros desechos [6].

Con la finalidad de que dicha planta pueda crecer de una forma más adecuada y rápida se han empleado reguladores de crecimiento o también conocidos como hormonas, para esta investigación destacan el ácido α -naftalenacético (ANA) y 6-benciaminopurina (BAP).

C. *Reguladores del crecimiento vegetal (fitohormonas)*

Went y Thimann definieron a las hormonas del crecimiento como “sustancias que siendo producidas en una parte de un organismo son transferidas a otra y en ésta influyen un proceso fisiológico específico” [7].

El término regulador de crecimiento vegetal define a los compuestos orgánicos distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican cualquier proceso fisiológico en las plantas [7].

Auxinas. Este término agrupa a una serie de compuestos químicos naturales o sintéticos que causan diversos efectos biológicos a las diferentes especies vegetales, o

variados efectos a una misma especie, dependiendo de la etapa fenólica en que se efectuó su aplicación. La auxina más típica, el ácido indolacético (AIA), provoca la estimulación del crecimiento del tallo, de la división celular, entre otros [8].

Citocininas. Son aquellas sustancias químicas que pueden estimular principalmente la división celular o citocinesis. Casi todas las citocininas conocidas, tanto naturales como sintéticas, son derivados de la adenina [7].

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Preparación del medio de cultivo

Para la preparación de los medios de cultivo se utilizaron frascos de vidrio pequeños, previamente lavados y esterilizados, se prepararon seis tratamientos, con dos repeticiones cada uno, esto por cuatro ocasiones, en dos de las cuatro ocasiones se manejó una concentración de agar bacteriológico al 5% y en otras dos al 8%, al mismo tiempo también se utilizó el medio Murashige & Skoog, con una concentración de 4.33 g/L, a un pH de 7.5 ± 0.1 . Las fitohormonas empleadas fueron el ácido α -naftalenacético (ANA) en el caso de la auxina, mientras que como citocinina se utilizó el 6-bencilaminopurina (BAP). El llenado se realizó de acuerdo con la siguiente tabla:

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo preparados.

Unidad Experimental	Porcentaje de agar	Tratamiento	mg/L Auxina (ANA)	mg/L Citocinina (BAP)
1	5%	Tx1	0.7	0.3
		Tx2	0.3	0.7
		Tx3	0.7	0.7
		Tx4	0.9	0.9
		Tx5	0.9	0.7
		Tx6	0.7	0.9
2	5%	Tx1	0.7	0.3
		Tx2	0.3	0.7
		Tx3	0.7	0.7
		Tx4	0.9	0.9
		Tx5	0.9	0.7
		Tx6	0.7	0.9
3	8%	Tx1	0.7	0.3
		Tx2	0.3	0.7
		Tx3	0.7	0.7
		Tx4	0.9	0.9
		Tx5	0.9	0.7

		Tx6	0.7	0.9
4	8%	Tx1	0.7	0.3
		Tx2	0.3	0.7
		Tx3	0.7	0.7
		Tx4	0.9	0.9
		Tx5	0.9	0.7
		Tx6	0.7	0.9

B. Obtención de la muestra

El tejido vegetal fue recolectado de los jales de la mina “El Bote” ubicada en el municipio de Zacatecas, Zac., se procuró que el tejido vegetal contará con raíz, para así poder realizar de igual forma el cultivo in vitro de raíz.

C. Lavado y desinfección de tejido

Inicialmente el material vegetal fue lavado con agua corriente con la finalidad de eliminar todo residuo de tierra presente en el tallo y raíz de la planta. Una vez limpia, se prosiguió a seccionar la raíz y parte del tallo con ayuda de un bisturí estéril, al contar con las secciones de planta ya cortada se realizaron siete lavados en condiciones asépticas, el primero consistió en lavar las porciones de tallo y raíz con agua corriente una vez más, en seguida, se hizo el mismo procedimiento, pero ahora con agua destilada y otra con agua estéril, como cuarto lavado se sumergieron las porciones de planta en etanol al 70, en donde se dejaron reposando por tres minutos aproximadamente, transcurrido el tiempo el etanol se desechó y se realizó otro lavado con una solución de hipoclorito de sodio, preparado a partir de blanqueador comercial en una concentración de 3% para la primera unidad experimental y de 1% para las unidades dos, tres y cuatro, dichos lavados se realizaron en un tiempo de treinta minutos para la primera unidad, diez minutos en la segunda unidad y cinco minutos para la tercer y cuarta unidad. El sexto lavado se hizo con una solución de peróxido de hidrógeno con una concentración del 7% para la primera unidad experimental, sin embargo, se disminuyó al 6% para las unidades dos, tres y cuatro. Como séptimo y último lavado se volvió a lavar a los segmentos de planta con agua estéril, con el fin de haber eliminado por completo cualquier contaminación.

D. Siembra de segmentos de planta

El cultivo de los explantes se realizó en condiciones asépticas y en una campana, el material utilizado se encontraba completamente estéril. Se colocaron 5 segmentos de planta en cada frasco, en forma de pentágono, se procuró que la parte del tejido vegetal de donde fue cortada quedará expuesta hacia el agar, esto con la finalidad de que pudiera absorber mejor los nutrientes presentes en el medio. Todos los tratamientos luego de haber sido sembrados se colocaron en un cuarto que contaba con luz blanca y se dejaron crecer aproximadamente dos semanas, estando al pendiente de los posibles cambios que pudieran presentarse.

IV. RESULTADOS

En ninguno de los tratamientos con tallo de ninguna de las unidades experimentales se observó crecimiento, las observaciones más trascendentales se presentan en las siguientes figuras:

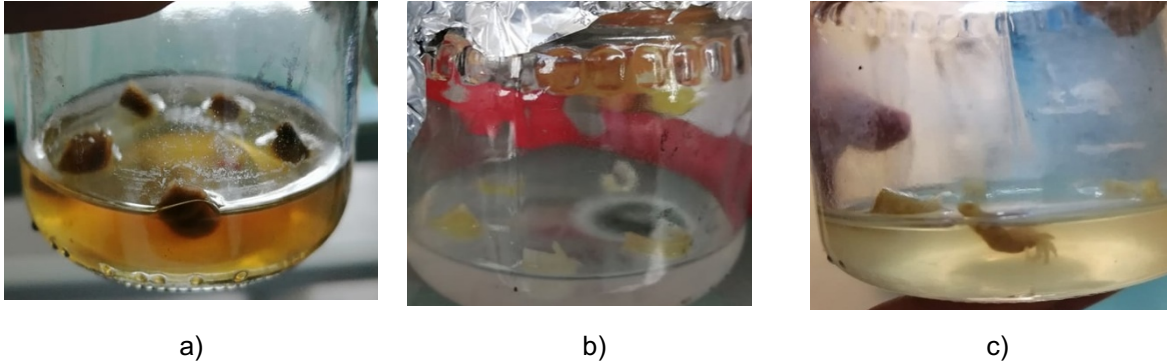


Fig. 1. a) Tratamiento 3 de la U1 con tejido vegetal necrosado. b) Tratamiento 6 de la U4 con contaminación. c) Crecimiento de raíz en tratamiento 2 de la U2.

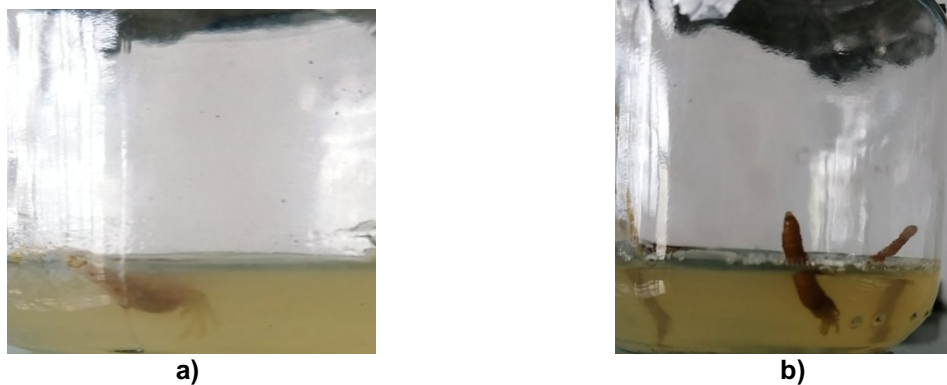


Fig. 2. a) Desarrollo en el crecimiento de la raíz del tratamiento 2 U2 a las tres semanas. b) Brote de raíz en el tratamiento 3 de la U2.

V. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se cree que la falta de crecimiento del tallo de *S. airoides* en los medios de cultivo se debe a distintos factores, inicialmente, en la primera unidad experimental se manejaron tiempos de lavado bastante prolongados con hipoclorito de sodio y peróxido de hidrogeno, lo que se cree fue el principal motivo para que la mayoría del tejido vegetal terminara necrosado y con un color característico de oxidación. Como otro factor de ruido del crecimiento nulo se asocia directamente a la concentración de fitohormonas, puesto que un inicio se utilizaron concentraciones bajas, lo que pudo haber resultado insuficiente para estimular el desarrollo de nuevo tejido, se piensa que también pudo haber influido el pH del medio, pues se sabe que la planta crece a un pH de 5.7 y al diluir las hormonas en hidróxido de sodio, el pH pudo haber sido modificado.

Sin embargo, como se muestra en resultados, se observó un pequeño crecimiento de tallo de *S. airoides* en dos de los tratamientos de la unidad experimental 2, dicho desarrollo se presentó de forma lenta, no obstante, se cree que al modificar las condiciones del medio en que se siembra, este crecimiento se pueda dar en menor tiempo y mayor tamaño.

VI. CONCLUSIONES

Se demostró la viabilidad del crecimiento *in vitro* de *S. airoides*, puesto que el crecimiento de raíz en dos de los medios representa una posibilidad de repetir la investigación, aumentando las concentraciones de hormonas y las condiciones físicas, tales como la exposición a la luz.

Se logró la estandarización de las condiciones a tomar en cuenta para la realización de lavados del tejido vegetal, tanto en tiempos como en concentraciones, al igual se pudo saber cual es la concentración óptima de agar para que solidifique correctamente.

VII. RECONOCIMIENTOS

Doy las gracias a la Universidad Autónoma de Aguascalientes, por el apoyo brindado para la realización de esta estancia, al igual que a la Universidad Autónoma de Zacatecas por haberme abierto las puertas durante estas semanas, al Dr. Armando Flores por la confianza y apoyo durante la investigación.

REFERENCIAS

- [1] (2005) Agriculturers. [Online]. Available: <https://agriculturers.com/la-fitorremediacion-plantas-para-tratar-la-contaminacion-ambiental/>
- [2] A. Flores, K. Mitchell, M. Ramos, A. Guerrero, L. Yamamoto and F. Avelar, "Effect of plant growth on Pb and Zn geoaccumulation in 300-year-old mine tailings of Zacatecas, México", *Environmental Earth Sciences*, 77:386, pp. 1, 2018.
- [3] M. Cerna and V. Tafur, "Cultivo *in vitro* de *Scoparia dulcis* L. (*Scrophulariaceae*)" *La Granja*, vol. 9, pp. 44-51. 2009.
- [4] W. Roca and L. Mroginski, *Cultivo de tejidos en la agricultura*, Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia, 1993.
- [5] F. Bautista, *Introducción al estudio de la contaminación del suelo por metales pesados*, Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán, 1999.
- [6] (2003) CONABIO. [Online]. Available: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/poaceae/sporobolus-airoides/fichas/ficha.htm#3.%20Identificaci%C3%B3n%20y%20descripci%C3%B3n>
- [7] R. Biwell, *Filosofía Vegetal*, Editorial A.G.T., México, 1979.
- [8] A. Larqué and M. T. Rodríguez, *Fisiología vegetal experimental*, Editorial Trillas, México, 2010.

Estimación de la recurrencia de cáncer del sistema respiratorio de 1975 a 2016 en los Estados Unidos de América

Jonathan Dazaeth Delgado Sánchez
Universidad Autónoma de Aguascalientes
Avenida Universidad 940, C.U., 20130
Aguascalientes, Ags.
dazaethsanchez@gmail.com

Asesora: Angélica Hernández Quintero
Universidad Autónoma de Aguascalientes
Avenida Universidad 940, C.U., 20130
Aguascalientes, Ags.
angelica.hernandez.q@gmail.com

Resumen — El cáncer de pulmón y bronquios representan el 12.9% de todos los casos nuevos de cáncer en Estados Unidos y se estima que el número de muertes en 2019 por este cáncer es de 142,670. El SEER se engloba en cáncer respiratorio a los cánceres con origen en nariz, cavidad nasal, oído medio; laringe, pulmón y bronquios; pleura; traque, mediastino y otros órganos respiratorios. El propósito de este análisis retrospectivo es determinar los grupos con mayor riesgo de recurrencia de cáncer en el sistema respiratorio. Se concluyó los grupos con mayor de recurrencia son los pacientes de raza negra ($p=1.08 \times 10^{-5}$) en pacientes femeninos y masculinos ($p=8.72 \times 10^{-5}$ y $p=3.03 \times 10^{-5}$ respectivamente) y con una localización izquierda ($p=3.55 \times 10^{-7}$).

Palabras clave — Cáncer de sistema respiratorio (CSR), análisis de supervivencia, Test log-rank, Test Gehan.

Abstract — Lung and bronchial cancer accounts for 12.9% of all new cancer cases in the United States and it is estimated that the number of deaths in 2019 from this cancer is 142,670. SEER includes respiratory cancers that originate in the nose, nasal cavity, middle ear; larynx, lung and bronchi; pleura; trache, mediastinum and other respiratory organs. The purpose of this retrospective analysis is to determine the groups with the highest risk of recurrence of cancer in the respiratory system. It was concluded the groups with the highest recurrence are black patients ($p = 1.08 \times 10^{-5}$) in female and male patients ($p = 8.72 \times 10^{-5}$ and $p = 3.03 \times 10^{-5}$ respectively) and with a left location ($p = 3.55 \times 10^{-7}$).

Keywords — Respiratory cancer (RC), survival analysis, Test log-rank, Test Gehan.

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es uno de los mayores problemas de salud pública y es la segunda causa de muerte en los Estados Unidos.(1) Según el Informe Anual a la Nación sobre el Estado del Cáncer del Programa de Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales (SEER por sus siglas en inglés) del Instituto Nacional de Cáncer (NHI) (2), las tasas generales de incidencia de cáncer para todas las edades durante 2011–2015 fueron 494.3 entre hombres y 420.5 entre mujeres.(2) En el SEER Causa de Muerte Recodificada 1969+, se encuentra como conjunto al sistema respiratorio a los cánceres con origen en nariz, cavidad nasal, oído medio, laringe, pulmón y bronquios, pleura, traque, mediastino y otros órganos respiratorios. (3,4) El cáncer de pulmón y bronquios representan el 12.9% de todos los casos nuevos de cáncer en el mundo. Sin embargo en los últimos informes de investigación médica sobre el tema (4–7) la evidencia refleja que si la naturaleza y los síntomas del cáncer se identifican correctamente en una etapa temprana, se puede curar.(5)

La medida estadística que se emplea puede emplear para determinar este panorama es la recurrencia, sin embargo solo se cuenta con datos de recurrencia con respecto a las recidivas locales y regionales después de un tratamiento quirúrgico, y la relación entre el tamaño del tumor con su recurrencia.(8) El propósito de este análisis retrospectivo es determinar los grupos con mayor recurrencia de cáncer de sistema respiratorio (CSR).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Los datos de recurrencia de cáncer de la población de los Estados Unidos han sido recopilados por el SEER del NHI desde 1976 hasta el 2016. Esta base de datos se extrajo únicamente la información de los pacientes registrado en los archivos de texto englobados como RESPIR.TXT con un total de 644594 pacientes. La información estadística fue adaptada y analizada utilizando software R versión 3.6.1.(9)

Utilizando la descripción de registro de datos SEER de investigación de los casos diagnosticados de 1976 a 2016, se seleccionaron para su análisis las variables; 4 (raza), 7 (sexo), 15 (lateralidad), 19 (código de comportamiento ICD-0-3) y 20 (grado).(10)

Se realizó la extracción de las curvas de supervivencia con el estimador Kaplan Meier (11) como se muestra en la Ec. (1):

$$\tilde{S}(t) = \prod_{t_i \leq t} \frac{n_i - d_i}{n_i} \quad (1)$$

donde el sombrero sobre S significa que es un estimado, es un estimador no paramétrico de máxima verosimilitud de $S(t)$, $S(t)$ es la función de supervivencia de una determinada población, d_i el número de muertes en el momento t_i , n_i es el número de sujetos en riesgo justo antes de t_i .(11)

Posteriormente se realizó una prueba de hipótesis para comparas las curvas de supervivencias, las hipótesis establecías para los grupos se muestra en la Ec. (2):

$$H_0 : S_1(t) = S_2(t) = \dots = S_G(t) \quad (2)$$

H_1 : las curvas de supervivencia de al menos 2 grupos diferente

donde S_i la supervivencia del grupo 1, t del tiempo observación, H_0 es la hipótesis nula y H_1 es la hipótesis alternativa.

Las hipótesis fueron realizadas con el Test de log-rank o Gehan según el caso. Para realizar la decisión de uno u otro teste se verifico bajo la hipótesis mostrada en la E. (3).

H_0 : Se cumple el supuesto de riesgos proporcionales (Test de log – rank)

H_1 : No se cumplen el supuesto de riesgos proporcionales (Test de Gehan)

Se trabajó con una confianza del 95% (α : 0.05). Se rechaza H_0 si el valor $p \leq 0.05$. El análisis estadístico se realizó en el software R, utilizando la paquetería survival.

III. RESULTADOS

Entre pacientes del sexo masculino y femenino con CSR se determinó que no existe diferencia entre los tiempos de recurrencia ($p=0.4$). Al agruparlos por raza se observó que entre los paciente de raza negra (PRN) y los pacientes de raza blanca (PRB), el grupo de mayor riesgo de recurrencia son los PRN ($p=1.08 \times 10^{-5}$). Se decidió hacer un subgrupo analizando el sexo y la raza de los pacientes, en el cual los PRN femeninos ($p=8.72 \times 10^{-5}$) y masculinos ($p=3.03 \times 10^{-5}$) tienen mayor riesgo de recurrencia que los PRB de ambos sexos como se puede observar en la figura 1.

Solo existen registrados casos de CSR con comportamiento de carcinoma in situ y maligno (sitio primario, invasivo). No existe riesgo de recurrencia entre ambos grupos ($p=0.678$). Sin embargo al analizarlo junto con la raza, el mayor tiempo de recurrencia se sigue encontrando en PRN ($p=0.0469$)

La lateralidad en un subgrupo por pacientes masculinos se observó un mayor riesgo los casos de CSR con una localización izquierda ($p=3.55 \times 10^{-7}$), mientras que en los pacientes femeninos existe un mayor riesgo de recurrencia en casos con un CSR bilateral de origen desconocido ($p=0.00121$) como se muestra en la figura 2. Cuando se analizó la lateralidad para cada raza se encontró que en los PRB el riesgo de recurrencia incrementa con los CSR con una localización izquierda ($p=3.96 \times 10^{-7}$) y los PRN con una localización bilateral. En el caso de los PRN no se existen registros de casos de CSR de origen único e inespecífico.

En el grupo de PRN se analizó tanto la lateralidad y el comportamiento, en el que no existe diferencia entre los tiempos de recurrencia en los casos de CSR con un comportamiento de carcinoma in situ ($p=0.169$) o maligno ($p=0.127$). En los PRB se analizaron las mismas variables, pero a diferencia de los PRN, se observó un incremento en el riesgo de recurrencia en los CSR de origen izquierdo con un comportamiento malino (2.84×10^{-7}), mientras que en los PRN no se encontró diferencia en los tiempos de recurrencia ($p=0.127$) como se puede observar en la figura 3.

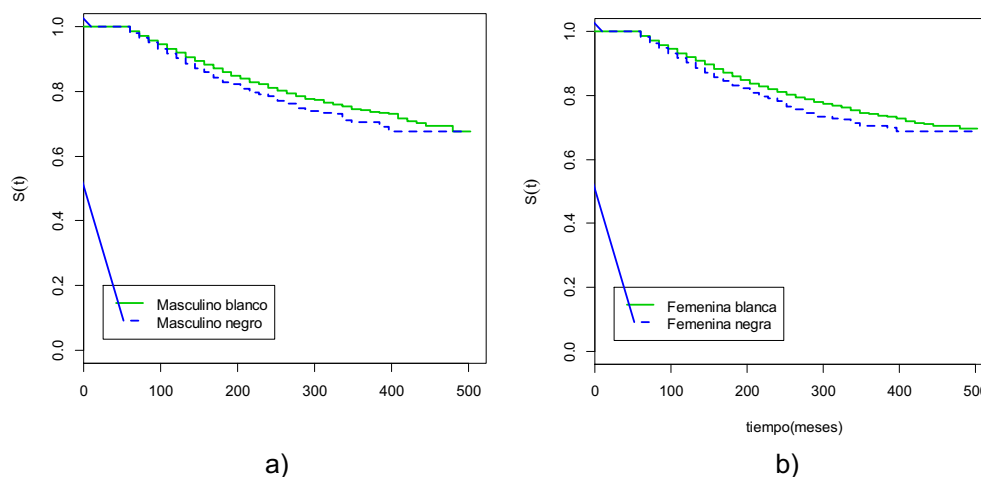


Fig.1. Estimador Kaplan-Meier para pacientes con cáncer de sistema respiratorio; a) pacientes masculinos de cada raza; b) pacientes femeninos de cada raza.

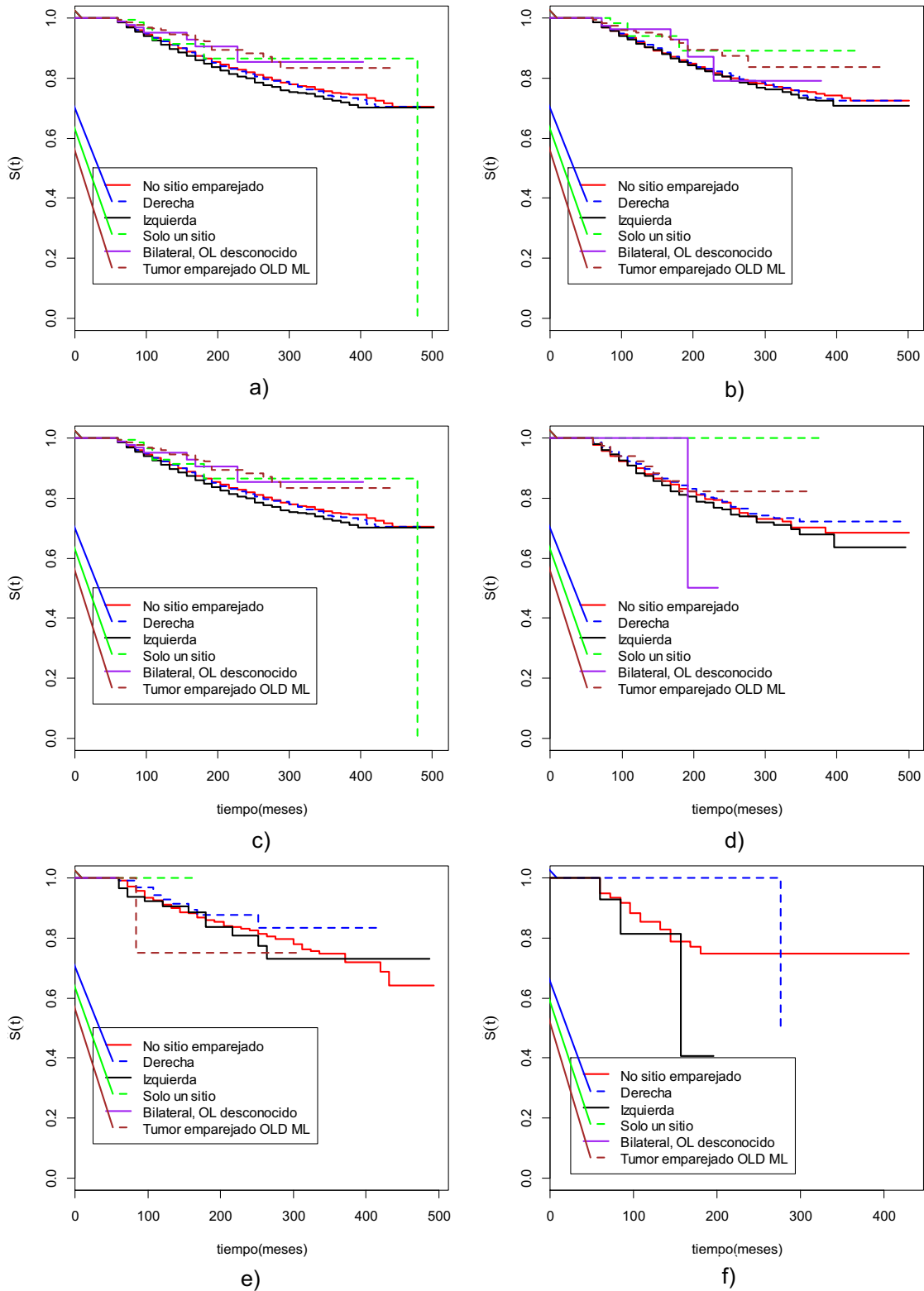


Fig.2. Estimador Kaplan-Meier para pacientes con cáncer de sistema respiratorio; a) lateralidad en pacientes masculinos; b) lateralidad en pacientes femeninos; c) lateralidad en pacientes de raza blanca; d) lateralidad en pacientes de raza negra; e) lateralidad in situ en pacientes de raza blanca; f) lateralidad in situ en pacientes de raza negra.

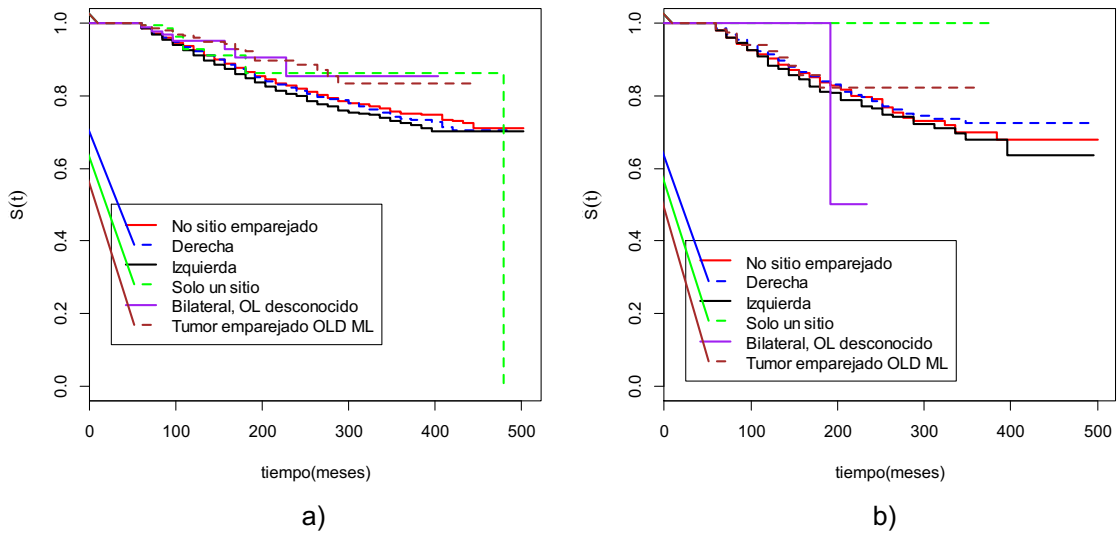


Fig.3. Estimador Kaplan-Meier para pacientes con cáncer de sistema respiratorio; a) lateralidad de malignidad (invasivo) en pacientes de raza blanca; b) lateralidad de malignidad (invasivo) en pacientes de raza negra.

IV. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

En un estudio de cohorte que incluyó 129,951 mujeres, no se encontraron diferencias raciales / étnicas en el riesgo de muerte por cáncer de pulmón en modelos completamente ajustados. Sin embargo este estudio no se tiene contemplado el riesgo de recurrencia en pacientes femeninas. (7) No se encontró en la bibliografía existente datos estadísticos de recurrencia que incluyera las variables en este estudio.

En un estudio retrospectivo en el que se analizó la supervivencia y recurrencia después de resección en cuña en pacientes con cáncer pulmonar, incluyendo cáncer de garganta, traque y bronquios, se determinó que hay un mayor riesgo de recurrencia en los pacientes con cáncer pulmonar local y con un diámetro mayor a 2cm ($p=0.05$). (8) Este estudio no hace diferencia entre una localización izquierda o derecha en la lateralidad, sin embargo como se puede observar en la figura 2 y figura 3, hay un mayor riesgo de recurrencia en la lateralidad izquierda y derecha.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Este estudio concluye que los grupos con mayor de recurrencia son los PRN ($p=1.08 \times 10^{-5}$) en pacientes femeninos y masculinos ($p=8.72 \times 10^{-5}$ y $p=3.03 \times 10^{-5}$ respectivamente) y con una localización izquierda ($p=3.55 \times 10^{-7}$). Los límites de este estudio es la escasa bibliografía, ya que no se cuenta con información que engloben sus estudios en CSR, haciendo imposible hacer un contraste de los resultados con otras investigaciones. La importancia de tener información global de los riesgos de recurrencia es sustentar futuros trabajos que necesiten partir estadísticamente de los grupos y variables de riesgo del cáncer de origen respiratorio.

RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Aguascalientes, la Universidad Autónoma de Querétaro y al CONACyT por las facilidades y el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano.

REFERENCIAS

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2019 Jan 1;69(1):7–34. Available from: <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
2. Jemal A, Siegel DA, Feuer EJ, Albert U. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1999–2015, Featuring Cancer in Men and Women ages 20–49 Elizabeth. 2015;1999–2015.
3. SEER Cause of Death Recode 1969+ (9/17/2004) [Internet]. 2014. Available from: https://seer.cancer.gov/codrecode/1969_d09172004/index.html
4. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ CK. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2016, National Cancer Institute [Internet]. 2019. Available from: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/
5. Dubey AK, Gupta U, Jain S. Epidemiology of lung cancer and approaches for its prediction: a systematic review and analysis. *Chin J Cancer*. 2016;35(1):71.
6. Fan Z, Ji T, Wan S, Wu Y, Zhu Y, Xiao F, et al. Smoking and risk of meningioma: A meta-analysis. *Cancer Epidemiol* [Internet]. 2013;37(1):39–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canep.2012.09.004>
7. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019;144(8):1941–53.
8. Billè A, Ahmad U, Woo KM, Suzuki K, Adusumilli P, Huang J, et al. Detection of Recurrence Patterns After Wedge Resection for Early Stage Lung Cancer: Rationale for Radiologic Follow-Up. *Ann Thorac Surg*. 2016;102(4):1067–73.
9. The R Foundation. R version 3.6.1 [Internet]. 2019. Available from: <https://www.r-project.org/>
10. SEER RESEARCH DATA RECORD DESCRIPTION CASES DIAGNOSED IN 1975-2016 * Submission : November 2018 Follow-up Cutoff Date : December 31 , 2016 Documentation Version : April 2019 Diagnosis Years : 1975-2016. 2019;(April):1975–2016.
11. Hernández Quintero A. Introducción a la inferencia estadística para datos de supervivencia. Aplicación en medicina. Saarbrücken, Alemania: Editorial Académica Española; 2012. 133 p.

Estimación de la remoción de Cr(VI) en agua empleando biomasa de *Sargassum* sp

Rodrigo Merino Lubetzky

Universidad de Guanajuato
División de Ciencias e Ingenierías
Lomas del Bosque #103,
Lomas del Campestre, 37150 León, Gto.
merinolr2015@licifug.ugto.mx.mx

Asesor: Edgar Vázquez Núñez

Universidad de Guanajuato
División de Ciencias e Ingenierías
Lomas del Bosque #103,
Lomas del Campestre, 37150 León, Gto.
edgar.vazquez@ugto.mx

Resumen — El cromo VI se encuentra comúnmente en aguas residuales industriales, su presencia causa graves daños al medio ambiente y a la salud. Emplear sargazo (*Sargassum* sp.) como material adsorbente en los tratamientos de efluentes podría aumentar la eficiencia en los procesos de remoción, coadyuvando con la reducción del impacto ambiental negativo de esta alga en las playas del caribe mexicano. El objetivo de este estudio fue el de encontrar las condiciones óptimas para la remoción de Cr (VI) empleando *Sargassum* sp. como bioadsorbente. El experimento se realizó haciendo uso de reactores batch de 200 ml, se midió la bioadsorción de Cr VI por métodos espectrofotométricos, usando una relación 2% de m/v de sargazo, se varió pH y el tamaño de partícula. Se encontró una óptima adsorción con un tamaño de partícula de *Sargassum* sp. de 0.234 mm² en pH's ácidos.

Palabras clave — Aguas residuales, Bioadsorción, Cromo VI, Sargazo.

Abstract — Chromium VI is usually found in industrial wastewater, its presence can cause serious damages to the environment and health issues. Using the sargassum in wastewater treatments would help reduce costs of the process, giving this way a use to the enormous amounts of sargassum on the coastline of the Mexican Caribbean. The objective of this study was to find the optimal conditions for the use of *Sargassum* sp. as a bioadsorbent of Cr VI. The adsorption of Cr VI was measured by spectrophotometric methods, using a 2% m/v ratio of sargassum in 200 ml batch reactors, pH and particle size were varied. Optimum adsorption was found with a particle size of 0.234 mm² in acidic pH's.

Keywords — Bioadsorption, Chromium VI, Residual Water, Sargassum.

I. INTRODUCCIÓN

El cromo es un metal pesado que se encuentra comúnmente en los efluentes de distintas industrias, su presencia en agua representa un riesgo para la salud y el medio ambiente. De acuerdo con la organización mundial de la salud, el límite máximo permisible de cromo en agua potable es de 0.05mg/L [1]. El cromo se puede encontrar en dos diferentes especies, trivalente (Cr III) y hexavalente (Cr VI), el cromo hexavalente proviene de actividades humanas y es altamente cancerígeno y mutagénico, siendo más tóxico y con mayor movilidad que el Cr III. Particularmente, las fuentes antropogénicas de Cr VI provienen de industrias del cuero, minería, producción de colorantes, pintura, papel y procesos de galvanizado. [2]

Los métodos convencionales para la remoción de metales pesados en agua son: intercambio iónico, adsorción, precipitación, filtración, evaporación y el uso de membranas [3]. Sin embargo, son usualmente costosos y poco eficientes. Dentro de los procesos de adsorción se encuentra el uso de materiales biológicos, teniendo como ventajas un bajo costo, eficiencia en la remoción de metales pesados, regeneración del bioadsorbente y recuperación del compuesto adsorbido. Dentro de los materiales biológicos, las algas

marinas han reportado tener una alta capacidad de unión con metales pesados debido a la presencia de polisacáridos, proteínas o lípidos en su pared celular, los cuales contienen grupos funcionales que actúan como sitios de unión para metales [4, 5].

Investigaciones recientes compararon la capacidad adsorbente de diferentes algas, reportando al *Sargassum* sp. como el mejor acumulador de metales pesados debido a su alta capacidad como bioadsorbente.[6] Esta macroalga ha adquirido popularidad en los últimos años debido a su presencia masiva en el mar Caribe. Las especies *Sargassum fluitans* y *Sargassum natans* llegan a las costas caribeñas invadiendo los ecosistemas presentes. El fenómeno ha ido en aumento desde el año 2011, y se tienen diferentes hipótesis dentro de las que destacan el calentamiento global y la reproducción excesiva del alga debido a eutroficación por la tala excesiva del Amazonas.[7]

La presencia excesiva de sargazo cerca de las costas conlleva un grave problema ambiental, provoca una alteración en la composición química del agua, lo que causa un cambio severo del ecosistema. La invasión de sargazo en la zona también involucra un grave problema financiero, el caribe tiene un sustento económico principalmente del turismo y la presencia del alga en las costas ha repercutido en aumento cada año por lo que se requiere su remoción. La disposición de las enormes cantidades de alga presenta un reto importante, sin embargo, las características de la biomasa permiten su uso diferentes actividades generando oportunidades económicas interesantes.

El uso de la biomasa como adsorbente representa una solución para dos problemas, la disposición del alga y el tratamiento de aguas residuales. El uso de *Sargassum* sp. podría representar una alternativa viable y sostenible, estudios previos [8] han demostrado que el alga tiene resultados prometedores como adsorbente de una gran gama de contaminantes.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Se uso *Sargassum* sp. como bioabsorbente, las muestras del alga fueron tomadas en las costas del caribe mexicano (latitud: 21.169379 longitud: -86.844882) en abril del 2019. Las muestras se lavaron con agua corriente y enjuagaron con agua destilada, se secaron a 40 °C por 24 horas. Se trituraron y se pasaron por dos tamices diferentes para obtener tamaños de partícula diferentes, 1.69 mm² y 0.234mm².

Las soluciones de cromo VI se prepararon usando 0.0373g de K₂Cr₂O₇ grado analítico marca Koral en 1lt de agua destilada, guardadas a temperatura ambiente. Para la curva de calibración se hizo uso de una solución estándar de cromo VI marca Koral diluida con agua destilada a diferentes concentraciones.

El análisis de cromo VI se analizo midiendo la absorbancia del complejo entre Cr VI y 1,5-difenilcarbazida a 540 nm con un espectrofotómetro UV-Vis (BioSpectrophotometer Eppendorf). [9]

Las pruebas se realizaron por triplicado en matraces Erlenmeyer de 250 ml con un volumen de operación de 200 ml de solución con agitación de 150 rpm, con relación 2% w/v, a una temperatura de 25 °C. Con el fin de obtener las condiciones de pH de operación adecuadas se probaron 3 diferentes valores de pH i.e.,4, 7.5 y 9. Cada prueba se repitió 3

veces por un tiempo de 240 minutos. Se tomaron muestras de 2 ml en los minutos 15, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210 y 240. Para la solución de Cr VI en pH 4 se hizo uso de una solución buffer de ácido fórmico y se ajustó el pH durante la prueba con H_2SO_4 1M. Para la solución a pH 9 se usó una solución buffer de tetraboratos y se ajustó el pH durante la prueba con NaOH 1M midiendo con un potenciómetro Hanna Instruments HI 2211.

Una vez determinado el pH adecuado para la remoción, haciendo uso de estas condiciones, se disminuyó el tamaño de partícula con el fin de observar el cambio en la velocidad de adsorción.

III. RESULTADOS

La especiación iónica de metales en solución tiene gran importancia en los estudios de biosorción ya que la captación de metales a menudo depende del pH del sistema de sorción. Los valores de pH más altos generalmente resultan en una mayor absorción de catión metálico debido a la baja solubilidad del metal. [10]

En este estudio se compararon las tasas de remoción del Cr VI a diferentes pH's. En la **fig 1** se puede observar que la remoción del Cr VI se dio de manera eficiente en medios ácidos, comparando con el medio a pH 7.5, la remoción fue casi nula y para pH 9 no hubo disminución en la concentración del cromo VI. En pH 4 se modificó el tamaño de partícula a uno más pequeño con el fin de observar si la velocidad de remoción tenía un cambio importante. Podemos notar que el equilibrio lo logra casi 2 horas antes debido a que presenta mayor área superficial. Sin embargo, en el tratamiento de aguas los tiempos de contacto tienden a ser prolongados, por lo que no es necesario disminuir el tamaño de partícula si la materia prima se encuentra en grandes cantidades.

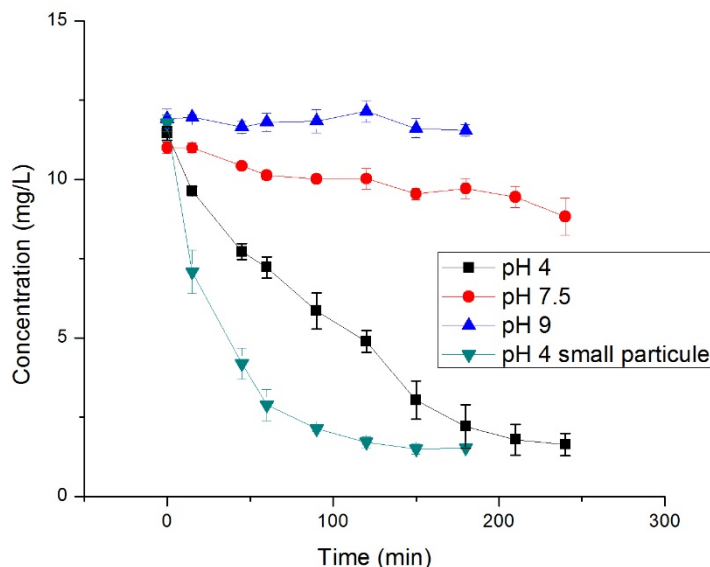


Fig. 1. Curvas de remoción de Cr VI en diferentes pH y tamaño de partícula.

Estudios anteriores han demostrado que el pH 2.0 es el pH óptimo para la remoción de Cr (VI) con *Sargassum* spp. Cuando el pH está fuera de este valor óptimo, la biosorción baja. La absorción de metal se vuelve insignificante a un pH superior a 6. Este fenómeno podría deberse a la ionización de los grupos carboxilo presentes en las algas a este pH, lo que puede resultar en mayor interacción con el cromo. Por el pH al que se llevó el experimento, la biosorción del cromo sigue dos procesos. El primer proceso es la reducción química que convierte Cr (VI) a Cr (III), debido al bajo pH, mientras que el segundo proceso es la coordinación de metales y el intercambio de iones que conducen a la acumulación de Cr (III) sobre el sólido. [11]

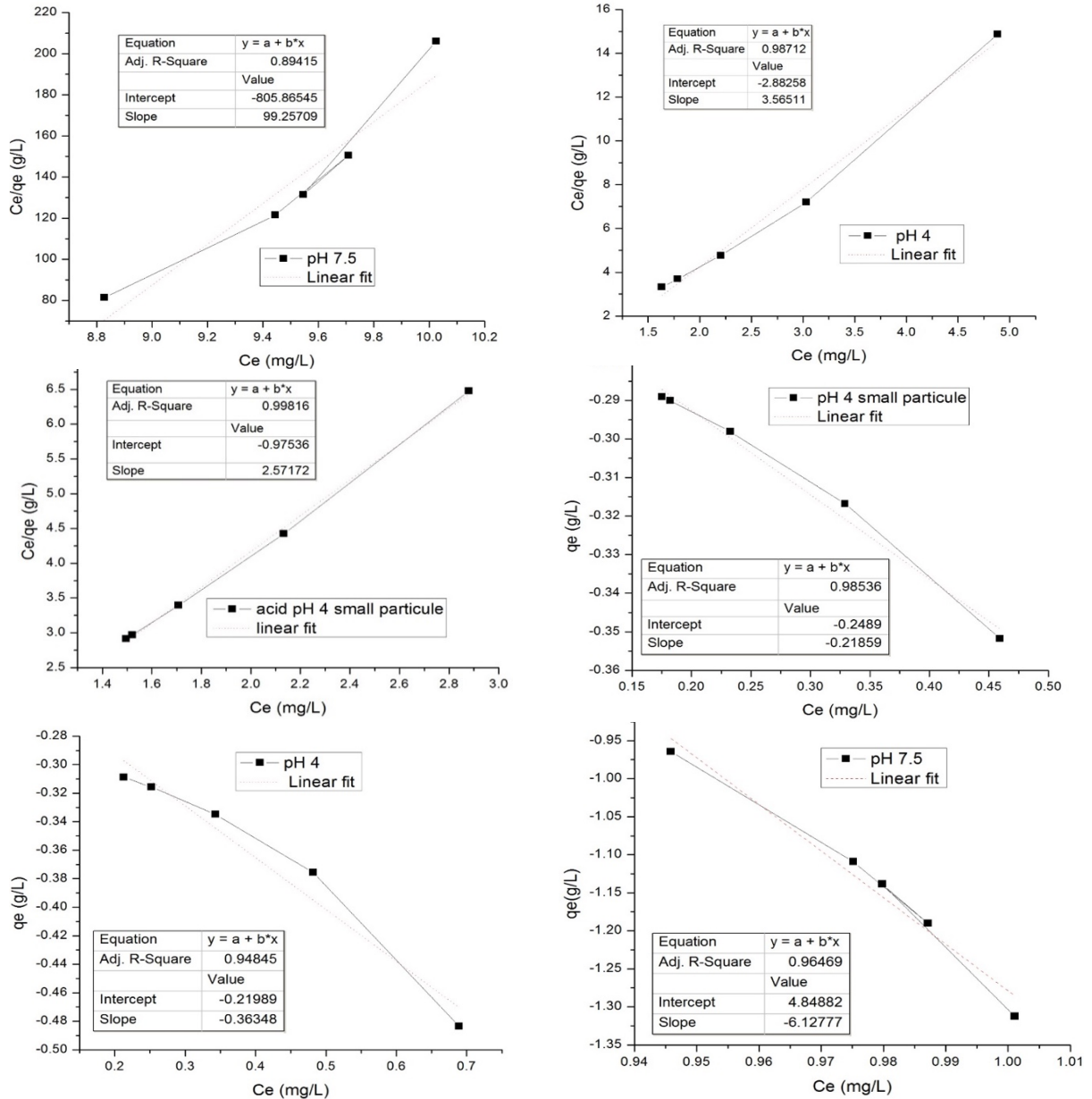


Fig. 2. Isotermas de Langmuir, primeras 3 gráficas, para pH 7.5, 4 y 4 con partícula pequeña. Isotermas de Freundlich para pH 4 con partícula pequeña, pH 4 y pH 7.5 respectivamente. Se observa en cada uno sus ajustes lineales.

En la figura 2 se presentan las isotermas de Langmuir y Freundlich para los experimentos en pH = 4, con ambos tamaños de partícula, y para pH 7. Observamos que las curvas se ajustaron mejor a las isotermas de Langmuir en pH 4, y como era de esperarse, por haber logrado el equilibrio con mayor velocidad, el experimento con partícula de menor tamaño presenta el mejor ajuste. Los valores de los parámetros de Langmuir y Freundlich para pH 4 con partícula pequeña se presentan a continuación.

- Constantes de Langmuir: $q_{\max} = 38.84 \text{ mg/g}$; $b = 0.026 \text{ L/mg}$
- Constantes de Freundlich: $K_F = 0.5637$; $n = 4.5747$

IV. CONCLUSIONES

Se logró observar una eficiente remoción de Cr VI empleando *Sargassum sp.* Se encontró que en pHs ácidos la remoción de Cr VI presenta resultados importantes, de 85% de remoción, estos estudios permitirán establecer condiciones prospectivas para el tratamiento de agua en presencia de contaminantes generados por la industria de cuero y curtido.

V. AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad de Guanajuato por las facilidades y el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano.

REFERENCIAS

- [1] World Health Organization (WHO), 2004. Guidelines for drinking-water quality (third ed.), vol. 1, Recommendations. WHO, Geneva, pp. 334– 335.
- [2] Margarita E, Carmona R, Moñica A, da Silva P, Selma G, Leite F, et al. Packed bed redistribution system for Cr(III) and Cr(VI) biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Taiwan Inst Chem Eng* 2012; 43:428–32.
- [3] Vieira, M. G. A., Oisiovici, R. M., Gimenes, M. L., & Silva, M. G. C. (2008). Biosorption of chromium (VI) using a *Sargassum sp.* packed-bed column. *Bioresource Technology*, 99(8), 3094–3099.
- [4] Ramelow GJ, Fralick D, Zhao Y, "Factors affecting the uptake of aqueous metal ions by dried seaweed biomass." *Microbios*. Vol. 72, p. 81-93, 1992.
- [5] Ho YB, "Ulva lactuca as bioindicator of metal contamination in intertidal waters in Hong Kong", *Hydrobiologia*. Vol. 203, p. 73-81, 1990.
- [6] Da Costa, A.C.A., De Franca, F.P., "Cadmium sorption by biosorbent seaweeds: adsorption isotherms and some process conditions", *Sep. Sci. Technol.* Vol. 31, p. 2373–2393, 1996.
- [7] Clifford Louime et al., "Sargassum Invasion of Coastal Environments: A Growing Concern", *American Journal of Environmental Sciences*, No. 13, Vol. 1, p.58-64, 2017.
- [8] Cruz C.V. Claudio y col., "Kinetic modeling and equilibrium studies during cadmium biosorption by dead *Sargassum sp.* Biomass", *Bioresource Technology*, Volume 91, Issue 3, p. 249-257, 2004.
- [9] Sandoval Ivette Guadalupe, *Modificación de membranas de ultrafiltración mediante la inserción de sub-micropartículas de óxido de hierro* [Tesis Licenciatura]. Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Guanajuato, 2012. Pp 30-32.

- [10] T.A. Davis, B. Volesky, "SARGASSUM SEAWEED AS BIOSORBENT FOR HEAVY METALS", *Wat. Res.* Vol. 34, No. 17, pp. 4270±4278, 2000.
- [11] Yang, L., & Chen, J. P. (2008). *Biosorption of hexavalent chromium onto raw and chemically modified Sargassum sp.* *Bioresource Technology*, 99(2), 297–307.

Estudio de biomateriales a base de cerámicos y polímeros bio-degradables y su aplicación en la dosificación de sustancias activas (A)

Ana Sofía Torres García
Universidad Autónoma de Coahuila
Facultad de Ciencias Químicas
28280, Saltillo, Coahuila, México
a-torres@uadec.edu.mx

Asesora: Maria Cristina Ibarra Alonso
Universidad Autónoma de Coahuila
Calle Ing. J Cardenas Valdez, Republica,
C.P.28280 Saltillo, Coahuila.
ibarra.cristina@uadec.edu.mx

Resumen – En este trabajo se describe la obtención y purificación de celulosa bacteriana (CB) y celulosa vegetal (CV) a partir de *Acetobacter xylinum* y sargazo respectivamente, así como la realización de biocompositos a base de PLA/Celulosa-Cerámico, como posible vehículo en la dosificación de sustancias activas. Se analizó el efecto de la concentración de PLA, dejando fija la concentración de la celulosa, sobre el efecto en la prueba hemólisis. Los resultados mostraron la obtención de celulosa bacteriana y celulosa de sargazo de acuerdo con los espectros de FTIR, además, las pruebas de hemólisis directa determinaron que el composito con menor concentración de PLA resultó ser menor hemolítico, sugiriendo potencial vehículo en la dosificación de sustancias activas.

Palabras clave – Celulosa bacteriana (CB), Ácido poliláctico (PLA), Biocompositos.

Abstract – This paper describes the obtaining and purification of bacterial cellulose (CB) and plant cellulose (CV) from *Acetobacter xylinum* and sargassum respectively, as well as the realization of biocomposites based on PLA / Cellulose-Ceramic, as a possible vehicle in the Dosage of active substances. The effect of PLA concentration was analyzed, leaving cellulose concentration fixed, on the effect on the hemolysis test. The results showed the obtaining of bacterial cellulose and sargassum cellulose according to the FTIR spectra, in addition, direct hemolysis tests determined that the composition with the lowest concentration of PLA was found to be lower hemolytic, suggesting potential vehicle in the dosage of active substances.

Keywords – Bacterial cellulose (CB), Polylactic acid (PLA), Biocomposites.

I. INTRODUCCIÓN

Los sistemas de dosificación de sustancias activas son tecnologías relativamente nuevas en creciente desarrollo, donde los materiales se emplean como herramientas de diagnóstico o para la liberación de agentes terapéuticos a sitios específicos de manera controlada, estos se han investigado extensamente debido a la alta demanda de sustancias activas de administración controlada, ya que los sistemas actuales presentan desventajas como la mala solubilidad en el torrente sanguíneo, poca especificidad, rápida descomposición, pérdida de la actividad; y como consecuencia una gran cantidad de efectos adversos [1].

El desarrollo de nuevos sistemas de liberación controlada tiene la ventaja de evitar la distribución del medicamento donde no es necesario y aumentar su eficacia, pues permite su disponibilidad donde es requerido. Las principales ventajas que presentan estos sistemas de liberación controlada incluyen [2]:

- Concentración uniforme y/o prolongada del nivel de la sustancia activa, reduciendo el riesgo de una sobredosis o una dosis insuficiente.
- Optimización del uso de la sustancia activa.
- Localización del principio activo mediante el uso de dispositivos, limitando efectos secundarios y daños colaterales.
- Reducción de la frecuencia de administración.

II. MARCO TEÓRICO

La liberación controlada de sustancias activas se basa en la idea de proveer la cantidad óptima del agente activo, en el momento preciso y en el lugar adecuado [2]. El diseño de los sistemas de liberación de sustancias activas ha experimentado una gran difusión y representa un importante mercado para el sector industrial. Hasta el momento se han utilizado diversas matrices tales como polímeros orgánicos, materiales híbridos orgánico-inorgánico, vidrios y cerámicas bioactivas [3]. Los beneficios de implementar un sistema de liberación controlada son múltiples y varía según el área de aplicación. La liberación de la sustancia activa es controlada principalmente por las propiedades de la matriz como la porosidad, área superficial, la hidrofiliidad/hidrofobicidad, la velocidad de absorción de solvente, la capacidad de hinchamiento y la velocidad de erosión [2].

A. Cerámicos

Los materiales cerámicos constituyen uno de los elementos principales para la fabricación de dispositivos que interactúan con los sistemas biológicos debido a sus características únicas como resistencia a la corrosión y resistencias al desgaste, cumpliendo con los requisitos para las aplicaciones en diversas especialidades de la medicina principalmente en la dosificación de fármacos, estas características son biocompatibilidad, alta capacidad de carga y protección de la sustancia deseada [4].

B. Celulosa

La celulosa es considerada como el biopolímero más abundante del planeta y representa aproximadamente 1.5×10^{12} toneladas anuales de biomasa producidas. Es encontrada en madera, hojas de plantas y tallos, en combinación con otros materiales, como la lignina y la hemicelulosa.

La celulosa es un polisacárido orgánico que consta de una cadena de glucosa unida por enlaces glucosídicos entre el carbono 1 y 4, su fórmula química es $(C_6H_{10}O_5)_n$ [8]. Aunque generalmente es considerada un material de las plantas, algunas bacterias también pueden producirlas. La celulosa producida por plantas y bacterias tienen la misma fórmula molecular, la celulosa vegetal se encuentra en la pared celular formando estructuras complejas con hemicelulosa, lignina y otras impurezas, en contraste la celulosa bacteriana (CB) es producida en forma de cintas (hebras) formando microfibras [5].

1) *Celulosa bacteriana*

En los últimos años la celulosa de origen bacteriano ha ganado importancia debido a sus propiedades, gracias a estas, la CB ha encontrado numerosas aplicaciones en biotecnología, microbiología y ciencia de los materiales [6]. Entre todos microorganismos, *Acetobacter xylinum* es la bacteria más eficiente productora de celulosa [7].

La celulosa producida por *A. xylinum* no contiene impurezas asociadas como las plantas, manifiesta una estructura única y propiedades bioquímicas, como una estructura de red de nanofibras, bioadaptabilidad, es inerte, hipoalergénica y tiene estabilidad química. Otra importante diferencia de la CB se encuentra en su estructura, que le confiere propiedades físico-químicas que la distinguen de la celulosa vegetal, como su elevada cristalinidad, durabilidad, resistencia mecánica y moldeabilidad [6].

2) *Celulosa de sargazo*

El sargazo pelágico es una macroalga marina parda del género *Sargassum* spp., componente importante de la flora marina de zonas tropicales, se mantiene a la superficie del océano sin adherirse al fondo, crece rápidamente y propicia un ambiente favorable para albergar especies y organismos marinos, así como para la reproducción y crianza de estos [8].

En nuestro país el sargazo está bien representado en las costas del Golfo de México, Mar Caribe y en el litoral del Océano Pacífico. Pese a que el arribazón de pequeñas cantidades de sargazo es un fenómeno natural, en los últimos años se ha extendido su periodicidad e incrementado el volumen de dichos arribazones a las costas de Quintana Roo, por lo que se consideran arribazones masivas y atípicas [11]. Anualmente se desaprovecha esta biomasa cosechable, ya que actualmente en nuestro país existen pocos estudios relacionados con el empleo de esta macroalga, encaminados a la extracción de alginatos o celulosa a nivel industrial. La celulosa algal posee propiedades químicas y estructurales muy similares a la celulosa extraída de plantas terrestres, de manera que podría sustituir a esta en multitud de aplicaciones [9].

C. *Ácido poliláctico (PLA)*

El PLA ha generado gran interés como uno de los polímeros más prometedores debido, principalmente, a sus propiedades de biodegradables, biocompatibles y de procesamiento, aunadas a buenas propiedades mecánicas, es por esto, que se ha vuelto altamente atractivo en aplicaciones biológicas, el uso de este polímero no solo se centra en la práctica ecológica, también se ha reportado en una extensa cantidad de publicaciones científicas en el área médica para la manufactura de dispositivos de liberación controlada de sustancias activas [10].

III. MATERIALES Y MÉTODO

Todos los reactivos fueron utilizados sin tratamiento adicional: Ácido poli-láctico (PLA) de 72,000 g/ml de peso molecular y Poli vinil alcohol (PVA) 57,000-66,000 g/ml de peso molecular de Alfa Aesar, Diclorometano (DMC) 99.9%, Etanol 96%, Ácido sulfúrico (H₂SO₄)

97%, Hidróxido de sodio (NaOH) 97% y Curcumina 94% se adquirieron de Sigma Aldrich. Nanopartículas de sílice (SiO₂).

A. *Obtención de CB*

La cepa de *Gluconoacetobacter xylinus* ATCC 10245 fue obtenida de la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares (CDBB) del CINVESTAV. La reactivación de la cepa se realizó según la hoja de datos proporcionada por el CDBB. Una vez reactivada la cepa se procedió a la inoculación en 250 mL de caldo manitol descrito en la hoja de datos del CDBB [12]. Se dejó incubando por 7 días a temperatura ambiente. Después del tiempo de incubación se recuperó la biomasa obtenida por centrifugación y se caracterizó por FTIR.

B. *Obtención de celulosa a partir de sargazo*

Las hojas de sargazo se recolectaron en la playa El Progreso en el municipio de Yucatán, del estado de Mérida, México; posterior a su recolección fueron secadas al sol. Se lavaron con abundante agua destilada, para posteriormente ser secadas en una estufa a una temperatura de 50° durante 24 horas. Las hojas de sargazo se sometieron a hidrólisis ácida con una solución de H₂SO₄ al 10% en un equipo Soxhlet a reflujo constante durante 6 horas. Posteriormente se neutralizó la solución con NaOH al 7%, se filtraron las fibras obtenidas y se lavaron con agua destilada en un equipo Soxhlet y se dejaron secar en una estufa a una temperatura de 50° por 24 horas. Las fibras obtenidas se caracterizaron por FTIR.

C. *Elaboración de biocompositos PLA/celulosa-cerámico*

Se seleccionó la celulosa obtenida del sargazo, ya que la celulosa bacteriana contenía impurezas debido a su proceso de obtención y requería un tratamiento adicional de purificación, que no contemplaba este trabajo de investigación. Previamente se acondicionó el PLA en un horno a 50°C durante 12 horas. Posteriormente se preparó soluciones de PLA/celulosa al 3:1, 4:1 y 5:1% en peso, dejando fijo el peso de la celulosa, en 12 ml de DMC. El cerámico se dispersó en una disolución de etanol al 40% y posteriormente se mezcló con la solución de PLA/celulosa, bajo agitación vigorosa, obteniendo una suspensión blanca lechosa.

Por otro lado, se prepara una solución de PVA en 100 ml de agua destilada, bajo agitación constante a 60°C, para disolver el PVA, una vez disuelto el PVA, la solución se enfrió a temperatura ambiente y se traspasó a un baño de ultrasonido por 15 minutos, transcurrido el tiempo, esta suspensión se goteo poco a poco a 500 rpm durante 15 minutos, en la solución de PVA previamente preparada. las esferas obtenidas se lavaron y se obtuvieron mediante filtración.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

A. *FTIR*

Se realizó un estudio de espectroscopía FTIR-ATR para determinar los grupos encontrados en la biomasa obtenida en los cultivos de celulosa bacteriana y celulosa de

sargazo. En la Figura 1, se muestra los espectros FTIR-ATR, se observa la presencia de las vibraciones características de la celulosa; enlaces C–H₂ (2918, 2851, 1427 y 1315 cm⁻¹), C–H (1360 y 1280 cm⁻¹), C–O (1054 y 1030 cm⁻¹), C–O–C (1160 cm⁻¹) y O–H (banda ancha entre 3600 y 3200 cm⁻¹, así como bandas en 1335 y 1205 cm⁻¹). A 898 cm⁻¹ se tiene la vibración del grupo del carbono anomérico de carbohidrato, C1–H, y en 1635 cm⁻¹ la banda correspondiente a agua adsorbida, también se observa para la celulosa bacteriana obtenida a partir de la cepa de *Gluconoacetobacter xylinus* ATCC 10245, una banda intensa a 1533 cm⁻¹ que corresponde a las impurezas asociadas con la pectina y lignina [12].

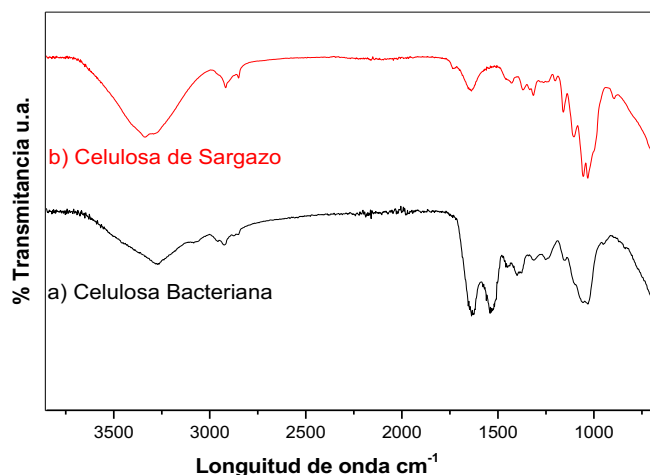


Fig. 1. Espectros de FTIR de la celulosa obtenida.

B. Hemólisis

La interacción de los compositos con los componentes sanguíneos puede conducir a la lisis de los eritrocitos humanos. Por esta razón, los efectos de los compositos en la sangre se evaluaron con ensayos de hemólisis. Los resultados indicaron que los compositos son hemolíticos a concentraciones de 5 mg / ml en todos los casos, mientras que las muestras evaluadas a 2.5 mg / ml resultaron ser no hemolíticas en las relaciones de 4:1 y 5:1, para la relación de 1 mg / ml las muestras resultaron ser no hemolíticas en todos los casos (Figura 2) Varios autores han evaluado la capacidad básica de compositos a base de cerámico y PLA/celulosa como portadores de fármacos, obteniendo resultados favorables en términos de pruebas de hemólisis [13].

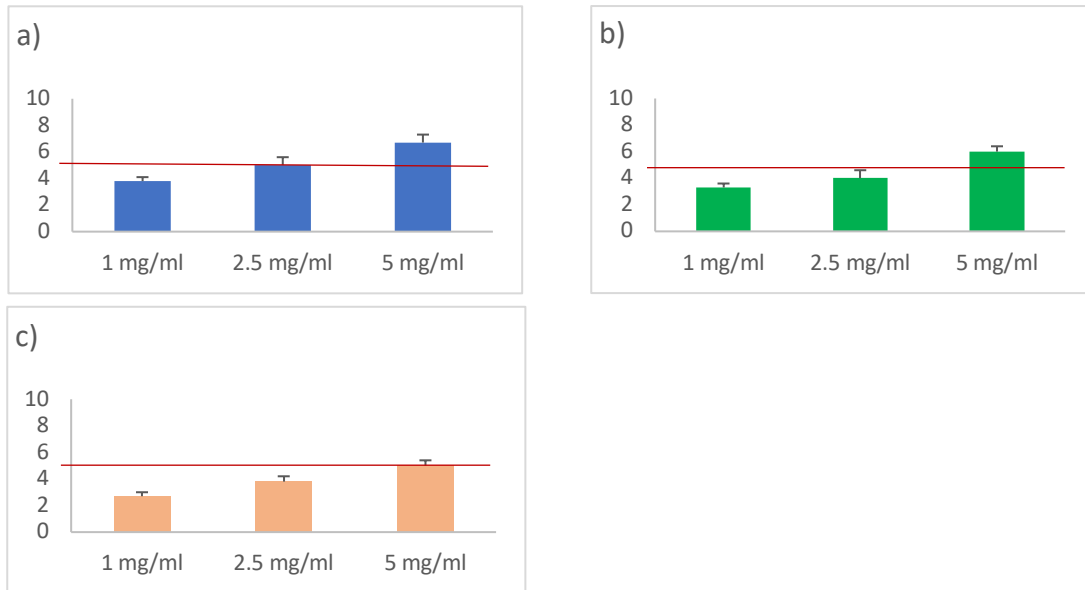


Fig. 2. Gráficos de pruebas de hemólisis: a) Relación 3:1, b) Relación 4:1, c) Relación 5:1

V. CONCLUSIONES

La técnica de caracterización FTIR-ATR demostró la obtención de celulosa bacteriana y celulosa de sargazo, mientras que los resultados de hemólisis directa indicaron que los compositos obtenidos son hemolíticos a concentraciones altas (5 mg / ml), como lo mostrado en los análisis, por lo que se infiere que entre mayor sea la relación de PLA en el composito PLA/celulosa-cerámico del mayor será el efecto hemolítico observado al igual que a mayores concentraciones de 5 mg / ml en todos los casos.

Con base en los resultados obtenidos se puede deducir que los compositos estudiados pueden tener potencial para su desarrollo en aplicaciones biomédicas como la administración controlada de sustancias activas.

REFERENCIAS

- [1] C. Y. Tecnológica, "Síntesis de nanopartículas potenciales vehículos."
- [2] C. Ishizawa and J. Nakamatsu, "Matrices Poliméricas para Liberación Controlada de Sustancias Activas," *Rev. Química*, vol. 16, no. 1–2, pp. 13–23, 2002.
- [3] M. Vallet, R. Antonio, and L. Doadrio, "Monografía XIX; Liberación de fármacos en matrices biocerámicas: Avances y perspectivas," *Inst. España, Real Acad. Nac. Farm.*, pp. 111–140, 2006.
- [4] V. Hernández-montes, C. P. Betancur-henao, and J. F. Santa-marín, "Titanium dioxide coatings on magnesium alloys for biomaterials: A review Recubrimientos de dióxido de titanio sobre aleaciones de magnesio para biomateriales: Una revisión," vol. 84, no. 200, pp. 261–270, 2017.
- [5] O. Adebayo, "EVALUATION OF BACTERIAL POLYMERS AS PROTECTIVE AGENTS FOR SENSITIVE PROBIOTIC BACTERIA," 2018.
- [6] S. Santos, J. M. Carbajo, and J. C. Villar, "Celulosa Bacteriana," no. November, 2015.
- [7] M. O. H. D. C. Airul, I. Q. M. Ohd, and A. B. G. U. A. Badi, "Bacterial Cellulose Film Coating as Drug Delivery System: Physicochemical, Thermal and Drug Release Properties," vol. 41, no. 5,

- pp. 561–568, 2012.
- [8] I. Tecnológica, E. N. Turismo, and M. Contextual, “Marco Contextual y Planteamiento del Problema,” 2018.
 - [9] A. Moral, “Microalgas para la extracción de celulosa de alta pureza Autor: Ana Moral Rama,” no. January 2012, 2014.
 - [10] M. S. Lopes, A. L. Jardini, and R. M. Filho, “Synthesis and Characterizations of Poly (Lactic Acid) by Ring-Opening Polymerization for Biomedical Applications,” vol. 38, pp. 331–336, 2014.
 - [11] S. Temp, “Gluconacetobacter xylinus Live Culture: See Gluconacetobacter xylinus,” no. provitamin C, pp. 1–2.
 - [12] H. J. Contreras, H. A. Trujillo, G. Arias, J. Pérez, and E. Delgado, “ATR-FTIR spectroscopy of cellulose : instrumental aspect and mathematical treatment of spectra,” *Rev. Digit. científica y tecnológica*, vol. 8, p. 9, 2010.
 - [13] J. Li and Y. Guo, “Basic evaluation of typical nanoporous silica nanoparticles in being drug carrier : Structure , wettability and hemolysis,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 73, pp. 670–673, 2017.

Estudio de biomateriales a base de cerámicos y polímeros bio-degradables y su aplicación en la dosificación de sustancias activas (B)

Andrea Concepcion Segovia Garcia
 Instituto Tecnológico Superior De Irapuato
 Carr. Irapuato-Silao Km.12.5 Irapuato, Gto.,
 Mexico 36821
andreaC_SG@hotmail.com

Asesora: Maria Cristina Ibarra Alonso
 Universidad Autónoma de Coahuila
 Calle Ing. J Cardenas Valdez, Republica,
 C.P.25280 Saltillo Coahuila.
ibarra.cristina@uadec.edu.mx

Resumen — Los biomateriales híbridos con estructura núcleo/coraza, se han convertido en un área de investigación importante en las últimas décadas debido a su gran potencial de aplicación como vehículos en la dosificación de sustancias activas, en este trabajo se describe la síntesis de un biomaterial a base de PLA-cerámico, con estructura núcleo-coraza, así como el método de carga con curcumina, sustancia con actividad a células cancerígenas. El biomaterial PLA-cerámico cargado con curcumina se caracterizó por FTIR-ATR y uv-visible, resultando en la eficiente carga de la curcumina y el análisis de la liberación de la curcumina indico un perfil de liberación más prolongado, resultando en un eficiente vehículo dosificador de curcumina.

Palabras clave —Biomateriales, ácido poliláctico (PLA), cúrcuma.

Abstract — Hybrid biomaterials with a core / shell structure have become an important research area in recent decades due to their great potential for application as vehicles in the dosage of active substances. In this work we describe the syntesis of a bio material with a PLA - ceramic base with core / shell estructura and a loading method with curcumin, a substance with activity to cancer cells. The PLA - ceramic biomaterial loaded with curcumin was characterized by FTIR-ATR and visible UV, which resulted in an efficient loading of curcumin and the analysis of curcumin release indicated a more prolonged release profile, which resulted in a vehicle of efficient curcumin dosage.

Keywords — Biomaterials, polylactic acid (PLA), curcumin.

I. INTRODUCCIÓN

Los biomateriales híbridos con estructura núcleo/coraza, se han convertido en un área de investigación importante en las últimas décadas debido a su gran potencial de aplicación en campos como las imágenes biológicas, la terapia de tumores, la ingeniería de tejidos la liberación controlada entre otras. Los sistemas de administración de fármacos pueden encontrar aplicaciones en la terapia del cáncer. se sabe que la curcumina, es una sustancia natural que ha demostrado ser eficaz en el tratamiento y la prevención de diversos cánceres y también se ha demostrado su baja toxicidad, siendo seguro su uso incluso a dosis (referencia). De esta manera se plantea la obtención de un nanocompuestos a base de ácido poli-láctico y cerámico como vehículos eficientes en la entrega de curcumina, sustancia activa eficaz en el tratamiento de cáncer.

II. MARCO TEÓRICO

El término biomaterial fundamentalmente es conceptualizado como un material diseñado para entrar en contacto con sistemas biológicos para evaluar, tratar, mejorar o reemplazar tejidos, órganos funcionales o funciones fisiológicas [1] [2][3].

Entre los biomateriales, se incluyen metales, cerámicos, vidrios, aleaciones metálicas, polímeros sintéticos o naturales [4][5]. Cual sea el biomaterial, puesto que su fin es ser implantado, debe poseer ciertas características en las que se incluye el concepto de biocompatibilidad, valorando diversas calidades que engloban la tolerancia de dicho material, su bioestabilidad tanto a corto como a largo plazo, o el mantenimiento de sus propiedades y estructura químico-física en un entorno biológico con condiciones establecidas en el lapso de tiempo que permanezca en el organismo efectuando la función para la que fue diseñado [4], [6].

A. Clasificación de los Biomateriales

La clasificación de los biomateriales puede realizarse atendiendo a su comportamiento al ser implantado o a su naturaleza química [6], [7][8]. Claro que, en el diseño óptimo de un composito, por ejemplo, pueden coordinarse diversos componentes de los cuales se establecen tres grupos principales: metales, cerámicos y polímeros [9].

1) Biomateriales Poliméricos

Los polímeros ofrecen facilidad de procesamiento y control sobre propiedades físicas necesarias para aplicaciones biomédicas más específicas [10]. Al igual que otros biomateriales que entran en contacto con la sangre, el uso pronunciado de los polímeros en la sangre se limita en parte a la trombosis inducida por la superficie, iniciada por la adsorción de proteínas plasmáticas y la activación de las plaquetas [11].

Los polímeros pueden ser tanto naturales como sintéticos y se pueden encontrar formulaciones biestables, es decir, con carácter permanente; o biodegradables, con carácter temporal.

- *Ácido poli-láctico PLA*

El ácido poli-láctico es un biopolímero biodegradable derivado del ácido láctico. Es un material altamente versátil, que se hace a partir de recursos renovables al 100%, como son el maíz, la remolacha, el trigo y otros productos ricos en almidón. Recientemente, los investigadores consideraron que el poli (ácido láctico) (PLA) es un candidato adecuado para reemplazar algunos polímeros sintéticos, debido a sus buenas propiedades mecánicas, facilidad de procesabilidad, menor impacto ambiental y sus recursos renovables [12].

2) Biomateriales cerámicos

Son aquellos materiales que incluyen a las composiciones inorgánicas y no metálicas. Los materiales cerámicos que son biocompatibles son denominados biocerámicos. Generalmente son usadas como implantes de cadera e implantes dentales, entre otros. A diferencia de los metálicos, estos no sufren los efectos de la corrosión, y aunque algunos pueden llegar a degradarse, los productos de tal degradación pueden ser reabsorbidos por las células sin causar mayores problemas al huésped [13].

B. Curcumina, sustancia activa

La curcumina, 7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1, 6-heptadieno-3, 5-diona, es un fitoquímico fenólico natural extraído de los rizomas de la especia conocida como cúrcuma

(*Cúrcuma longa* L.) Es un polvo cristalino de color amarillo o naranja, de fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_6$, punto de fusión $183\text{ }^{\circ}\text{C}$, soluble en alcohol y ácido acético glacial e insoluble en agua y éter. A pH 3 es de color amarillo-limón y a pH 10 de color naranja a marrón-rojizo, es estable al calor, pero sensible a la luz (lo que limita muchas veces su aplicación). Ingrediente activo comprende 2-5% de la cúrcuma y se ha demostrado que tienen propiedades antioxidantes similares a la vitamina C y E. La curcumina recientemente que se ha comenzado a usar como anti-inflamatorio, antiviral, anti-infeccioso, hipocolesterolémico, antimicrobiano, antirreumático, antidiabético, y antihepatotóxico. También se considera que tiene propiedades anticancerígenas y se utiliza a menudo como un antioxidante en cápsulas y tabletas [14].

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Materiales

Ácido poli-láctico (PLA) de 72,000 g/ml de peso molecular, Poli vinil alcohol (PVA) 57,000-66,000 g/ml de peso molecular de Alfa Aesar, Diclorometano (DMC) y Curcumina se adquirieron de Sigma Aldrich. Nanopartículas de sílice (SiO_2)

B. Metodos

Previamente se acondiciono el PLA en un horno a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 12 horas. Por otro lado, se prepara una solución de PVA en 100ml de agua destilada, bajo agitación constante a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, para disolver el PVA, una vez disuelto el PVA, la solución se enfrió a temperatura ambiente. Para preparar los biomateriales con estructura núcleo-coraza, primero se realizó la dispersión del cerámico en una disolución de etanol al 40% y posteriormente se agito por 15 minutos, en un baño de ultrasonido.

La solución donde se dispersó el cerámico, se mezcla bajo agitación constante, con las soluciones de PLA y una solución de 12 ml de DMC, por 10 minutos, obteniendo una suspensión lechosa. Esta suspensión se goteo poco a poco a 500 rpm durante 15 minutos, en la solución de PVA previamente preparada. Las esferas se lavaron y se obtuvieron mediante filtración.

C. Caracterización

Se realizó caracterización de las muestras por FTIR-ATR, donde los espectros de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) se registraron en un rango de 400 a 4000 cm^{-1} , usando un Espectrofotómetro Thermo Scientific con ATR.

El análisis de liberación de curcumina, se evaluó sumergiendo cierta cantidad de los materiales a evaluar, en 10 ml de una disolución de PBS a pH de 7.4 a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. A predeterminados intervalos de tiempo se midieron alícuotas de 1ml del medio de liberación y se añadió un volumen idéntico de PBS. La concentración cúrcumina liberada en el medio fue cuantificada nuevamente a 423 nm. El porcentaje de liberación se calculó en base a una la curva de calibración, la cual se trazó usando soluciones patrón de concentraciones conocidas de curcumina.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

A. Espectroscopia de FTIR-ATR

En la Figura 1a, se muestra los espectros de IR correspondiente al biomaterial cargado con curcumina, 1b el espectro del PLA-curcumina y en la Figura 1c el espectro de la curcumina para comparación.

Para la curcumina (Fig. 1c), se observa la banda a 3400 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de estiramiento OH, la banda a 2962 cm^{-1} se atribuyen a la vibración de estiramiento C–H de los anillos aromáticos, presentes en la curcumina, la banda a 1627 cm^{-1} y 1629 cm^{-1} corresponden al estiramiento C=C y C=O respectivamente. A 1508 cm^{-1} , se observa la banda que se atribuye a las vibraciones del carbonilo (C=O) y C-C-C [15]. En el espectro de PLA-cerámico (Fig. 1b), las bandas de absorción a 1753 cm^{-1} (estiramiento de CO) y las bandas a 2995 cm^{-1} y 2945 cm^{-1} corresponde al estiramiento asimétrico y asimétrico del CH_3 respectivamente, finalmente la banda de absorción ubicada a 3506 cm^{-1} puede atribuirse a grupos -OH estas señales son características de la estructura del PLA. Para la Figura 1a, se observa la aparición de la banda a 3400 cm^{-1} y la desaparición de 2962 cm^{-1} , revelando la interacción del ácido poliláctico con la cúrcuma.

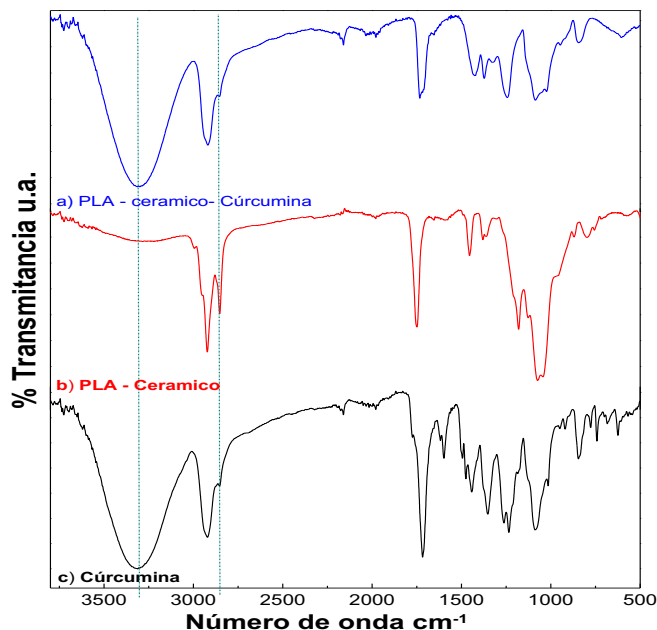


Figura 1. Espectros FTIR de la curcumina, de PLA-cerámico y del PLA-cerámico cargado con curcumina.

B. Evaluación de liberación de la cúrcumina

El análisis de los perfiles de liberación para la sustancia activa “curcumina”, cargadas en el cerámico, polímero y el biomaterial con estructura núcleo coraza se observan en la Figura 2.

Para el cerámico debido a su naturaleza porosa, se obtiene altos porcentajes de liberación a los pocos minutos de la prueba y una disminución en el porcentaje a partir de

las 4 horas, para el PLA se observa una mejor estabilidad en el perfil de liberación, sin embargo, a partir de las 5 horas disminuye su porcentaje de cúrcumina liberada. Para el biomaterial se observa un perfil de liberación más estable y sostenido, infiriendo en un mayor periodo de liberación de la curcumina, debido a la pobre difusión de la curcumina para migrar del cerámico y de la capa polimérica con estructura nucleo-coraza, por lo que, el biomaterial PLA-cerámico-cúrcumina, muestra un perfil de liberación más prolongado.

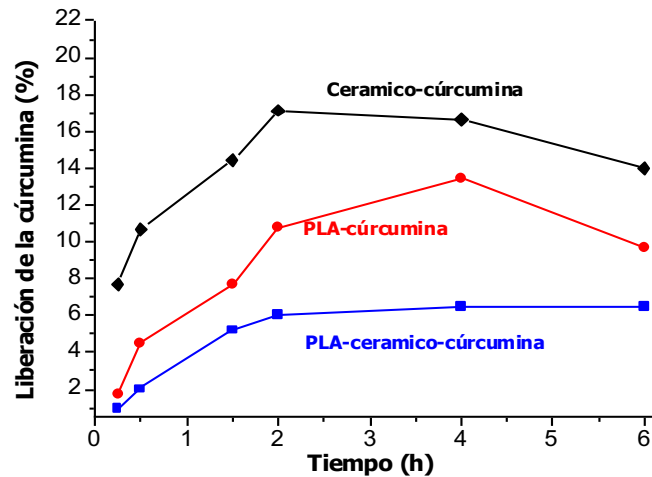


Figura 2. Liberación in vitro de la Cúrcumina.

V. CONCLUSIONES Y DISCUSIONES

La carga de la cúrcumina en el biomaterial PLA-cerámico se llevó a cabo con éxito, según los resultados de la caracterización por espectroscopia de FTIR-ATR, donde se observó la banda a 3400 cm^{-1} , característica de la curcumina, presente en el biomaterial.

Respecto a los resultados de liberación de cúrcumina, se observan altos porcentajes de curcumina liberada para el cerámico debido a su naturaleza porosa, la liberación ráfaga, poco deseable se observa en menor porcentaje para PLA-curcumina, sin embargo, a las pocas horas se observa también se observa una disminución en la liberación. Para el biomaterial PLA-cerámico, se observó un efecto de bloqueo en los porcentajes de liberación de cúrcumina debido al bloqueo que ejerce la estructura núcleo-coraza, induciendo un periodo de liberación más prolongado y sostenido, este tipo de comportamiento en los perfiles de liberación, es la deseable en los vehículos dosificadores de fármacos.

Faltan análisis de caracterización que permitan darle continuidad al trabajo, como las pruebas de biocompatibilidad y de viabilidad celular y la caracterización de la morfología (TEM), quedando como trabajo futuro. Sin embargo, podemos concluir que el biomaterial PLA-cerámico, tendrán aplicaciones potenciales como vehículo dosificador de sustancias activas.

VI. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos al financiamiento obtenido del Proyecto de ciencias básicas de CONACYT (Programa 287245) (CB-2016-01). También se agradece la Universidad Autónoma de Coahuila por sus instalaciones y al comité organizador del 21° verano de la ciencia de la región centro, por proporcionar el capital humano para el desarrollo de este trabajo.

REFERENCIAS

- [1] Aiping Zhu, Fengjuan Li, Lijun Ji. "Poly(lactic acid)/N-maleoylchitosan core-shell capsules Preparation and drug release properties" *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.*, Vol. 91, pp 161-167, March 2012.[1] D. W. Grainger, "The Williams dictionary of biomaterials, P. (2005). 2 Surface biocompatibility, 14–52. <https://doi.org/10.1039/b408906p>terials," *Mater. Today*, vol. 2, no. 3, p. 29, 1999.
- [2] M. Antonia Lizarbe, "SUSTITUTIVOS DE TEJIDOS: DE LOS BIOMATERIALES A LA INGENIERÍA TISULAR," 2007.
- [3] V. I. I. Programa and C. Cient, "Sustitutivos De Tejidos: De Los Biomateriales Ala Ingenieríatisular," vol. 101, pp. 227–249, 2009.
- [4] A. N. Cranin, "Biomaterials: An interfacial approach, L. L. Hench and E. C. Ethridge, New York, Academic, 1982, 384 pp. 14 Chapters, Glossary, Bibliography, and Index. Price: \$42.00," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 19, no. 5, pp. 611–612, May 1985.
- [5] B. An, I. Approach, L. L. Hench, E. C. Ethridge, and N. York, "Book review," vol. 19, pp. 611–612, 1985.
- [6] D. F. (David F. Williams, *The Williams dictionary of biomaterials*. Liverpool University Press, 1999.
- [7] G. Binyamin, B. M. Shafi, and C. M. Mery, "Biomaterials: A primer for surgeons," *Semin. Pediatr. Surg.*, vol. 15, no. 4, pp. 276–283, 2006.
- [8] T. Velnar, G. Bunc, R. Klobucar, and L. Gradisnik, "Biomaterials and host versus graft response: A short review," *Bosn. J. Basic Med. Sci.*, vol. 16, no. 2, pp. 82–90, 2016.
- [9] B. D. (Buddy D. . Ratner, *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. Elsevier Academic Press, 2004.
- [10] R. Ghosh Chaudhuri and S. Paria, "Core/Shell Nanoparticles: Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications," *Chem. Rev.*, vol. 112, no. 4, pp. 2373–2433, 2012.
- [11] R. Iberoamericana, "en Internet <http://www.rioeoi.org>."
- [12] V. L. Finkenstadt, L. S. Liu, and J. L. Willett, "Evaluation of poly(lactic acid) and sugar beet pulp green composites," *J. Polym. Environ.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–6, 2007.
- [13] N. C. Parera, "Modelling Drug Delivery Mechanisms for Microencapsulated," no. May, 2012.
- [14] Hernandez Huesca Karina, "Caracterizacion y digestion gastrointestinal de capsulas de curcuma," 2016.
- [15] A. Sharma *et al.*, "Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Multifunctional mesoporous curcumin encapsulated iron-phenanthroline nanocluster: A new Anti-HIV agent," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 180, no. January, pp. 289–297, 2019.

Estudio de la asociación simbiótica *Trichoderma*-planta

Sofía Abigail Valero Rodríguez

Universidad Autónoma de Coahuila
Facultad de Ciencias Químicas
Ing. J Cárdenas Valdez S/N, República, 25280
Saltillo, Coah.
sofia.valero@uadec.edu.mx

Asesor: Alfredo H. Herrera Estrella

Cinvestav IPN
Laboratorio de Expresión Génica y Desarrollo
en Hongos. Langebio.
Libramiento Norte, Carretera Irapuato-León.
alfredo.herrera@cinvestav.mx

Resumen — El género *Trichoderma* incluye especies de hongos filamentosos ampliamente conocidos por su capacidad antagónica contra otros hongos conocida como micoparasitismo. Durante la interacción con las plantas, promueven el crecimiento y desarrollo vegetal, proporcionando protección contra fitopatógenos y estrés abiótico. Se ha propuesto que *Trichoderma* produce citocininas, hormonas esenciales en el accionar de varios procesos vinculados al crecimiento y desarrollo de plantas, relacionado con la actividad de varios genes. Se conoce que las citocininas pueden iniciar brotes adventicios en porciones de las hojas, venas y peciolo intactos.

Con la finalidad de determinar el papel que podrían tener las citocininas producidas por *T. atroviride* en las asociaciones biológicas establecidas por el hongo, en el grupo de trabajo fueron generadas mutantes nulas de los genes de síntesis *ipt* y *log* de *T. atroviride*.

Palabras clave — Interacción, simbiosis, citocininas.

Abstract —The genus *Trichoderma* includes species of filamentous fungi widely known for their antagonistic capacity and other fungi such as mycoparasitism. During the interaction with plants, they promote plant growth and development, protection against phytopathogens and abiotic stress. It has been proposed that *Trichoderma* produces cytokinins, essential hormones several processes related to the growth and development of plants with production would be related to the activity of several genes. It is known that cytokinins can initiate adventitious shoots in portions of leaves, veins and intact petioles.

In order to determine the role of *T. atroviride* cytokinins in the biological associations established by the fungus, null mutant the *T. atroviride* biosynthetic genes *ipt* and *log* were generated in the working group.

Keywords — Interaction, symbiosis, cytokinins

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad los hongos son unos de los principales microorganismos sujetos a investigación. Uno de estos hongos es *Trichoderma atroviride*, un hongo filamentosos, que se encuentra comúnmente en el suelo. A la fecha se sabe que diferentes especies de *Trichoderma* pueden tener actividad como biocontrolador de enfermedades fúngicas y estimulador del crecimiento vegetal, induciendo la activación de vías de defensa. Diferentes grupos de investigación han reportado que *Trichoderma* tiene la capacidad de matar otros hongos, a partir de diferentes mecanismos de acción entre los cuales se encuentran micoparasitismo (definido como una simbiosis antagónica entre organismos), en este proceso generalmente están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas y proteasas, que se sugiere juegan un papel importante en dicho proceso.

Por otro lado, estudios recientes demuestran que *Trichoderma atroviride* es capaz de modificar los niveles de reguladores de crecimiento (auxinas) en la rizósfera y estimular el crecimiento de las plantas las cuales podrían ayudar para mejorar la calidad de cultivos y

así reducir el uso de fertilizantes. Siendo este uno de los impactos más significativos en la agricultura, reduciendo los costos de producción y el uso de productos químicos en campos de cultivos de interés comercial. Ya que a lo largo de los años aumenta la demanda de alimentos de una manera acelerada por la alta tasa de crecimiento poblacional.

Conforme estudios previamente realizados se tienen conocimientos de que *Trichoderma atroviride* ofrece un intercambio benéfico con la planta promoviendo el crecimiento de esta y estableciendo sistemas de defensa contra patógenos mediante la creación de una relación con ella. Las plantas estimuladas con *Trichoderma* presentan diferentes tipos de respuestas benéficas, las cuales son inducidas por poligalacturonas, xilanasas, celulasas, cerato-plataninas, proteínas de virulencia y proteínas con dominios de lisinas, tricocenos y fitohormonas.

II. MARCO TEÓRICO

A. El género *Trichoderma*

El género *Trichoderma* spp. fue nombrado por primera vez en 1794, por el micólogo Pearson. Es un hongo Ascomiceto aeróbico, miembro de la familia Hypocreaceae. Es un habitante común en suelos. Las especies de hongos que pertenecen al género *Trichoderma* han sido plenamente caracterizadas por tener aplicación en el ámbito agrícola, principalmente para el control biológico de otros organismos patógenos que atacan a los cultivos. *Trichoderma* ha sido estudiado también por tener efectos benéficos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas; ha sido vinculado con el control de hongos patógenos de plantas, omicetos e incluso nematodos.

Los miembros del género *Trichoderma* tienen el potencial de sintetizar y liberar enzimas como celulasas, xilanasas y quitinasas, las cuales se han aprovechado en procesos industriales (Kubicek y Harman 1998, Verma et al. 2007). Lo cual lo hace perfecto como objeto de estudio para así poder obtener el mayor número de benéficos de los cuales este hongo es responsable y así tener la oportunidad de aprovecharlo por completo.

B. Citocininas

En este proyecto se decidió estudiar a las citocininas. En las plantas, las citocininas intervienen en procesos de división celular, promoviendo el crecimiento de los distintos órganos, particularmente los frutos. Las citocininas tienen aplicaciones industriales parecidas a las de las auxinas, usándose para favorecer el crecimiento. Tienen la ventaja de que la cantidad necesaria para que se produzca una respuesta es muy baja. Los niveles de citocininas en las plantas dependen de su biosíntesis o su absorción, a partir de fuentes extracelulares, interconversiones metabólicas, inactivación y degradación. Las plantas pueden obtener citocininas a partir de la hidrólisis de los tRNA con citocininas y su ruta principal es la del mevalonato (MVA) pero la mayoría, son sintetizadas de novon (directamente) por plantas siendo las interconversiones entre bases, nucleósidos y nucleótidos constituyentes de la ruta principal del metabolismo de éstas; y es la conjugación con restos glicocídicos el que regula los niveles endógenos de CKs libres biológicamente activas.

Como objetivos particulares se tuvieron:

1. Analizar el crecimiento de la planta en la interacción in vitro con mutantes en la síntesis de citocininas de *T. atroviride*.
2. Estudiar el efecto de la presencia de *T. atroviride* sobre la vía de citocininas en *Arabidopsis thaliana*.

III. MATERIALES Y MÉTODO

Crecimiento y mantenimiento de cepas fúngicas. Para la obtención de cultivos, las cepas de *Trichoderma* fueron mantenidas por resiembras periódicas en medio de cultivo PDA. Para la obtención de conidios las cepas fueron cultivadas durante cuatro días a 28 °C. Las conidias fueron recuperadas raspando con una espátula de vidrio y agua destilada estéril, se realizó un conteo de conidias en la cámara de Neubauer y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Establecimiento de cocultivos. Para los experimentos de co-cultivo se utilizó la línea silvestre Columbia-0 de *Arabidopsis thaliana*. Las interacciones se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Contreras Cornejo y col., (2009). Brevemente, las semillas fueron esterilizadas superficialmente, realizando cuatro lavados con etanol absoluto grado reactivo, agitando en vórtex, centrifugando durante un minuto y desechando el etanol entre cada lavado. Se dejaron secar en la campana de flujo laminar, hasta la evaporación total de etanol. Diez semillas fueron sembradas en placas de agar MS 0.2X; fueron colocadas en línea, en un extremo de la placa, posteriormente las placas se verbalizaron por un periodo de 4 días a una temperatura de 4 °C para sincronizar la germinación. Pasado este tiempo, las placas fueron atemperadas y puestas a germinar, colocadas verticalmente con un ángulo de 65° aproximadamente para prevenir que la raíz se enterrara en el medio de cultivo y permitir el crecimiento sin obstáculos de los hipocotilos, a una temperatura de 24 °C durante 4 días con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad, al término de ese tiempo las plántulas fueron expuestas al inóculo de 1×10^6 conidias de las cepas de *T. atroviride*. La interacción fue mantenida por un periodo de cinco días, registrando el tamaño de la raíz principal, el número de brotes o raíces laterales, el crecimiento del micelio; se colectaron y se pesaron las plantas para obtener el peso fresco. Y también se colectó el micelio del hongo a diferentes tiempos de interacción. Para el análisis de la expresión de genes relacionados con la biosíntesis y señalización de Cks en la planta, se realizó la obtención de material vegetal de *A. thaliana* a partir de los experimentos de co-cultivo con las diferentes cepas de *Trichoderma*, en los cuales las plantas fueron colectadas en tubos eppendorf, congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a -70 °C hasta su uso.

Obtención de ácidos nucleicos. Para la obtención de ácidos nucleicos, la extracción de ADN de plantas se realizó utilizando el regulador de urea. En el cual después de que la planta o el micelio del hongo es molido por medio de una varilla de vidrio en un eppendorf, con nitrógeno líquido, le es agregado un volumen de buffer de urea, se le aplica un vortex y se deja encubar por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se le agrega un volumen de fenol-cloroformo y se realiza un vortex de 10 min, se centrifuga por 15 min/ 10000 rpm. Se pasa el sobrenadante a otro eppendorf y se adiciona nuevamente fenol-cloroformo, se realiza otro vortex de 10 min y se centrifuga por 15 min/ 10000 rpm. Se pasa

el sobrenadante a otro tubo y se le agrega 1 volumen de isopropanol y se realiza un vortex ligero, se incuba por 10 min a -20°C . se centrifuga por 10 min /10000 rpm. Se lava la pequeña pastilla que se forma con etanol al 70% y se resuspende esta misma en un volumen de agua desionizada estéril y se realiza un vortex rápido. La extracción de ARN total de micelio las cepas de *T. atroviride* se realizó por el método de Chomczynski y Sacchi (1987), utilizando un sistema comercial (TRIzol® Reagent, Invitrogen). La extracción de ARN total del tejido vegetal se realizó de la misma manera. El DNA y RNA obtenidos, se almacenaron a -20°C , se determinó la concentración en un equipo Nanodrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific®) en base a su absorbencia a 260 nm (A260). Para confirmar la integridad del ARN y ADN total obtenido, las muestras se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Reacciones de la Polimerasa en cadena. Las reacciones de amplificación en gradiente fueron realizadas tomando como templado el ADN de *Arabidopsis*, se utilizaron oligonucleótidos de genes implicados en la vía de señalización y síntesis de CKs en la planta. Las reacciones se realizaron en un volumen de 20 μl . Las condiciones de amplificación utilizadas fueron: $95^{\circ}\text{C}/3$ min, $95^{\circ}\text{C}/30$ seg, gradiente de temperatura/30 seg, $72^{\circ}\text{C}/1$ min y $72^{\circ}\text{C}/3$ min. Utilizando 28 ciclos de amplificación. El producto de la reacción se analizó en un gel de agarosa al 1%.

IV. RESULTADOS

En este trabajo se utilizaron dos cepas mutantes de los genes *ipt* y *log*, generadas por transformación de la cepa silvestre IMI206040 las cuales se han llamado Δtaipt y Δtalog . En la figura 1 se muestra el crecimiento en placas PDA, de las tres cepas utilizadas en este trabajo.

Se sabe que existe una diferencia en la tasa de crecimiento de las mutantes con respecto a la cepa parental de ocho hasta diez horas. Dicha diferencia en la velocidad de crecimiento se reafirmó y con ello se ajustó el tiempo de inoculación de los conidios de cada cepa durante los experimentos de interacción, con el objetivo de homogenizar el crecimiento del micelio.

Trichoderma además de colonizar la rizósfera, también penetra la epidermis de las raíces, viviendo como un endófito (Harman et al., 2004). El efecto positivo que se ha reportado sobre el crecimiento y desarrollo radicular de las plantas, así como la resistencia al estrés abiótico, se ha atribuido a la producción de compuestos por parte del hongo, entre ellos compuestos tipo auxinas y diversos metabolitos pequeños que pueden ser difusibles o volátiles, los cuales juegan un papel importante en la comunicación biológica entre el hongo y la planta. Para evaluar el efecto en el crecimiento de las plantas de *A. thaliana* durante la interacción con las cepas de *T. atroviride*, se llevaron a cabo experimentos de co-cultivo con contacto directo de las cepas de *T. atroviride* con plántulas de *A. thaliana* Col 0. La figura 2 muestra fotografías del experimento de co-cultivo directo a los 3 días de interacción. Al realizar la interacción planta hongo se pudieron ver las diferencias de crecimiento y de producción de raíces laterales conforme a la caja control de *Arabidopsis thaliana* y las plantas con la interacción el hongo y sus mutantes a 3 días de inoculación antes del contacto de la raíz con el micelio del hongo.

Para continuar con segundo objetivo, que consistía en estudiar el efecto de la presencia de *T. atroviride* sobre la vía de citocininas en *Arabidopsis thaliana*, a través de los niveles de expresión de genes de síntesis y señalización de CKs, se realizó la extracción de RNA total de las plantas en interacción con *Trichoderma*. La figura 5 muestra la electroforesis de las muestras de RNA. En donde podemos observar la integridad del RNA probando diferentes oligos a una misma temperatura.

Se realizó extracción de DNA de *Arabidopsis*, para realizar PCR en gradiente de oligonucleótidos de genes implicados en la biosíntesis y señalización de CKs en la planta. Tomando como templado el DNA se probó un gradiente de temperatura para estandarizar las condiciones de amplificación de los oligonucleótidos. Se muestran los geles de agarosa correspondientes a las reacciones de PCR que se realizaron para cada par de oligonucleótido. En un recuadro en rojo, se indica la temperatura seleccionada para para cada oligonucleótido, como resultado del gradiente.

V. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se observa como claramente el crecimiento de las mutantes una vez que es inoculado es mayor con respecto a la cepa silvestre de *Trichoderma* a. Teniendo de diferencia con estas dos un aproximado de 8 a 10 horas para que se tenga el mismo tamaño en cada caja.

Podemos notar como la interacción con la planta antes y después del contacto de donde podemos deducir que la cepa silvestre en comparación con las mutantes induce la formación de un mayor número de raíces laterales y un mayor crecimiento de la raíz principal, pero también se puede ver que entre estas no existe una diferencia notable en el crecimiento de raíces laterales, pero en el crecimiento de la raíz principal si existe una diferencia entre ellas presentándose un mayor crecimiento en el caso del co-cultivo con la cepa Δ Ta_{ipt}.

Podemos decir que aquí si se ve un mayor crecimiento en la parte aérea de la planta en una de nuestras mutantes con respecto a nuestras otras dos cepas con interacción, se vio como al parecer en los primeros 3 días la cepa Δ Ta_{ipt} no provocaba un crecimiento mayor, pero a partir del día 3 al 5 que era el último que se tomaba como referencia para la medición de nuestros experimentos su crecimiento era mayor al observado en las otras dos interacciones. Con respecto a la otra mutación Δ Ta_{log} se ve como los primeros 3 días las plantas tenían un mayor crecimiento al interactuar con esta cepa que con. Sin embargo a partir del día 3 al 5 este disminuye o simplemente ya no aumenta.

Los resultados de amplificación de los genes seleccionados para monitorear gradientes de temperatura, usando los diferentes oligonucleótidos disponibles en el laboratorio, donde cada uno tiene una concentración de DNA y paso por un proceso de PCR para después amplificar sus pares de bases y probar la temperatura óptima para cada uno de ellos.

VI. CONCLUSIONES

Mediante la realización de este experimento y su experimento piloto podemos concluir que aun con la falta de dos genes importantes en la citosina las mutantes siguen teniendo

un efecto positivo en las plantas no mayor que la cepa silvestre, pero si lo suficiente como para ser considerable a estudios futuros.

Obteniendo un indicio de que estos genes sirven para un mayor desarrollo de crecimiento aéreo en las plantas haciéndolas tener una mayor cantidad de hojas en menor tiempo.

La diferencia mostrada en las plantas co-cultivadas con mutantes y con la cepa silvestre se puede deber a que al aislar estos genes en la cepa de hongo este disminuya su producción de citocinina haciendo que no cumpla los suficientes requerimientos nutricionales para su completa formación.

VII. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Principalmente quiero agradecer al comité organizador del Verano de la Ciencia 2019 por permitirme formar parte del grupo de estudiantes seleccionados para realizar su estancia de estudio.

Al Dr. Alfredo H. Herrera Estrella por abrirme las puertas de su laboratorio y asignarme un tema de estudio para este verano permitiéndome ampliar mi conocimiento científico.

A mi asesora estudiante de doctorado y MC. María Daniela Porras Troncoso por su disposición y su tiempo para enseñarme a realizar cada uno de los procesos a desarrollar y por dejarme formar parte de su trabajo en esta investigación.

A mi familia principalmente a mi mamá por la confianza y el apoyo que me brindaron en este mes de estancia y a César por ayudarme de una gran manera a cumplir este sueño brindándome toda la ayuda posible.

REFERENCIAS

- Pérez, Alejandro A. (2015). Performance de *Trichoderma atroviride* como biocontrolador de enfermedades fúngicas y estimulador del crecimiento vegetal, en el cultivo de garbanzo. Repositorio Digital UNC. 4-11 pag.
- Revisa el funcionamiento de auxinas, giberelinas y citosinas. 29/agosto/2017. Agricultores Red de especialistas en agricultura. <https://agricultores.com/revisa-el-funcionamiento-de-auxinas-giberelinas-y-citocininas/>
- <https://www.eluniversal.com.mx/articulo/cartera/economia/2015/12/9/crecimiento-poblacional-se-mantiene-en-14-anual>
- Guzmán-Guzmán., Porras-Troncoso., Olmedo-monfil., Herrera-Estrella. (2019). *Trichoderma* Species: Versatile Plant Symbionts. *Phytopathology*. 109:6-16 • 1-11pag.
- Alarcón A. Cerrato R. y Cabriales J. (2009) EL GÉNERO FÚNGICO *Trichoderma* Y SU RELACIÓN CON CONTAMINANTES ORGÁNICOS E INORGÁNICOS. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 25 (4) 257-269 pag.
- Cerezo J. Citoquininas Ingeniería agrónoma grado en hortofruticultura y jardinería Fisiología Vegetal Ingeniería agrónoma grado en hortofruticultura y Fisiología Vegetal. Tema XI
- Contreras-Cornejo H. A., Macías-Rodríguez L., Beltrán-Peña E., Herrera-Estrella A., López-Bucio J. (2011). *Trichoderma*-induced plant immunity likely involves both hormonal-and camalexin-dependent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Signaling & Behavior* 6:101554-1563.

Salas-Marina M. A., Silva-Flores M. A., Uresti-Rivera E. E., Castro-Longoria E., Herrera- Estrella A., Casas-Flores S. (2011). Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *Eur J Plant Pathol* 131, 15-26.

Estudio de la regeneración de resinas *in situ* en una celda de electrodeionización

Claudia Zúñiga Chacón

Instituto Tecnológico Superior de Abasolo
Blvd. Cuitzeo de los Naranjos #401 Col. Cuitzeo
de los Naranjos, C.P. 36976
Abasolo, Gto.
claudiazunigachacon@gmail.com

Asesora:

Lucía Guadalupe Alvarado Montalvo

Universidad de Guanajuato
Ex. Hda. San Matías s/n
Frac. San Javier, C.P. 36020
Guanajuato, Gto.
lucia.alvarado@ugto.mx

Resumen — El objetivo de la presente investigación es realizar un estudio sobre la regeneración de resinas de intercambio iónico en una celda de electrodeionización, realizando experimentos de remoción de cromo hexavalente a diferente pH, para, posteriormente analizar las soluciones obtenidas y el comportamiento del experimento. La técnica utilizada fue la de electrodeionización, es decir, una combinación entre la técnica de electrodiálisis e intercambio iónico. De acuerdo a los resultados obtenidos se pudo observar evidencia de regeneración *in situ* de las resinas de intercambio iónico.

Palabras clave — Electrodeionización. Electrodiálisis, Intercambio iónico.

Abstract — The aim of this investigation is to carry out a study about of regeneration of ion exchange resins in an electrodeionization cell, performing experiments about hexavalente chromium removal at different pH, to, subsequently to analyze the solutions obtained and the experimental behavior. The technique used was electrodeionization, which is, a combination of electro dialysis technique and ion exchange. According the results obtained, it was observed evidence of *in situ* regeneration of the ion exchange resins.

Keywords — Electrodeionization, Electro dialysis, Ion exchange.

I. INTRODUCCIÓN

La electrodiálisis es un proceso de separación electroquímico, el cual ofrece ventajas frente a otros métodos, gracias a la selectividad, baja demanda de reactivos y recuperación de agua. Este procedimiento consiste en una celda electroquímica que contiene membranas de intercambio iónico formando compartimientos entre un par de electrodos que se encargan de generar una diferencia de potencial y provocar el movimiento de los iones; de esta manera se generan compartimientos diluidos y concentrados. El intercambio iónico por su parte es un proceso en el que generalmente se utilizan resinas sintéticas como intercambiadores de iones, que después de un lapso de tiempo de uso se saturan y pierden su capacidad de intercambio.

La electrodeionización (EDI) es una tecnología híbrida, ya que combina la técnica de electrodiálisis e intercambio iónico, y que se utiliza para el tratamiento de efluentes de baja concentración. Es básicamente una celda de electrodiálisis en que se introduce un material de intercambio iónico (resina) en los compartimientos del diluido, lo que permite obtener un medio conductor debido a la presencia de grupos funcionales del material de intercambio actuando como puente iónico entre las membranas de intercambio, permitiendo llegar a concentración más baja en el diluido. Sin embargo, su funcionalidad depende en gran medida de la capacidad de regeneración de la resina durante el proceso. Se sabe que las resinas pueden recuperar/regenerar la capacidad para seguir intercambiando iones usando sustancias químicas como ácidos o bases, sin embargo, en la EDI esto puede lograrse

mediante la generación de iones oxhidrilos y protones en la celda; de esta manera la EDI elimina la necesidad de tener etapas de regeneración y uso de reactivos químicos, como sería en una columna de intercambio iónico convencional. En el año 2004, Meng et al. [1], realizaron un estudio sobre la regeneración de resinas en un sistema de EDI y propusieron la existencia de cuatro formas de contacto entre el material de intercambio iónico donde se lleva a cabo la regeneración *in situ* de las resinas. No obstante, en ocasiones no se logra llegar al punto de regeneración óptimo en la EDI.

II. MARCO TEÓRICO

A. Electrodeionización

La electrodeionización (EDI) es un proceso que se basa en la producción de agua de alta pureza, el cual consiste en utilizar un lecho de resinas de intercambio iónico en el compartimento diluido de una celda de electrodiálisis (Fig.1). Este proceso surge como una combinación de la técnica de electrodiálisis y la de intercambio iónico, [2]. La combinación de ambas tecnologías permite llegar a concentraciones más baja y electro-regenerar a las resinas durante el proceso.

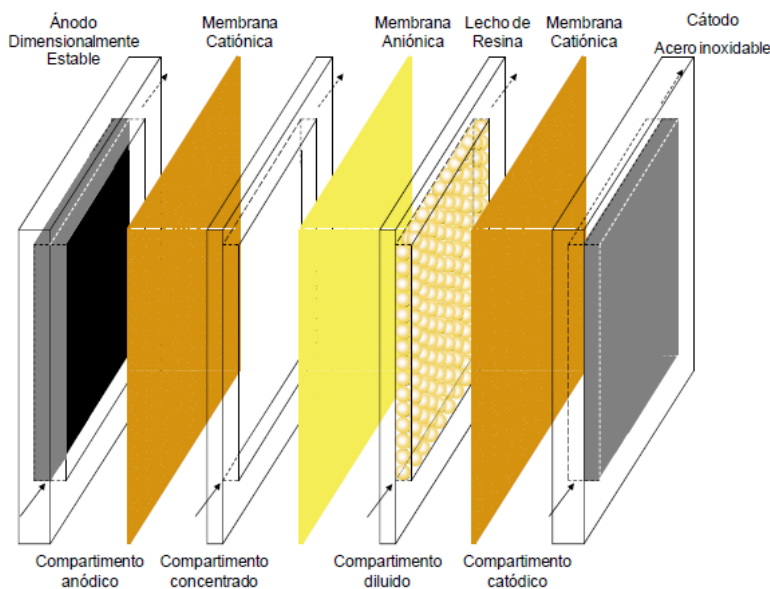


Fig. 1 Esquema de una celda de EDI [1].

B. Regeneración de resinas

Durante la electrodeionización se genera el movimiento de los iones del diluido hacia el concentrado a través de ruta sólido-líquido, líquido-líquido y sólido-sólido. La resina en el diluido actúa como un medio conductor que permite que el intercambio se dé a una mayor velocidad, debido a la alta concentración de los iones en el sólido [1].

La regeneración de la resina ocurre cuando debido a la generación de la diferencia de potencial se rompen las moléculas de agua y se producen iones H^+ y OH^- que serán intercambiados por la resina, es decir, estos iones continuamente provocan la regeneración

de la resina y evita el uso de ácidos o bases, [3]. Existen 3 posibilidades para que la regeneración tenga lugar (Fig. 2):

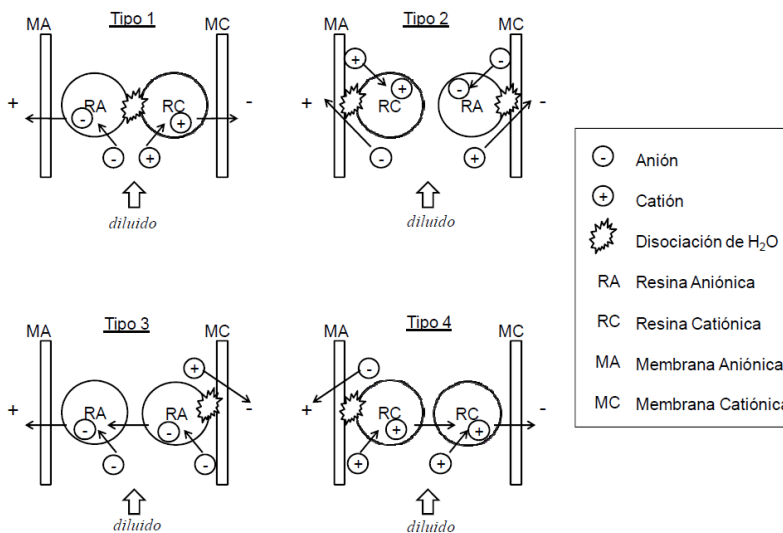


Fig. 2 Tipos de regeneración, imagen tomada de [1] en referencia a Meng et al. 2004

C. *Electrodiálisis*

Este proceso se basa en la separación de iones a través de una celda (Fig. 3) en la que se utilizan membranas de intercambio iónico (aniónicas y catiónicas) de manera intercalada para generar canales de flujo entre un par de electrodos, los cuales se encargan de generar una diferencia de potencial, provocando entonces un movimiento de los iones por migración. Las membranas aniónicas permiten el paso a los aniones y las membranas catiónicas a los cationes; de esta manera, algunos de los compartimientos de la celda se quedarán sin iones (diluido) mientras otros adquirirán una mayor cantidad de iones (concentrado) [4]. Lo anterior marca un punto en el cual se genera una mayor resistencia en la celda y la eficiencia decae.

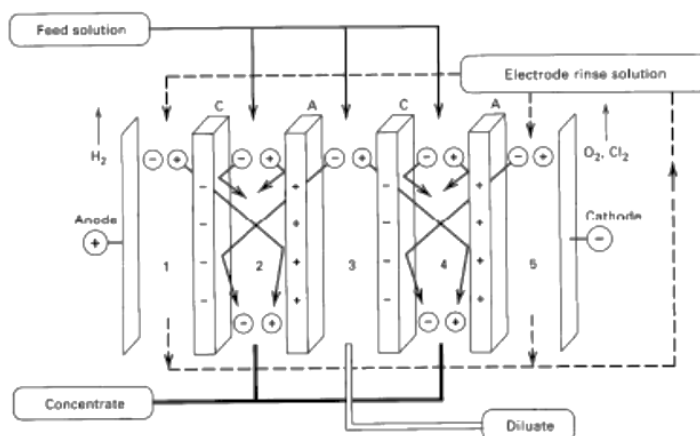


Fig. 3 Esquema de una celda de electrodiálisis [5].

D. Intercambio iónico

En este proceso generalmente se usan resinas sintéticas como intercambiadores iónicos, las cuales contienen iones con carga ya sea positiva o negativa, que al entrar en contacto con una solución acuosa, procederá a intercambiar iones como resultado de la diferencia de potencial químico establecido entre sólido-solución, existiendo así un mecanismo de transporte de masa por difusión. Después de que la resina ha sido utilizada, deberá existir una etapa de elución en donde éstas entren en contacto con sustancias químicas (ácidos y bases) que lo permitan un nuevo intercambio, liberando a la especie intercambiada previamente, usualmente se utilizan ácidos o bases [4].

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Preparación de soluciones

Todos los experimentos fueron realizados a 25°C usando soluciones de Cr (VI) a 100 ppm, preparada a partir de $K_2Cr_2O_7$ y agua desionizada (18M Ω), a dos diferentes pH (pH natural que fue de 4.9 y a pH 2). La solución de pH 2, se ajustó con HCl. Las concentraciones se determinaron mediante Espectroscopía de Absorción Atómica en un aparato Perkin Elmer 3100.

B. Experimentos de Electrodeionización

En estos experimentos se realizó rellenando el compartimiento del diluido con resina mixta (aniónica y catiónica). La resina fue previamente saturada con una solución de cromo hexavalente. La celda fue conectada a una fuente de poder a 25 V para promover el movimiento de los iones y la regeneración. La solución fue alimentada mediante una bomba peristáltica a 10 mL/min, durante el experimento fueron tomadas 7 muestras del diluido y del concentrado, a los 10, 20, 40, 60, 90, 120 y 180 minutos. A dichas muestras se les midió la concentración, conductividad y el pH.

IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A. Electrodeionización a pH 2

La resina que fue colocada en el compartimiento del diluido fue previamente saturada; pese a ello, al aplicar la diferencia de potencial se puede observar cómo la concentración de cromo en el diluido va disminuyendo (Fig. 4 a), manteniendo la misma velocidad de remoción durante los primeros 20 minutos, para después disminuir la velocidad de remoción entre 20 y 120 min. Como puede observarse en la Fig. 4 b) en el primer periodo mencionado hay un decaimiento de la velocidad del transporte de carga (I), para de inmediato aumentar drásticamente, dicho punto puede deberse a la regeneración del lecho, pues la alta transferencia de carga significa un aumento en la cantidad de iones disponibles para el transporte. Cuando la concentración disminuye o aumenta, la conductividad también, como se puede observar en las gráficas (Fig. 4 a y 5 b), ya que esta es un reflejo de la concentración de iones en solución. Por otro lado, el pH en el diluido cada vez es más alta, debido a que los H^+ agregados a la solución se mueven hacia la solución electrolítica, mientras que en el concentrado el pH aumenta solo ligeramente como resultado de la concentración de las especies.

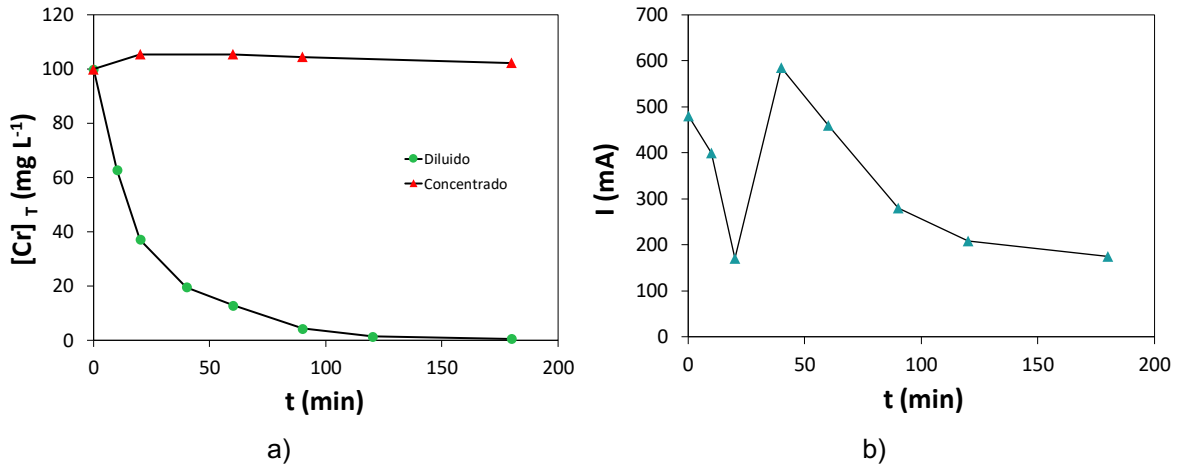


Fig. 4 a) Cambios de la $[Cr]$ vs t , b) Intensidad de corriente vs t .

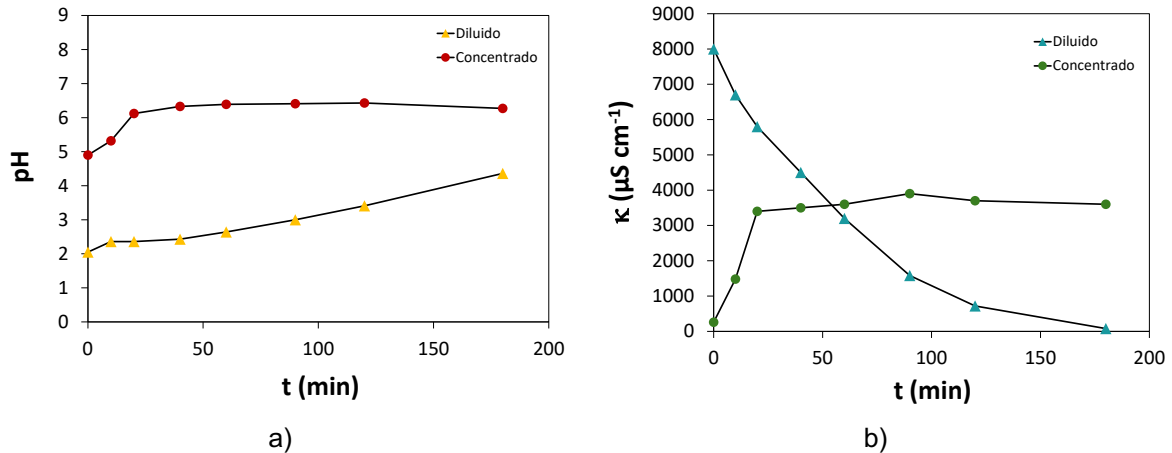


Fig. 5 a) Variaciones de pH durante la EDI vs t , b) Conductividad vs t .

B. Electrodeionización a pH 5

En este experimento, Fig. 6 a) se puede observar que en el diluido mantiene una primera velocidad de remoción en los primeros 20 minutos, seguido por los siguientes 40 minutos a una velocidad menor, y para terminar con un periodo de 30 minutos donde se logra remover todo el cromo presente. En la Fig. 6 b) se muestra el aumento drástico de la corriente desde los 10 minutos, ello se debe a que la regeneración del lecho sucede antes al no tener suficientes iones para mantener la conductividad de la solución, lo cual se puede corroborar por la Fig. 7 a) y b), donde se observa, por un lado un aumento en el pH, lo que necesariamente implica un aumento en la concentración de oxidrilos, cuyo único origen es la descomposición de agua. En el caso de la conductividad esta aumenta rápidamente en el concentrado por la mayor presencia de iones tanto de cromo como los que provienen de la descomposición del agua.

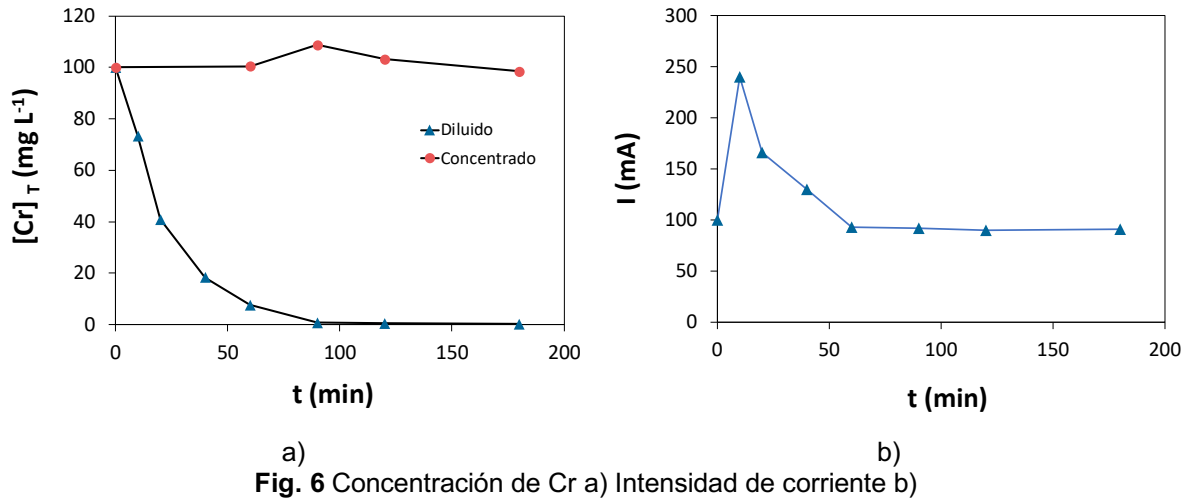


Fig. 6 Concentración de Cr a) Intensidad de corriente b)

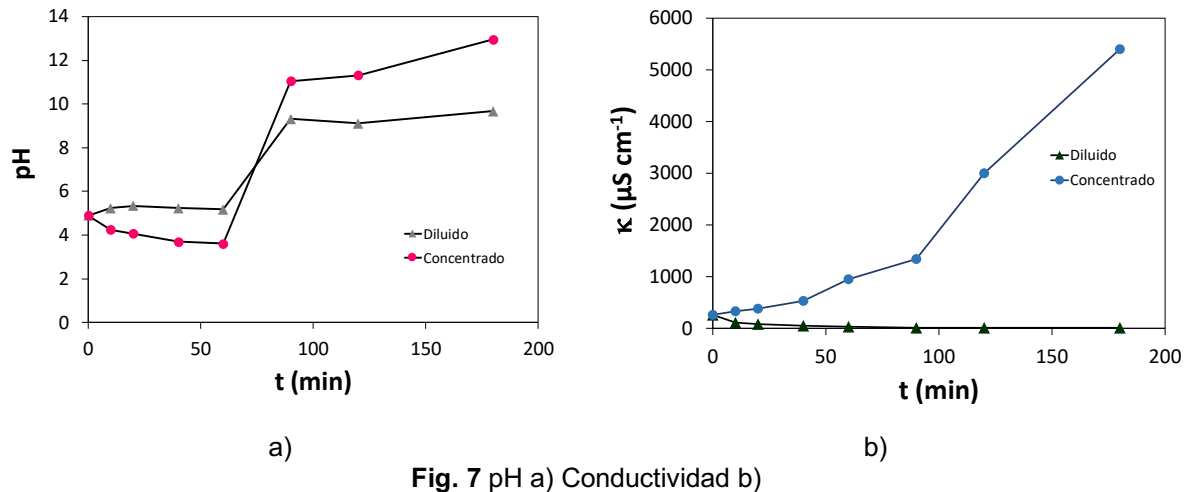


Fig. 7 pH a) Conductividad b)

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El lecho de resina utilizado se encontraba previamente saturado de cromo, pero al haber disminución en la concentración, se puede constatar que efectivamente, la resina puede regenerarse. Los cambios de pH más marcados en los experimentos de un pH 5 indican que la descomposición del agua fue llevada a cabo. Lo anterior fue fundamental para alcanzar una mayor remoción de cromo en este sistema en menor tiempo. Los resultados a distinto pH nos indican que se ve más favorecida la regeneración al bajar la conductividad del sistema, es decir, no es necesario aumentar su conductividad, de hecho, ello retrasa la regeneración. Estos experimentos se llevaron a cabo a potencial constante, se puede explorar la posibilidad de mantener constante la intensidad de corriente para tener mayor control respecto al tiempo del proceso.

VI. AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Departamento de Ingeniería en Minas, Metalurgia y Geología, División de Ingenierías, Universidad de Guanajuato, campus Guanajuato por permitirme hacer uso de sus instalaciones para realizar el desarrollo del proyecto, gracias al técnico académico Juan

Carlos Martínez Barrón por su apoyo en la determinación de concentración por Absorción Atómica, gracias al Instituto Tecnológico Superior de Abasolo por el apoyo económico otorgado. Este agradecimiento es para la Doctora Lucía Guadalupe Alvarado Montalvo por su apoyo, paciencia, consejos, pero sobre todo las correcciones que me ayudarán para mejorar académicamente.

REFERENCIAS

- [1] Alvarado Montalvo, L. G. (2014). *Mecanismo de Electrodeionización aplicado a la remoción de Cr(VI)*, Publicia, ISBN: 978-3-639-55148-8.
- [2] Sanz, J., Guerrero, L., & Roca, M. (n.d.). *Producción de Agua de Alta Pureza: Electrodesionización en Continuo (CEDI)*.
- [3] García Castillo, F. J., Renau Gimeno, E., Duque Hebrero, R., Moliner Fas, F., & Peñalver Sobrinos, J. (n.d.). *Plantas de tratamiento de agua para producción de agua desmineralizada en usos industriales*.
- [4] López García, U. M. (2005). “ *APLICACIÓN DE LA ELECTRODIÁLISIS A LA ELIMINACIÓN DE NITRATO EN AGUA* ” (Tesis de maestría) Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica.
- [5] Hareh Sadhwani, S. (2009). *Diseño de una planta de electrodiálisis*.

Estudio de las especies moleculares presentes en el disco L1551 IRS 5

Citlalli Gabriela Vidales Hernández

Universidad Autónoma de Zacatecas

Unidad Académica de Física.

Solidaridad sn, Hidráulica, 98068

Zacatecas, Zac.

gabriela_vh@hotmail.com

Asesor: Miguel Ángel Trinidad Hernández

Universidad de Guanajuato

Departamento de Astronomía

Callejón de Jalisco sn, Colonia Valenciana,

36240, Guanajuato Gto.

trinidad@astro.ugto.mx

Resumen — Durante mucho tiempo ha sido de interés general entre los astrónomos describir el mecanismo de formación estelar, una vez que se establece que se forman a partir de discos circunestelares resulta importante describir la composición química de los mismos. A través de los espectros de emisión molecular se puede trazar su evolución física y con ello determinar su estructura química. Aquí se presenta un estudio de las especies moleculares presentes en el sistema binario L1551 IRS 5 resultando en un diagrama de la posición de los anillos de algunas moléculas importantes.

Palabras clave — Formación estelar, Espectros de emisión, especies moleculares.

Abstract — For a long time it has been a common interest in the astronomical community the description of Stellar formation mechanism, once it is established that the stars were formed by the circumstellar disks is important to describe their chemical composition. Cause it is possible to trace their physical evolution and their chemical structure base on their molecular emission spectra. Here we present a study of the molecular species present in the binary system L1551 IRS 5 that will result in a diagram of the rings position of some important molecules.

Keywords — Stellar formation, emission spectra, molecular species.

I. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo tiene por objeto el estudio de las moléculas en el espacio, en particular en el disco circunestelar alrededor de la estrella L1551 IRS5, puesto que resulta esencial para obtener información sobre la estructura química y física durante la formación estelar. Sobre este tema se han realizado ya algunas investigaciones y han demostrado que las nubes presentan una gran variedad de moléculas y que además la complejidad química del medio interestelar aumenta proporcionalmente con el proceso de formación estelar.

II. MARCO TEÓRICO

A. Astroquímica y Discos Protoplanetarios

Las estrellas se forman dentro de las nubes de gas o moleculares, y en su proceso de formación se crean discos de acreción alrededor del núcleo y se eyecta materia en forma de flujos bipolares (J. Pintado, 2008). Dentro de los discos se forman grandes conglomerados de material rocoso en su parte interna y hielo, gas y polvo en la externa.

Con la formación de la primera generación de estrellas se generaron los elementos relevantes para la vida y con su muerte se formaron los primeros granos de polvo, que están compuestos de carbono y silicio y son importantes como catalizadores de las reacciones, además fungen como vehículo desde las regiones más frías a las más cálidas (Natalia R. Sermanovich, 2012). Para poder ser detectadas por los radiotelescopios las moléculas deben formarse en la superficie del polvo y deben pasar a su fase gaseosa. En las regiones de formación estelar la fuerza de gravedad está superando la resistencia producida por la presión del gas lo que produce un colapso, en donde la química no está en estado estable, y puede ser usada para trazar la evolución del mismo (D.A. Williams, T.W. Hartquist, 2015). Toda la información que tenemos del universo viene de observaciones pasivas porque los datos de los telescopios llegan en forma de señales en varias partes del espectro electromagnético y deben ser interpretadas para establecer la composición atómica y molecular de estas regiones. Las observaciones consisten en líneas espectrales de las distintas especies moleculares. La identificación de moléculas en el espacio solo se puede hacer al identificar líneas espectrales y compararlas con las obtenidas en la Tierra para una determinada molécula. Así se han detectado más de 165 especies moleculares. Siendo el CO el mejor trazador de nubes moleculares por su espectro en longitudes de onda milimétricas.

Los discos protoplanetarios que rodean las estrellas jóvenes se pueden describir como sistemas giratorios de gas y polvo que transportan una cantidad neta de masa al centro de la estrella y de momento angular hacia fuera y constituyen el lugar de nacimiento de los sistemas planetarios (T. Henning, D. Semenov, 2013). En el interior denso del disco las condiciones son favorables para una rápida aglomeración de los pequeños granos de polvo y la química se aproxima al cuasiequilibrio, las reacciones neutro-neutro son dominantes. En el exterior se ha podido encontrar la presencia de hielos moleculares, la radiación UV estelar y la radiación interestelar ioniza y disocia las moléculas y da origen a la química ión-molécula (D. Semenov, 2010). El estudio de los discos protoplanetario se hace a través de los espectros electromagnéticos que recibimos de ellos. Dichos espectros poseen información única sobre la cinemática y la geometría del disco, la temperatura, la densidad y las intensidades de radiación. Para extraer información completa de los espectros interferométricos de una molécula genérica tenemos que emplear un modelo de transporte de radiación de línea para ajustar los datos de manera iterativa. La espectroscopía Raman y la de masa son usadas para identificar las especies químicas individuales pero la detección de las líneas de emisión molecular requiere de una resolución espectral alta.

L1551 IRS5 es una envoltura protoestelar que rodea un sistema binario. Se encuentra en la región de formación estelar de la constelación de Tauro a una distancia $d = 450$ años luz. Tiene una estructura alargada de gas denso similar a la observada en B335. Al ser un sistema binario formado las protoestrellas se encuentran separadas por 45 UA, cada una de ellas está rodeada por un disco circunestelar de radio ~ 10 UA; ambos discos están rodeados por un disco circumbinario mucho más grande, que todavía está rodeado por una envoltura densa y grande de radio ~ 8000 AU. (M. Osorio, et al. 2004). Las observaciones interferométricas de L1551 IRS 5 muestran que, en longitudes de onda milimétricas, hay dos componentes distintos en la fuente, una envolvente con un radio \geq

2000 UA y un núcleo compacto con un radio ≤ 64 UA (J. Keene, C. R. Masson, 2017). Ambas estrellas están rodeadas por un disco de polvo y gas que podría estar formando planetesimales. Existen fuertes indicios de que la más grande de la pareja va a ser como el sol cuando envejezca, mientras que la más pequeña será una enana roja, y en este momento están ingresando fase T-Tauri. (Fridlund, 2002). Por lo tanto, L1551 IRS 5 es un caso especial para estudiar las fases iniciales de la formación estelar. Puesto que podría proporcionar muchos detalles sobre cómo se forman las estrellas e incluso los planetas.

III. MATERIALES Y MÉTODO

El objetivo principal al estudiar los discos protoplanetarios es describir las moléculas que contienen, en que región del disco se encuentran y cual es su concentración en esas regiones; puesto que éstas moléculas nos servirán como trazadores de la dinámica de los discos. Como en toda investigación, partimos sobre la base de los estudios ya realizados en el tema, buscando en primer lugar entender el mecanismo de formación de las nubes interestelares y el cómo para formar estrellas a partir de las nubes se consolidan los discos protoplanetarios y los flujos bipolares. Posteriormente leímos sobre la estructura física y química, junto con los mecanismos de formación de moléculas dentro de los discos. Y se recopilieron los datos de las moléculas presentes en los discos dentro de una tabla, organizada de acuerdo con su clasificación química en inorgánicas, orgánicas, iones o deuteradas; y de forma vertical de las más simples a las más complejas. Finalmente haciendo uso del software CASA (Common Astronomy Software Applications) de NRAO (National Radio Astronomy Observatory) para procesar los datos interferométricos se obtuvieron los mapas correspondientes a los espectros de emisión de las moléculas presentes en el disco L1551 IRS5.

IV. RESULTADOS

Tabla 1: Lista de Moléculas que se han encontrado en el disco protoplanetario

Inorgánicas	Orgánicas	Basadas en deuterio	Iones
H ₂ - Hidrógeno diatómico	CH ₄ -Metano	HD- Hidrógeno deuterado	H ₂ ⁺ - Ión hidrógeno diatómico
He- Helio	C ₂ H-Radical etilo	HDO-Agua deuterada	H ₃ ⁺ - Ión hidrógeno triatómico
O ₂ - Oxígeno diatómico	C ₂ H ₂ - Acetileno	DCN- Cianuro de hidrógeno deuterado	C ⁺ - Ión de carbono
N ₂ - Nitrogeno diatómico	HC ₃ N-Cianoacetileno	DNC- Isocianuro de hidrogeno deuterado	He ⁺ - Ión helio
OH- Hidroxilo	H ₂ CO- Formaldehido	DCO-Radical formilo	CH ₄ ⁺ Ión metano
CO- Óxido de carbono	C ₂ H-Metileno	HDCO- Formaldehído deuterado I	HCO ⁺ - Cation de formilo
CN- Cianuro	C ₃ H ₂ - Propinil aldehído	D ₂ CO- Formaldehído deuterado II	H ₃ O ⁺ - Ión hidronio
NO- Óxido de nítrico	CH ₃ -OH-Metanol	CH ₂ DOH- Metanol deuterado I	N ₂ H ⁺ - Ión hidrazina
FeS- Sulfuro de hierro	C ₂ H ₃ OH- Etanol	CHD ₂ OH- Metanol deuterado II	H ₁₃ CO ⁺ -

21º Verano de la Ciencia de la Región Centro. Junio-agosto 2019

FeO- Óxido de hierro	CH ₃ -O-CH ₃ - Dimetil eter	CD ₃ OH- Metanol deuterado III
NaCl- Cloruro de sodio	CH ₂ -CO- Ketina	NH ₂ D- Amoniaco deuterado.
H ₂ O- Agua	HCO-OH- Ácido fórmico	
CO ₂ - Dióxido de carbono	HNCO- Ácido isocianóico	
N ₂ H- Hidrazina	HCnN- Cianopolienos (fórmula general)	

Tabla 1: Muestra el contenido molecular dentro del disco estudiado

Tabla 2: Posiciones de las moléculas importantes

Molécula	Distancia al centro del disco (Dc)	Distancia molécula (Dmol)	Declinación original (DEC)	Ángulo de desviación $\Theta = \text{Sen}^{-1} (D_{\text{mol}}/D_{\text{c}})$	Nueva declinación DEC _n = DEC - Θ
Agua disco Superior (H ₂ O)		10 UA	+018.08.04.9 9388 +/- 0.00261	0.0700 arcsec	18.08.04.92388
Agua disco Inferior (H ₂ O)			+018.08.04.6 8161 +/- 0.00531		18.08.04.61161
Formaldehído (H ₂ CO)	137.96 pc	100 UA		0.6710 arcsec	18.08.04.16674
Metanol (CH ₃ OH)	En años luz:	150 UA		1.0066 arcsec	18.08.03.83114
Clorobenzilideno (CS)		200 UA		1.3422 arcsec	18.08.03.49554
Ión de Formilo (HCO ⁺)	450 Ly	250 UA	+018.08.04.8 3774 +/- 0.00396	1.6777 arcsec	18.08.03.16004
Ión hidrazina (N ₂ H ⁺)	En Unidades Astrnómicas:	400 UA	arcsec	2.6844 arcsec	18.08.02.15334
Etileno (CCH)		500 UA		3.3553 arcsec	18.08.01.48244
Óxido de Carbono (CO)	28,458,484. 65 UA	300 - 1,000 UA		2.0133 - 6.7110 arcsec	18.08.02.82444 - 18.07.08.126

Tabla 2: Datos utilizados para calcular la posición de las moléculas en la imagen.

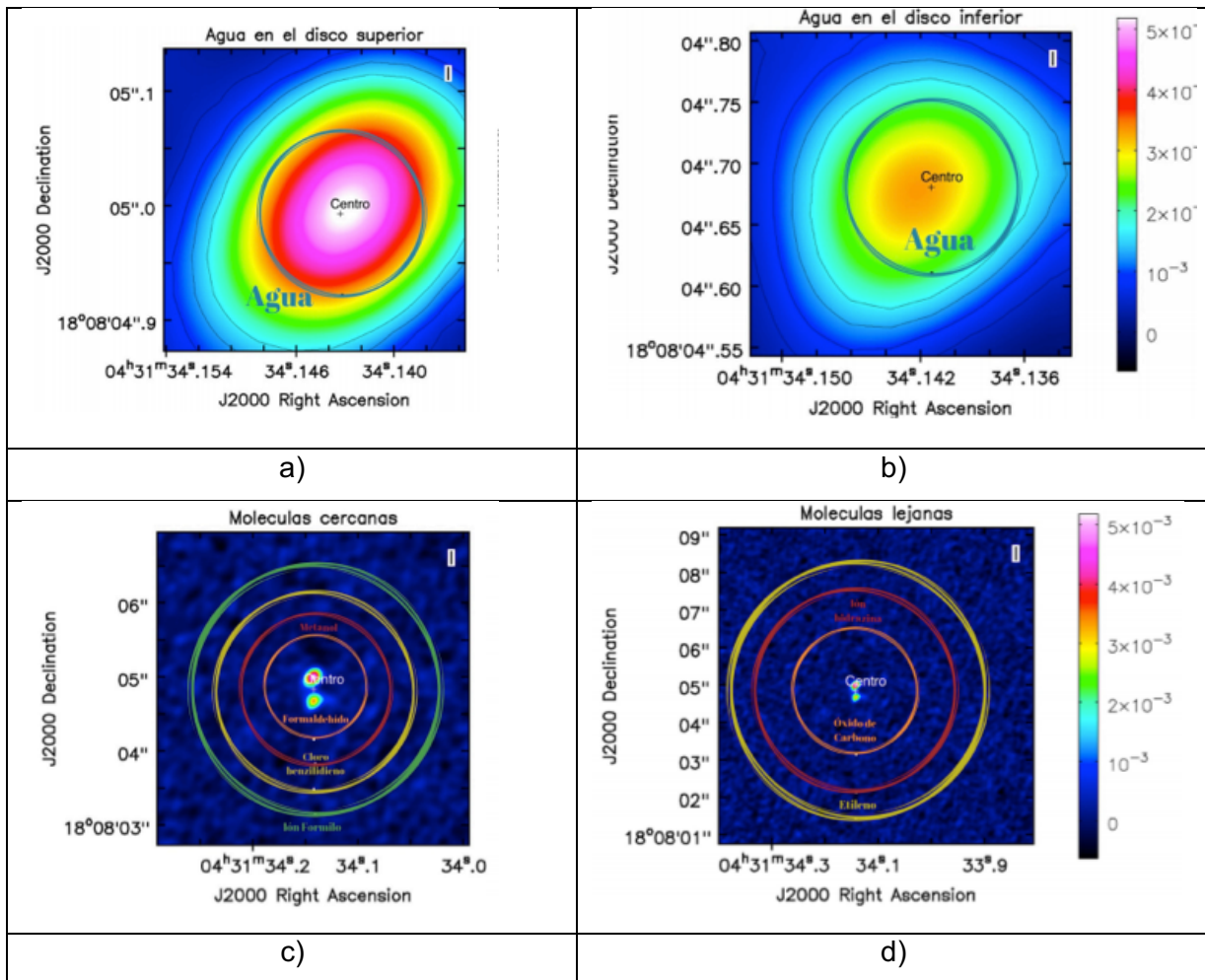


Fig. 1. a), b) Discos de agua, c) Moléculas cercanas, d) Moléculas Lejanas

V. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La tabla 1 muestra las moléculas que pueden ser encontradas dentro de los discos circunestelares, se organizaron de acuerdo con su clasificación química en inorgánicas, orgánicas, deuteradas y iones ; y hacia abajo se listaron en función del número de átomos, de las más pequeñas a las más grandes con el objetivo de clarificar la abundancia de moléculas en el disco. La tabla 2 agrupa los datos calculados para obtener la posición de los anillos moleculares en el sistema binario. Las declinaciones fueron obtenidas en el programa de análisis de datos astronómicos CASA con la tarea imfit. El ángulo de desviación se obtuvo al transformar la distancia (del centro a la molécula) al el ángulo correspondiente en segundos de arco. La resta se realiza para obtener la posición del disco en la imagen. La figura 2 es una representación del sistema binario analizado. El anillo correspondiente al Agua se muestra en la parte a) para la estrella norte y b) para la estrella sur, y por ser el de radio más pequeño fue el único que se pudo ubicar en esa escala. Por otro lado las siguientes moléculas en la tabla 2 se muestran en las partes c) corresponde las 4 moléculas más cercanas al centro (Formaldehído, Metanol , CS e Ión

formilo), y finalmente la parte d) corresponde a las 4 moléculas más alejadas al centro (CO, Ión hidrazina y Etileno).

VI. CONCLUSIONES

La síntesis de moléculas en el espacio es un hecho en si mismo sorprendente, puesto que las condiciones para su formación son muy específicas, pero su estudio es particularmente importante porque son ellas las que modelan la formación estelar. A lo largo de este trabajo se da una breve idea de la composición molecular del sistema binario L1551 IRS 5, obteniendo un total de 60 moléculas presentes, 8 de las cuales pudieron ser ubicadas en el mapa de visualización del disco. Ahora tenemos una idea general de la estructura química del disco y a partir de aquí podremos entonces determinar la evolución física del mismo y con ello el mecanismo de formación del sistema.

VII. RECONOCIMIENTOS

Quiero agradecer a la 21 edición del Verano de la Ciencia Región Centro por permitirme disfrutar de ésta experiencia. Asimismo a la Universidad de Guanajuato (UG) por recibirme y a la Universidad Autónoma de Zacatecas (UAZ) por ofrecerme las bases que me permitieron entender el tema tratado.

REFERENCIAS

- [1] Robert Estallela, Guillem Anglada. "Introducción a la física del medio interestelar". Departamento de astronomía y meteorología. Universidad de Barcelona, (2008).
- [2] Belén Tercero Martínez. "Condiciones físicas y químicas del gas alrededor de estrellas jóvenes masivas", tesis doctoral. Departamento de Astrofísica y CC. De la atmósfera, Universidad Computense de Madrid.
- [3] Jesús Martín Pintado. "La química del universo y el origen de la vida". Información y Actualidad Astronómica, 25, 2008.
- [4] David A. Williams, Thomas W. Hartquist. "The Chemistry of Star formation". Department of Physics, University of Leeds, UK Accounts of Chemical Research, Vol.32, pp.334-341, (1999).
- [5] D. J Castillo Pazos. "Astroquímica: Desarrollo y Aplicaciones". Ensayo, noviembre de (2012).

Estudio de reactividad de derivados de piridinas para generar moléculas con propiedades de óptica no lineal

Lucero Alejandra Vela López

Universidad de Guanajuato
Col. Noria Alta S/N
C.P. 36050, Guanajuato, Gto.
Lucero_Vela97@hotmail.com

Asesor: Miguel Ángel Vázquez Guevara

Universidad de Guanajuato
Col. Noria Alta S/N
C.P. 36050, Guanajuato, Gto.
mvazquez@ugto.mx

Resumen — En este trabajo se describe la síntesis de una cloropiridina y su funcionalización utilizando el 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-eno (DBU) con el objetivo de generar un producto que puede ser utilizado como un intercalante de ADN. El diseño del producto tiene como objetivo ser estudiado en óptica, ya que puede presentar propiedades de óptica no lineal, así mismo, también puede mostrar una acción similar a la molécula SYBR-GREEN por su fluorescencia y uso como marcador celular. El avance de la reacción fue monitoreo por medio de TLC y se comprobó su transformación por medio de una resonancia magnética nuclear de H1.

Palabras clave — Cloropiridina, DBU, Intercalante de DNA, SYBR-GREEN.

Abstract — Here, we report the reactivity studies of chloropyridine derivatives with the 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-ene (DBU). The proposed product can be used as a DNA intercalator due its structural similarity to SYBR-GREEN molecule. The latter shows fluorescence activity, so it is expected that the products obtained here in future studies they can be used in the area of molecular biology, as well as, optical area. The synthesized compound was monitored by means of TLC and its transformation was verified by means of a nuclear magnetic resonance of H1.

Keywords — Chloropyridine, DBU, DNA intercalator, SYBR-GREEN.

I. INTRODUCCIÓN

En la década de 1980, los materiales orgánicos se revelaron como materiales viables en la obtención de respuestas no lineales, siendo además fáciles de procesar e integrar en dispositivos ópticos, otra razón por la cual se han buscado estos materiales es debido a su inigualable posibilidad de diseño, pues esto ofrece establecer relaciones estructura-actividad que permiten un mejor conocimiento y control de estas propiedades ópticas no lineales, [1] lo que ha dado lugar a la síntesis de compuestos orgánicos, los cuales tienen el potencial de combinar la alta no linealidad óptica, flexibilidad química, alta estabilidad térmica y resistencia mecánica comparada a la de los materiales inorgánicos. [2]

Además de algunos compuestos inorgánicos, que fueron los primeros en presentar no linealidad como óxidos minerales y monocristales ferroeléctricos (KH₂PO₄ o el LiNbO₃), [2] los compuestos orgánicos se han posicionado como candidatos ideales para generar nuevas tecnologías eficientes en el campo de la ONL. [3] [4] Aunque los materiales orgánicos se han estudiado en gran medida durante los últimos años debido a su potencial no linealidad, bajo costo y la amplia variedad de estructuras a las que se puede acceder mediante la síntesis orgánica, no cualquier compuesto orgánico es capaz de manifestar propiedades no lineales.

Los compuestos capaces de emitir actividad ONL son compuestos tipo push-pull y deben constar de 3 partes importantes dentro de su estructura [5].

- Fragmento dador. Puede ser un grupo funcional o un núcleo capaz de deslocalizar o donar densidad electrónica
- Fragmento aceptor. Puede ser un grupo funcional o un núcleo capaz de atraer o retener la densidad electrónica presente en el sistema.
- Espaciador. Es un sistema conjugado (sistema de electrones π deslocalizados), ya sea lineal o aromático que separe los fragmentos dador y aceptor lo más posible para generar un dipolo definido.

La óptica no-lineal está tomando un papel muy importante en la tecnología fotónica y optoelectrónica. Se han realizado numerosos estudios en la síntesis y crecimiento de cristales como materiales ópticos no lineales debido a su potencial uso en el campo de la tecnología láser, almacenamiento óptico de datos, entre otros.

II. MARCO TEÓRICO

Se sintetizó un análogo de milrinone-nifedipina reportado previamente que posee un efecto vasorrelajante potente y eficiente que podría usarse para controlar la hipertensión con mayor eficacia, con menos efectos adversos y un impacto neutral en los factores de riesgo cardiovascular conocidos. Las 2-piridonas constituyeron un tipo importante de heterocíclico que ha mostrado variedad de compuestos biológico [6]. La 2-piridona sintetizada se usó como plataforma para obtener la cloropiridina, estructura de gran utilidad en el sector industrial, agrícola y de salud que fue utilizada como materia prima de este trabajo (Figura 1).

Los derivados de la piridina se encuentran ampliamente en la naturaleza en ciertas biomoléculas como los nucleótidos de piridina y alcaloides, punto de gran interés en la biología molecular, los cuales permiten el desarrollo intensivo de tecnologías para la cuantificación de ácidos nucleicos donde refleja su importancia en el diagnóstico y la investigación biomédica. Recientemente, el desarrollo de nuevas técnicas de fluorescencia ha conducido a nuevos formatos de ensayo basados en PCR que simplifican enormemente los protocolos actuales [7]. Algunas moléculas con una base de piridina se pueden insertar entre las bases de una molécula de ADN, interrumpiendo la alineación y el emparejamiento de bases de las cadenas complementarias como el bromuro de etidio, amsacrina, cloroquina y naranja de acridina.

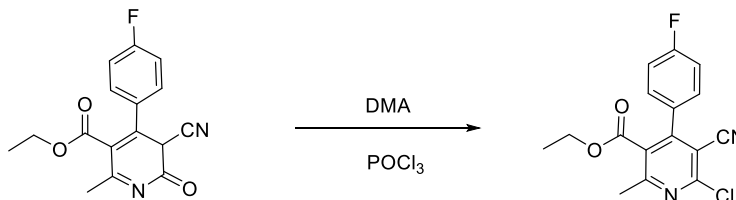


Fig 1. Obtención de la cloropiridina por medio de una 2-piridona.

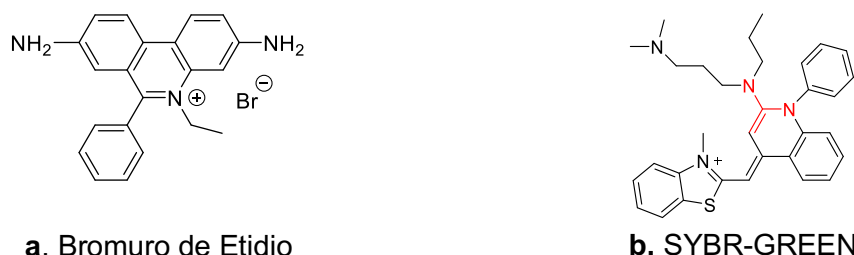


Fig 2a-b. Moléculas intercaladoras de ADN utilizadas en biología molecular.

También hay otras moléculas que no son intercaladoras de ADN entre dos pares de bases sino que se asocia a la molécula de ADN interactuando con la hendidura mayor o menor del ADN, como es el caso de SYBR-GREEN. Esta molécula se introduce en la estructura secundaria de la doble hélice del ADN y se acopla energéticamente a los ácidos nucleicos de éste, de manera que se incrementa notablemente su tasa de emisión fluorescente. En la técnica de electroforesis, el SYBR-GREEN representa una alternativa como tinte al bromuro de etidio (Figura 2-a), ya que es hasta 100 veces más sensible que éste y mucho menos perjudicial para la salud. El SYBR-GREEN (Figura 2-b) se emplea como colorante para la cuantificación de ADN de doble cadena en algunos métodos de PCR cuantitativa o para la visualización del ADN en la electroforesis con geles de agarosa y también se puede utilizar en el etiquetado del ADN dentro de las células para la citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. En este sentido, el proyecto global tiene como objetivo sintetizar moléculas con propiedades de óptica no lineal y fluorescente, así mismo, realizar pruebas de aplicación. En este trabajo de verano de investigación se planteó contribuir en este proyecto realizando un estudio de reactividad entre derivados de cloropiridina y DBU (Figura 4), con el objetivo de encontrar las mejores condiciones de reacción y purificación de productos.

III. METODOLOGÍA

La primera etapa del trabajo consistió en obtener derivados de 4H-piranos que sirvieron como materia prima siguiendo la metodología previamente reportada por el grupo de investigación [8]. Una vez obtenido estas moléculas, estas fueron transformadas a 2-piridonas [6]. Para la generación de las 2-cloropiridinas se añadió a un matraz bola y en presencia de nitrógeno: las 2-cloro piridinas, 4-N,N-Dimetilaminopiridina y luego lentamente el POCl₃, dejándose agitando en reflujo por 7 días comprobando por medio de TLC en un sistema 5:5 el termino de reacción (Tabla 1). Una vez finalizada la reacción, la mezcla de oxiclورو de fosforo se fue adicionando lentamente a una mezcla de Hielo:H₂O bajo constante agitación. Finalizada la adición, la mezcla en agitación se forma un sólido el cual es cuantificado (Figura 3).

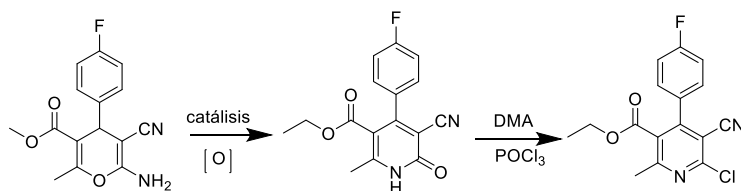


Fig 3. Proceso de reacción para la obtención de la 2-cloropiridina.

Tabla 1. Condiciones de reacción para la obtención de la 2-cloropiridina

2-piridona	DMA	POCl ₃	t	T (°C)	Rend (%)
1 eq	1.82 eq	42.92 eq	7 días	138	91

Tabla 2. Condiciones de reacción del compuesto de transformación.

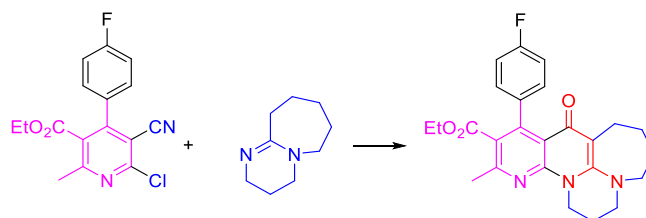
2-cloropiridina	DBU	t	T (°C)	Rend (%)
1 eq	3 eq	1 h	120	50.32%

Para realizar el estudio que tiene como objetivo este verano de investigación (Figura 4), se utiliza la 2-cloropiridina, la cual se coloca en un tubo de presión y se agrega lentamente el 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-eno (DBU), transformándose en una consistencia muy viscosa y de un color morado intenso, no se agregó disolvente. Se colocó el tubo de presión en un baño de arena a 120°C [9] [10] [11] por una hora con un cambio de color a rojo-café (Tabla 2). Una vez obtenido el crudo, se le realizó una extracción con CH₂Cl₂:H₂O para tratar de eliminar el exceso del DBU. Se concentró la muestra luego de la extracción y con mezcla de CH₂Cl₂:Hex se formó un sólido rojo-café, se filtró y se cuantificó, obteniendo un 50.32% de transformación.

IV. RESULTADOS

Se seleccionó una cloropiridina como precursor para el sistema heterocíclico en conjunto del 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-eno (DBU) que se conoce desde hace mucho tiempo y se utiliza como una base fuerte no nucleófila [12]. Esto sigue siendo válido hoy en día, aunque se han informado numerosos ejemplos que demuestran que el DBU puede actuar como nucleófilo [13]. La reacción fue monitoreada por TLC hasta observar el consumo de la materia prima en una hora. En la Figura 5-a se muestra la RMN de ¹H del crudo de reacción. Así mismo, el crudo de reacción generaba 2 distintos R_f's en TLC; 1 fluorescencia azul y 1 roja tanto en onda corta como onda larga. En un sistema 3:7 la banda azul tuvo un R_f de 0.64 y la banda roja un R_f de 0.32, compuestos muy polares.

Con el objetivo de analizar dichos compuestos formados en el crudo de reacción se realizó una cromatografía en columna sobre gel de sílice (Hexano /Acetato: 7:3) para separar los productos, de las pruebas realizadas se observa un producto purificado (Figura 5-b) el cual coincide con las señales esperadas del producto diseñado (Figura 4), queda en observación para futuros trabajos realizar más ejemplos de síntesis y purificación.

**Fig 4.** Estructura del crudo de reacción

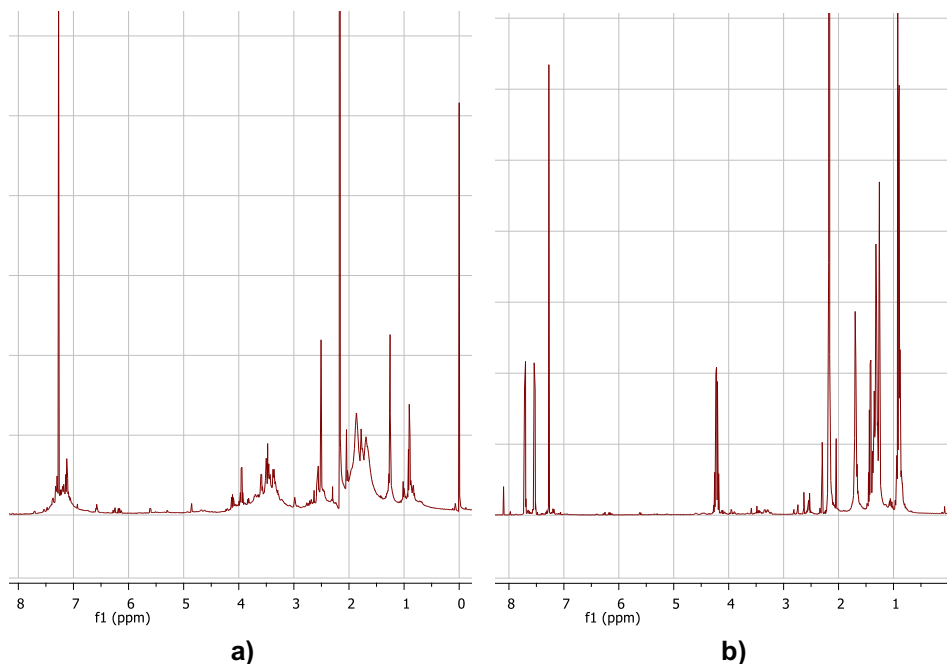


Fig 5. a) Espectro de RMN H1 del crudo de reacción. b) Producto azul purificado

V. DISCUSIÓN

Los experimentos realizados con la cloropiridina en reacción con el DBU resultaron ser moléculas inestables durante la cromatografía en columna y una posible oxidación en exposición con el aire, siendo uno de los factores principales de no haber obtenido la pureza deseada de nuestros productos.

El producto estudiado por la técnica espectrométrica de resonancia nos permitió conocer el consumo total de la 2-cloropiridina y el DBU comprobando su transformación y consolidando los sustituyentes de la 2-cloropiridina que posee un átomo de cloro y un grupo nitro activados hacia la sustitución nucleofílica generando una estructura heterocíclica más compleja y dando lugar a productos fluorescentes.

Pese a que se manejó el crudo de reacción en cromatografía en columna en un sistema Hexano:Acetato:7:3 para lograr el aislamiento de los compuestos, no se generaron resultados favorables, por lo que se recomienda estudiar algún otro sistema para una favorable separación para futuros trabajos.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este proyecto se propuso y se sintetizó una molécula con una estructura amidina con la intención de implementarla como un intercalador de ADN con la finalidad de obtener un sistema como la molécula SYBR-GREEN que permiten cuantificar el ADN en procedimiento de PCR por su emisión fluorescente y con la intención de contar con propiedades ópticas no lineales.

VII. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Expreso mi agradecimiento a la Universidad de Guanajuato por las facilidades y el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano.

REFERENCIAS

- [1] G. De la Torre, L. Sanchez, N, Martin, "Compuestos orgánicos con propiedades ópticas no lineales: hacia las nuevas tecnologías fotónicas y electrónica", Vol. 2, pp 5, 2002.
- [2] Kandasamyb, A. et al. *J. Cryst. Growth* 2009, 331, 1161–1165
- [3] E. Garmire. "Nonlinear optics in daily life", Vol. 21, Issue 25, pp 30532-30544, 2013.
- [4] L. A. Padilha, S. Webster, O. V. Przhonska, H. Hu, D. Peceli, T. R. Ensley, M. V. Bondar, A. O. Gerasov, Y. P. Kovtun, M. P. Shandura, A. D. Kachkovski, D. J. Hagan, E. W. Van Stryland. "Efficient Two-Photon Absorbing Acceptor- π -Acceptor Polymethine Dyes", Vol. 114, pp 6493-6501, 2010.
- [5] J. L. Vazquez Torres, Cumarinas estratégicamente sustituidas: diseño, síntesis y evaluación de actividad óptica no lineal. (Tesis de licenciatura). Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Gto. 2016.
- [6] F. Hernández, A. Sánchez, P. Rendón-Vallejo, C. Millán-Pacheco, Y. Alcaraz, F. Delgado, M. A. Vázquez, S. Estrada-Soto." *Synthesis, ex vivo and in silico studies of 3-cyano-2-pyridone derivatives with vasorelaxant activity*", Vol. 70, pp 669-676, 2013.
- [7] U.E.M. Gibson, C.A. Heid, P.M. Williams. "A novel method for real time quantitative RT-PCR, *Genome Methods*", Vol 6, pp 951– 1001, 1996.
- [8] A. Sánchez, F. Hernández, P. Cruz, Y. Alcaraz, J. Tamariz, F. Delgado, M.A. Vázquez, "Infrared irradiation-assisted multicomponent synthesis of 2-amino-3-cyano-4H-pyran derivatives", Vol. 56 pp 121-127, 2012.
- [9] D. T. Gryko, J. Piechowska, V. Vetokhina, D. Wójcik. *Fluorescent Dyes with 2-Amino-4,7-diazaindole Skeleton: Synthesis and Spectroscopy*, Vol. 82, pp 1514–1519, 2009.
- [10] Ł. G. Łukasiewicz, I. Deperasin´ska, Y. M. Poronik, [a] Y. Woong Jun, M. Banasiewicz, B. Kozankiewicz, K. Han Ahn, D. T. Gryko. "Dipolar Dyes with a Pyrrolo[2,3-b]quinoxaline Skeleton Containing a Cyano Group and a Bridged Tertiary Amino Group: Synthesis, Solvatofluorochromism, and Bioimaging", Vol. 11, pp 1718 – 1724, 2016.
- [11] Y. M. Poronik, D. T. Gryko, "Pentacyclic coumarin-based blue emitters - the case of bifunctional nucleophilic behavior of amidines", Vol. 50, pp 5667–5798, 2014.
- [12] D. Basavaiah, A. J. Rao and T. Satyanarayana, "Recent Advances in the Baylis–Hillman Reaction and Applications", Vol. 10, pp 811-891. 2003. (b) I. Hermez, *Chemistry of Diazabicycloundecene (DBU) and Other Pyrimidoazepines*, Vol. 42, pp 83-202, 1987.
- [13] Vangala, M., & Shinde, G. P., "p-Nitrophenyl carbonate promoted ring-opening reactions of DBU and DBN affording lactam carbamates", Vol. 12, pp 2086–2092. (b); A. Kers, I. Kers, J. Stawinski, "The reaction of diphenyl and dialkyl phosphorochloridates with 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU). Formation of phosphonate diesters via N→C phosphorus migration", Vol. 12, pp 2071, 1999. (c) W. Zhanga, M. Shi, DBU catalyzed cyanoacylation of ketones with acyl cyanides, Vol. 9, pp 1671, 2006. (d) W. C. Shieh, M. Lozanov, Loo, M., O. Repič, T. J. Blacklock, "DABCO- and DBU-accelerated green chemistry for N-, O-, and S-benzoylation with dibenzyl carbonate", *Tetrahedron Letters*, Vol. 44, pp 4563–4565, 2003. (e) G. L. Zhao, Y. L. Shian and M. Shi, "Pentacyclic coumarin-based blue emitters – the case of bifunctional nucleophilic behavior of amidines", Vol. 7, pp 4527, 2005. (f) N. Kumagai, S. Matsunaga, M. Shibasaki, *Angew*, "An efficient synthesis of bicyclic amidines by intramolecular cyclization", Vol 43, pp 478-482, 2004. (g) H. Lammers, P. Cohen- Fernandes and C. L. Habraken, "Tetrahedron, Nucleophilic behaviour of DBU and DBN in reactions with 4-halo-3,5-dimethyl-1-nitro-1H-pyrazoles", Vol. 50, pp 865-870, 1994.

Estudio de relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) de moléculas afines a la proteína de vesículas sinápticas 2A (SV2A) y con actividad anticonvulsiva

Estefano Michelle Buenfil Valdovino

Universidad de Guanajuato
Noria Alta s/n, Col. Noria Alta,
C.P. 36050, Guanajuato, Gto.
em.buenfilvaldovino@ugto.mx

Asesor: Rubén Antonio Romo Mancillas

Universidad Autónoma de Querétaro
Cerro de las Campanas S/N, Centro Universitario,
76010 Santiago de Querétaro, Qro.
ruben.romo@uaq.mx

Resumen: La epilepsia es un trastorno neurológico que afecta a la población en general a nivel mundial. El tratamiento para el control de las crisis epilépticas es el farmacológico, entre los fármacos anticonvulsivos que se utilizan, destaca el levetiracetam, el cual presenta características farmacológicas cercanas a las ideales, además de un mecanismo de acción único sobre la proteína SV2A. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar la relación que existe entre las diferentes moléculas afines a SV2A, tomando en consideración su efecto biológico. Permitiendo así encontrar el modelo más adecuado para estudiar los campos electrónicos y estéricos importantes en las diferentes moléculas para identificar factores estructurales que son importantes para llevar a cabo la interacción entre los diferentes ligandos y la proteína SV2A.

Palabras Clave: QSAR, Levetiracetam, SV2A, Epilepsia, crisis epiléptica, FAE

Abstract: Epilepsy is a neurological disorder that affects the entire population without any discrimination between sex or age. The treatment for the control of epileptic seizures is the pharmacological, among the anticonvulsant drugs that are used highlights levetiracetam, which has pharmacological characteristics close to the ideal, in addition to a single mechanism of action on the protein SV2A. The main objective of this work was to identify different molecules with anticonvulsant activity taking as a criterion the interaction with the SV2A protein and subsequently a computational analysis related to structure and activity was carried out, where the type of biological activity reported was evaluated by different authors and the effect on protein. Allowing to find the most appropriate model to study the important electronic and steric fields in the different molecules to identify structural factors that are important to carry out the interaction between the different ligands and the SV2A protein. Keywords: QSAR, Levetiracetam, SV2A, Epilepsy, epileptic crisis, AED

Keywords: QSAR, Levetiracetam, SV2A, Epilepsy, epileptic seizures, AED

I. INTRODUCCIÓN

Los métodos computacionales se usan como herramienta para el diseño racional de fármacos el cual consiste en realizar un análisis de la estructura química de las moléculas y las interacciones que puede presentar ante diferentes dianas biológicas; con la finalidad de optimizar moléculas o encontrar nuevos candidatos que posean mayor actividad biológica o una actividad biológicamente diferente. Lo cual tiene como ventaja reducir gastos monetarios así como la inversión de tiempo para el desarrollo de nuevas moléculas.

De esta forma podemos encontrar resultados a un gran número de moléculas en cuestión de semanas, y no en cuestión de meses o años como si se siguiera la química convencional que implicaría la síntesis de los fármacos, los bajos rendimientos en la

reacción y otros inconvenientes. Permitiendo así crear una biblioteca de moléculas en favor de la actividad presentada y solamente sintetizar las moléculas que pudieran presentar o no un efecto farmacológico, y descartando las moléculas que no tendrán actividad, permitiendo optimizar recursos y tiempo para el experimentador.

II. MARCO TEÓRICO

A. *Epilepsia*

La epilepsia es un trastorno cerebral crónico que afecta aproximadamente a 65 millones de personas en todo el mundo y se caracteriza por la aparición de crisis epilépticas recurrentes. Estas crisis son episodios breves de movimientos involuntarios que pueden afectar a una parte del cuerpo (crisis parciales) o a su totalidad (crisis generalizadas) y a veces se acompañan de pérdida de la consciencia y del control de los esfínteres.⁽¹⁰⁾

Para diagnosticar a un paciente con epilepsia se evalúan los siguientes parámetros:⁽⁷⁾

1. La presencia de al menos dos crisis no provocadas (o reflejas) con >24 h de separación.⁽⁷⁾
2. Una crisis no provocada (o refleja) y una probabilidad de presentar nuevas crisis durante los 10 años siguientes similar al riesgo general de recurrencia (al menos el 60 %) tras la aparición de dos crisis no provocadas.⁽⁷⁾
3. Diagnóstico de un síndrome de epilepsia.⁽⁷⁾

Una vez identificado un paciente con epilepsia, el tratamiento de primera elección es el farmacológico. Entre los fármacos reconocidos, estudiados y recomendados por la ILAE encontramos diferentes medicamentos con diversos mecanismos de acción entre estos están:—fenobarbital, fenitoína, benzodiazepinas, etosuximida, carbamazepina, ácido valproico, pregabalina y levetiracetam (LEV); los cuales corresponden a la primera y segunda generación de fármacos anticonvulsivos (FAE's), destacando que el LEV presenta características farmacológicas cercanas a las de un fármaco ideal, siendo una molécula prometedora para modificaciones estructurales dado que presenta un mecanismo de acción único el cual consiste en la interacción con la proteína de vesículas sinápticas 2A(SV2A).⁽⁸⁾ Por otro lado, se encuentran FAE's de tercera generación como son: brivaracetam y lacosamida; presentando como ventaja la disminución en los efectos adversos que son producidos por otros FAE's, además de su efectividad en el control de las crisis epilépticas.⁽⁹⁾

B. *Levetiracetam*

El levetiracetam (LEV), químicamente es un derivado enantiomérico del piracetam, fármaco que presenta actividad. En estudios biológicos se mostró que la administración sistémica como central de LEV protegen contra el desarrollo de crisis epilépticas en los animales. Esto sugiere que el compuesto original media un efecto antiepiléptico por una acción central. Los hallazgos indican que las propiedades farmacológicas de LEV en modelos animales de crisis convulsivas y epilepsia son únicas y lo distinguen de todos los demás FAE.⁽⁵⁾

C. *Proteína SV2A*

La proteína 2 de vesículas sinápticas (SV2) es una glicoproteína transmembranal expresada en neuronas y células endocrinas. En las neuronas, se localiza en vesículas sinápticas y se ha propuesto que su función es modular la liberación de neurotransmisores dependientes de Ca^{2+} . La proteína SV2 tiene tres isoformas, A, B y C, siendo SV2A la más expresada en el cerebro. Se identificó en SV2A el sitio de unión específico para el levetiracetam y su análogo brivaracetam. ⁽⁵⁾

D. QSAR

Las técnicas computacionales, han sido de gran ayuda en el diseño de fármacos debido a que permiten comprender las diferentes actividades que presentara un ligando en su proteína, evaluando así los diferentes componentes del fármaco y adecuándolo a los necesarios requeridos por blanco de acción.

Las bases para el diseño de fármacos se dividen en dos: A) Diseño basado en la estructura del ligando y B) Diseño basado en la estructura del receptor. ⁽³⁾

En las técnicas basadas en la estructura del ligando existen estudios como los de relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR), donde se emplean métodos matemáticos y estadísticos para encontrar relaciones empíricas entre la actividad biológica de una o varias moléculas y las propiedades estructurales calculadas de uno o varios compuestos. ⁽³⁾

Para llevar a cabo un estudio de tipo QSAR se necesita saber ciertos parámetros: (A) estructura molecular de diferentes compuestos que tengan un mismo mecanismo de acción (farmacodinamia), y por lo tanto se consideran como ligandos ante una diana biomolecular común; (B) datos de actividad biológica de cada uno de los ligandos incluidos en el estudio (por ejemplo: DE_{50} , DL_{50} , K_i , IC_{50}). ⁽³⁾

La metodología QSAR es interdisciplinaria, por lo que recibe información de la Química Orgánica y de la Farmacología. En concreto, QSAR persigue el diseño molecular dirigido de compuestos con potencial farmacológico, permitiendo el ahorro de recursos económicos y humanos. ⁽³⁾

III. METODOLOGÍA

A. *Análisis relación cuantitativa estructura-actividad*

Se consultaron diferentes bases de datos con la finalidad de obtener la mayor cantidad de moléculas afines a la proteína SV2A y además se tuvieran datos de bioensayos de estas. Posteriormente se registraron los datos biológicos obtenidos en los diferentes modelos en los que se evaluaron los ligandos reportados (DE_{50} , K_i , pIC_{50} , pKI), además de la estructura química de la molécula en cuestión. Se prosiguió con el diseño de una base de datos interna en la cual se registró el nombre y estructura de la molécula, el modelo biológico en el cual fue evaluada, la actividad biológica, el parámetro biológico evaluado y un número de serie para procesar la información. Empleando el programa Maestro de Schödingler 2019-2 se dibujaron las estructuras tridimensionales de los compuestos

encontrados, además se agruparon de acuerdo con los diferentes datos de actividad biológica.

Empleando el programa Open3DAlign, se importaron las moléculas preparadas con el programa Maestro Schödinger para realizar el alineamiento de los ligandos e identificar el mejor para ser empelado como plantilla, considerando los datos de actividad biológica de cada molécula. Posteriormente usando la interfaz del programa Open3DQSAR se delimitó el tamaño de la malla para realizar el cálculo de los descriptores, así como de las mallas electrostáticas y estéricas. Además, se creó el grupo de prueba (28 % de los datos) y el grupo de entrenamiento. La validación de los modelos creados se realizó usando los mínimos cuadrados parciales y validación cruzada empleando LMO y LOO.

Se realizaron 4 experimentos independientes en los cuales se eligió el mejor modelo obtenido y se analizaron los datos estadísticos, así como la visualización de los modelos.

B. Acoplamiento molecular (docking)

Una vez analizados los resultados obtenidos en cada experimento y en cada modelo de QSAR, se eligieron 5 moléculas para ser analizadas mediante acoplamiento molecular (docking), con la finalidad de identificar las interacciones que se presentan entre los ligandos y la proteína SV2A. Esto se realizó utilizando los programas: PyMOL, Autodock 4.2 y Maestro de Schödinger.

En el programa Autodock 4.2 se adicionaron los átomos de hidrógeno y se detectaron los centros de torsión y los enlaces rotables. Además, también se preparó la proteína SV2A.

Se utilizaron dos regiones de búsqueda, una correspondiente al sitio de unión del levetiracetam y otra abarcando toda la región transmembranal de SV2A. Posteriormente usando Autodock 4.2 se buscaron las conformaciones de los ligandos a evaluar empleando el algoritmo Lamarckiano, con un tamaño de población de 50, 5 millones de evaluaciones y 20 corridas. Una vez obtenidos los modelos, se seleccionaron el clúster más probable y el energéticamente favorable (menor $\Delta G_{unión}$). La visualización de los diagramas se realizó utilizando PyMOL y Maestro Schödinger.

IV. RESULTADOS

A. Estudio cuantitativo relación estructura-actividad QSAR

Tabla 1. Validación estadística del análisis QSAR

Tabla 1. Validación estadística del análisis QSAR							
					Validación cruzada		
					LOO		
Experimento	Modelo	SDEC	r ²	F-test	SDEP	q ²	r ² (pred)
1	5	1.0413	0.7457	100.8758	1.2901	0.6097	0.8795
2	5	0.7944	0.787	119.0028	1.0104	0.6554	0.7604
3	5	0.7507	0.7841	113.3379	0.9842	0.6289	0.7807
4	5	0.9592	0.7675	113.5806	1.1505	0.6656	0.5021

Se realizó una base de datos la cual se formó con 186 moléculas reportadas con bioactividad e interacción con la proteína SV2A. Se agruparon de acuerdo con la variable biológica con la que se reportaron: DE₅₀, Ki, pIC₅₀, pKI. Para este trabajo se evaluaron las

38 moléculas con pKI, obteniendo para los 4 experimentos independientes que el mejor modelo fue del número 5, con valores de r^2 considerables y significativos para el caso de la validación cruzada (q^2), además de que para los 4 modelos la $r^2(\text{pred})$ es similar a la r^2 , los valores obtenidos para cada modelo se pueden observar en la tabla 1. Así mismo los alineamientos de todas las moléculas se pueden observar en la figura 1.

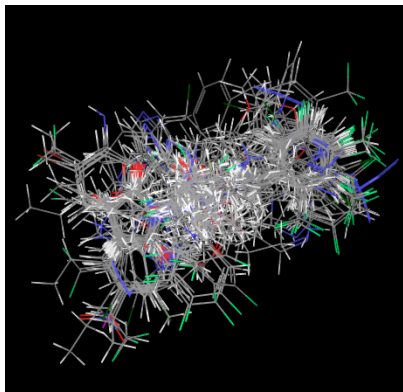


Figura 1. Alineamiento de las moléculas afines a la proteína SV2A.

B. Acoplamiento molecular

Para el estudio de acoplamiento se evaluaron 5 ligandos analizados previamente por QSAR, los cuales se sabe que son afines a SV2A. Aunado a esto se utilizaron como controles levetiracetam y brivaracetam, dos fármacos que se administran en pacientes con epilepsia y que han sido estudiados de acuerdo con su mecanismo de acción, este es la interacción con la proteína SV2A.

Como resultado a este análisis, en la tabla 2 se reportan los valores de energía de unión de los fármacos de referencia y los ligandos analizados. Así mismo, se compararon las interacciones que se llevaron a cabo con los residuos de aminoácidos de la proteína SV2A, esto se puede observar en la figura 2. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2.

V. CONCLUSIONES

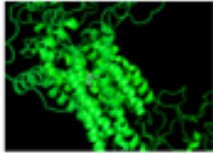
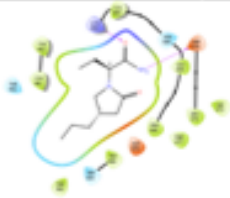
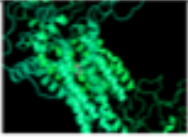
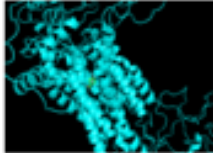
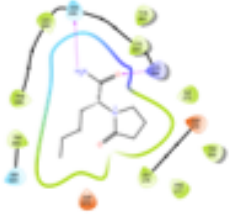
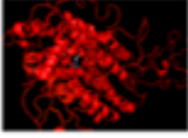
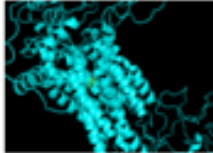
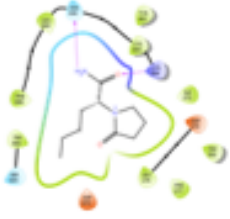
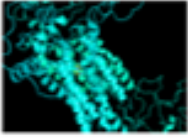
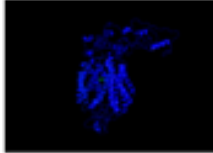
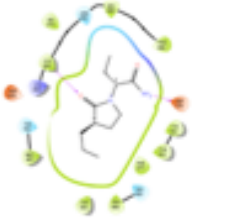
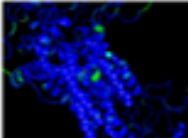
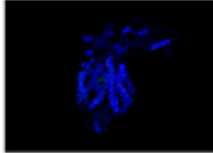
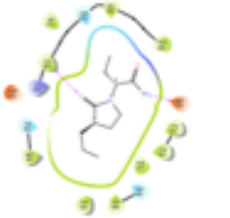
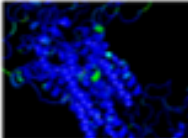
Se realizó el estudio de QSAR relaciones cuantitativas estructura-actividad de moléculas afines a SV2A. con ayuda del programa Open3DQSAR, evaluando todos los fármacos encontrados que consistieron en 186 moléculas, valorando el diferente comportamiento que tendría cada uno de estos. En el sitio activo de la proteína. Se evaluaron las diferentes densidades de electrones y campo potencial electrostático que pueden presentar estas moléculas en una interacción con la proteína SV2A

Se logró generar y descifrar el comportamiento de todas estas moléculas en el programa 3D-QSAR utilizando combinaciones aleatorias de diferentes conjuntos de prueba/ entrenamiento, esquemas de superposición, selección de variables y procedimientos de aleatorización de datos. Se logra un alto rendimiento computacional a través de la implementación de algoritmos, construcción y validación de modelos PLS.

Se encontró el mejor acoplamiento molecular entre el ligando y la proteína 2A, en que se encontró la mejor conformación y orientación que tendrían que tener las moléculas y se logró medir la interacción que tendrán estas dos estructuras al unirse.

Gracias al estudio computacional realizado, ahorramos gran cantidad de tiempo y solo se tratara de sintetizar las moléculas que encontramos que tendrán una respuesta,

Tabla 2. Valores de energía de unión de fármacos y respectivos ligandos.

Nombre del fármaco	Interacción del fármaco con la proteína	Interacción de los residuos del fármaco con los aa. De la proteína		
Levetiracetam			Levetiracetam	
A4c2			A4c2	
A3c6			A3c6	
A4c3			A4c3	
A3c7			A3c7	

VI. RECONOCIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Querétaro y al grupo de investigación del Dr. Rubén Romo, en especial a su estudiante de doctorado, Amelia Chávez, quien fue la encargada de supervisar y ponerme en contexto para la realización de la estancia de verano.

REFERENCIAS

- (1) Jose M., (2006), Diseño de fármacos asistido por computadora, PROFESORES AL DÍA [FARMACIA Y LAS TIC], Educación Química 17[4], 452-457
- (2) "Carolina Jiménez, (2014), Análisis de la relación entre la epilepsia y los trastornos psiquiátricos (tesis de posgrado) Universidad de costa rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica". Consulta 10-7-19
- (3) "Jorge Lozano, (2012), ¿Qué sabe Ud. acerca de...QSAR?, Rev. Mex Cienc Farm 43 (2) 2012"Recuperado desde: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcf/v43n2/v43n2a10.pdf> 09-7-19

- (4) "Madeo M., Kovács A., Pearce D., (2014), The Human Synaptic Vesicle Protein, SV2A, Functions as a Galactose Transporter in *Saccharomyces cerevisiae* 09-7-19
- (5) [Marianna Madeo](#), [Attila D. Kovács](#), [David A. Pearce](#) (2014), The Human Synaptic Vesicle Protein, SV2A, Functions as a Galactose Transporter in *Saccharomyces cerevisiae*, [J Biol Chem](#). 2014 Nov 28; 289(48): 33066–33071.
- (6) [CMSimple](#) - [CMSimple-Styles](#), Open3DQSAR "<http://open3dqsar.sourceforge.net/?Description>" Última actualización: 18 de abril de 2018 11:58:59 Consultado 13/07/2019
- (7) S. Fisher Robert, (2014), Definición clínica práctica de la epilepsia, INFORME OFICIAL DE LA ILAE, *Epilepsia*, 55(4):475–482, 2014 doi: 10.1111/epi.12550
- (8) Estela López, Jorge Bravo, Hugo Solís (2005), Epilepsia y antiepilépticos de primera y segunda generación. Aspectos básicos útiles en la práctica clínica, *Rev Fac Med UNAM* Vol.48 No.5 Septiembre-Octubre, 2005 (201,209).
- (9) Desiderio Pozo, Albia Pozo, (2010), Antiepilépticos de tercera generación, *Rev Cubana Pediatr* v.82 n.1 Ciudad de la Habana ene.-mar. 2010, . (10) Organización Mundial de la Salud, definición de epilepsia, Recuperado de <https://www.who.int/topics/epilepsy/es/> 16/07/20

Estudio del origen del agua subterráneas utilizando hidrogeoquímica

Dayanne Araceli Vázquez Contreras

Facultad de Ciencias Químicas
Blvd. V. Carranza s/n esq. con Ing. José
Cárdenas Valdés. Col. República Ote. C.P.
25280. Saltillo, Coahuila.

dayannevazquezcontr@uadec.edu.mx

Asesor: José Alfredo Ramos Leal

Instituto Potosino de Investigación Científica
y Tecnológica
Camino a la presa San José #2055, Lomas 4ª.
Secc., C.P. 78216. San Luis Potosí, S.L.P.

jalfredo@ipicyt.edu.mx

Resumen — Este documento trata acerca de los análisis hidrogeoquímicos del agua en diferentes puntos de la región Cerritos, San Luis Potosí. Así mismo se estudiaron los análisis de los parámetros físico-químicos obtenidos en la región; de igual manera fue analizada la forma en que se toma la muestra. Estos parámetros fueron estudiados mediante el balance iónico en unidades de miliequivalentes por litro, así como también por medio de los diversos diagramas de Piper, Stiff y Schoeller realizados con ayuda de los softwares Surfer y Aquachem. Se pudo observar los diferentes tipos de familias del agua dada su composición química, los análisis químicos con que se trabajó tienen un error menor al 10%. En donde se observó en su gran mayoría aguas sulfatadas cálcica.

Palabras clave —Hidrogeoquímica, diagramas, familias de agua.

Abstract — This document deals with hydrogeochemical analyses of water in different parts of the Cerritos region, San Luis Potosí. The analyses of the physical-chemical parameters obtained in the region were also studied; the same way the sample was taken. These parameters were studied by ion balance in milliequivalent units per liter, as well as through the various Piper, Stiff and Schoeller diagrams made with the help of Surfer and Aquachem software. The different types of water families could be observed given their chemical composition, the chemical analyses with which they worked have a error less than 10%. Where mostly calcium sulfated waters were observed.

Keywords — hydrogeochemistry, diagrams, water families.

I. INTRODUCCIÓN

El estudio del agua subterránea mediante la hidrogeoquímica permite conocer la evolución del agua; es decir concede datos dada su composición química que nos proporciona información para conocer la calidad, distribución del agua; así como, determinar los procesos químicos y físicos que le afectan durante su trayecto. Las mediciones necesarias para dichos análisis van desde la temperatura, conductividad, pH, total de sólidos disueltos, oxígeno disuelto, hasta los procesos de Oxido-Reducción que depende de los nitratos, sulfatos y bicarbonatos presentes en el agua.

Para corroborar la eventualidad del balance iónico se representa como un porcentaje de la suma de los cationes menos la suma de aniones, entre la suma de cationes más la suma de aniones, todo esto por 100, como se muestra en la Ec. (1). [1-2]

$$\text{Error} = \frac{\sum \text{aniones} - \sum \text{cationes}}{\sum \text{aniones} + \sum \text{cationes}} * 100 \quad (1)$$

donde los aniones mayoritarios son: Cloro, sulfatos, bicarbonatos y los cationes mayoritarios: Sodio, potasio, magnesio y calcio; así mismo las unidades de dichos parámetros se utilizan en miliequivalentes por litro. El error debe ser menor al 10% para que sea admisible.

II. MARCO TEÓRICO

La hidrogeoquímica analiza la composición del agua, así como los cambios en los procesos químicos y físicos como la interacción agua- roca que ocurren durante su trayecto al subsuelo. Para conocer un poco más de la hidrogeoquímica es necesario conocer los parámetros físico- químicos, más importantes:

Conductividad. Es la capacidad que tiene el agua para transmitir corriente eléctrica. A medida que la concentración de iones aumenta, la conductividad también incrementa.

Temperatura. La temperatura del agua subterránea, en un punto y momento determinado, representa un estado de equilibrio entre los "aportes" y las "extracciones" caloríficas en ese punto. La distribución de temperaturas en un acuífero depende inicialmente de la temperatura del medio ambiente y posteriormente del gradiente geotérmico.

Sólidos disueltos totales. Es la suma de iones mayores (aniones y cationes). Son aquellas sales o residuos orgánicos disueltas en agua, sean o no volátiles.

pH. Es la actividad de iones hidrógeno que mide la acidez del agua. El pH a su vez ayuda en procesos químicos como lo son los procesos redox en aguas subterráneas.

Alcalinidad. Esta se produce por los iones de carbonato y bicarbonato; es decir representa la capacidad del agua para neutralizar los ácidos.

Oxígeno disuelto. Sirve como indicador de las condiciones bioquímicas del agua en un lugar y momento determinado; es decir, un nivel alto puede indicar agua de mejor calidad, mientras un nivel demasiado bajo indica contaminación. La mayor parte del oxígeno disuelto proviene del oxígeno del aire del lugar.

Potencial Oxido- Reducción. Es la capacidad del agua para oxidarse.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1) *Equipos y materiales de muestreo*

Entre los equipos se encuentran medidores portátiles de pH, conductividad, temperatura, envases, recipientes para el envasado y transporte de las muestras, en caso de ser necesario equipo de filtrado de muestras, material de seguridad e higiene (guantes, gafas), material auxiliar (rollo de papel, cinta adhesiva, cuerda).

Lavado y reutilización de los equipos:

El procedimiento más común para el lavado es con detergentes (fosfato trisódico oalconox), aclarado 3 veces con agua corriente y luego, dos aclaraciones con agua destilada.

Material de plástico se limpia con HCl o HNO₃ y se enjuaga con abundante agua corriente y desionizada.

Bombas y sondas de nivel, debido a la posible contaminación cruzada que puede producir. Requiere el siguiente protocolo de limpieza propuesto por la EPA:

- 2) *Lavado con agua potable (dos volúmenes)*
- 3) *Alconox (dos volúmenes)*
- 4) *Agua potable (dos volúmenes)*
- 5) *Etiquetas de muestras y bitácora de campo*

El etiquetado de los recipientes deberá realizarse antes de la toma de muestra y tendrá que ser identificada con los siguientes datos:

- Referencia de la muestra
- Fecha y hora de toma
- Tratamiento (acidificación, conservantes, etc.)

Los datos que corresponden a la bitácora de carácter obligatorio son:

- Referencia de la muestra
- Fecha y hora de la toma.
- Identificación del punto de muestreo.
- Adiciones (acidificación, conservantes, etc.)
- Situación del punto de muestra.
- Profundidad del muestreo.
- Parámetros determinados en campo
- Observaciones, es decir cualquier tipo de incidencia que pueda influir en el análisis de la muestra.

Metodología de muestreo

- Inspección de la captación.
- Purgado de la captación/ sin purgado.
- Recolección de muestras.

Metodología IN SITU

- Nivel del agua.
- Profundidad del pozo de monitoreo.
- Parámetros físico-químicos: conductividad, pH, temperatura, oxígeno disuelto, etc.

6) *Métodos*

ICP. Plasma de acoplamiento inductivo que se utiliza para analizar muchos elementos en niveles bajos en ppm. Este se basa en el acoplamiento del plasma acoplado inductivamente que genera iones y el espectrómetro de masas para detectar los iones.

7) *Análisis de datos*

Diagrama de Piper. Este diagrama representa la composición aniónica y catiónica. Se representan 2 triángulos en la parte inferior que simbolizan los aniones (triángulo inferior derecho) y los cationes (triángulo inferior izquierdo) y en el centro se encuentra un diamante que es donde se hacen presentes las familias de aguas. Dicho diagrama se representa en porcentajes calculados por medio de la Ec. 2.

$$\% = \frac{100 \cdot \text{componente (en } \frac{\text{mEq}}{\text{L}})}{\text{suma de aniones o cationes}} \quad (2)$$

Diagrama de Stiff. Cada uno de los análisis realizados simboliza un polígono para observar la familia hidrogeoquímica, es decir el tipo de rocas en el que se encuentra, dependiendo de la región analizada.

Diagrama de Schoeller. Aquí se representan los iones mayoritarios expresados en concentraciones de miliequivalentes por litro. [3-4]

IV. RESULTADOS

Tabla 1. Parámetros físico-químico

Nombre	x	y	z	Tamb	Tmta	OD	OR	Ph	CE	STD	Alk	Cl mg/L	HCO3 mg/L	SO4 mg/L	Na mg/L	K mg/L	Ca mg/L	Mg mg/L	NO3 mg/L
manantial le	366162	2456962	1180	22.6	22.8	34.1	41	7.5	2260	1675	285	6	285	1200	8.5	3.7	503	64	12
MANANTIAL	366889	2456163	1203	26.4	24.5	69.2	68	6.8	2270	1675	222	5	222	1220	7.0	2.1	511	62	12
MANANTIAL	367009	2456289	1206	29.3	26.2	0	-284	6.5	2850	2198	414	28	414	1500	11.4	8.0	530	178	14
MINA DE AZ	366528	2453647	1249-42	31.4	21.6	15.7	4.36	1.6	9550	2361	0	11	0	5200	49.8	65.0	305	898	24
REPETICIÓN												11.1		5200	49.0	76.2	358	1049	24
CARRIZAL	369901	2452745	1168	21.8	23.2	44.3	125	7.4	2170	1605	240	6.3	240	3360	3.9	64.1	315	913	13
NORIA GUA)	368463	2457057	1171	30.5	23.5	64.4	216	6.1	2240	1670	261	6.8	261	1380	8.4	2.8	503	60	11
AGUA DEL N	371663	2450735	1194	28.3	23.2	43.9	116	6.9	2190	1614	219	4.4	219	1400	4.4	1.5	495	45	15
PUERTA DEL	370232	2459985	1103	26.7	27	45.9	172	7	1220	874	225	5.5	225	630	6.7	2.0	252	59	14
EL CARDOSO	361235	2462188	1347	28.6	22.3	70	125	7.3	2140	1577	273	3.4	273	1040	4.3	1.1	517	41	11
LA PILA	361920	2461001	1367	20	20	86.7	99	7.4	2220	1641	222	4.3	222	1100	6.0	2.1	509	49	11
CAVERNA N	362626	2460322	1300	21	22	82.7	93	7.6	2300	1710	255	3.9	255	1220	5.7	1.6	538	53	13
LA PILA II	361831	2461675	1351	20.25	21	81	88	6.9	2270	1687	223	5	223	1380	5.9	1.6	545	47	12
LAS HIGUER	364407	2459164	1262	26	22	10	96	7.1	1700	1326	300	3.4	300	1300	5.1	2.0	550	48	15
EL OJO DE A	362830	2459555	1282		23.14	100.1	90.6	6.97	2595	1497	300	4.5	300	1320	5.3	2.1	543	49	11
EL SAUS	364759	2457896	1230	21	20	30	104	7.3	2150	1587	189	3.4	189	1000	6.0	3.6	507	52	15
EL ZACATÓ	362033	2457916	1268	21.8	22.2	42.2	97	7.1	2070	1578	135	3.7	135	1380	4.5	1.5	518	35	15
LOS OCOTIL	362908	2457250	1293	21.3		24.7	90	7.6	2280	1692	300	5	300	1200	4.9	1.3	558	46	13
LOS SIRIACI	363346	2458231	1250	23.5	21.5	42.3	92	7.1	2230	1650	186	3.2	186	980	5.4	2.5	438	45	16
EL SAUS 2	365112	2457676	1229	26.7	27.3	97.1	93	6.8	2210	167	252	3.8	252	1450	7.0	3.3	524	64	12
LA LAGUNIT	364998	2457095	1229	26.66	22.9	70.2	111	6.6	2180	1611	261	4	261	1380	6.1	2.0	541	57	13
LOS POZAS	365380	2457339	1225	25.5	21.4	5.8	-107	6.6	2300	1717	228	3.2	228	1480	8.9	1.9	549	75	24

Tabla 2. Porcentajes utilizados en el diagrama de Piper

Error	% Cl	% HCO3	%SO4	%Na+K	%Ca	%Mg	%NO3
1.734025545	1.12072199	15.4684896	82.7699885	2.65432509	80.4747382	16.8709367	0.64079991
2.930311266	0.95520392	12.3235399	86.0658631	2.12848568	81.6541039	16.2174104	0.65539314
3.09033512	3.9648476	17.0343363	78.4340667	2.81316227	62.5806142	34.6062235	0.56674939
-6.975136286	0.56757507	0	99.0783979	6.30500718	16.0303668	77.664626	0.35402703
0.491727451	0.57270529	0	99.0732859	5.62590877	16.192818	78.1812732	0.35400876
10.97181147	0.47709048	5.28114208	93.9603195	2.13144917	16.9633487	80.9052022	0.28144796
-4.152798812	1.14213105	12.7380791	85.5915949	2.58578755	81.3878038	16.0264086	0.52819498
-7.06548492	0.7466446	10.7984588	87.7272055	1.44278217	85.7633786	12.7938392	0.72769111
2.006269651	1.7884891	21.2599645	75.6500403	3.53505931	69.6875771	28.7773636	1.30150607
5.577431997	0.72353809	16.8811309	81.7261098	1.36594714	87.2842194	11.3498335	0.66922125
5.43463322	0.89929929	13.4910321	84.9519759	1.9101713	84.6063754	13.4834533	0.65769272
2.827273448	0.73277519	13.9220355	84.646886	1.69479997	84.5860997	13.7191004	0.69830324
-1.86035452	0.85789435	11.1179592	87.4355202	1.74130643	85.9886715	12.2700221	0.58862622
-0.743207543	0.59139432	15.1626774	83.5000223	1.5435965	86.1159911	12.3404124	0.74590591
-1.732884905	0.77285806	14.9714854	83.7155561	1.63182678	85.5954264	12.7727468	0.54010036
10.74064364	0.78726013	12.7162059	85.5035891	2.02686693	83.7968624	14.1762706	0.99294491
-3.689258364	0.66450014	7.04504106	91.520302	1.46143813	88.7343311	9.80423078	0.77015682
2.826562528	0.92762027	16.1725272	82.2103464	1.43689479	86.74896	11.8141452	0.68950613
4.541579484	0.75524007	12.755703	85.40949	2.03234129	83.698738	14.2689207	1.07956696
-3.879834131	0.61698534	11.8890785	86.9369209	2.15443073	81.4398118	16.4057575	0.5570152
-1.786037811	0.67436563	12.785931	85.913128	1.80524993	83.7494107	14.4453394	0.62657541
-0.865676887	0.51378143	10.6370128	87.7475797	2.36950727	79.4509359	18.1795568	1.10162611

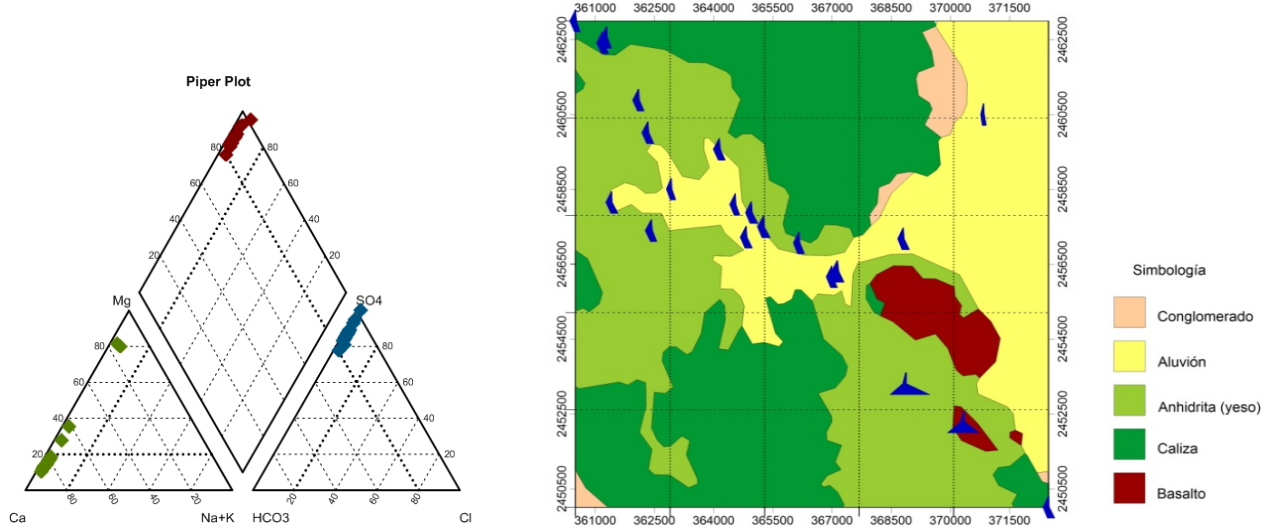


Fig. 1. Diagrama de Piper y **Fig. 2.** Diagrama de Stiff.

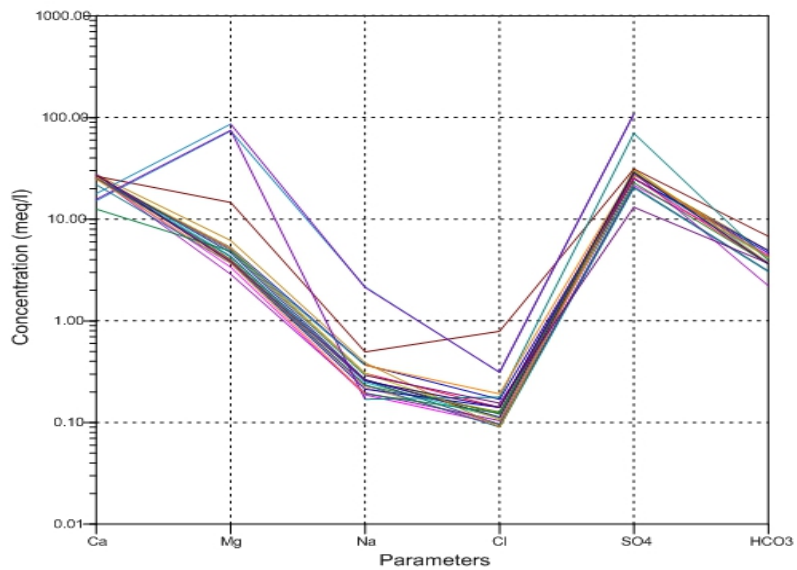


Fig. 3. Diagrama de Schoeller.

Los parámetros físico- químicos analizados (Tabla 1) van desde la temperatura ambiente de la región, la temperatura de la muestra, pH, hasta la concentración de los aniones y cationes en miligramos por litro.

Los datos que se obtuvieron en el diagrama de Piper (Fig.1) muestran que la mayoría de las concentraciones de los aniones son sulfatos, así como la mayoría de las concentraciones de los cationes son calcio, esto significa que la familia de agua que sobre sale son las sulfatadas cálcicas (Ca-SO₄). Todos estos datos se representan en porcentajes (Tabla 2).

El diagrama de Stiff (Fig. 2) demostró que la mayoría de los análisis realizados provienen de la Anhidrita y que sólo unos pocos son de Aluvi3n y Basalto.

Los resultados representados en el diagrama de Schoeller (Fig. 3) exponen los parámetros con respecto a su concentraci3n que se expresa en miliequivalentes por litro, para así tener una mejor vista de aquellos que sobresalen. El diagrama muestra que domina el anión SO_4 y el catión Ca solo en tres muestras domino el Mg, posiblemente por la presencia de dolomita o la interacci3n con basaltos.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El agua identificada en la regi3n es de tipo Ca- SO_4 , lo cual es indicativo de su interacci3n con evaporitas (anhidrita) y tiene altos contenidos de SO_4 , que la clasifican como no apto para consumo humano, debido a que rebasa lo establecido por la NOM-127 que es de 400 ppm.

A pesar de que el tiempo durante la investigaci3n fue corto se lograron resultados favorables, principalmente la determinaci3n de la familia de agua predominante que fue la familia sulfatada cálcica, lo que indica que es un suelo rico en anhidrita.

VI. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Agradezco el apoyo durante la elaboraci3n de la presente investigaci3n al Instituto Potosino de Investigaci3n Científica y Tecnológica (IPICYT), especialmente a mi asesor, el Dr. José Alfredo Ramos Leal y la Dra. Janete Moran Ramírez por la ayuda y comprensi3n.

A la Universidad Autónoma de Coahuila (UADEC) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

REFERENCIAS

- [1] D, Palavicini, Caracterizaci3n hidrogeoquímica para determinar los usos del agua en el acuífero de Tulancingo estado de Hidalgo [Tesis]. Instituto Politécnico Nacional, México, D.F, 2012.
- [2] N. Hernández. "Modelo geoquímico conceptual de la evoluci3n del agua subterránea en el valle de México" IEEE Ingeniería Hidráulica en México, Vol X, pp. 71-90, Sep-Dic.1995.
- [3] S. Montoya "Protocolo de monitoreo de calidad de agua subterránea", Gestión sostenible del agua, Nov, 2013.Disponible en <http://gidahatari.com/ih-es/protocolo-de-monitoreo-de-calidad-de-agua-subterranea>
- [4] P. Collazo, "Bases conceptuales y muestreo de la calidad del agua". Actualizaci3n de diseño de redes de monitoreo de aguas subterráneas, Montevideo, Uruguay, octubre de 2015.

Estudio etnobotánico en comunidades rurales de Dolores Hidalgo, Guanajuato

Elsa Guadalupe Hernández Valadez

Universidad de Guanajuato
División de Ciencias Naturales y Exactas
Noria Alta S/N, Noria Alta, 36050 Guanajuato, Gto.
eg.hernandezvaladez@ugto.mx

Rubí Luévano Rodríguez

Universidad Autónoma de Aguascalientes
Departamento Ciencias Básicas
Av. Universidad #940, Aguascalientes, Ags.
rubi_luevanordz@hotmail.com

Luis David Vargas López

Universidad Autónoma de Zacatecas
Unidad Académica de Ciencias Biológicas, Calzada
Solidaridad esq. Paseo La Bufa s/n
C.P. 98060 Zacatecas, Zac.
luisdavid_vargaslopez@hotmail.com

Asesor: Ángel Josabad Alonso Castro

Universidad de Guanajuato
División de Ciencias Naturales y Exactas
Noria Alta S/N, Noria Alta, 36050 Guanajuato, Gto.
angeljosabad@ugto.mx

Resumen — México es uno de los países con mayor tradición ancestral y riqueza en el uso de la herbolaria medicinal. Los materiales y los métodos utilizados para el realizar el estudio etnobotánico, fueron entrevistas directas con los habitantes de las comunidades de Dolores Hidalgo. Las entrevistas fueron analizadas con dos herramientas cuantitativas: a) el factor de consenso del informante (FCI) el cual estima los nivel de conformidad acerca de cuáles plantas podrían ser usadas en cada categoría y b) la importancia relativa (IR) que determina el grado de la utilización potencial de cada especie. Un total de 72 especies de plantas con propósitos medicinales pertenecientes a 20 familias fueron reportadas por los entrevistados, para tratar 52 enfermedades y 1 para filiaciones culturales. Fueron reportadas 9 combinaciones de plantas por los entrevistados. *Thymus vulgaris* fue la planta más usada en las combinaciones (5 combinaciones). Los resultados del FCI muestran que enfermedades relacionadas con el aparato respiratorio, el aparato circulatorio y aparato digestivo tienen el más alto nivel de acuerdo. Mientras que la especie más versátil de acuerdo a la IR fueron *Moringa Oleifera* (IR=2 y *Thymus vulgaris* (IR=1.84). Con este estudio se pudo demostrar el rol que cumplen las plantas medicinales para estas comunidades por estar alejadas de los servicios médicos de la ciudad.

Palabras clave — Plantas medicinales, importancia relativa, factor de consenso del informante, medicina tradicional.

Abstract — Mexico is one of the countries with great ancestral tradition and wealth in the use of the medicinal herbal. The material and methods used to carry out the ethnobotanical study were interview direct with the habits of the regions of Dolores Hidalgo. The interviews were analyzed with two quantitative tools: a) the informant consensus factor (IFC) that estimates the level of agreement about which medicinal plants may be used for each category and b) the relative importance (RI) that determines the extent of potential utilization of each species. A total of 72 plants species with medicinal purposes belonging to 20 families were reported for the interviewed, for treat 52 illnesses and one for cultural filiation. Nine mixtures of plants were reported. *Thymus vulgaris* was the more used plant in the mixtures (five mixtures). The results of the IFC showed that diseases of the respiratory, circulatory and digestive system had the greatest agreement. The most versatile species according to their RI are *Moringa Oleifera* (RI=2) and *Thymus vulgaris* (RI=1.84). With this study it was possible to demonstrate the role that plays the medicinal plants for these communities, for being away from medical services of the city.

Keywords — Medicinal plants, relative importance, informant consensus factor, traditional medicine.

I. INTRODUCCIÓN

México es un país megadiverso que combina una de las floras más ricas del mundo con una alta diversidad cultural y una gran variedad de conocimientos tradicionales (del Carmen Juárez-Vázquez et al., 2013; Reimers et al., 2018). Las comunidades en México, especialmente las indígenas, poseen un profundo entendimiento de su medio ambiente y las plantas medicinales han jugado un papel importante, desde hace siglos, para el tratamiento empírico de muchas enfermedades (debido a eficacia, tradición y su bajo costo) y prácticas mágico-religiosas. Estos conocimientos constituyen una base importante para la conservación de la biodiversidad global y para su uso sustentable (Alejandro, Alberto, Gama Campillo, & Mariaca Méndez, 2010; Alonso-Castro et al., 2012; Canales Martínez et al., 2006; del Carmen Juárez-Vázquez et al., 2013; Gómez Álvarez, 2012).

En ciertas regiones, las comunidades presentan carencias en cuanto a los servicios médicos. Por lo cual, las parteras, los "yerberos" y los curanderos son los responsables de la salud de los pobladores, por lo que el uso de las plantas es innegable ya que todavía dependen de ellas para la terapia primaria (Andrade-Cetto, 2009; Gómez Álvarez, 2012).

México es uno de los países de América con mayor tradición ancestral y riqueza en el uso de la herbolaria medicinal. En México, el conocimiento de las plantas medicinales está evolucionando para tratar muchas enfermedades, así como para tratar enfermedades que han cobrado una importancia actual (obesidad, diabetes, ansiedad, depresión, etc.). La sabiduría de origen antiguo o tradicional continúa proporcionando salud y bienestar a la población de pocos recursos, por lo que es importante continuar con su estudio, rescatando el conocimiento ancestral y promoviendo su uso (Hurtado Rico, Rodríguez Jiménez, & Aguilar Contreras, 2006; Reimers et al., 2018).

Las herramientas cuantitativas utilizadas en los estudios etnobotánicos permiten la selección de las plantas más importantes para iniciar estudios farmacológicos (Alonso-Castro et al., 2012). Dentro de los trabajos cuantitativos actuales se pueden clasificar en tres categorías: consenso de informantes, asignación subjetiva y usos totalizados. La técnica usada en este trabajo pertenece a la primera categoría, en la cual la importancia relativa de cada uso es calculada directamente por el grado de consenso de la respuesta de los informantes (Hurtado Rico et al., 2006).

Las comunidades de San Vicente y San Marcos de Abajo pertenecen al municipio de Dolores Hidalgo, localizado en el noroeste del estado de Guanajuato, México. En conjunto son una zona rural, con un bajo índice de población, la cual está conformada en su mayoría por mujeres y niños (INEGI, 2019). Las principales actividades a las que se dedican son la agricultura y la ganadería. En este reporte se describen los resultados del estudio etnobotánico acerca de los usos de plantas medicinales usadas por los habitantes de ambas comunidades.

II. MATERIALES Y MÉTODO

A. *Sitio de estudio*

La comunidad de San Vicente se localiza a 21°1'40.74" N de latitud, 101°0'34.739" O de

longitud y a una altitud de 2030 metros sobre el nivel del mar (Figura 1). La comunidad contaba con 429 habitantes en el 2010, de los cuales 204 son del género femenino y 220 son del género masculino, que se encuentran distribuidos en un área de 92 853.460 m² (SEDESOL, 2013; INEGI, 2019a) mientras que la comunidad de San Marcos de Abajo selocaliza a 21°1'20.661" N de latitud, 101°1'2.969" O de longitud y a una altitud de 2030 msnm (Figura 1). La comunidad de San Marcos de Abajo contaba con 515 habitantes en 2010, de los cuales 246 eran del género masculino y 269 del género femenino (INEGI, 2019b), la población en ambas comunidades presenta en su mayoría un nivel socioeconómico y escolar bajo (SEDESOL, 2013). La mayoría de los hombres se ven en la necesidad de migrar; principalmente a Estados Unidos, para mejorar las condiciones de vida de sus familias. En general, la población cuenta con los servicios básicos como agua potable, drenaje y electricidad, aun así, gran parte de la población no tiene acceso a otros servicios como internet. Además, es importante señalar que en las comunidades no se cuenta con ningún tipo de atención médica.

B. Recolección de datos

Se realizaron entrevistas directas con gente de la población de la comunidad de San Vicente, en el mes de junio del 2019. Fueron entrevistadas individualmente un total de 180 personas, donde el 33.7% eran hombres y 66.3% mujeres, cuyo rango de edad se encuentra de entre 22 a 80 años. Antes de iniciar las entrevistas se pidió el consentimiento para poder recabar la información. Las preguntas estaban enfocadas al uso que se daban a las plantas medicinales: nombre común, preparación, y la parte de la planta utilizada. Los nombres científicos de las especies vegetales y a la familia a la que pertenecen fueron buscados en bibliografía especializada.

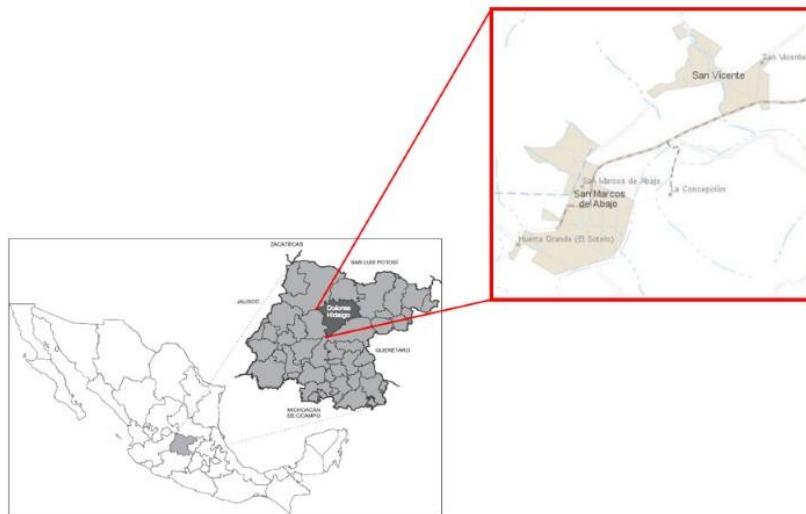


Figura 1. Mapa del área de estudio, municipio de Dolores Hidalgo, Guanajuato, México (Sepúlveda Garza, 2014; INEGI, 2019c).

C. Análisis de datos

Los padecimientos tratados con la flora medicinal de San Vicente y San Marcos de Abajo

fueron agrupados en 8 categorías, basada en la clasificación usada por la Clasificación Internacional de Enfermedades usada por la Organización Mundial de la Salud (ICD-International statistical classification of diseases and related health problems (World Health Organization) por sus siglas en inglés, 2017). La importancia relativa (IR) de las especies citadas fue calculada (adaptada de Bennett y Prance, 2000) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$IR = NCS + NP, NCS = \frac{NCSS}{NCSV}, NP = NPS/NPSV \quad (1)$$

donde NCS es el número de sistemas corporales, que es obtenida dividiendo NCSS, el número de sistemas corporales tratados por una especie dada, por NCVS, el número total de sistemas corporales tratados por la especie más versátil. NP es el número de propiedades farmacológicas, las cuales son obtenidas dividiendo NPS, número de propiedades atribuidas a la especie, por NPSV, el número total de propiedades atribuidas a la especie más versátil. El resultado puede tener un valor máximo de 2, indicando la especie más versátil. El factor de consenso informante (ICF), adaptado por Henrich et al. (1998), Estima el nivel de acuerdo entre los entrevistados acerca de cuáles plantas son usadas en cada categoría, y se calcula con la siguiente fórmula:

$$ICF = \frac{nur - nt}{nur - 1} \quad (2)$$

donde nur es el número de citas de plantas medicinales en cada categoría y nt es el número de usos citados para la planta en cada categoría. El resultado de este factor está en un rango desde 0 a 1, donde el valor más cercano a 1 indica un criterio bien definido de selección en la comunidad y/o si la información es intercambiada entre los informantes, mientras un bajo nivel indica que las especies vegetales son escogidas aleatoriamente, o que la información de su uso no es intercambiada.

III. RESULTADOS

A. *Uso de la flora medicinal*

Un total de 73 especies de plantas con propósitos medicinales pertenecientes a 20 familias fueron reportadas por los entrevistados. Las plantas medicinales fueron reportadas para tratar 52 enfermedades y 3 para filiaciones culturales (tabla 1). Las familias más comunes son: Ranunculaceae, Lamiaceae y Arecaceae. Ninguna de las plantas mencionadas por los entrevistados se encuentra en peligro de extinción.

Las especies más mencionadas fueron *Matricaria recutita* (28 menciones), *Thymus vulgaris* L. (21 menciones), *Mentha spicata* (19 menciones), *Ocimum basilicum* (19 menciones), *Origanum vulgare* (16 menciones), *Zingiber officinale* (12 menciones), *Equisetum myriochaetum* (12 menciones), *Artemisia vulgaris* (12 menciones), *Cestrum fasciculatum* (11 menciones), *Tilia platyphyllos* (11 menciones). Las partes de la planta usada más comúnmente son las hojas, el tallo y la planta ente

Tabla 1. Especies de plantas utilizadas con fines medicinales en las comunidades de Dolores Hidalgo C. I. N., Guanajuato, México

Familia	Nombre científico	Nombre común	Parte que se usa	Preparación/ Aplicación	Enfermedad/ síntomas	Número de menciones	Importancia relativa
Alliaceae	<i>Allium cepa</i> L.	Cebolla	Barbas	Infusión/Oral	Dolor de muela	1	0.37
Arecaceae	<i>Cocos nucifera</i> L.	Coco	Barbas	Infusión/Oral	Dolor de muela	1	0.57
Asphodelaceae	<i>Aloe vera</i> L.	Sábila	Penca	Infusión/ Oral y pomada/ Cutánea	Cicatrización de heridas, gastritis y dolor muscular	2	1.10
Asteraceae	<i>Artemisia vulgaris</i> L.	Ajenjo	Hojas	Infusión/Oral	Dolor estomacal	8	0.37
Asteraceae	<i>Artemisia mexicana</i> Nutt.	Estafiate	Hojas y tallo	Infusión/Oral	Masticado/oral	4	0.37
Asteraceae	<i>Brickellia cavanillesii</i> Cass.	Prodigiosa	Hojas	Infusión/Oral	Dolor estomacal y diarrea	1	0.74
Asteraceae	<i>Matricaria recutita</i> L.	Manzanilla	Toda la planta	Infusión/Oral	Dolor estomacal, dolor de pecho, gripe e infección en los ojos	20	1.67
Asteraceae	<i>Cyclolepis genistoides</i> D. Don	Palo azul	Tallo	Infusión/Oral	Infección urinaria	1	0.57
Asteraceae	<i>Cynara scolymus</i> L.	Alcachofa	Hojas	Infusión/Oral	Triglicéridos y colesterol alto, dolor articular	1	0.90
Asteraceae	<i>Tagetes lunulata</i> L.	Cinco llagas	Hojas	Infusión/Oral	Dolor estomacal	2	0.37
Asteraceae	<i>Tanacetum parthenium</i> L.	Santa maría	Toda la planta	Infusión/Oral	Diarrea	2	0.57
Brassicaceae	<i>Camelina sativa</i> L.	Camelina	Flor	Infusión/Oral	Tos	1	0.37
Equisetaceae	<i>Equisetum myriochaetum</i> Cham.	Cola de caballo	Toda la planta	Infusión/Oral	Dolor estomacal y Ardor al orinar	7	0.74
Fabaceae	<i>Lathyrus odoratus</i> L.	Clarín	Hojas	Pomada/ Cutánea	Cosquilleo o dolor nasal	1	0.54
Lamiaceae	<i>Marrubium vulgare</i> L.	Marrubio	Hojas	Infusión/Oral	Dolor estomacal y cólicos	2	0.74
Lamiaceae	<i>Melissa officinalis</i> L.	Toronjil	Toda la planta	Infusión/Oral	Dolor estomacal y dolor de pecho	7	0.54
Lamiaceae	<i>Mentha spicata</i> L.	Hierbabuena	Hojas y ramas	Infusión/Oral	Dolor estomacal, vómito, tos y dolor de pecho	12	1.47
Lamiaceae	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Albahaca	Hojas	Infusión/Oral	Dolor de estómago, cólicos, dolor de parto	11	0.90
Lamiaceae	<i>Origanum majorana</i> L.	Mejorana	Hojas	Infusión/Oral	Dolor de pecho	2	0.37
Lamiaceae	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Romero	Tallo y hojas	Infusión/ Oral y jabón/ Cutánea	Dolor estomacal y limpieza de heridas cutáneas	6	0.74
Lamiaceae	<i>Teucrium marum</i> L.	Maro	Hojas	Infusión/Oral	Dolor de muela, cólicos y todas las demás enfermedades	7	1.10
Lamiaceae	<i>Thymus vulgaris</i> L.	Tomillo	Toda la planta	Infusión/Oral	Dolor estomacal, cólicos, pulmonía, dolor de pecho e infección urinaria	17	1.84
Lauraceae	<i>Cinnamomum verum</i> J. Presl	Canela	Tallo	Infusión/Oral	Dolor estomacal	1	0.37
Malvaceae	<i>Tilia platyphyllos</i> Scop.	Tila	Hojas y tallos	Infusión/Oral	Dolor estomacal y cólicos	6	0.74
Myrtaceae	<i>Eucalyptus</i> L'Hér.	Eucalipto	Hojas	Pomada/ Cutánea	Congestión nasal	5	0.57
Oleaceae	<i>Fraxinus ornus</i> L.	Mana	Rama	Infusión/Oral	Dolor de pecho	1	0.97
Pinaceae	<i>Cedrus Trew.</i>	Cedro	Hojas	Infusión/Oral	Gripe	1	0.57
Poaceae	<i>Zea mays</i> L.	Elote	Barbas	Infusión/Oral	Limpieza riñón	1	0.37
Polemoniaceae	<i>Loeselina mexicana</i> Lam.	Espinosillo	Tallo	Infusión/Oral	Fiebre en niños	1	0.57
Ranunculaceae	<i>Ranunculus acris</i> L.	Riel de oro	Toda la planta	Infusión/Oral	Dolor de pecho	2	1.17
Rubiáceas	<i>Pentas lanceolata</i> Forssk.	Estrellita	Flores	Infusión/Oral	Dolor estomacal	1	0.37
Rutaceae	<i>Citrus limon</i> L.	Limón	Hojas	Infusión/ Oral y pomada/ Cutánea	Dolor estomacal y gripe	3	0.74
Rutaceae	<i>Ruta graveolens</i> L.	Ruda	Hojas y ramas	Infusión/Oral	Dolor de oído, vómito y dolor de pecho	7	1.10
Solanaceae	<i>Cestrum fasciculatum</i> Schlttdl.	Hierba del perro	Toda la planta	Infusión/Oral	Dolor estomacal, diarrea e indigestión	10	0.90
Zingiberaceae	<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	Jengibre	Raíz	Infusión/Oral	Triglicéridos y colesterol alto, dolor articular	6	1.50

21° Verano de la Ciencia de la Región Centro. Junio-agosto 2019

Lauraceae	<i>Persea americana</i>	Aguacate	Bola / Hojas	Infusión/Oral	Bronquitis/Dolor de garganta y cuerpo cortado	2	1.10
Poaceae	<i>Phalaris canariensis</i>	Alpiste	Granos	Licuada/Oral	Reduce colesterol en sangre	3	0.37
Apiaceae	<i>Pimpinella anisum</i>	Anís	Planta completa	Infusión/Oral	mal de aire	1	0.37
Illiciaceae	<i>Illicium verum</i>	Anís estrella	Semilla	Infusión/Oral	Empacho de bebés	3	0.37
Asteraceae	<i>Arnica montana</i>	Árnica	Planta completa	Infusión/Oral	Heridas/Golpes internos	5	0.74
Iridaceae	<i>C. sativus</i>	Azafrán o Carcuma	Raíz	Infusión/Oral	Antiinflamatorio	1	0.77
		Azahates	Tallo y flor	Infusión/Oral	Nervios	4	0.37
Boraginaceae	<i>B. officinalis</i>	Borraja	Planta completa/ flor y hoja	Infusión/Oral	Calentura	4	0.57
Pinaceae	<i>Cedrus</i>	Cedrón	Tallo y hojas	Infusión/Oral	Relajar	2	0.77
Papaveraceae	<i>Argemone gaida6</i>	Chicalote	Flor	Infusión/Oral	Dolor de muela	1	0.37
Zingiberaceae	<i>Curcuma longa</i>	Curcuma	Raíz	Infusión/Oral	Diarrea	3	0.57
Crassulaceae	<i>Sedum morgianum</i>	Dedito de dios	Hoja	Maceración/ Cutánea	Para quitar mezquinos	3	0.37
Asteraceae	<i>Taraxacum officinale</i>	Diente de León	Hojas	Infusión/Oral	Dolor de estomago	1	0.37
Amaranthaceae	<i>Dysphaniambrosioides</i>	Epazote	Tallo y hojas	Infusión/Oral	Abortivo	1	0.37
Amaranthaceae	<i>Chenopodium graveolens</i>	Epazote de zorrillo	Hoja morada/tallo	Infusión/Oral	Tos/Diarrea	2	0.94
Nyctaginaceae	<i>Bougainvillea</i>	Flor de Bugambilia	Flor	Infusión/Oral	Tos	1	0.57
Malvaceae	<i>C. pentadactylon</i>	Flor de manita	Hojas	Infusión/Oral	Dolor de cabeza	3	0.57
Euphorbioideae	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	Flor de noche buena	Hoja	Infusión/Oral	Abortivo	2	0.37
Zygophyllales	<i>Larrea tridentata</i>	Gobernadora	Tallo y hojas	Infusión/Oral	Cálculos renales	4	0.57
Scrophulariaceae	<i>Verbascum thapsus</i>	Gordolobo	Flor	Infusión/Oral	Tos	2	0.57
Annonaceae	<i>Annona muricata L.</i>	Guanábana	Hojas	Infusión/Oral	Cáncer, diabetes, asma, hipertensión	1	1.47
Asteraceae	<i>A absinthium</i>	Hierba maestra	Hojas	Infusión/Oral	Corajes	1	0.57
Apiaceae	<i>F vulgare</i>	Hinojo	Tallo y hojas	Infusión/Oral	Dolor de estomago y muscular/Corajes	2	1.30
Lauraceae	<i>Persea americana</i>	Hojas de aguacate	Hojas	Infusión/Oral	Dolor de garganta y cuerpo cortado	2	0.94
Zingiberaceae	<i>Zingiber officinale Rosc.</i>	Jengibre	Raíz	Infusión o licuada verde/Oral	Bajar de peso, defensas / Diurético/Gripa	6	1.50
Crassulaceae	_____	kalanchoe	Tallo y hojas	Infusión/ Cutánea/ baños de asiento	Hemorroides, cáncer	1	0.94
Linaceae	<i>L usitatissimum</i>	Linaza	Semilla	Remojada/Oral	Gastritis, colitis, digestión	1	0.90
Moringaceae	<i>Moringa Oleifera</i>	Moringa	Hojas/semillas y hojas	Infusión/Oral	Diabetes, Hepatitis, Bronquitis, Hipertensión/Bajar de peso, colesterol	6	2
Rosaceae	<i>Eriobotrya gaida6ca</i>	Níspero	Hojas	Infusión/Oral	Asma	3	0.57
Lamiaceae	<i>Origanum vulgare</i>	Oregano	Tallo y hojas	Infusión/Oral	Tos con flema/ciclos menstruales	8	0.94
Ericaceae	<i>Arctostaphylos pungens</i>	Pingüica	Fruto	Infusión/Oral	Diurético	2	0.57
Rosaceae	<i>Rosa gallica</i>	Rosa de castilla	Flor	Infusión/ Ocular	Infección de ojos	2	0.57
Euphorbiaceae	<i>Croton lechleri</i>	Sangre de grado	Hoja	Maceración/ Cutánea	Para Caída de cabello	3	0.57
		Seno de mujer	Semilla	Infusión/Oral	Diabetes	2	0.57
Crassulaceae	<i>Sempervivum spp</i>	Siempre viva	Hojas	Maceración/ Ocular	Cataratas	1	0.37
Sterculiaceae	<i>Waltheria spp</i>	Tapa cola	Tallo y hojas	Infusión/Oral	Infección del estomago	1	0.57
Fabaceae	<i>M tenuiflora</i>	Tepezcohuite	Planta completa	Maceración/ Cutánea	Para quemaduras	1	0.57

La forma en que las personas administran las plantas medicinales es principalmente en forma de infusión (tabla 1). La mayoría de los entrevistados cultivan las plantas en sus mismas casas, mientras otra parte las obtienen del campo o las compran para hacer uso de ellas. Por la ausencia de un hospital y médicos operando en la zona, todas las personas que fueron entrevistadas prefieren el uso de plantas medicinales para sanar ciertas enfermedades y dolencias. Además, la falta de recursos como dinero, transporte y seguro médico son otras de las causas por las cuales se prefieren este tipo de alternativas.

Tabla 2. Combinaciones de especies de plantas utilizadas con fines medicinales en San Vicente, Dolores Hidalgo C. I. N., Guanajuato, México

Especie y parte de la planta usada	Especie y parte de la planta usada	Especie y parte de la planta usada	Especie y parte de la planta usada	Malestar/Síntomas	Menciones
<i>Artemisia vulgaris</i> (Planta completa)	<i>Solanum lycopersicum</i> (Hojas)			Dolor de estómago	1
<i>Cynara scolymus</i> L. (Hoja)	<i>Zingiber officinale</i> Rosc. (Raiz)			Triglicéridos, Articulación, Colesterol	1
<i>Allium cepa</i> (Barbas)	<i>Teucrium marum</i> L. (Hojas)			Dolor de Muela	1
<i>Cestrum fasciculatum</i> Schltl. (planta completa)	<i>Cinnamomum verum</i> J.Presl (Tallo)			Empacho, Dolor de estómago, diarrea	1
<i>Matricaria recutita</i> (planta Completa)	<i>Thymus vulgaris</i> L. (Planta completa)	<i>Cinnamomum verum</i> J.Presl (Tallo)		Dolor de cabeza, Dolor de estómago, nervios y gripe	1
<i>Teucrium marum</i> L. (Planta entera)	<i>Thymus vulgaris</i> L. (Planta completa)			Todas las enfermedades	1
<i>Brickellia cavanillesii</i> Cass. (Hojas)	<i>Solanum lycopersicum</i> (Hojas)			Dolor de estómago y diarrea	1
<i>Ruta graveolens</i> (Planta completa)	<i>Thymus vulgaris</i> L. (Planta completa)	<i>Melissa officinalis</i> L. (planta completa)	<i>Ruta graveolens</i> (Planta completa)	Dolor de aire	1
<i>Thymus vulgaris</i> L. (Planta completa)	<i>Ocimum basilicum</i> (Hojas)	<i>Teucrium marum</i> L. (Hojas)	<i>Fraxinus ornus</i> L. (Ramas)	Dolor de estómago, Aire	1
<i>Thymus vulgaris</i> L. (Planta completa)	<i>Cinnamomum verum</i> J.Presl (Tallo)			Dolor de pecho, espalda y estómago	1

IV. DISCUSIÓN

Muchas personas en la actualidad han tenido experiencia con las recetas de sus antepasados para dolores de cabeza, malestares, irregularidad menstrual, náuseas, hemorragias nasales, dolor de hombros y otros síntomas. El uso de las plantas medicinales (tanto como uso interno como para uso externo con compresas o emplastos) a menudo puede lograr una rápida solución del problema. Es importante mencionar que muchas de las especies de plantas medicinales que utilizan los habitantes de estas zonas de bajos recursos, crecen de manera silvestre y han sido aprovechadas por la gente de la comunidad para solucionar algunos problemas de salud, por lo que las plantas medicinales siguen siendo culturalmente adecuados como tratamientos para varias enfermedades (Andrade-

Cetto, 2009; Alejandro et al., 2010). Sin embargo, estudios previos indican que los huertos familiares son los principales lugares donde se encuentran las plantas medicinales y donde se da el flujo de conocimiento del uso múltiple de cada una de las especies y es donde se da la transmisión y la adquisición del conocimiento (Alejandro et al., 2010).

Estudiando la diversidad biológica de plantas relacionadas con su uso tradicional como medicamentos nos puede llevar a entender cómo actúan y asegurar la explotación nacional de los recursos y su posterior desarrollo como fitomedicinas (Andrade-Cetto, 2009). Gran parte de la investigación indica que vivir lejos de los centros urbanos, vivir en la pobreza y tener bajos niveles de educación son los principales impulsores de la preferencia de las personas por la medicina tradicional (Reimers et al., 2018). En el caso del estudio hecho se pudo observar que las razones son, el hecho de vivir alejados de los centros urbanos así como el bajo nivel de educación ya que la gran mayoría de las personas entrevistadas solo han terminado la primaria.

Los resultados mostraron que las principales dolencias tratadas por la flora medicinal en San Vicente y San Marcos, Dolores Hidalgo C. I. N, son las enfermedades del sistema digestivo y enfermedades endocrinas, además existe un consenso sobre las plantas utilizadas para tratarlas. Esto puede ser consecuencia de que la población considera que este tipo de dolencias no son graves y creen prudente el curarlas con las plantas medicinales que se encuentran a su alcance.

V. CONCLUSIÓN Y REFERENCIAS

El estudio demostró la importancia de una amplia variedad de plantas en la práctica de curación o tratamiento de enfermedades entre los habitantes de Dolores Hidalgo. Sin embargo, se requiere de estudios toxicológicos, farmacológicos y fitoquímicos de las diversas plantas medicinales mencionadas por los habitantes para evaluar y evidenciar su uso tradicional.

VI. RECONOCIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad de Guanajuato por haberme abierto las puertas para realizar mi proyecto dentro de sus instalaciones, así como al Dr. Angel Josabad Alonso Castro por su apoyo y orientación, de igual manera a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por las facilidades y el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano.

REFERENCIAS

- [1] Alejandro, M., Alberto, M., Gama Campillo, L. M., & Mariaca Méndez, R. (2010). El uso de las plantas medicinales en las comunidades Maya-Chontales de Nacajuca, Tabasco, México. *Polibotánica*(29), 213-262.
- [2] Alonso-Castro, A. J., Maldonado-Miranda, J. J., Zarate-Martinez, A., del Rosario Jacobo-Salcedo, M., Fernández-Galicia, C., Figueroa-Zuñiga, L. A., Reyes-Munguía, A. (2012). Medicinal plants used in the Huasteca Potosina, Mexico. *Journal of ethnopharmacology*, 143(1), 292-298.
- [3] Andrade-Cetto, A. (2009). Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, México. *Journal of ethnopharmacology*, 122(1), 163-171.
- [4] Del Carmen Juárez-Vázquez, M., Carranza-Álvarez, C., Alonso-Castro, A. J., González-Alcaraz,

- V. F., Bravo-Acevedo, E., Chamarro-Tinajero, F. J., & Solano, E. (2013). Ethnobotany of medicinal plants used in Xalpatlahuac, Guerrero, México. *Journal of ethnopharmacology*, 148(2), 521-527.
- [5] Gómez Álvarez, R. (2012). Plantas medicinales en una aldea del estado de Tabasco, México. *Revista fitotecnia mexicana*, 35(1), 43-49.
- [6] Hurtado Rico, N. E., Rodríguez Jiménez, C., & Aguilar Contreras, A. (2006). Estudio cualitativo y cuantitativo de la flora medicinal del municipio de Copándaro de Galeana, Michoacán, México. *Polibotánica*(22), 21-50.
- [7] Reimers, E. A. L., Cusimamani, E. F., Rodríguez, E. A. L., del Valle, J. M. Z., Polesny, Z., & Pawera, L. (2018). An ethnobotanical st.
- [8] INEGI. (2019b). Archivo histórico de localidades geoestadísticas. Recuperado el 4 de Julio, 2019, from <https://www.inegi.org.mx/app/geo2/ahl/>
- [9] INEGI (Cartographer). (2019c). Espacio y datos de México. Recuperado de <https://www.inegi.org.mx/app/mapa/espacioydatos/default.aspx?ag=110140317>
- [10] Reimers, E. A. L., Cusimamani, E. F., Rodríguez, E. A. L., del Valle, J. M. Z., Polesny, Z., & Pawera, L. (2018). An ethnobotanical study of medicinal plants used in Zacatecas state, Mexico. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 87(2).
- [11] Sepúlveda Garza, M. (2014). Tradiciones y Transiciones en las organizaciones productivas del México mestizo: Dolores Hidalgo, Guanajuato. *Diálogo andino* (43), 77-89.
- [12] SEDESOL. (2013). Catálogo de Localidades Retrieved 2 de julio, 2019, from <http://www.microrregiones.gob.mx/catloc/contenido.aspx?refnac=110140317>

Etnografía y muestreo poblacional de comunidades nativas del Bajío. Caso: La Cruz del Palmar, San Miguel de Allende

Diana Paola Morales Martínez

Universidad de Guanajuato
Noria Alta s/n
dp.mr.mtz@gmail.com

Asesor: Karla Sandoval Mendoza

LANGEBIO-UGA, Cinvestav
Irapuato - Guanajuato, México
karla.sandoval@cinvestav.mx

Resumen — La etnografía es una herramienta cualitativa antropológica muy utilizada, que ofrece una perspectiva verosímil de la dinámica y estructura sociocultural de las poblaciones humanas. Su relevancia en este trabajo es la de proporcionar un panorama actualizado y contextualizado de las poblaciones nativas del Bajío, región Centronorte-Occidente de México, con el objetivo de diseñar las mejores estrategias para realizar diversos muestreos poblacionales de rigor científico ético, consentido y respetando sus usos y costumbres. La elaboración de etnografías serán la base para el diseño correcto de un muestreo poblacional, en el que se coleccionará información genealógica, histórica, antropométrica y material biológico, para estudiar la estructura genética de las poblaciones nativas de la zona del Bajío. Esta región resulta relevante por su ubicación en el territorio mexicano, en la que el desarrollo económico, urbano y social que ha tenido hasta hoy genera un impacto en la dinámica poblacional y sociocultural de los grupos originarios del lugar, como son Otomíes, Chichimecas Jonáz, Nahuas, Pames y Huicholes. El estudio antropogenético de las poblaciones nativas contribuirá al conocimiento sobre su contexto tanto cultural como genético en el Bajío Mexicano.

Palabras clave — Etnografía, Bajío, genética de poblaciones, Grupos nativos de México.

Abstract — Summary - Ethnography is a widely used anthropological qualitative tool, offering a credible perspective on the socio-cultural dynamics and structure of human populations. Its relevance in this work is to provide an updated and contextualized panorama of the native populations of the Bajío, West region of Mexico, to design the best strategies to carry out diverse population samplings of ethical scientific rigor, consented and respecting their uses and customs. The elaboration of ethnographies will be the base for the correct design of a population sampling, in which genealogical, historical, anthropometric information and biological material will be collected to study the genetic structure of the native populations of the Bajío zone. This region is relevant because of its location in the Mexican territory, in which the economic, urban and social development that it has had until today generates an impact on the population and sociocultural dynamics of the original groups of the place, such as Otomies, Chichimecas Jonaz, Nahuas, Pames and Huicholes. The anthropogenetic study of native populations will contribute to the knowledge about their cultural and genetic context in the Mexican Bajío.

Keywords — Ethnography, Bajío, Population genetics, Mexican native groups.

I. INTRODUCCIÓN

El estudio de la variabilidad genética de poblaciones nativas o indígenas actuales y mestizas, nos permite tener un mejor entendimiento sobre, algunos aspectos relacionados con la dinámica social, cultura y demográfica de determinada población. Es un acercamiento más objetivo para resolver varias de las preguntas antropológicas más relevantes y clásicas como; las posibles rutas migratorias de los primeros pobladores, en este caso de la zona del Bajío, ¿quiénes eran?, ¿de dónde venían?, ¿eran solo un grupo?, ¿las poblaciones

nativas actuales asentadas en esta zona son los descendientes de esos primeros pobladores?, ¿Cómo y cuándo fue el poblamiento a esta zona?, entre otras.

Conocer la estructura genética de las poblaciones nativas y mestizas, en conjunto con la información recabada de un buen estudio etnográfico de las comunidades, son una ventana para conocer más detalladamente la historia y el estado actual de la comunidad de estudio. Con esta información recabada, la obtenida por medio de cuestionarios genealógicos y entrevistas, así como las mediciones antropométricas de los participantes, y su análisis estadístico en conjunto, nos permitirá evaluar las hipótesis generadas de otros campos como la historia y la arqueología. También la información de la estructura genética de la población estudiada será contextualizada y por lo tanto mejor entendida.

El uso de estas técnicas nos proporcionará información genealógica, histórica, antropométrica y material biológico (muestras para analizar su ADN) todas relevantes para tener un mejor entendimiento sobre, el poblamiento, la conformación actual y la estructura genética de las poblaciones nativas de la zona del Bajío. Región relevante por su ubicación en el territorio mexicano, en la que el desarrollo económico, urbano y social que ha tenido hasta hoy genera un impacto en la dinámica poblacional y sociocultural de los grupos originarios del lugar, como son Otomíes, Chichimecas Jonáz, Nahuas, Pames y Huicholes.

Zona del Bajío

El Bajío se puede entender como el conjunto de planicies intercomunicadas en el sur del actual estado de Guanajuato, junto con las partes adyacentes de Querétaro, Michoacán y Jalisco. Tiene una elevación de alrededor de 1600 a 2000 metros sobre el nivel del mar. Esta región tiene como límite una serie de elevaciones orográficas: al oriente los altos de Querétaro y la sierra de Amealco; al poniente la sierra de Pénjamo; al norte la sierra de Guanajuato; y al sur las serranías que constituyen la vertiente septentrional del Eje Neovolcánico. El Bajío está regada por el río Lerma, que procede del valle de Toluca, y por sus afluentes, los ríos Querétaro-Apaseo, Laja, Guanajuato y Turbio. Incluye las ciudades de León, Irapuato, Salamanca, Celaya y Querétaro. Siguiendo el río Laja hacia el norte, se incluyen en esta región Comonfort (antiguamente Chamacuero), San Miguel de Allende y Dolores Hidalgo. Siguiendo el río Guanajuato, se llega a la ciudad con el mismo nombre, en una cañada de la sierra de Guanajuato. El Bajío corresponde al Centro-Norte de México, entre el Centro de México y el Altiplano Septentrional (Álvarez, 1987-1988: II, 816-817).

El Bajío prehispánico era una zona fronteriza en dos sentidos. En primer lugar estaba la frontera cultural, borrosa y fluctuante, que corría de Poniente a Oriente, marcando el límite entre mesoamericanos y chichimecas. Durante el segundo milenio a. C. y los primeros siglos del siguiente, el Bajío estaba habitado por cazadores y recolectores, quedándose al margen del surgimiento de las aldeas agrícolas y los incipientes centros urbanos en los valles centrales de México. Hacia el siglo VI a. C., la cultura mesoamericana se extendió hasta el Bajío. A partir de entonces y hasta el siglo X, esta región formó parte de Mesoamérica, participando en esta gran red de interacción cultural. La retracción de la frontera norte de Mesoamérica se dio del siglo X al XII. En ese lapso hubo asentamientos vinculados con los toltecas de Tula, notablemente El Cerrito, en el Bajío oriental. Durante los últimos siglos de la época Prehispánica, el Bajío estaba bajo el control de los nómadas, con la excepción de ciertos asentamientos tarascos al norte del río Lerma que fueron abandonados antes de la llegada de los españoles (Braniff, 2001; Cárdenas, 1999; Crespo,

1991).

La segunda frontera fue de tipo lingüístico. Corría de Norte a Sur, dividiendo el Bajío en dos, con yutonahuas en el Poniente y otopames en el Oriente. El territorio ancestral de los yutonahuas fue en el Occidente de México, incluyendo parte del Bajío. Del siglo VI al XIII, más o menos, hubo migraciones nahuas hacia el Oriente y el Sur. Los nahuas eran los más mesoamericanos de la familia yutonahua. Otros grupos yutonahuas eran nómadas. Los otopames del Norte (pames y chichimecos jonaces) eran nómadas y los del Sur (otomíes, mazahuas, matlatzincas y ocuiltecos) eran mesoamericanos. La presencia tarasca en el Bajío resalta aún más el carácter plurilingüe de esta región (Wright, 1999a). [1,2]

Actualmente una diversidad de etnias permanece en pequeñas comunidades por todo el estado, producto de los fenómenos demográficos que han acontecido en la zona del Bajío. Según datos del INPI en un censo realizado en el estado de Guanajuato en 2005, las poblaciones indígenas con presencia de más de 1000 habitantes son las que siguen:[3]

Tabla 1. Poblaciones indígenas con más de 1000 habitantes

	Población	Hombres	Mujeres	Total
1	Otomí	2481	2838	5319
2	Chichimeca Jonáz	2134	2090	4224
3	Nahuatl	1953	2166	4119
4	Mazahua	1713	1308	3021
5	Tarasco	565	531	1096
6	Mixe	673	374	1047

Los otomíes, el grupo con mayor población, tienen presencia en los municipios de Tierra Blanca, Dolores Hidalgo, San Miguel de Allende, Comonfort, Apaseo el Alto y Cortazar.

En San Miguel de Allende existen alrededor de 27 comunidades registradas por la Secretaría de Desarrollo Social y Humano del Estado de Guanajuato, algunas de ellas situadas en asentamientos prehispánicos a lo largo del Río Laja, como es el caso de la comunidad La Cruz del Palmar, referente actual de un asentamiento prehispánico otomí que comenzó en el año 1250 y en donde la comunidad actual se fundó en el año 1516.[4]

La importancia de los asentamientos prehispánicos en la rivera del río Laja, radica en la cercanía que poseen con la zona arqueológica Cañada de la Virgen (principal asentamiento de la zona del Bajío), la cual se ubica en la cuenca central de dicho río. Cañada de la Virgen fue uno de los asentamientos que se desarrollaron en la región centro norte del país y que lograron constituirse como sociedades complejas y multiculturales. Actualmente es un referente para interpretar explicar y entender a los viejos habitantes que vivieron en los límites sureños de una región septentrional de la Mesoamérica. La cuenca central del río Laja, donde se asienta Cañada de la Virgen (y más de noventa asentamientos prehispánicos) representó entre 540 a 1050 d. c., el lugar de establecimiento de un dominio religioso y jerárquico que se apoyó en el manejo de los calendarios para el desarrollo de los sistemas agrícolas y para la sacralización de un linaje gobernante.

Sobre el funcionamiento de estos calendarios, la investigadora Rossana Quiroz (2009), al analizar los calendarios nahua y otomí, acentuó que posiblemente el componente humano fundamental en la ritualización de Cañada de la Virgen proviniera de pueblo

otomangués. Actualmente, la investigación de corte lingüístico y etnohistórico indica que el sur de la cuenca del río Laja estuvo poblado, durante el Preclásico Temprano por grupos lingüísticos proto-otomí/mazahua. [5]

II. MARCO TEÓRICO

Un estudio etnográfico o etnografía, es un método de la antropología social de investigación cualitativo que se centra en la observación, descripción profunda e interpretación de una cultura o de un grupo de personas que comparten un espacio geográfico, usos y costumbres, en un periodo determinado.

La etnografía usualmente no sigue una hipótesis deductiva, ni maneja fórmulas estadísticas, se trata de lograr una interacción rica para lograr una narración detallada de la cultura, la historia y las características de un fenómeno social.

La realización de una etnografía se puede resumir en los siguientes 7 pasos:

A. Selección del diseño:

El diseño de nuestro estudio dependerá de su enfoque, es decir del fenómeno social que se quiera comprender. De manera general, esta comprensión se da en tres niveles: el nivel primario o "reporte" es lo que se informa que ha ocurrido (el "qué"); la "explicación" o comprensión secundaria alude a sus causas (el "por qué"); y la "descripción" o comprensión terciaria se ocupa de lo que ocurrió para sus agentes (el "cómo es" para ellos). Difícilmente se entendería una acción sin comprender los términos en que la caracterizan sus protagonistas. En este proyecto, abordaremos los tres niveles de comprensión, en un tiempo corto, lo que denominamos como "etnografía express"

B. Determinación de técnicas:

Para hacer etnografía se emplean dos técnicas de trabajo de campo: la observación y la entrevista.

Observación: Es en donde se da cuenta y se detalla todo lo necesario para hacer una descripción rica en detalles. La observación puede o no ser participante, mientras se observa se puede participar de los fenómenos de estudio. Esto dependerá de como se dé la interacción con las personas del grupo. En el desarrollo de la etnografía que desarrollaremos se realizarán ambas observaciones, la participante, ya que te permite compenetrar en los procesos socioculturales "en vivo" y la no participante, para mantener una distanciamiento que permita mayor objetividad.

Entrevista: Es una conversación en donde el informante nos entrega una buena cantidad de información valiosa sobre un fenómeno. Las preguntas de apertura usualmente son generales y buscan establecer un marco referencial sobre el tema sobre el cual se quiere saber más.

Por el enfoque de ancestría de la población, es de interés para el estudio conocer la genealogía de las personas involucradas, esta información se obtendrá a partir de cuestionarios genealógicos, que ya elaboramos en base a la investigación bibliográfica e histórica realizada. Por la naturaleza de nuestro estudio, es crucial la confirmación y verificación de la pertenencia de los individuos a la comunidad.

Para el registro de datos de ambas técnicas, el etnógrafo puede apoyarse de un diario de campo, representaciones gráficas, elementos audio y/o visuales. Toda la información deberá estar sistematizada por fechas, horas, lugares y personas que intervienen. Se elaborará un diario de campo, con una división y registro de las observaciones subjetivas y objetivas de los procesos estudiados.[6]

C. Acceso al ámbito de investigación:

Es importante que el grupo de estudio esté de acuerdo en ser parte de él, de lo contrario no se podrá acceder al conocimiento que pueden proporcionarnos respecto al fenómeno social que nos interesa.

D. Selección de informantes:

Dentro de la comunidad se elige a una persona o personas, que hayan nacido y vivido ahí. Es necesario que conozcan la dinámica de la población, que tengan una excelente relación con los habitantes y las autoridades, para que el acceso a la información sea sencillo y lo más veraz posible.

E. Recopilación de datos:

Variantes obtenidas en las entrevistas y cuestionarios.

F. Análisis de información:

Se rectificaron los datos sobre el fenómeno social de interés, haciendo comparaciones en la información obtenida a partir de la observación y de algunos informantes, procurando ser lo más objetivos posible.

G. Elaboración del informe:

Después de la revisión de información y la rectificación de datos, se procederá a redactar el informe, en el que se hablará de como la etnografía, responde los aspectos relacionados con cómo realizar el muestreo, quienes serán nuestros principales sujetos de estudio y cómo acercarnos a ellos para que el estudio pueda ser una grata experiencia para todos los participantes.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Antes de relizar una estudio etnográfico y trabajo de campo previo al acercamiento de la comunidad, se ha realizado una amplia investigación bibliográfica, para conocer sobre la historia de la población de estudio, el lugar en donde actualmente se asienta y se ha asentado, así como sus cambios socioculturales a través del tiempo, que la han llevado a la situación en la que se encuentra.

Se ha concluido la investigación bibliográfica, el diseño de cuestionarios y entrevistas contextualizados y dirigidos a la población de estudio, para posteriormente hacer un primer acercamiento a la comunidad La Cruz del Palmar, a través de los líderes y/o representantes de esta. Se les presentará el proyecto y la explicación de la importancia de su participación, además se responderán todas las dudas que surjan en torno al proyecto. Posteriormente, si los líderes de la comunidad aceptan la participación en el proyecto, simultáneamente se les presentará a las autoridades de gobierno, se procederá a realizar el estudio etnográfico de la comunidad “etnografía express”, con el objetivo de diseñar la mejor estrategia(428

adecuadas para realizar un muestreo poblacional, en donde se obtendrá información genealógica, histórica, antropométrica y material biológico (muestras de saliva, sangre o cabello) para analizar el ADN.

IV. RESULTADOS

El principal producto de la estancia de verano 2019, fue el desarrollo y planteamiento del proyecto titulado “Etnografía y muestreo poblacional de comunidades nativas del Bajío. Caso: La Cruz del Palmar, San Miguel de Allende”. Se realizó una investigación bibliográfica e histórica sólida, la cual ofrece un respaldo que servirá de base para la realización de tesis de quien llevo a cabo la estancia de verano. Todo lo anterior ha sido el diseño para poner en práctica lo aprendido, y llevar a cabo una etnografía de la población La Cruz del Palmar, clave para conocer la cultura de la comunidad con la que se estará trabajando, el resultado de esta etnografía será presentado este año en octubre, en el XX Coloquio Internacional de Antropología Física “Juan Comas”, para el cual se realizó un abstract del proyecto y fue sometido a dictamen del comité organizador dicho coloquio, quienes mandaron carta de aceptación para presentar el trabajo en la modalidad de cartel.

Otro resultado fue la experiencia de estar en un instituto de investigación, donde se obtuvo una visión interdisciplinaria de la investigación, ya que el proyecto en el que participé tiene una base social e histórica, pero con las técnicas de biología molecular, la obtención de datos genómicos y su análisis se podrán responder las preguntas de investigación planteadas. Se dejaron listos todos los elementos para realizar una etnografía que nos permita realizar un muestreo poblacional contextualizado en la comunidad de estudio.

V. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El proyecto, además de obtener información de tipo biocultural sobre una de las comunidades del Bajío, busca conocer la estructura genética de la población para incorporarla a los paneles de diversidad actuales de otras poblaciones nativas de México, en donde aún esta ausente esta región. Como contribución extra, además se buscará si existe un parentesco entre la antigua población de la zona arqueológica Cañada de la Virgen, ya que geográficamente esta muy cerca de la comunidad de La Cruz del Palmar, donde habitan los indígenas actuales de la zona, ambas en la cuenca central del Río Laja en San Miguel Allende. Este planteamiento se basa en la información previa que se conoce de Cañada de la Virgen, la cual nos dice que en el sur de la cuenca del río Laja estuvo poblado, durante el preclásico temprano (2500-1200 A.P.), por grupos lingüísticos proto-otomí/mazahua. Sobre la comunidad, la monografía dada por la Secretaría de Desarrollo Social y Humano, indica que se dio un asentamiento otomí en el año 1250 en donde es actualmente Cruz del Palmar. La ubicación geográfica de ambas zonas y el parecido lingüístico nos hace pensar en proponer esta hipótesis.

VI. CONCLUSIONES

Esta estancia de verano, fue relevante en el reforzamiento de algunas habilidades que he desarrollado durante de la carrera como es la búsqueda de referencias, que a pesar de que el planteamiento no es perteneciente a un área con la que me encontraba relacionada,

me fue posible encontrar e identificar la información relevante para el planteamiento del proyecto.

Así como fortalecí algunas habilidades, aprendí otras como el desarrollo de un proyecto interdisciplinario, en el cual es necesario que pueda llegar a relacionarme con otras áreas lo suficiente para conocer la dimensión de su trabajo dentro del proyecto y la forma en que puedo colaborar con el proyecto desde mi área de estudio. Así como la elaboración de un abstract-resumen y el proceso de envío para que sea aceptado en un coloquio internacional. En general, la experiencia de estar en un instituto de investigación me ha estimulado para decidir que quiero seguir preparándome para una carrera académica, probablemente hasta científica.

VII. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Al LANGEBIO, por permitirme el uso de sus instalaciones en la realización de mi verano. Al comité organizador del Verano de la Ciencia Región Centro, por la creación de este espacio de intercambio de conocimiento, que es de gran ayuda para impulsar a más estudiantes a formarse como científicos. A la Universidad de Guanajuato, por el apoyo económico. A los laboratorios del Dr. Rafael Montiel y el Dr. Andrés Moreno, que me permitieron integrarme a sus equipos para conocer sus proyectos y donde conocí personas maravillosas que me han inspirado en continuar con una formación científica. A Ximena Osorio, que fue mi mamá adoptiva por un mes y me trasladaba de mi ciudad al centro de investigación. Y sobre todo a la Dra. Karla Sandoval, quien fue mi guía, inspiración y amiga durante mi estancia de verano, en donde me enseñó sobre las maravillas de su proyecto y me permitió colaborar con ella, espero que así de fructífero y extraordinario sea el tiempo que seguiremos trabajando juntas en esta investigación.

REFERENCIAS

- [1] Carr, D. C. W. *Los pueblos indígenas en la fundación del Real de Minas de Guanajuato*.
- [2] Aguilar R. & J. Falcón. (Primavera de 2006). «*Andar con el hato a cuestras*». *La fundación de villas y pueblos de indios en el valle de los Chichimecas*. Takwá, 9, 53.
- [3] Instituto Nacional de los Pueblos Indígenas. (2005) *ATLAS DE LOS PUEBLOS INDÍGENAS DE MÉXICO*
- [4] Secretaría de Desarrollo Social y Humano. *La Cruz del Palmar, San Miguel de Allende*. Monografía
- [5] Zepeda, G. M. G. (2010). *Cañada de la Virgen; Refugio de los muertos y los ancestros*.
- [6] Guber, R. (2001). *La etnografía: método, campo y reflexividad* (Vol. 11). Editorial Norma.

Evaluación de la capacidad extractiva del aceite de soya para llevar a cabo la recuperación de naproxeno mediante la técnica de extracción líquido-líquido

Diana Laura González Cervantes

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Cerro de las Campanas S/N, Centro
Universitario, Santiago de Querétaro, Qro.
dianagonzalezcrv@gmail.com

Asesora: Teresa Alejandra Razo Lazcano

Universidad de Guanajuato
División de Ciencias Naturales y Exactas,
Departamento de Química
Cerro de la Venada S/N, Colonia Pueblito de
Rocha, Guanajuato, Gto.
teresarazo@ugto.mx

Resumen — La presencia de fármacos en el medio ambiente es una preocupación creciente para los científicos y la población en general. Así, este trabajo propone emplear la técnica de extracción líquido-líquido, usando como fase orgánica un diluyente de origen natural (aceite de soya), para la recuperación de naproxeno presente en aguas residuales. Se estudió la influencia del valor de pH, así como las cinéticas de extracción y desextracción. Los resultados muestran que la extracción fue completa usando como fase acuosa naproxeno en solución a pH 5.2 en un tiempo de 1 minuto. Mientras que porcentajes de desextracción de alrededor del 90 % fueron obtenidos a los 20 minutos de contacto de las fases, utilizando NaHCO_3 0.1M como fase de desextracción.

Palabras clave — Naproxeno, Extracción líquido-líquido, Desextracción.

Abstract — The presence of drugs in the environment is a growing concern for scientists and the general population. Thus, this work proposes to use the liquid-liquid extraction technique to the recovery of naproxen present in wastewater, using a natural diluent (soybean oil) as the organic phase. The influence of the pH value was studied, as well as the extraction and stripping kinetics. The results shown that the extraction was complete in 1 minute, using naproxen in solution at pH 5.2 as the aqueous phase. While stripping percentages of around 90% were obtained after 20 minutes of phases contact, using 0.1M NaHCO_3 as the stripping phase.

Keywords — Naproxen, Liquid-Liquid Extraction, Stripping.

I. INTRODUCCIÓN

Los productos farmacéuticos son sustancias químicas sintéticas o naturales que se pueden encontrar en medicamentos recetados, de venta libre y veterinarios [1]. La presencia de estos compuestos en el medio ambiente es una preocupación creciente para los científicos y la población en general [2]. Estos compuestos se convierten en parte de los desechos humanos y se excretan en el medio ambiente como compuestos y metabolitos principales no metabolizados. Así, se tiene que una alta concentración de éstos ingresa diariamente a las plantas de tratamiento de aguas residuales, a través, de la excreción urinaria o fecal y de las instalaciones de fabricación farmacéutica [3], ocasionando que diversos suministros de agua sean expuestos a sufrir una contaminación generalizada.

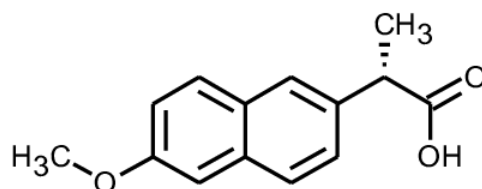


Figura 1. Estructura química del naproxeno.

El naproxeno, ácido orgánico débil perteneciente al grupo de los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) (ver figura 1), es uno de los fármacos más vendidos, en cantidades superiores a los 2000 kg/año y, por lo tanto, más consumidos por la población mexicana, siendo así detectado en aguas residuales en el intervalo de 4200 – 13589 ng.L-1 [4].

Para la remoción de estos contaminantes existen diversos métodos [5]. Dentro de estos métodos se encuentra la técnica de Extracción Líquido-Líquido (ELL). Para llevar a cabo dicho proceso es necesario utilizar diluyentes orgánicos, los cuales usualmente presentan propiedades tóxicas y contaminantes, tales como los derivados del petróleo. Por lo anterior, se propone utilizar un diluyente de origen natural (aceite de soya) y evaluar su capacidad extractiva.

Así, en el presente trabajo se evaluó la capacidad que posee el aceite de soya para llevar a cabo la recuperación de naproxeno, presente en soluciones acuosas, mediante la aplicación de esta técnica y variando diferentes parámetros, tales como: el valor de pH y el tiempo de contacto entre las fases.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Extracción

Se realizó la extracción utilizando como fase acuosa naproxeno (50 ppm) disuelto en una solución de fosfatos a pH 5.2 y 5.5 y como fase orgánica aceite de soya. Se colocaron en contacto volúmenes iguales de ambas fases y se llevaron a agitación (150 rpm) a diferentes tiempos (0.25-60 min.). Una vez terminada la agitación se recuperó la fase orgánica y la acuosa. A esta última se le determinó el valor pH y se le cuantificó la concentración de naproxeno mediante la técnica de Espectroscopía UV/VIS a una longitud de onda de 272 nm.

Los porcentajes de extracción se obtuvieron de la siguiente manera:

$$\%E = \left(\frac{[]_{inicial} - []_{final}}{[]_{inicial}} \right) (100) \quad (1)$$

B. Desextracción

La fase orgánica que se recuperó en la extracción se utilizó para llevar a cabo la desextracción. Primero se utilizó NaOH 0.1 M como fase acuosa de desextracción, ésta se colocó en contacto con la fase orgánica a volúmenes iguales y se llevó a agitación (150 rpm) por 60 minutos. Lo anterior se repitió pero con una solución de NaHCO₃ 0.1M, sin embargo, con esta solución se realizó a diferentes tiempos de agitación (1-180 min.). Transcurrido el tiempo, se recuperó la fase acuosa de desextracción, a la cual se le

determinó el valor pH y se le cuantificó la concentración de naproxeno mediante la técnica de Espectroscopía el UV/VIS a una longitud de onda de 272 nm.

Los porcentajes de desextracción se obtuvieron de la siguiente manera:

$$\%DES = \left(\frac{[\text{fase orgánica}]}{[\text{fase acuosa}]} \right) (100) \quad (2)$$

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo al comportamiento observado del naproxeno en procesos de extracción realizados en estudios anteriores, se determinó que un valor de pH 5.5 era el adecuado para preparar la fase acuosa [6]. Sin embargo, como en este proyecto la fase orgánica sería diferente, se procedió a realizar el proceso de extracción utilizando como fase acuosa naproxeno disuelto en solución de fosfatos tanto a pH 5.2 como 5.5. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.

A partir de la tabla se puede observar que conforme se aumenta el valor de pH, el porcentaje de extracción disminuye. Esto es debido a que cuando el pH se hace más básico, es decir, a valores superiores al valor del pKa del fármaco (4.2), el naproxeno va adquiriendo carga negativa, evitando de esta manera ser extraído hacia fase orgánica [7]. Por lo anterior, se determinó que un valor de pH de 5.2 sería el óptimo para realizar los estudios posteriores.

Así, establecido el valor de pH al cual se realizaría el proceso de extracción, se procedió a estudiar la naturaleza de la fase acuosa de desextracción. Se utilizaron dos soluciones, una de NaOH 0.1 M y otra de NaHCO₃ 0.1 M. La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos.

Como se puede apreciar utilizando NaOH 0.1 M como fase acuosa de desextracción no se obtuvo un porcentaje de desextracción. Esto fue debido a que al recuperar la fase acuosa se observó que ésta era muy turbia, por lo cual no fue posible llevar a cabo la cuantificación del fármaco (Figura 2 (B)). Sin embargo, al utilizar NaHCO₃ 0.1 M como fase acuosa de desextracción, se obtuvo que ésta presentaba nula o una muy ligera turbidez al separar las fases, lo que permitió cuantificar el fármaco en la misma y obtener porcentajes de desextracción de alrededor del 92.4% (Figura 2 (A)). Así, se determinó que una solución de NaHCO₃ 0.1M sería la óptima para llevar a cabo el proceso de desextracción.

Tabla 1. Porcentaje de extracción obtenido a diferentes valores de pH. Fase acuosa: Npx (50 ppm) disuelto en solución de fosfatos; Fase orgánica: aceite de soya; $V_{\text{agitación}} = 150 \text{ rpm}$; $t_{\text{agitación}} = 60 \text{ min}$.

pH.	%Extracción.
5.2	90.6
5.5	84.7

Tabla 2. Porcentajes de desextracción en función de la naturaleza de la fase acuosa de desextracción. Fase acuosa: NaOH 0.1 M y NaHCO₃ 0.1 M; Fase orgánica: aceite de soya + NPX, $V_{\text{agitación}}: 150 \text{ rpm}$; $t_{\text{agitación}}: 60 \text{ min}$.

Fase acuosa de desextracción.	% Desextracción.
NaOH 0.1 M	----
NaHCO ₃ 0.1 M	92.4

Establecidas las condiciones de extracción y desextracción, se procedió a llevar a cabo las cinéticas de extracción y desextracción. Las Figuras 3 y 4 muestran los resultados obtenidos.

Analizando las figuras, se puede apreciar que la cinética de extracción es muy rápida, mientras que la cinética de desextracción es un poco más lenta, sin embargo, no pierde eficacia. De esta manera, se observa que al minuto de contacto entre las fases se obtiene una extracción completa, indicando la alta capacidad extractiva del aceite de soya. En tanto que a los 20 minutos de contacto entre la fase acuosa de desextracción y la fase orgánica con NPX, los porcentajes de desextracción oscilaron alrededor del 90%.

Lo anterior resulta favorable para el objetivo del proyecto, ya que será posible llevar a cabo la separación del fármaco presente en efluentes acuosos en tiempos cortos y con altos porcentajes de extracción y desextracción.

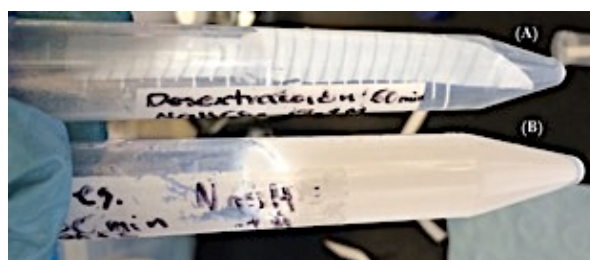


Figura 2. Proceso de desextracción con diferentes soluciones. (A) NaHCO_3 0.1 M; (B) NaOH 0.1 M.

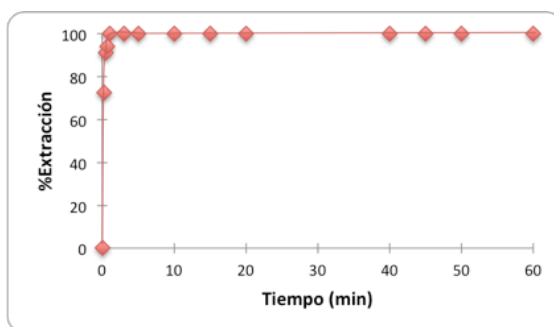


Figura 3. Cinética de extracción de NPX. Fase acuosa: NPX (50 ppm) disuelto en solución de fosfatos pH 5.2; Fase orgánica: aceite de soya; $v_{\text{agitación}}$: 150 rpm.

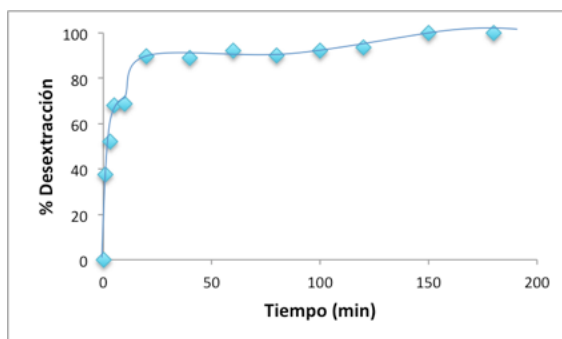


Figura 4. Cinética de desextracción de NPX. Fase acuosa de desextracción: NaHCO_3 0.1M; Fase orgánica: aceite de soya + NPX; $v_{\text{agitación}}$: 150 rpm.

IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

A partir de los resultados antes presentados y discutidos, se encontró que el aceite de soya posee una capacidad extractiva alta para llevar a cabo la recuperación de naproxeno presente en soluciones acuosas mediante la técnica de ELL, ya que se obtuvo un porcentaje de extracción del 100% desde el minuto 1 de contacto entre las fases. Además, se pudo concluir que el NaHCO_3 0.1M resultó ser una solución ideal para llevar a cabo el proceso de desextracción del fármaco, obteniéndose un 90% de desextracción a los 20 minutos de contacto.

Lo anterior, abre la posibilidad a que este sistema compuesto por un diluyente de origen natural se pueda utilizar en un futuro para el tratamiento de aguas residuales que reciben efluentes generados por diversas fuentes, tales como, hospitales o industrias farmacéuticas, ayudando de esta manera a que el medio ambiente sufra menores impactos negativos.

V. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Agradezco a la Dra. Teresa Alejandra Razo Lazcano por haberme brindado su apoyo y conocimientos para llevar a cabo este trabajo; a la Universidad Autónoma de Querétaro por las facilidades proporcionadas y a mis padres por apoyarme en todo este proceso.

REFERENCIAS

- [1] Organización Mundial de la Salud, "Productos farmacéuticos en el agua potable". Disponible en: https://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/info_sheet_pharmaceuticals/es/ [consultado en 2019].
- [2] L. Madikizela, L. Chimuka, "Simultaneous determination of naproxen, ibuprofen and diclofenac in wastewater using solid-phase extraction with high performance liquid chromatography", *Water SA* Vol. 43 No. 2, pp. 264, Abril 2017.
- [3] L. Madikizela, L. Chimuka, "Occurrence of naproxen, ibuprofen, and diclofenac residues in wastewater and river water of KwaZulu-Natal Province in South Africa", *Environmental Monitoring and Assessment*, 189(7), pp. 1-2. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6069-1> [consultado en 2019].
- [4] R. Gibson, JC. Durán-Álvarez, KL. Es, BJ. Cisneros. "Accumulation and leaching potential of some pharmaceuticals and potential endocrine disruptors in soils irrigated with wastewater in the Tula Valley, Mexico". *Chemosphere*. 2010;81:1437-45.
- [5] SEMARNAT, "Agua". Disponible en: https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe_resumen14/06_agua/6_2_3.html#a1_1 [consultado en 2019].
- [6] D. Rivera, "Uso de membranas líquidas emulsionadas para la recuperación de naproxeno" [Tesis de licenciatura]. Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México, 2018.
- [7] K. Ulisse, "Microextracción de fármacos antiinflamatorios no esteroideos desde matrices acuosas usando polímero de impresión molecular inmovilizado en un sistema de disco rotatorio" [Tesis]. Universidad de Chile, Santiago, Chile, 2014.

Evaluación de la promoción del crecimiento de *Sorghum bicolor* en asociación con el hongo *Metarhizium brunneum*

María Guadalupe Mendoza Cervantes

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Cerro de las Campanas S/N, C. P. 76010,
Querétaro, Qro.
gpe.mendoza.c@gmail.com

Asesor: Israel Enrique Padilla Guerrero

Universidad de Guanajuato
División de Ciencias Naturales y Exactas
Departamento de biología
Noria Alta S/N, Col. Noria Alta, C.P. 36050,
Guanajuato, Gto.
ie.padillaquerrero@ugto.mx

Resumen — *Metarhizium* es un hongo entomopatógeno del cuál recientemente se ha reportado su asociación simbiótica con raíces de plantas y capacidad de producir compuestos relacionados con la promoción del crecimiento vegetal. En el presente trabajo se evaluó la capacidad de 8 cepas de *Metarhizium brunneum* para promover el crecimiento de *Sorghum bicolor*. Semillas de sorgo fueron inoculadas con conidios de *M. brunneum*, sembradas y mantenidas en invernadero durante 21 días para después determinar longitud total, de raíz, de tallo y peso seco. Las plantas tratadas con la cepa AT3 presentaron diferencias significativas en longitud de tallo con respecto al control, siendo las tratadas con ésta cepa 37.67% más altas. Para los otros parámetros no se encontraron diferencias significativas.

Palabras clave — *Metarhizium brunneum*, promoción del crecimiento, *Sorghum bicolor*.

Abstract — *Metarhizium* is an entomopathogenic fungus of which its symbiotic association with plant roots and ability to produce compounds related to plant growth promotion has recently been reported. In the present work the capacity of 8 strains of *Metarhizium brunneum* to promote the growth of *Sorghum bicolor* was evaluated. Sorghum seeds were inoculated with conidia of *M. brunneum*, sown and kept in greenhouse for 21 days and then total length, root, stem and dry weight were determined. Plants treated with strain AT3 showed significant differences in stem length with respect to control, those treated with this strain were 37.67% higher. For the other parameters no significant differences were found.

Keywords — *Metarhizium brunneum*, plant growth promotion, *Sorghum bicolor*.

I. INTRODUCCIÓN

Dentro de la aparición de nuevas tecnologías para mejorar los rendimientos de los cultivos y disminuir el impacto negativo al medio ambiente se encuentra el uso de los productos biológicos; es decir incorporar al sistema productivo organismos seleccionados por sus funciones en diversos procesos biológicos. Dentro de este grupo se pueden citar a los microorganismos promotores del crecimiento vegetal. Estos se definen como microorganismos habitantes de la rizósfera que estimulan significativamente el crecimiento de las plantas [1]. Entre los mecanismos por los cuales ejercen efectos positivos sobre las plantas se pueden mencionar: fijación de N₂, solubilización de fósforo (P), capacidad de producir ácidos orgánicos y fosfatasa facilitando la solubilidad del P y otros nutrientes. También se les asocia a la producción de fitohormonas y a la protección contra hongos fitopatógenos [2].

Las especies del género *Metarhizium* (Hypocreales: Clavicipitaceae) son hongos entomopatógenos, ampliamente reconocidos por su potencial de control biológico, pudiendo infectar a más de 200 especies, incluyendo por lo menos siete órdenes de insectos [3]. El

estilo de vida de *Metarhizium* no solo incluye parasito de insectos, sino que también coloniza la rizósfera de las plantas [4]; es encontrado mundialmente en gran variedad de ecosistemas, llegando a alcanzar en suelo concentraciones de hasta 10^6 propágulos por gramo de tierra [5].

Se ha demostrado que *Metarhizium* promueve el crecimiento de plantas de interés agrícola ya que es capaz de traslocar nitrógeno proveniente del insecto que infecta hacia la planta [6] además libera al medio nitrógeno en forma de amonio de manera natural [7]. También estudios recientes han demostrado que *Metarhizium robertsii* produce ácido 3-indolacético, el cual es una fitohormona tipo auxina [8], que ayuda al crecimiento y proliferación de las raíces de las plantas.

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de siete cepas de *M. brunneum* y una cepa de *M. pingshaense* nativas del estado de Guanajuato para promover el crecimiento de sorgo en invernadero.

II. MARCO TEÓRICO

A. Simbiosis plantas y hongos

Simbiosis es una asociación entre dos o más especies diferentes de organismos, esta asociación puede ser permanente, o de larga duración. Los organismos que están involucrados pueden tener beneficios, ser perjudicados, o no ser afectados por la asociación. Más del 90 % de todas las especies de plantas que crecen en la tierra establecen relación simbiótica con hongos y dependen de esta interacción para sobrevivir [9]. Estas relaciones con las plantas son formadas por hongos micorrizas o endófitos. Los hongos endófitos viven en los tejidos de las plantas; incluyendo las raíces [10].

B. Rizosfera

La rizósfera es una zona estrecha de tierra directamente influenciada por las secreciones de la raíz, es el sitio de interacciones complejas entre la plantas, bacterias, hongos, protistas, nematodos e insectos [11]. La rizósfera se caracteriza por potenciar la biomasa y la actividad microbiana [12].

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Obtención de conidios de las cepas de *M. brunneum*

Para el ensayo se utilizaron siete cepas de *M. brunneum* y una cepa de *M. pingshaense* nativas del estado de Guanajuato y pertenecientes a la Colección de Hongos Entomopatógenos del Laboratorio de Genética Molecular de Hongos, Universidad de Guanajuato. Las cepas se crecieron en medio M-100 2N a 26 °C por 12 días. Para coleccionar los conidios se utilizó una solución de Tritón X-100 al 0,1 % (Sigma- Aldrich®) se tomaron los conidios crecidos en caja Petri con una pipeta Pasteur estéril, se filtró con malla de fibra sintética para eliminar micelio y se realizaron 3 lavados con 30 mL de Tritón X-100 al 0.01%,

finalmente se determinó la concentración de conidios/mL mediante la cuenta con hemocitómetro (Hausser Scientific®).

*B. Ensayo en invernadero de la interacción *M. brunneum*--*Sorghum bicolor**

Para inocular las semillas de sorgo se preparó por triplicado una solución de conidios de cada una de las 8 cepas de concentración 1×10^8 conidios/mL en Tritón X-100 al 0,01 %, esta solución se centrifugó para recuperar la pastilla celular, a la que se le adicionaron 250 μ L de una solución de carboximetilcelulosa al 0.5%; la suspensión resultante se agregó a un tubo que contenía 20 semillas de sorgo y se mezcló en vortex durante 1 minuto, para adherir 1×10^6 conidios en cada una de las semillas.

Para la siembra se usó como sustrato Peat Moss esterilizado tres veces en autoclave 20 minutos, 121°C a 2 atm de presión, con el cual se llenaron macetas de plástico de 15x8 cm; en cada una se sembraron 16 semillas de sorgo, previamente tratadas con la solución de conidios y el adherente (solución saturada de carboximetilcelulosa), a 1 cm de profundidad. Después de la siembra cada maceta se regó con 100 mL de agua destilada y se incubaron en invernadero por 21 días manteniéndose un riego de 100 mL de agua destilada cada 48 horas.

Transcurridos los 21 días se analizaron las plantas que germinaron en las 3 macetas sembradas para cada cepa; las plantas se retiraron de las macetas y se lavaron con agua hasta la disgregación del suelo de las raíces para finalmente ser medidas y secadas a 50°C por 72 h determinándose así de cada planta: longitud total, longitud de raíz, longitud de tallo y peso seco.

C. Análisis estadístico

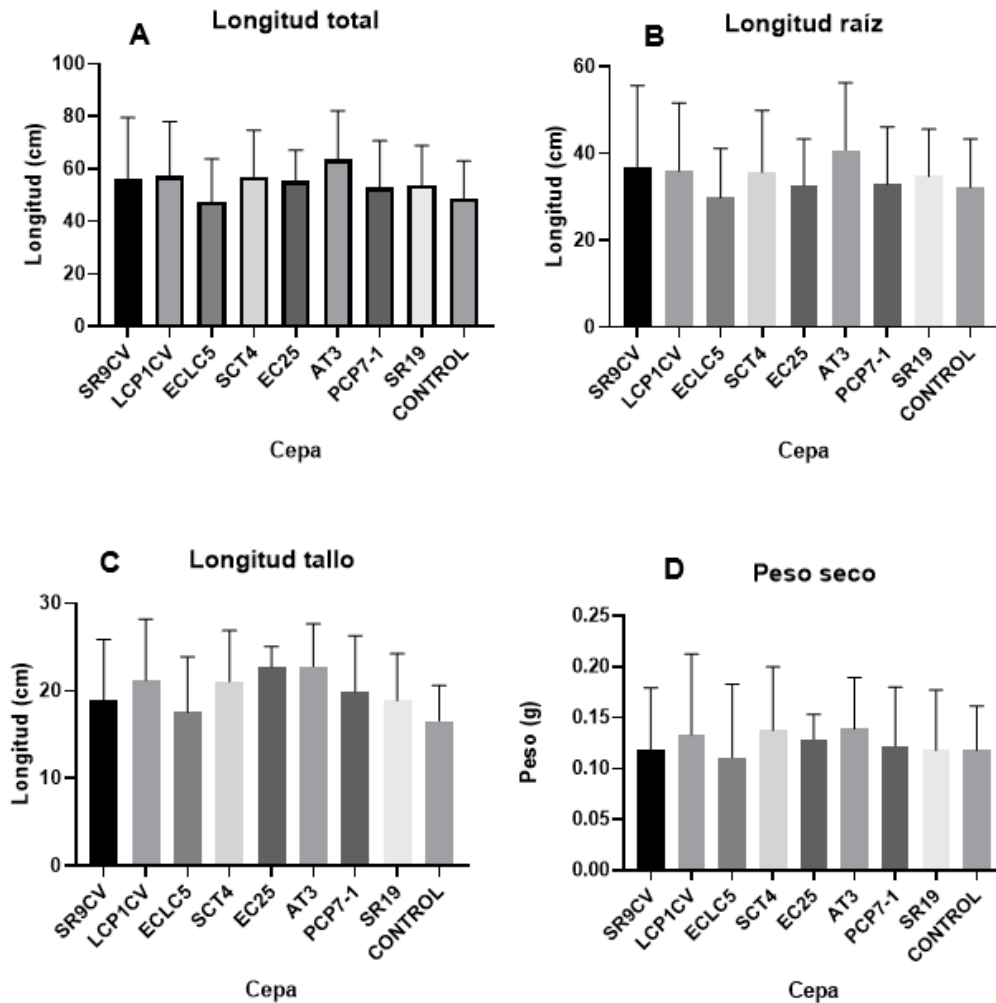
Para el análisis estadístico se consideró cada cepa como un tratamiento. Primero se hizo una comprobación de la distribución normal de los datos mediante la prueba de D'Agostino & Pearson y posteriormente un ANOVA de una vía y una prueba de Tukey de comparación múltiple a un nivel de significancia de 0.05 con el programa GraphPad Prism 8.2.0

IV. RESULTADOS

Mediante la prueba de D' Agostino & Pearson se comprobó que los datos cumplían con una distribución normal para todos los parámetros, por lo que se procedió a hacer la prueba de ANOVA para cada uno. Mediante dicha prueba se determinó diferencias significativas únicamente en Longitud de tallo (Tabla 1) y mediante una prueba de Tukey de comparaciones múltiples ($p=0.05$) se determinó que para este parámetro las plantas tratadas con la cepa AT3 son significativamente diferentes al control siendo las tratadas con AT3 37.67% más altas que las del control (Figura 1).

Tabla 1. Resultados de la prueba de ANOVA para los distintos parámetros.

Parámetro	F	P	R ²
Longitud total	1.293	0.2513	0.0653
Longitud de raíz	0.899	0.5191	0.0463
Longitud de tallo	2.681	0.0088	0.1266
Peso seco	0.4960	0.8576	0.0261

**Figura 1.** Comparación de los distintos tratamientos para: A) longitud total B) longitud de raíz C) longitud de tallo D) Peso seco.

V. DISCUSIÓN (O ANÁLISIS DE RESULTADOS)

La única cepa que tuvo efecto significativo en el crecimiento de sorgo fue la AT3 (*M. brunneum*) al promover la elongación del tallo, generándose plantas con una longitud de tallo 37.67% mayor a las plantas control. Estos datos sugieren que esta cepa podría estar secretando fitohormonas implicadas en la elongación del tallo como giberelinas [13], lo que concuerda con los reportes de un aumento en el porcentaje de germinación de las semillas

de sorgo cuando están en interacción indirecta con cepas de *Metarhizium* ya que la principal fitohormona encargada de la germinación en plantas es el ácido giberélico [14].

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La cepa AT3 tuvo efecto significativo en el crecimiento de sorgo al promover la elongación del tallo, generándose plantas con 37.67% mayor longitud de tallo con respecto a las plantas control.

Para la longitud total, longitud de la raíz y peso seco no se encontraron diferencias significativas.

Sería conveniente evaluar si la cepa AT3 sí está produciendo fitohormonas al estar en interacción con las raíces de sorgo. Además, el estudio también debería realizarse dejándose más tiempo en interacción las plantas de sorgo con *M.* para evaluar el efecto en todo el ciclo fenológico del cultivo, así como en el rendimiento del grano.

Estudiar el efecto en el crecimiento vegetal de distintas cepas nos permite avanzar en la búsqueda de las mejores para ser aplicadas en campo como una alternativa al uso de agroquímicos y que ofrezcan al productor beneficios competentes al manejo convencional.

VII. AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro por el apoyo económico para manutención durante la estancia.

Al Dr. Israel Padilla, al M. C. Iván Piña y a todos los integrantes del Laboratorio de Genética Molecular de Hongos de la Universidad de Guanajuato, por sus enseñanzas y amabilidad.

REFERENCIAS

- [1] M. L. Puente, J. E. García, E. Rubio y A. Peticari, "Microorganismos promotores del crecimiento vegetal empleados como inoculantes en trigo. Información técnica de trigo y otros cultivos de invierno" Publicación Miscelánea N° 116, campaña, 2010.
- [2] J. W. Kloepper, R. Lifshitz, y R. M. Zablutowicz, "Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity" Trends Biotechnol. Vol. 7, 39-43, 1989.
- [3] R. M Kepler, T. A. Ugine, J. E. Maul, M. A. Cavigelli, y S. A. Rehner, "Community composition and population genetics of insect pathogenic fungi in the genus *Metarhizium* from soils of a long-term agricultural research system" Environmental microbiology, Vol.17(8), 2791-2804, 2015.
- [4] G. Hu, y R. J. St Leger, "Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent" Applied and Environmental Microbiology, Vol 68(12), 6383-6387, 2002.].
- [5,6] S. W. Behie, P. M. Zelisko, y M. J. Bidochka, "Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants" Science, Vol. 336(6088), 1576-1577, 2012.
- [7] R. J. St Leger, J. O. Nelson, y S. E. Screen, "The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity" Microbiology, Vol. 145(10), 2691-2699, 1999.

- [8] X. Liao, B. Lovett, W. Fang, y R. J. St Leger, "Metarhizium robertsii produces indole-3 acetic acid, which promotes root growth in Arabidopsis and enhances virulence to insects" *Microbiology* (Reading, England), Vol. 163(7), 980, 2017.
- [9, 10] S. W. Behie, y M. J. Bidochka, "Insects as a nitrogen source for plants" *Insects*, Vol. 4(3), 413-424, 2013
- [11] H. P. Bais, T. L. Weir, L. G. Perry, S. Gilroy, y J. M. Vivanco, "The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms" *Annu. Rev. Plant Biol.* Vol. 57, 233-266, 2006.
- [12] R. K. Sasan, y M. J. Bidochka, "The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development" *American journal of botany*, Vol. 99(1), 101-107, 2012.
- [13] M. Miransari, y D. L. Smith, "Plant hormones and seed germination", *Environmental and Experimental Botany* Vol. 99, 110-121, 2014.
- [14] L. J. Herrera-Gutiérrez, Evaluación de la interacción de cepas de *Metarhizium* con *Sorghum vulgare* [Tesis de licenciatura]. Universidad de Guanajuato, Guanajuato, 2016.

Evaluación de la promoción del crecimiento de *Sorghum bicolor* en asociación con el hongo *Metarhizium robertsii*

Sara Paulina López López

Universidad de Guanajuato
División de Ciencias Naturales y Exactas
Departamento de Biología
Noria Alta S/N; C.P. 36050; Guanajuato, Gto.
sara_paulina96@hotmail.com

Asesor: Israel Enrique Padilla Guerrero

Universidad de Guanajuato
División de Ciencias Naturales y Exactas,
Departamento de Biología
Laboratorio de Genética Molecular de Hongos
Noria Alta S/N; C.P. 36050; Guanajuato, Gto.
ie.padillaquerrero@ugto.mx

Resumen — *Metarhizium spp.* Es un hongo entomopatógeno, conocido por su considerable potencial en el control biológico, llegando a infectar a más de 200 especies de insectos, los cuales provén a la planta nutrientes nitrogenados necesarios para favorecer a su crecimiento, creando una simbiosis entre planta y el hongo, colonizando la rizosfera donde se adhiere a las raíces de la planta en forma de micorriza y endofítica. El objetivo de este proyecto fue analizar la promoción del crecimiento en invernadero por 21 días de la planta de sorgo (*Sorghum bicolor*) en interacción con 10 cepas de *Metarhizium robertsii*.

Palabras clave — *Metarhizium robertsii*, rizosfera, hongo patógeno, Sorgo.

Abstract — *Metarhizium spp.* is an entomopathogenic fungus, known for its considerable potential as biological control, infecting more than 200 species of insects, which will provide the plant with nitrogen nutrients necessary to favor its growth, creating a symbiosis between plant and fungus, colonizing the rhizosphere where it adheres to the roots of the plant in the form of mycorrhizae and endophytic. The objective of this project was to analyze the 21-day greenhouse growth promotion of the sorghum plant (*Sorghum bicolor*) in interaction with 10 *Metarhizium robertsii* strains.

Keywords — *Metarhizium robertsii*, rhizosphere, pathogenic fungus, sorghum.

I. INTRODUCCIÓN

Metarhizium es un género de hongos ascomicetos (Hypocreales: Clavicipitaceae) clasificado como entomopatógeno-micorrízico, ocupa nichos ecológicos especializados como endófitos y patógenos de insectos. Sus hábitats son en la rizosfera del suelo y las plantas, incluidos los hábitats de la rizosfera distribuido a nivel mundial con un amplio rango de hospedadores de insectos, que infecta a más de 200 especies de insectos, ellos pueden sobrevivir como saprófitos o siendo hospederos de insectos [1,2]. Cabe mencionar que los hongos endófitos ascomicetos, han sido frecuentemente reportados como agentes protectores contra patógenos y plagas de plantas. *Metarhizium spp.* Llega a colonizar la rizosfera y se adhiere a la superficie de las raíces de las plantas [3].

La rizosfera abarca los milímetros del suelo que rodea la raíz de una planta donde ocurren procesos biológicos y ecológicos complejos, es una zona estrecha de suelo directamente influenciada por secreciones radiculares. Es el sitio de interacciones complejas entre plantas, bacterias, hongos, protistas, nematodos e insectos, tales asociaciones de plantas y microbios son importantes para el ciclo de nutrientes, Los hongos, en particular, son cruciales para el crecimiento y la salud de las plantas como solubilizantes de nutrientes, fita

sa productores y antagonistas de fitopatógenos e insectos. Se han reportado que los hongos endófitos son benéficos en la colonización de la rizosfera, promueven el crecimiento vegetal, mejoran la nutrición en las plantas, incrementan el desarrollo de las raíces y mejoran la tolerancia ante un estrés ambiental [4].

Se ha descrito que el hongo patógeno de insectos es *Metarhizium robertsii* es un agente de biocontrol utilizado en todo el mundo para controlar varias plagas agrícolas. Se conoce que es un habitante común de los suelos, llega a establecer interacciones mutualistas con plantas como colonizadores de raíces de plantas y es capaz de impulsar el crecimiento de las plantas matando insectos, aumentando absorción de nutrientes por las raíces y protección contra fitopatógenos [5,6]. Además, *Metarhizium* estimula el crecimiento de la raíz y el desarrollo del vello radicular.

Casi todas las especies de plantas forman simbiosis con hongos del suelo, y la transferencia de nutrientes a las plantas está mediada en gran medida a través de esta asociación. Los estudios sobre la transferencia de nutrientes fúngicos a las plantas se han centrado principalmente en la transferencia de nutrientes limitantes del suelo, como el nitrógeno y el fósforo, por los hongos micorrícicos. Sin embargo, ciertos endófitos fúngicos, como *Metarhizium* y *Beauveria*, también pueden transferir nitrógeno a sus plantas anfitrionas [7]. Cabe resaltar que los hongos, en particular, son cruciales para el crecimiento y la salud de las plantas como solubilizantes de nutrientes, fitasa productores y antagonistas de fitopatógenos e insectos [8]. En los agroecosistemas, las prácticas de cultivo y labranza influyen en las comunidades fúngicas del suelo con efectos desconocidos en la distribución de *Metarhizium*, cuya presencia puede reducir las poblaciones de plagas de cultivo [2].

El sorgo (*Sorghum bicolor*) es una hierba perteneciente a la familia de las gramíneas (Poaceae), cuyos frutos se utilizan para hacer harina y como forraje; es el quinto cereal de mayor importancia en el mundo después del trigo, el arroz, el maíz y la avena. el sorgo tropical presenta buena adaptabilidad y rendimiento aceptable, por lo que se le ha llegado a llamar el cereal del siglo XXI [9]. Esto es debido a sus características agronómicas y nutricionales pudiera aportar grandes beneficios en la alimentación, tanto humana como animal, a nivel mundial, tropical y nacional. Ocupa el segundo lugar en América Latina; los países más importantes debido por su producción y superficie son Estados Unidos de América y México, en donde existe un patrón muy definido para la producción del grano, que se destina a la comercialización para consumo animal [10].

La finalidad de este proyecto es determinar la promoción del crecimiento de sorgo (*Sorghum bicolor*) evaluando a diez cepas distintas de *Metarhizium robertsii* obtenidas en el estado de Guanajuato.

II. MATERIALES Y METODOS

Cepas utilizadas y recolección de conidios

Las cepas utilizadas de *Metarhizium robertsii*, fueron EC26, ES14, ECLC2, CU3, ECLC14, AT25, ES18-1, ES2, PCP2, ES15, las cuales fueron obtenidas de la Colección de Hongos Entomopatógenos del Laboratorio de Genética Molecular de Hongos de la Universidad de Guanajuato, México.

Las distintas cepas de *Metarhizium robertsii* se crecieron en medio MS-100 2N a 28°C por un período de 15 días. Para la recolección de conidios de cada una de las cepas, se utilizó una solución de tritón X-100 al 0.1%, se realizó un raspado en las cajas de Petri utilizando un asa de Drigalski triangular, una vez desprendidos los conidios se tomaron con una pipeta Pasteur filtrando la solución con una malla de fibra sintética para eliminar los restos de micelio, posteriormente se realizaron 3 lavados con 30mL de Tritón X-100 al 0.01%, centrifugando a 3,000 rpm durante 5 minutos entre cada lavado. Una vez obtenida la pastilla se resuspendió en 10mL de Tritón 0.01%, y se realizó el conteo con un hemocitómetro (Hausser Scientific®) para determinar las cantidades de conidios/mL.

Ensayo en invernadero en interacción hongo-planta

Se preparó una solución de 1×10^8 conidios/mL en Tritón X-100 al 0.01% por triplicado de cada una de las cepas, se centrifugó a 3,000 rpm durante 5 min, una vez obtenida la pastilla celular se resuspende en 250 μ L de la solución carboximetilcelulosa al 0.5%. Posteriormente se adiciona la solución a un tubo Corning que contiene 16 semillas de sorgo, se realizó vortex durante 1 min para lograr una adherencia de los conidios en cada una de las semillas.

Se utilizó sustrato Peat Moss para la siembra de las semillas, se humedeció el sustrato con 1L de agua destilada, enseguida se esterilizó en autoclave 3 veces por 40 minutos a 121°C a 2atm de presión, posteriormente se colocó el sustrato sobre macetas de plástico de 15x8 cm, donde se sembraron 16 semillas por macetas a 1cm de profundidad previamente tratadas en la solución de 1×10^8 conidios/mL, Posteriormente se colocaron las macetas en el invernadero a una temperatura promedio de 30°C y 25% de humedad, se dejaron crecer durante 21 días, y fueron regadas cada 48 horas con 50mL de agua destilada.

Una vez transcurridos los 21 días de su germinación, se retiraron las plantas de las macetas y se lavaron cada una de las plantas con agua para eliminar el exceso de sustrato, enseguida se realizaron medidas de la longitud de raíz, longitud de planta aérea y la longitud total de la planta, posteriormente se envolvieron en papel aluminio. Los sobres de aluminio con la planta se colocaron a 50°C por 72 horas para poder obtener el secado total de la planta, finalmente se realizó el peso de cada una de las plantas en una balanza analítica para obtener el peso seco de las plantas.

Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico se colocaron los valores de las cepas analizadas y se realizó una comprobación de la distribución normal de los datos mediante la prueba de pruebas de normalidad D'Agostino & Pearson y Shapiro-Wilk, posteriormente un ANOVA de una vía y una prueba de Tukey de comparación múltiple a un nivel de significancia de 0.05 con el programa GraphPad Prism 7.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el análisis de los datos obtenidos de las plantas de sorgo en interacción con *Metarhizium robertsii*, se utilizó GraphPad Prism 7 como programa estadístico, en el cual se realizó ANOVA y pruebas de normalidad D'Agostino & Pearson omnibus normality test y Shapiro-Wilk normality test.

Obteniendo de la prueba de normalidad una distribución relativamente normal. Al realizar el ANOVA de comparación múltiple en la longitud de raíz, se tuvo como resultado una significancia negativa de la cepa ECLC2 con un valor de $p=0.1096$ con respecto al control con un valor de $P=0.5355$ (Figura 1a). Por otro lado, en el análisis de peso seco se observó en el ANOVA de comparación múltiple, significancia negativa en 3 cepas distintas, que son ECLC2, AT25 y ES18-1, ya que se encuentran por debajo del control (Figura 1b). En el análisis del porcentaje de germinación se pueden observar algunas cepas que se acercan al porcentaje obtenido del control de 60.37%, pero ninguno tiene un valor óptimo, las más cercanas fueron las cepas CU3 y ES15 con un valor de 54.12%.

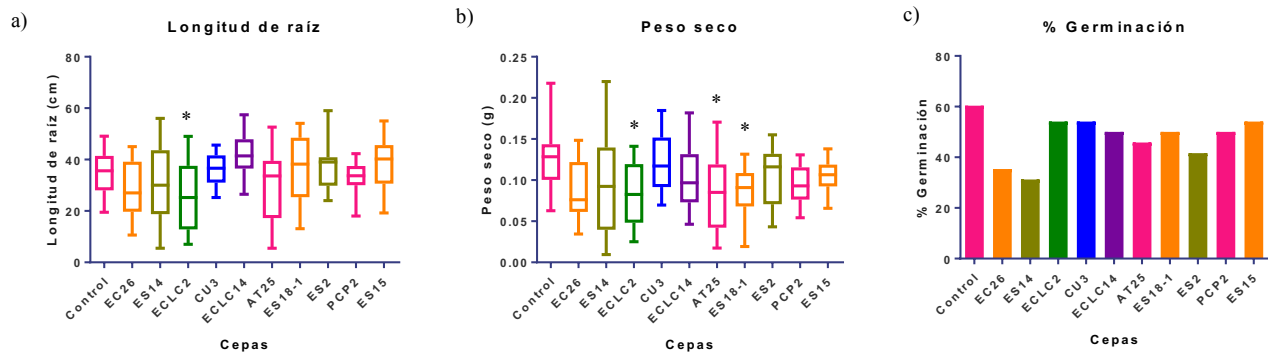


Fig. 1. Gráficas de los datos obtenidos de Sorgo en interacción con *Metarhizium robertsii* en invernadero por 21 días, a) Longitud de raíz con respecto a las 10 distintas cepas analizadas. b) Peso seco de cada una de las plantas en interacción con el hongo. c) % de germinación de las cepas analizadas.

Estos resultados nos pueden indicar que la interacción que existe entre el Sorgo y con las cepas de *Metarhizium* si llegan a tener tendencias a un aumento tanto en peso seco como en su raíz, observándose en las cepas ES14 y AT25, por lo que podemos decir que si está interactuando *Metarhizium robertsii*, sobre las raíces de las plantas, por lo que es posible realizar otro experimento con un tiempo mayor en la interacción hongo-planta, para que sea posible la obtención de valores más significativos y poder observar el crecimiento o promoción de las raíces.

IV. CONCLUSIONES

En este proyecto fue posible analizar la promoción del crecimiento de las plantas de Sorgo en interacción con el hongo *Metarhizium robertsii*, aunque no se obtuvieron datos significativos contundentes en cada una de las cepas, si se pudieron observar ciertas tendencias al aumento de raíz, como del peso seco, con esto podemos decir que *Metarhizium*, si lo podemos encontrar en las raíces de las plantas y si es un hongo que logra la promoción del crecimiento en las mismas de manera efectiva.

V. AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Verano de la Ciencia de la Región Centro por el apoyo y la oportunidad en este verano de investigación y a la Universidad de Guanajuato por darnos la oportunidad de participar en esta experiencia de la investigación.

Por otro lado, agradezco a mis asesores por compartirme de su conocimiento, su tiempo y paciencia y por el apoyo que me brindaron durante la realización de este proyecto.

REFERENCIAS

- [1] Behie, S. W., Moreira, C. C., Sementchoukova I., Barelli L., Zelisko P. Z., and Bidochkaa M. J. (2017). Carbon translocation from a plant to an insect-pathogenic endophytic fungus. *Nature Communiccation*, 8: 14245.
- [2] Kepler, R.M., Ugine, T.A., Maul, J.E., Cavigelli, M.A., y Rehner, S.A. (2015). Community composition and population genetics of insect pathogenic fungi in the genus *Metarhizium* from soils of a long-term agricultural research system. *Environmental microbiology*; 17(8), 2791-2804
- [3] Hu, G., y St Leger, R.J. (2002). Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Applied and Environmental Microbiology*; 68(12), 6383-6387.
- [4] Schardl C. L., Leuchtman A., Spiering M. J. (2004). Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Rev Plant Biol*. 2004;55:315-40.
- [5] Liao, X., Lovett, B., Fang, W., y St Leger, R.J. (2017). *Metarhizium robertsii* produces indole-3 acetic acid, which promotes root growth in *Arabidopsis* and enhances virulence to insects. *Microbiology (Reading, England)*, 163(7), 980.
- [6] Sasan R, Bidochka M. 2013. Antagonism of the endophytic insect pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* against the bean plant pathogen *Fusarium solani* F. sp. *phaseoli*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 35: 288–293.
- [7] Behie S y Bidochka MJ. 2014. Nutrient transfer in plant–fungal symbioses. *Trends in Plant Science* 19: 734–740. doi.org/10.1016/j.tplants.2014.06.007.
- [8] Liao X., O'Brien T. R., Fang W., St Leger R. J.(2014). The plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate with their association with roots. *Microbiol Biotechnol*, 98(16):7089-96.
- [9] Pacheco, D.R. Caracterización agronómica de dieciséis maicillos mejorados (*Sorghum bicolor* L. Moench) en diferentes localidades. Presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agrónomo en el grado académico de Licenciatura. El Zamorano, Honduras. 1998.
- [10] Alcalá, S. L. Sistema de producción de sorgo (*Sorghum bicolor*) En el noroeste de Tamaulipas, México. Estudio técnico y financiero para la región de San Fernando. Maestría en Ciencias en Producción Agrícola. Universidad Autónoma de Nuevo León, Junio 2003.

Evaluación de la sensibilidad de tres especies de microalgas expuestas ante contaminantes emergentes

TAQ. Antonio Sebastián Monroy Castillo

Instituto Tecnológico Superior de Purísima del Rincón
Blvd. Del Valle #2301, Guardarrayas
Purísima del Rincón, Gto. C.P. 36413
lcs15460159@purisima.tecnm.mx

Asesor:

Dr. Gustavo Emilio Santos Medrano
Universidad Autónoma de Aguascalientes
Departamento de Química, Toxicología Acuática
Av. Universidad #940, Ciudad Universitaria, C.P.
20131, Aguascalientes, Ags.
gesantos@correo.uaa.mx

Resumen — El objetivo de este trabajo fue evaluar la sensibilidad de tres fármacos (Acetaminofén, Diclofenaco y Naproxeno) mediante pruebas agudas con 3 especies de microalgas (*Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata* y *Selenastrum capricornotum*). Las pruebas se realizaron a 20 °C con 2000 luxes durante un periodo de 24 horas de luz continua; al término de la incubación, se midió la fluorescencia por medio de un fluorómetro de placa para determinar el posible daño en las microalgas. El rango de toxicidad fue: 3.61-4.26, 0.51-0.63 y 2.36-2.57 mg/L para el Acetaminofén, Diclofenaco y Naproxeno, respectivamente. En las tres especies de microalgas el orden de toxicidad fue igual, Diclofenaco>Naproxeno>Acetaminofen. *Nannochloropsis oculata*, fue la que presentó la menor sensibilidad al Acetaminofén y diclofenaco.

Palabras clave — Concentración letal media, Fluorescencia, Fármacos, Clorofila.

Abstract — The aim of this work was to evaluate the sensitivity of three emerging contaminants (Acetaminophen, Diclofenac and Naproxen) by acute toxicity tests with 3 species of microalgae (*Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata* and *Selenastrum capricornotum*). The assays were carried out at 20° C with 2000 lux, with 24 hours of continuous light. At the end of incubation, the fluorescence was measured by means to determine the possible damage to the microalgae. The acute toxicity range was: 3.61-4.26, 0.51-0.63 and 2.36-2.57 mg / L for Acetaminophen, Diclofenac and Naproxen, respectively. In the three species of microalgae the order of toxicity was the same, Diclofenac> Naproxen> Acetaminophen. *Nannochloropsis oculata*, showed the lowest sensitivity to Acetaminophen and Diclofenac.

Keywords — Median lethal concentration, Fluorescence, Drugs, Chlorophyll.

I. INTRODUCCIÓN

Desde hace tiempo se conoce la presencia de diversos agentes contaminantes “comunes” de gran impacto (metales y residuos orgánicos) en los drenajes, ríos y lagos, así como también agentes microbiológicos (parásitos, bacterias, hongos, etc.) y diferentes contaminantes emergentes incluyendo productos de limpieza, fármacos y aceites.

Incluso, la presencia de productos de aseo personal y fármacos es ahora documentada por el drenaje, plantas de tratamiento y otras fuentes de contaminación (Stumpf *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2001; Kümmerer, 2001; Pedersen *et al.*, 2005) incluso en aguas potables (Stackelberg *et al.*, 2004). De manera más precisa, los fármacos en los sistemas de agua no se podrían disminuir, e incluso se espera que incrementen debido al envejecimiento de la población humana, dando continuidad al desarrollo de nuevos fármacos y tratamientos terapéuticos (Servos *et al.*, 2002).

Debido a esta problemática se a buscado alternativas para reducir, remediar y/o eliminar dichos agentes, empleando la biotecnología por medio de microalgas, que ayudan a remediar la contaminación en agua; con esto se escogieron 3 especies de microalgas como son *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata*, *Selenastrum capricornotum* y así observar, registrar y evaluar su sensibilidad ante agentes contaminantes emergentes, los cuales son: Acetaminofén, Diclofenaco y Naproxeno.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Los fármacos acetaminofén, diclofenaco y naproxeno fueron adquiridos en Sigma-Aldrich con una pureza del 98%. La prueba inicia contando el número de células presentes en el cultivo mediante la cámara de Neubauer, se debe hacer una dilución con el fin de obtener en cada prueba una concentración inicial de 1×10^5 células/ml.

Se preparó una solución de Naproxeno con una concentración de 4 g/l , que posteriormente se utilizara para evaluar la sensibilidad según los parametros de concentración. El acetaminofén y diclofenaco se prepararon en soluciones de 5 y 1 g/L, respectivamente. Todas las diluciones fueron con medio EPA (USEPA, 1992).

Se tomo una muestra de microalga, la cual se encontraba en medio basal BOLD (Nichols, 1973) a 20°C , en un fotoperiodo continuo a 2000 luxes; dicha muestra fue tomada en fase estacionaria que es durante los 4 a 7 días (USEPA, 1992).

Se toma una alícuota de la muestra para hacer conteo en cámara Neubauer, y poder determinar la concentración de células presentes por ml.

Se prepara medio EPA, el cual sera empleado para llevar acabo las pruebas de sensibilidad.

Para realizar los calculos de concentración en 1 ml (naproxeno); se lleva acabo la sig fórmula:

$$\frac{\text{concentración del farmaco a evaluar} \cdot 1000\mu\text{l}}{\text{concentraci3n del farmaco}} \therefore \frac{\left(100 \frac{\text{mg}}{\text{l}}\right) \cdot (1000\mu\text{l})}{4000 \frac{\text{mg}}{\text{l}}} = 25\mu\text{l}$$

Se comenzó con un parametro de 100mg/l hasta 3300mg/ml de Naproxen.

Para saber la cantidad de cel necesarias en 1ml; se lleva acabo la sig fórmula:

$$\frac{\text{concentraci3n de algas} \cdot 1000\mu\text{l}}{\text{concentraci3n obtenida al conteo}} \therefore \frac{\left(1 \times 10^5 \frac{\text{cel}}{\text{ml}}\right) \cdot (1000\mu\text{l})}{6.5 \times 10^6 \frac{\text{cel}}{\text{ml}}} = 16\mu\text{l}$$

Después se realiza una sumatoria de la concentración de celulas necesarias y concentración de farmaco, tomando medio EPA y así poder completar los $1000 \mu\text{l}$.

En una placa de 24 pozas se llevará acabo las pruebas teniendo en cuenta el control, el cual llevara la misma concentración de algas y el resto será medio EPA.

Se coloca la placa (24 pozas de poliestireno, Corning) con luz continua mayor a 2000 luxes durante 24h a 20°C .

Una vez transcurrido las 24h se toma una alícuota de 280 μ l y se coloca en una placa (96 pozas de fondo oscuro, Corning) medir la para fluorescencia.

Por medio de un fluorómetro de placa (Modulos Microplate, Turner Biosystem) utilizando filtro rojo (600 nm) haciendo 2 mediciones, inicial y a los 20 min transcurridos.

Se obtiene los valores de fluorescencia para cada tratamiento y el porcentaje de inhibición se calculó mediante la siguiente formula:

$$\%I = (F_i - F_t) / F_i \times 100$$

donde:

I% = Porcentaje de inhibición

F_i = Fluorescencia inicial

F_t = Fluorescencia final

El análisis estadístico se realizó con el programa Statistica 10.0. Los valores de CL50 se calcularon mediante una regresión lineal entre las unidades de fluorescencia y las concentraciones del fármaco empleado. Por medio de una ANOVA se analizaron las unidades de fluorescencia y mediante una prueba de Duncan se comparó si existía diferencia entre las medias del control negativo y los diferentes tratamientos; de esta forma se podrá establecer si existe una diferencia significativa y determinar que concentraciones representan los valores LOEC y NOEC.

III. RESULTADOS

Para poder obtener resultados positivos se aplicaron ciertas acotaciones en los parametros con el fin de poder delimitar la concentración y así tener un mejor avance dentro de lo experimental; los siguientes resultados constan de: concentración letal, concentración a la cual no se observa efecto y concentración mínima donde se observa efecto.

Además de ajustar el parametro del tiempo ya que por diferencia de 1-2 min varia según la especie de microalga.

En las figuras 1, 3 y 5, se observa cada especie de alga con luz blanca bajo el microscopio con una magnificación de 40X. En las figuras 2,4 y 6, se muestra la fluorescencia producida por la clorofila de cada microalga bajo la luz fluorescente.

La especie *N. oculata* fue la menos sensible al acetaminofén y diclofenaco teniendo los valores más altos de LC50 (Tabla 1). La microlaga *C. vulgaris* fue la más sensible al acetaminofén y diclofenaco, por otra parte *S. capricornotum* mostro mayor sensibilidad al naproxeno (Tabla 1).

Tabla 1. Pruebas agudas (24h)							
Especie	Fármaco	CL50	NOEC	LOEC	LC	R ²	CV (%)
Cv	Acetaminofén	3.61	1.0	1.8	3.0189-4.215	0.95	2.89
	Diclofenaco	0.51	0.12	0.24	0.451-0.572	0.97	1.83
	Naproxeno	2.57	0.80	1.60	1.666-2.737	0.86	2.67
No	Acetaminofén	4.26	1.8	2.8	3.570-4.967	0.93	2.55
	Diclofenaco	0.63	0.05	1.0	0.455-0.818	0.88	5.46
	Naproxeno	2.57	0.80	1.60	1.666-2.737	0.86	2.67
Sc	Acetaminofén	4.10	1.6	2.4	2.997-5.206	0.84	5.41
	Diclofenaco	0.57	0.15	0.30	0.321-0.821	0.77	12.62
	Naproxeno	2.36	1.7	2.5	1.804-2.921	0.84	9.45

Cv = *Chlorella vulgaris*, No = *Nannochloropsis oculata*, Sc = *Selenastrum capricornotum*. CL50 = concentración letal donde el 50% de la población muere. NOEC = concentración a la cual no se observa efecto. LOEC = concentración mínima donde se observa efecto. LC = Límites de confianza con 95%, R² = coeficiente de correlación. CV = Coeficiente de variación. Todos los valores son en g/L. N= 3

En el caso del naproxeno la concentración letal media fue la misma para *C. vulgaris* y *N. oculata*, lo cual sugiere que el mecanismo de acción es muy similar.

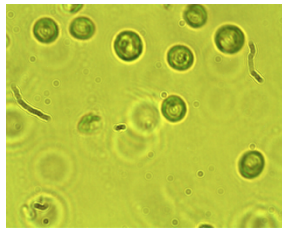


Fig. 1. *Nannochloropsis oculata* 40x.

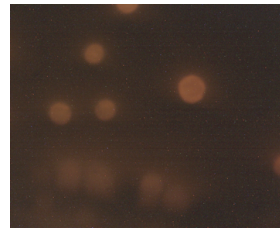


Fig. 2. *Nannochloropsis oculata*, fluorescencia. 40x.

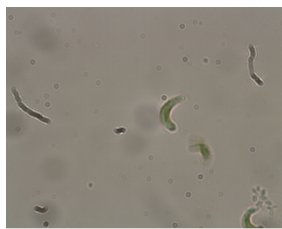


Fig. 3. *Selenastrum capricornotum*. 40x.

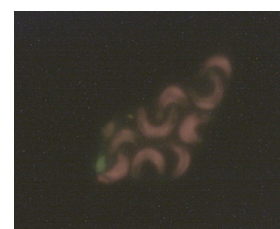


Fig. 4. *Selenastrum capricornotum*, fluorescencia. 40x.

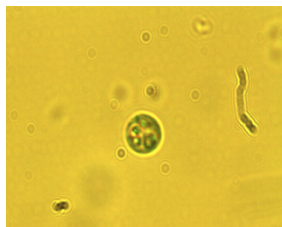


Fig. 5. *Chlorella vulgaris*. 40x.

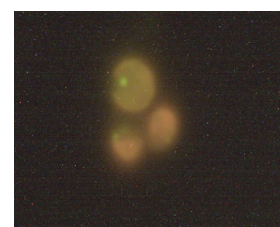


Fig. 6. *Chlorella vulgaris*, fluorescencia. 40x.

IV. CONCLUSIONES

Con la realización de este proyecto, al exponer las microalgas a fluorescencia, por medio de la luz que irradian se tiene saber si estas viven o están muertas, ya que los fotones se activan y con los valores arrojados por el instrumento de medición tenía una relación entre fluorescencia emitida células vivas; se logró evaluar la sensibilidad de los diferentes agentes biológicos ante los contaminantes de manera eficiente; se tuvieron ciertas variaciones en resultados preliminares y la manera en que se comportaban las microalgas, dichas variaciones se pudieron solucionar y conocer el comportamiento de las mismas; cabe mencionar que las microalgas son microorganismos muy complejos que hoy en día mediante la aplicación de Biotecnología se puede llegar a remediar problemáticas de contaminación, ya que tienen diversas aplicaciones.

V. RECONOCIMIENTOS

De la manera más atenta agradezco a la Universidad Autónoma de Aguascalientes, al Verano de la Ciencia y al CONACyT por las oportunidades y el apoyo otorgado, así como también al Dr. Gustavo Emilio Santos Medrano, su dedicación y enseñanzas durante mi estancia en la UAA

A mis padres y tíos que sin su apoyo incondicional no hubiese estado en este 21º Verano de la Ciencia.

REFERENCIAS

- [1] RA El-Bassat , HE Touliabah & GI Harisa (2012) Toxicity of four pharmaceuticals from different classes to isolated plankton species, African Journal of Aquatic Science
- [2] United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1992. Short-term methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms. EPA-600/4-91-022. Tercera edición. A. L. Philip Lewis, D. J. Klem y J. M. Lazorchak.
- [3] Environment Canada. 1992. Biological Test Method: Growth Inhibition Test Using the Freshwater alga *Selenastrum capricornutum*. Environmental Protection Series EPS 1/RM/24.
- [4] C. Blaise and J.-F. Féraud (eds.), Small-scale Freshwater Toxicity Investigations, Vol. 1, 137-179. 2005 Springer.
- [5] Minguez, L; Pedelucq, J. (08 OCTOBER 2014). Toxicities of 48 pharmaceuticals and their freshwater and marine environmental assessment in northwestern France. Springer, 23, 4992-5001.
- [6] Blaise, C; Gagné, F; Eullaffroy, P. (2006). Ecotoxicity of selected pharmaceuticals of urban origin discharged to the Saint-Lawrence River (Québec, Canada): A review. Environment Canada, 10, 29-51.
- [7] Nichols, H. W. 1973. Growth media-freshwater. In: *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. J. R. Stein (ed.): 7-24. University Press, Cambridge. UK.

Evaluación del efecto antifúngico de nanopartículas de oro (AuNPs) y plata (AgNPs) de origen biogénico sobre los fitopatógenos *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*

Ana Cristina Morales Moreno

Universidad de Guanajuato
Noria Alta S/N, Noria Alta, 36050
Guanajuato, Gto.

morales.ana.cristina@hotmail.com

Asesora: Luz Elena Vidales Rodríguez

Universidad Autónoma de Zacatecas
Preparatoria S/N, Agronómica, 98067
Zacatecas, Zac.

luzelenavr@uaz.edu.mx

Resumen – La biosíntesis de nanopartículas (NPs) metálicas con diversas aplicaciones es una alternativa ecológica a bajo costo para su producción. Se obtuvieron NPs de oro (AuNPs) y plata (AgNPs) mediante biosíntesis fúngica y se analizó su efecto antifúngico sobre morfología, crecimiento micelial y viabilidad de conidias de dos fitopatógenos. Las AgNPs afectaron la morfología colonial de *A. alternata* y las AuNPs no tuvieron efecto sobre la morfología y/o crecimiento micelial, sin embargo, las AuNPs redujeron la viabilidad de las conidias de *A. alternata* y *F. oxysporum* un 100% y 99.6%, a concentraciones de 300 y 400 mg/L, respectivamente. Las AgNPs a 200 mg/mL, disminuyeron un 97.5% la viabilidad de conidias de *F. oxysporum*, demostrando así el potencial antifúngico de las NPs.

Palabras clave– Biosíntesis de nanopartículas, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*.

Abstract – Biosynthesis of metallic nanoparticles (NPs) with diverse applications is an ecological alternative at low cost of production. The analysis of the antifungal effects of gold and silver NPs obtained by fungal biosynthesis, over the morphology, mycelial growth and conidia viability of two fungal phytopathogens, indicated that AgNPs affected the morphology of *A. alternata* colonies, and the AuNPs did not affect morphology and/or mycelial growth. However, conidia viability of *A. alternata* and *Fusarium oxysporum* were reduced a 100% and 99.6%, at 300 and 400 mg/L, respectively. The AgNPs at 200 mg/L reduced a 97.5% of conidia viability of *F. oxysporum*, demonstrating the antifungal potential of the metallic NPs.

Keywords – Nanoparticle biosynthesis, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*.

I. INTRODUCCIÓN

La biosíntesis de NPs es actualmente una alternativa para solventar la creciente necesidad de utilizar métodos de síntesis eficientes y amigables con el medio ambiente [1]. Debido a su capacidad de tolerancia y bioacumulación de metales, los hongos se han posicionado en el escenario del estudio sobre la producción de NPs metálicas de origen biogénico, esto debido a la factibilidad de su producción, ya que son secretores sumamente eficaces de metabolitos y enzimas extracelulares que reducen los iones metálicos; lo cual facilita la nucleación y síntesis de NPs a gran escala por la facilidad del manejo de la biomasa. Aunado a esto, la biosíntesis fúngica de NPs es un método ecológicamente amigable y de bajo costo [2]. La síntesis extracelular de NPs permite: 1) optimizar el proceso de síntesis para la obtención de NPs con diferente composición química, forma y tamaño; 2) excluir componentes celulares innecesarios cuya eliminación implica procesos de purificación adicionales y 3) la química de superficie de las NPs biogénicas abre la

posibilidad de hacer uso de la ingeniería genética para la expresión específica de componentes celulares que controlen su tamaño y forma [3].

La actividad antimicrobiana de las AgNPs y AuNPs ha sido previamente demostrada. En particular, la actividad antifúngica se ha reportado para las AgNPs [4, 5], sin embargo; los estudios sobre el potencial antifúngico de las AuNPs contra fitopatógenos es escaso [6]. Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó el efecto antifúngico de AgNPs y AuNPs obtenidas mediante biosíntesis fúngica [7], sobre el crecimiento y la viabilidad de conidias de los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata*, los cuales son la causa de infecciones en diferentes cultivos que provocan pérdidas importantes en la producción agrícola.

II. MARCO TEÓRICO

Las propiedades optoelectrónicas de las AgNPs y AuNPs permiten determinar la presencia de éstas en el medio en el cual se lleva a cabo la biosíntesis, produciéndose un cambio de coloración de amarillo claro a color púrpura (AuNPs) o café oscuro (AgNPs). Además, la presencia de NPs puede determinarse mediante análisis espectrofotométrico en la región UV-Visible, ya que presentan una propiedad llamada resonancia de plasmón superficial responsable de su absorción a longitudes de onda de alrededor de 520 nm (AuNPs) y de 450 nm (AgNPs) [8].

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas fúngicas. Para la biosíntesis de AuNPs se utilizó la cepa de *Epicoccum nigrum* (Au 1-8), para la biosíntesis de AgNPs, la cepa de *Fusarium* sp. (Ag 0.5-5). El efecto de las NPs se evaluó en las cepas de los hongos fitopatógenos *F. oxysporum* (AC1) y *A. alternata* (AH1).

Biosíntesis, análisis UV-Vis y cuantificación de Au y Ag asociados a NPs. A partir de cultivos de 9 días en medio PDA (BD Bioxon), se llevó a cabo la biosíntesis de NPs mediante un protocolo previamente descrito [7]. Las NPs se separaron del medio por centrifugación (13000 rpm/45 min), los sobrenadantes se utilizaron para la cuantificación de iones Au^{+3} y iones Ag^{+1} , y los paquetes de NPs se lavaron y resuspendieron con H_2O desionizada estéril. Las suspensiones de NPs se analizaron por espectrofotometría UV-Vis (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) en un rango de 300 a 600 nm. La concentración de Au y Ag asociada a las NPs, se calculó a partir de los datos concentración de los iones Ag^{+1} y Au^{+3} no asociados a NPs que permanecieron solubles en el medio después de la centrifugación; los cuales fueron obtenidos mediante análisis de Fluorescencia de Rayos X de energía dispersiva (EDXRF Rigaku® NEX QC+ QuantEZ). El cálculo se realizó de acuerdo a la fórmula:

$$C_{NPs} = C_{MS} - C_{SN} \quad (1)$$

donde, C_{NPs} es la concentración de Au o Ag asociados a NPs en mg/L, C_{MT} es la concentración total de metal utilizada en la biosíntesis (196.96 mg/L), y C_{AgSN} es la concentración de iones Ag^{+1} y/o Au^{+3} en el medio después de centrifugar las NPs, en mg/L.

Evaluación del efecto de las AgNPs y AuNPs sobre el crecimiento micelial de los fitopatógenos *F. oxysporum* (AC1) y *A. alternata* (AH1). Se obtuvieron cultivos de ambos hongos en medio PDA (BD, Bioxon) con 5 días de crecimiento a 28°C; se tomó micelio de la periferia de la colonia con sacabocados y se colocaron sobre el centro de placas con PDA suplementadas con diferentes concentraciones de AgNPs (0, 50, 100, 200, 400 y 600 mg/L) o AuNPs (0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 mg/L). Se incubaron 5 días a 28°C y se midió el diámetro de las colonias, se fotodocumentó la morfología colonial y microscópica de los hongos.

Evaluación del efecto de AgNPs y AuNPs sobre la viabilidad de conidias de los fitopatógenos *F. oxysporum* (AC1) y *A. alternata* (AH1). Se expusieron 4×10^6 conidias de *F. oxysporum* (AC1) y 2×10^5 conidias *A. alternata* (AH1) a diferentes concentraciones de AgNPs (0, 100 y 200 ppm) y AuNPs (0, 100, 200, 300, 400 y 600 ppm) en un volumen total de 2 mL en placas de poliestireno de 24 pozos (Nunclon™ Delta). Se incubó durante 24 h (180 rpm / 28°C) y se hicieron preparaciones en fresco para su observación en microscopio óptico; por otro lado, se realizaron diluciones seriadas de cada condición y se sembraron 100 μ L de cada dilución por duplicado en placas con PDA (BD, Bioxon). Se incubaron a 28°C por 48 h y se contabilizaron las colonias para calcular el porcentaje de sobrevivencia de las conidias en cada condición evaluada.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Biosíntesis, análisis UV-Vis y cuantificación de Au y Ag asociados a NPs. Durante el proceso de biosíntesis de las AgNPs y AuNPs se observó el cambio de coloración producido por las propiedades de absorción de luz características de las NPs, y el cual demuestra la presencia de NPs (Figura 1a). En el análisis espectrofotométrico de las suspensiones de NPs, se observó un plasmón único con un máximo de absorción a 420 nm para las AgNPs, y de 550 nm para las AuNPs (Figura 1b).

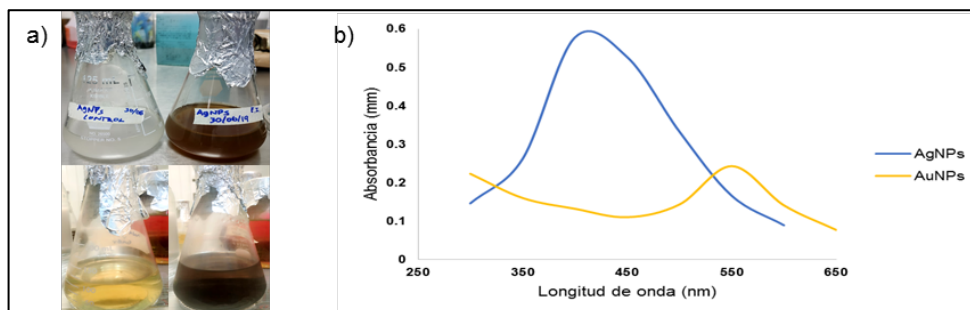


Fig.1. Análisis de suspensiones de AgNPs y AuNPs obtenidas mediante biosíntesis fúngica. a) Cambio de coloración producido por la presencia de NPs en el medio extracelular de cultivos de *Fusarium* sp. Ag0.5-5 (AgNPs) y *Epicoccum nigrum* Au1-8 (AuNPs). b) Espectro UV-Vis de las suspensiones de AgNPs y AuNPs obtenidas mediante biosíntesis extracelular.

Mediante la cuantificación de los iones Ag^{+1} y Au^{+3} no asociados a NPs que permanecieron solubles en el medio después de la biosíntesis, se determinó que la concentración de Ag y Au asociada a las NPs fue de 90.8 y 161.5 mg/L, respectivamente;

lo cual representa un 84% y 82% del total de Ag y Au utilizados en el proceso de biosíntesis, indicando que el proceso de biosíntesis empleado fue eficiente.

Efecto de las AgNPs y AuNPs sobre el crecimiento micelial de los fitopatógenos *F. oxysporum* (AC1) y *A. alternata* (AH1). No se observaron diferencias significativas en el crecimiento micelial de *F. oxysporum* y *A. alternata* (Fig. 2) en presencia de AgNPs o AuNPs, sin embargo; en presencia de AgNPs se observaron alteraciones de la morfología colonial de *A. alternata*, produciéndose bordes irregulares de las colonias y disminución de la coloración verdosa producida por la conidiación (Figura 3b), lo cual sugiere que las AgNPs pudieran afectar la conidiación de este hongo. Por otro lado, no se observaron cambios evidentes en la morfología colonial (Fig. 3a) y/o microscópica (datos no mostrados) de *A. alternata* en presencia de AuNPs (Fig 3b) o de *F. oxysporum* en presencia de NPs (Fig. 3c y 3d).

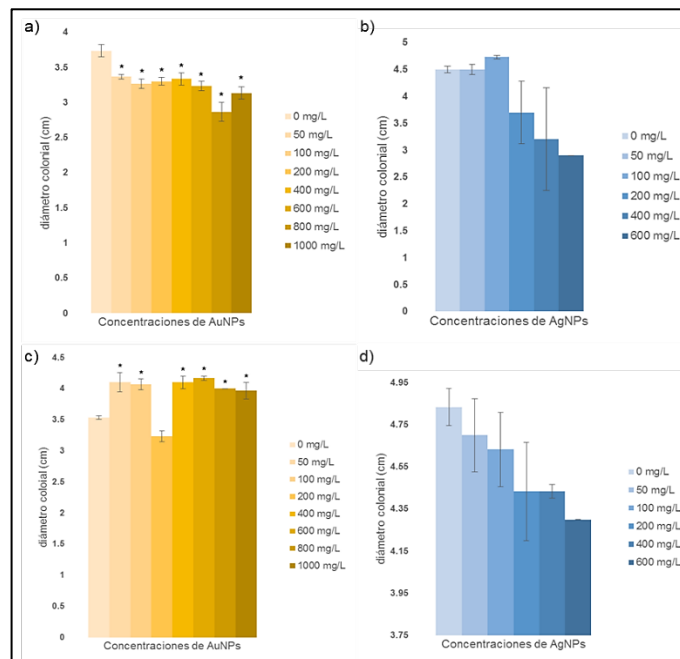


Fig. 2. Efecto de las AgNPs y AuNPs sobre el crecimiento micelial del hongo *F. oxysporum* (AC1) y *A. alternata* (AH1). Se muestran los promedios del diámetro colonial de *A. alternata* (a y b) y *F. oxysporum* (c y d) con 5 días de crecimiento en PDA suplementado con diferentes concentraciones de AuNPs y AgNPs, respectivamente. Las barras negras indican la desviación estándar \pm SD de experimentos realizados por triplicado. (*) Valores estadísticamente iguales. ($P < 0,05$).

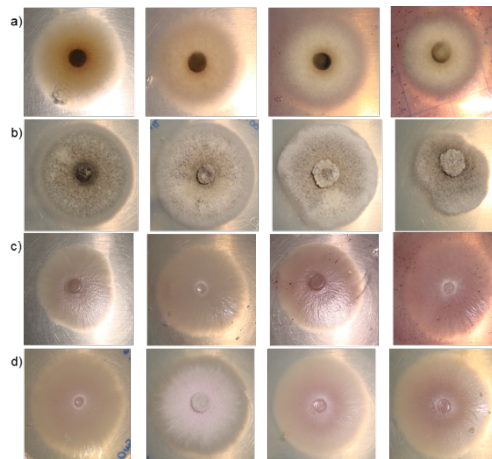


Fig. 3. Efecto de las NPs sobre el crecimiento colonial de *A. alternata* (AH1) y *F. oxysporum* (AC1). Se muestra el crecimiento colonial de *A. alternata* (a y b) y *F. oxysporum* (c y d) con 5 días de crecimiento en PDA suplementado con diferentes concentraciones de AuNPs: 0, 50, 200 y 600 mg/L; y AgNPs: 0, 100, 400 y 800 mg/L, respectivamente.

Efecto de las AuNPs y AgNPs sobre la viabilidad de conidias de los fitopatógenos *F. oxysporum* (AC1) y *A. alternata* (AH1). La viabilidad de conidias de *A. alternata* y *F. oxysporum* y expuestas a AuNPs se redujo hasta 0% a concentraciones de 400 y 300 mg/L, respectivamente (Fig. 4a y 4b), mientras que en *F. oxysporum* la exposición a 100 mg/L de AgNPs redujo la viabilidad de las conidias hasta un 2.5%. En conjunto éstos resultados demuestran el potencial antifúngico de ambos tipos de NPs (AgNPs y AuNPs) sobre conidias de dos hongos fitopatógenos de interés agrícola.

En un trabajo previo se reportó la actividad antifúngica de AgNPs. Las NPs biosintetizadas con *F. chlamydosporum* y *P. chrysogenum*, inhibieron la germinación de esporas de los hongos micotoxigénicos *A. flavus* (CMI de 48 y 45 µg/mL de FAgNP y PAgNP, respectivamente) y *A. ochraceus* (CMI de 51 y 47 µg/mL de FAgNP y PAgNP, respectivamente [4]. Por otro lado, las AuNPs a concentraciones de 160 ppm, no tuvieron efecto obvio en el crecimiento de varias cepas de *Candida*. Sin embargo, sí tuvieron efecto sobre la formación de biopelículas, encontrando que las AuNPs inhiben significativamente su formación a concentraciones de 5 ppm y causan una disminución notable en la actividad metabólica de las biopelículas, mientras que a concentraciones ≥ 20 ppm de AuNPs la formación de biopelículas se afectó más de un 80% [6].

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La capacidad de biosíntesis de NPs metálicas de los hongos *Fusarium* sp. Ag0.5-5 (AgNPs) y *Epicoccum nigrum* Au1-8 (AuNPs) es muy prometedora como alternativa para la síntesis verde mediante un método simple y de bajo costo. La actividad antifúngica mostrada por las NPs sobre la viabilidad de las conidias de los hongos fitopatógenos *A. alternaria* y *F. oxysporum* demuestra su potencial como agente antimicrobiano en el control y tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por hongos.

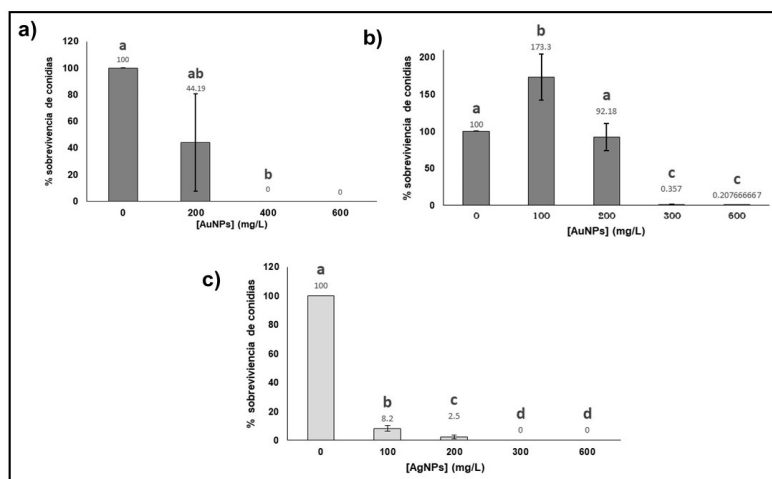


Fig. 4. Efecto de las AgNPs y AuNPs sobre la viabilidad de conidias de hongos fitopatógenos. a) *A. alternata* tratada con AuNPs, b) *F. oxysporum* tratado con AuNPs y c) *F. oxysporum* tratado con AgNPs. Análisis estadístico; T-student ($P < 0,05$)

VI. AGRADECIMIENTOS

A la AMC por el apoyo otorgado a través del Programa Verano de la Ciencia. A la Dra. Luz Elena Vidales de la Unidad de Ciencias Biológicas (UAZ) y su grupo de investigación, por el apoyo académico, técnico y profesional durante la realización de este proyecto.

REFERENCIAS

- [1] M. Aguilar, "Síntesis y caracterización de nanopartículas de Plata: Efecto sobre *Colletotrichum gloeosporioides*" [Tesis Doctoral], Instituto Politécnico Nacional, México, D.F., 2009.
- [2] K. N. Thakkar, S. S. Mhatre, and R. Y. Parikh, "Biological synthesis of metallic nanoparticles", *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 6, pp. 257-262, April 2010.
- [3] G. S. Dhillon, S. K. Brar, S. Kaur, and M. Verma, "Green approach for nanoparticle biosynthesis by fungi: current trends and applications", *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 32, pp. 49-73, June 2011.
- [4] N. M. Khalil, M. N. Abd El-Ghany, and S. Rodríguez-Couto, "Antifungal and anti-mycotoxin efficacy of biogenic silver nanoparticles produced by *Fusarium chlamydosporum* and *Penicillium chrysogenum* at non-cytotoxic doses", *Chemosphere*, vol. 218, pp. 477-486, November 2018.
- [5] B. Xue, D. He, S. Gao, D. Wang, K. Yokoyama, and L. Wang, "Biosynthesis of silver nanoparticles by the fungus *Arthroderma fulvum* and its antifungal activity against genera of *Candida*, *Aspergillus* and *Fusarium*", *International Journal of Nanomedicine*, vol. 11, pp. 1899-1906, May 2016.
- [6] Q. Yu, J. Li, Y. Zhang, Y. Wang, L. Liu, and M. Li, "Inhibition of gold nanoparticles (AuNPs) on pathogenic biofilm formation and invasion to host cells", *Sci. Rep.* 6, 26667, May 2016.
- [7] C. Rodríguez, "Aislamiento e identificación de hongos filamentosos tolerantes a metales pesados y su utilización en la síntesis de nanopartículas metálicas de oro (Au) y plata (Ag)" [Tesis Licenciatura], Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas, Zac., 2016.
- [8] K. C. Bhainsa, and S. F. D'souza, "Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 47, pp. 160-164, February 2006.

Evaluación prospectiva de materiales no convencional (vegetales y bacterianos) para la elaboración de biocompositos con aplicaciones industriales

Samantha María Calvillo Fuentes

Universidad de Guanajuato.
División de Ciencias e Ingenierías
Lomas del bosque 103. C.P 37150. León,
Guanajuato.
calvillofs@licifug.ugto.mx

Asesor: Edgar Vázquez Núñez

Universidad de Guanajuato.
División de Ciencias e Ingenierías
Lomas del bosque 103. C.P 37150. León,
Guanajuato.
ed.vazquezn@gmail.com

Resumen — Los biomateriales hechos con recursos renovables y/o biodegradables están generando un gran interés tanto en la industria de los plásticos como en la sociedad en general debido al impacto positivo que éstos tienen sobre el ambiente.

En el presente trabajo se muestran los resultados de manufactura, caracterización física, química y mecánica de compositos manufacturados mediante la técnica de evaporación de solvente (*casting*) de mezclas de polihidroxitirato (PHB) y fibras vegetales de ricino (*Ricinus comunis*). Las películas elaboradas únicamente con PHB fueron empleadas como control. Las fibras de ricanos fueron sometidas a un pretratamiento con una solución básica (mercerización) para eliminar material lignínico y favorecer la incorporación con la matriz polimérica. Los compositos fueron elaborados y sometidos a análisis de microscopía SEM, espectrometría de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) y pruebas mecánicas.

Palabras clave — Biocompositos, Polihidroxitirato (PHB), *Ricinus communis*

Abstract — Biomaterials made with renewable and / or biodegradable resources are generating great interest both in the plastics industry and in society in general due to the positive impact they have on the environment.

This paper shows the results of manufacturing, physical, chemical and mechanical characterization of composites manufactured by using the solvent evaporation technique (*casting*) of mixtures of polyhydroxybutyrate (PHB) and castor vegetable fibers (*Ricinus comunis*). The films were made solely with PHB were used as control. The castor fibers were subjected to a pretreatment with a basic solution (mercerization) in order to eliminate ligninic material and enhance the incorporation with the polymer matrix. The composites were prepared and analyzed by SEM microscopy tests, Fourier Transform Infrared Transmission Spectrometry (FTIR) and mechanical tests.

Keywords — Biocomposites., Polyhydroxybutyrate (PHB), *Ricinus communis*.

I. INTRODUCCIÓN

Los polímeros sintéticos se obtienen fundamentalmente a partir del petróleo y son creados para funciones específicas (Bastioli C., 2001). Los plásticos son populares porque son a la vez, económicos, livianos, resistentes a la oxidación, inalterables a los agentes atmosféricos, versátiles, aislantes de la corriente eléctrica y pueden sustituir la madera, la piedra o el metal.

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son una serie de poliésteres sintetizados por algunos géneros bacterianos como material de reserva, cuando el medio de cultivo se encuentra

desbalanceado con limitación en nitrógeno, fósforo, azufre, magnesio y/o oxígeno y con exceso de fuente de carbono (Kim B. y col., 1994). Son considerados fuertes candidatos para el reemplazo de los polímeros de origen petroquímico, ya que, siendo sintetizados por microorganismos a partir de sustratos agrícolas, tienen la posibilidad de ser degradados a dióxido de carbono y agua en condiciones aerobias o a metano en condiciones anaerobias, en hábitats tan diversos como suelo, mar, aguas estancadas o aguas residuales (Lee S., 1996). El reciclado es y será una solución, pero se produce sobre el residuo ya generado y, además no es una alternativa efectiva para todos los plásticos. Los biopolímeros suponen, en cambio, una solución desde el origen del problema (Philp, J., 2013).

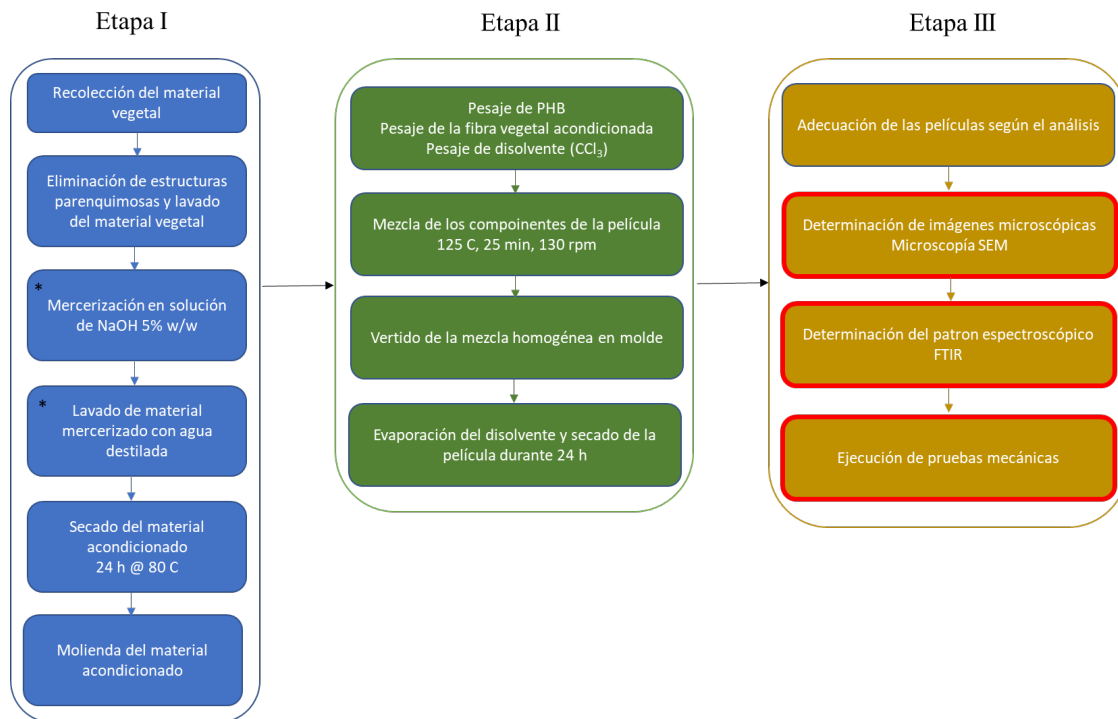
Los biopolímeros se pueden clasificar según su fuente, de las cuales se analizarán los biopolímeros más importantes del mercado divididos en tres subgrupos: polímeros basados en recursos renovables (almidón y celulosa), polímeros biodegradables basados en monómeros bioderivados (aceites vegetales y ácido láctico) y biopolímeros sintetizados por microorganismos (polihidroxicanoatos (PHA)) (Villada H. y Acosta H., 2007). Se busca que los plásticos sean más baratos y amistosos con el ambiente, además de tener la posibilidad de ser renovables y más fáciles de usar en la producción, haciendo uso de una menor cantidad de energía (Madison L. y Huisman G., 1999).

Las fibras naturales pueden reemplazar a las fibras sintéticas tradicionales (vidrio, carbono, aramida) en diferentes aplicaciones industriales por sus propiedades de reciclaje y reproducción. Las fibras naturales se pueden obtener de diferentes plantas. Algunas fibras se obtienen desde el vástago de la planta y fibras de hojas. Los materiales compuestos se fabrican combinando dos o más materiales que son: la matriz (plástico), material de refuerzo (fibras o partículas) y aditivos. La matriz junta las fibras, transfiere la carga, da la forma de una estructura, separa las fibras y provee un acabado superficial de buena calidad que protege de la influencia del medioambiente (Tadeusz M. y Andrzej B. 2016).

El objetivo de este proyecto es la caracterización de las propiedades morfológicas, estructurales y mecánicas de fibra proveniente de ricino cruda y mercerizada en biocompósitos basados en PHB, así como la medición y comprobación de las propiedades fisicoquímicas de los biocompósitos para su aplicación.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y métodos se muestran en el siguiente esquema:



* Las muestras se someten a este proceso cuando el tratamiento lo establezca.

III. RESULTADOS

A. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

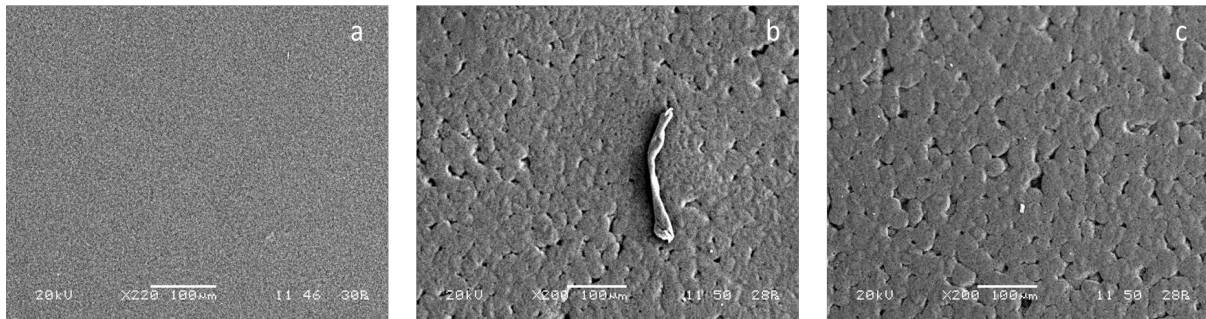


Figura 1. Comparación de fotografías a través de SEM a 100 μm de las siguientes muestras: a) PHB (control), b) PHB con Fibra de ricino control no mercerizada y c) PHB con Fibra de ricino mercerizada

B. Pruebas de espectroscopía de transmisión de infra rojo con transformada de Fourier (FT IR)

La mezcla fue vertida, evaporada y preparada (Fig. 2) para ser analizada en FTIR



Figura 2. a) Película de PHB/fibra ricino lado anverso b) Película de PHB/fibra ricino lado reverso

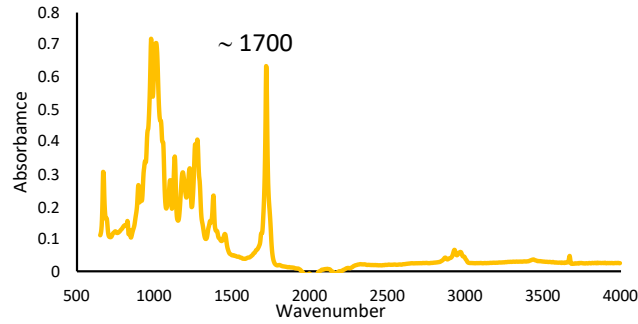


Figura 3. FT-IR de Polihidroxiuterato obtenido experimentalmente

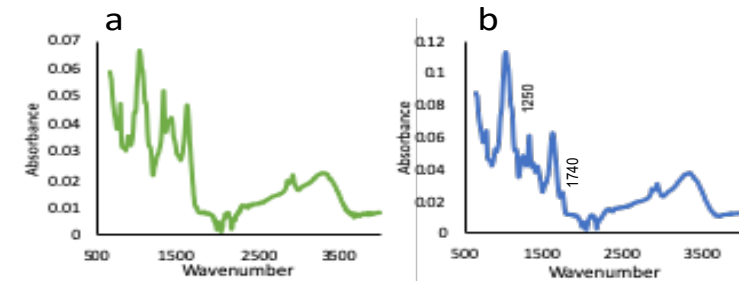


Figura 4. Comparación de FT-IR de a) Fibra ricino mercerizada y b) Fibra ricino control

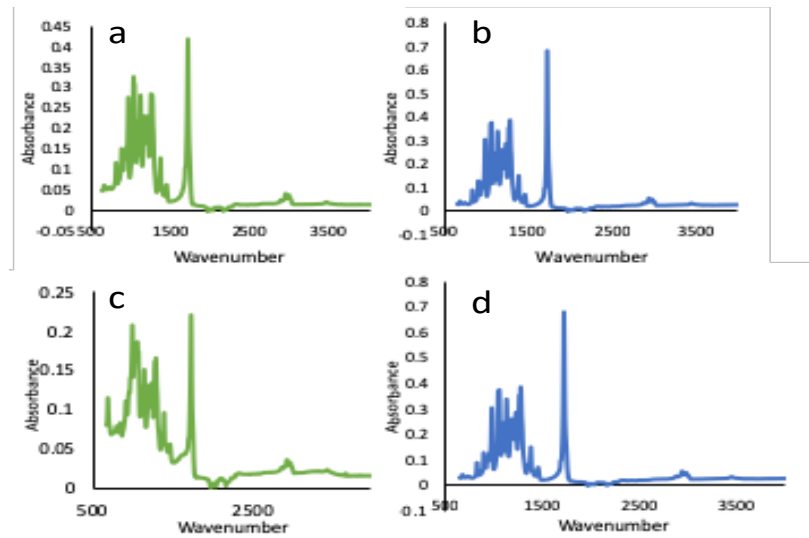


Figura 5. Comparación del FT-IR a)PHB/ricino mercerizada lado anverso b) PHB/ricino control lado anverso c) PHB/ricino mercerizada lado reverso d) PHB/ricino control lado reverso

C. *Modulo de Young*

Tabla 1. Módulo de Young para las muestras analizadas

Proceso	Módulo de Young [MPa]
Ricino mercerizada	176610 (17259)
Ricino control	189795 (25182)
PHB	411656.857 (19935)

IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS

1) Análisis Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se puede observar en las imágenes de la figura 1, que la fibra mercerizada se encuentra adherida con mayor integración a la matriz polimérica comparada con la fibra no mercerizada. Las figuras b y c, muestran la superficie de la película con fibra no mercerizada y mercerizada, en el escrutinio no fue posible identificar fibra tratada incorporada en la matriz polimérica, sin embargo, se observa para el caso b, una fibra con poco efecto pull out.

2) Análisis FTIR

En la Figura 3 se aprecian los FTIR realizados a la fibra de ricino no mercerizado y después del proceso de mercerización. En el eje de las abscisas se aprecia el valor de la frecuencia de absorción de los enlaces que son característicos de la fibra de *Ricinu c.* liso (control).

La fibra mercerizada no tiene las bandas de absorción características de la hemicelulosa, las cuales están ubicadas en las longitudes de onda de 1740 y 1250 cm^{-1} . (Gurubasappa G.,2017), de igual forma podemos apreciar una de las longitudes de onda características de ~ 1700 del PHB presente en cada uno del FTIR para nuestros diferentes procesos.

3) Análisis mecánico

Los valores determinados en las pruebas mecánicas de ruptura son únicos a la fecha. Se han encontrado datos para mezclas poliméricas PHB, PHV y fibras naturales que se encuentran por debajo del valor obtenido en nuestras muestras. Se sugiere caracterizar mecánicamente la película obtenida a fin de determinar los parámetros completamente y compararse con otros valores de otras mezclas poliméricas.

V. CONCLUSIONES

El tratamiento de superficial de mercerización fue efectivo en la fibra de ricino en una solución de hidróxido de sodio cuya concentración fue del 5% w/v. El análisis mediante SEM arrojó cambios en la morfología de la partícula. El tratamiento de mercerización tiene dos efectos en la fibra como es el aumento de la rugosidad de la superficie como resultado un

mejor enclavamiento mecánico; y segundo, que aumenta la cantidad de celulosa expuesta en la superficie de la fibra, lo que aumenta el número de posibles sitios de reacción.

Por medio del análisis de FT-IR se verificó la eliminación en la fibra mercerizada de sustancias como la hemicelulosa y de la adhesión de la fibra a la matriz.

VI. RECONOCIMIENTOS

S M C-F agradece el apoyo otorgado por parte de la DCI, universidad de Guanajuato y al programa de Verano Regional Zona Centro por el soporte y acompañamiento.

REFERENCIAS

1. Bastioli, C., Global status of the production of biobased packaging materials. *Starch-Stärke*, pp. 351-355, 2001
2. Kim, B., Lee, S., Lee, S., Chang, H., Chang, Y., y Seong Ihl, W. 1994. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fedbatch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. *Biotechnology and Bioengineering*, pp. 892-898.
3. Lee, S. Bacterial polyhydroxyalkanoates. 1996. *Biotechnology and Bioengineering*, pp. 1-14.
4. Philp, J., Ritchie, R.J. and Guy, K., Biobased plastics in a bioeconomy, *Trends Biotechnol.*, pp. 65-67, 2013.
5. Villada, H.S. y Acosta, H.A., Biopolímeros naturales usados en empaques biodegradables, *Temas Agrarios*, pp. 5-13, 2007.
6. Madison, L y Huisman, G. 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, pp. 21-53.
7. Tadeusz M. y Andrzej B. 2016. Plásticos reforzados con fibras naturales en el sector automotriz, pp 24-26
8. Neira R., Quiroz E., 2016. Influencia de la concentración de NaOH del proceso de mercerización en fibras de pseudotallo de plátano, sobre la resistencia a tracción, en un compuesto de matriz poliéster insaturada, pp. 29-56
9. Gurubasappa G., C. T. Shivasharana, Basappa B. 2017 Characterization of Polyhydroxybutyrate (PHB) Produced by Novel Bacterium *Lysinibacillus sphaericus* BBKGBS6 Isolated From Soil

Extracción de compuestos polifenólicos asistida por microondas y ultrasonido de *Crataegus mexicana* (tejocote) (A)

Laura Angélica García Ruiz

Universidad Autónoma de Zacatecas
Unidad Académica de Ciencias Químicas
Campus UAZ siglo XXI, Km. 6,
Carr. Zac.- Guad., Ejido la Escondida, Zac.
lau.agr10@gmail.com

Asesora: Lluvia López López

Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Instituto de Investigación de Zonas Desérticas
Altaír No. 200, Fracc. del Llano,
C.P. 78377, San Luis Potosí, S.L.P.
lluvia.lopez@uaslp.mx

Resumen—El fruto de *Crataegus mexicana* o tejocote se usa principalmente para consumo, sin embargo, en Europa es utilizado con fines medicinales tradicionalmente, mientras que en México este uso es limitado; por lo anterior se pretende obtener y caracterizar compuestos fenólicos al ser posibles responsables de un efecto cardioprotector; se recolectó fruto y se realizaron extracciones en diferentes condiciones utilizando la técnica de microondas y ultrasonido para obtener la mejor extracción de compuestos fenólicos. Fue posible determinar que microondas es la mejor técnica para extracción y la concentración de muestra que proporciona mayor rendimiento, se evidenció que las muestras también contienen azúcares y flavonoides entre otros compuestos, se realizó una caracterización por IR de los extractos y se comprobó su actividad antioxidante.

Palabras clave — *Crataegus*, compuestos fenólicos, extracción, antioxidante, medicinal

Abstract — The fruit of Mexican *Crataegus* or tejocote is mainly used for consumption, however, in Europe it is used traditionally for medicinal purposes, while in Mexico this use is limited; Therefore, it is intended to obtain and characterize phenolic compounds as possible responsible for a cardioprotective effect; Fruit was collected and extractions were performed under different conditions using the microwave and ultrasound technique to obtain the best extraction of phenolic compounds. It was possible to determine that microwaves are the best technique for extraction and the concentration of the sample that provides the highest yield, it was shown that the samples also contain sugars and flavonoids among other compounds, an IR characterization of the extracts was performed and their antioxidant activity was verified.

Keywords — *Crataegus*, phenolic compounds, extraction, antioxidant, medicinal

I. INTRODUCCIÓN

Crataegus mexicana, popularmente conocido como tejocote, es un árbol perene ampliamente distribuido en nuestro país y que se cultiva de manera comercial principalmente en Puebla. Es usado en la alimentación, como fuente de pectina y como forraje; aunque puede tener un amplio uso medicinal, en México es mínimo, mientras que en otros países, principalmente asiáticos, sus congéneres muestran importantes usos medicinales [1]. Por lo anterior, se pretende con este trabajo lograr un acercamiento hacia las principales propiedades del tejocote que pudieran conferirle usos tanto curativos como preventivos en el área de la cardiología, ya que en la actualidad las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en nuestro país [2]. Unos de los metabolitos secundarios que proporcionan efectos benéficos son los compuestos fenólicos, los cuales se conforman de un anillo aromático con uno o más grupos OH, con estructuras que van desde una molécula fenólica simple hasta polímeros complejos [3]. Algunas de las virtudes que se esperan del tejocote se atribuyen a que puede compartir características con otras especies pertenecientes a la misma familia como el espino blanco, el cual posee tanto actividad antioxidante como antilipemiente y

anticolesterolemiante, que en conjunto pueden producir un efecto cardioprotector [4]. A diferencia del espin blanco, el tejocote tiene pocos estudios tanto clínicos como fitoquímicos, por lo cual los objetivos del presente trabajo es realizar la extracción asistida por microondas y por ultrasonido de una variedad silvestre de *C. mexicana*, establecer las mejores condiciones de extracción, determinar el contenido total de fenoles, realizar un tamizaje fitoquímico, purificar la fracción fenólica, caracterizar por infrarrojo y determinar la capacidad antioxidante por las técnicas de ABTS y DPPH. Con estos estudios preliminares, y la posterior determinación de los principales compuestos fenólicos, nos proporcionaría información para estudios futuros *in vitro*, *in vivo*, para así conocer y determinar al tejocote como potencial fuente de moléculas cardioprotectoras.

II. METODOLOGÍA

A. Material vegetal

Se recolectaron los frutos del tejocote (*Crataegus mexicana*) silvestre en el mes de noviembre de 2018 dentro del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la UASLP (22.1271601,-100.944444). Se lavaron (agua-solución jabonosa-hipoclorito de sodio 2%-agua destilada), se les quitó la semilla y se secaron en estufa a 50 °C, y luego se molieron y tamizaron hasta obtener un polvo fino de color café rojizo que se mantuvo protegido de la luz en un lugar seco.

B. Extracción, determinación y purificación de polifenoles

Para obtener las mejores condiciones de extracción, se realizó un diseño experimental con un arreglo factorial completamente al azar (tabla 1 y 2). Se emplearon los métodos Extracción Asistida por Microondas (EAM) y Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU). Para ambas, se pesaron las cantidades de muestra correspondientes a cada concentración y se agregaron cada una a 10 mL del disolvente indicado (0% y 70% etanol). En la EAM las mezclas se vertieron en los tubos de teflón acoplados al carrusel que integra al equipo de microondas CEM MARS 6, y se corrieron a una potencia de 100 W, una temperatura de 60 °C y a cada uno de los tiempos establecidos (2, 4 y 8 minutos). Al término, cada muestra se filtró y se conservó en congelación hasta posterior determinación. Para las muestras sometidas a EAU, las muestras se colocaron en tubos de vidrio dentro de un baño de ultrasonido marca Branson 1510, a temperatura ambiente (25°C) y a los tiempos de 10, 20 y 30 minutos, de igual manera después de la extracción fueron filtrados y colocados en congelación.

Tabla 1. Parámetros EAM

Etanol (%)	Tiempo (minutos)	Muestra:Solvente
0%	2	1:20
		1:40
		1:80
	4	1:20
		1:40
		1:80
70%	8	1:20
		1:40
		1:80

Tabla 2. Parámetros EAU

Etanol (%)	Tiempo (minutos)	Muestra:solvente
0%	10	1:20
		1:40
		1:80
	20	1:20
		1:40
		1:80
70%	30	1:20
		1:40
		1:80

Se determinó la concentración total de fenoles (CTF) mediante el método de Folin-Ciocalteu. 20 μL de una dilución de la muestra (1:100), se mezcla con 100 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu, se agita por 1 min y se mantiene en oscuridad por 4 min. Posteriormente se añade 75 μL de carbonato de sodio (100 g/L), se agita y se deja en reposo con protección de la luz por 2 horas. Al término del tiempo, se mide la absorbancia a 750 nm en un lector de microplaca EpochTM marca BioTek. La absorbancia de las muestras se comparó con una curva estándar de ácido gálico para estimar la CFT en la muestra.

La CFT es expresada en miligramos de ácido gálico por gramo de fruto seco (mg AG/g). Una vez determinada la CTF, se eligieron las mejores condiciones para EAM y EAU, y se realizaron las extracciones a mayor volumen, para EAM se pesaron 10.5 g y para EAU 25.0 g. Las extracciones se filtraron, se centrifugaron y el solvente fue evaporado. Se realizó la purificación de la fracción fenólica mediante cromatografía en columna con Amberlita XAD 16 N (Sigma) como soporte sólido. Para ello, primero la resina se activó con metanol, se montó en la columna de vidrio a razón de 1:20 con la muestra. La muestra se añadió y se eluyó con agua (se descartó la fracción), seguida con etanol, recuperando esta fracción, la cual se concentró en el rotavapor y se distribuyó en cajas Petri. Se dejó secar a temperatura ambiente hasta la formación de cristales; los cristales se rasparon y pesaron.

C. Caracterización y actividad antioxidante

Se realizó el tamizaje fitoquímico, utilizando una serie de reacciones específicas para cada grupo reactivo, con ello se pone de manifiesto el metabolito secundario. Además, se realizaron los espectros de infrarrojo, utilizando el equipo Termo Scientific NICOLET iS10-ATR, las determinaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente con 25 scan.

Por último, se determinó la actividad antioxidante de los extractos por la depleción de los radicales ABTS y DPPH. Para el ensayo de inhibición del radical ABTS, éste es generado por mezcla de una solución acuosa de ABTS (7 mM) y persulfato de potasio (2.45 mM), se incuba a temperatura ambiente en oscuridad por 12-15 h para promover la generación del radical. Se diluye con metanol al 80% hasta dar un valor de absorbancia de 0.700 ± 0.002 . Posteriormente, las muestras se trataron de la forma siguiente, 1900 μL de la solución diluida de ABTS con 100 μL de la muestra (31.25 ppm) y se lee a 734 nm. La capacidad de inhibir el radical se calcula de acuerdo a la ecuación (1).

$$\% \text{ Inhibición} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{control}}] * 100 \quad (1)$$

donde A_{control} es la absorbancia de la reacción control (conteniendo todos los reactivos menos la muestra), A_{muestra} es la absorbancia de la muestra. El ácido gálico es usado como referencia. Y la inhibición es expresada como mg de ácido gálico por gramo (mg AG/g) de fruto seco del promedio de tres réplicas.

Para el ensayo de inhibición del radical DPPH, 100 μL de una dilución de la muestra (1:20), se coloca por triplicado dentro de los pocillos de una microplaca, se añaden 100 μL de la solución de DPPH (0.4 mM), se incuba a la oscuridad por 30 min. Posteriormente se lee en un lector de microplaca a 517 nm. Se utiliza la siguiente la misma ecuación mostrada anteriormente para determinar el porcentaje de inhibición. El reactivo Trolox es utilizado como referencia y se expresan como mg de equivalentes Trolox por gramo de fruto seco (mg ET/g).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cuantificación de fenoles totales (CFT) mostró que las condiciones con mayor concentración de éstos fueron para la EAM un tiempo de 4 min, concentración de 25 ppm (dilución 1:40) en etanol al 70%; mientras que para la EAU fue un tiempo de 30 min y concentración de 50 ppm (dilución 1:20) en etanol al 70% como se observa en la Figura 1. Como se describe en la literatura existen diversos parámetros a considerar dentro de la extracción de fenoles en una muestra vegetal, como la proporción muestra:solvente, el tiempo, la temperatura, el solvente, tamaño de partícula, entre otros.

Se realizó un tamizaje fitoquímico para EAM y EAU, donde muestra una gran diversidad de metabolitos secundarios, destacándose la presencia de azúcares, flavonoides, antocianinas y leucoantocianinas, ciertos tipos de taninos, así como heterósidos cardiotónicos y alcaloides que únicamente se evidenciaron por Baljet y Wagner respectivamente (Tabla 3). Son pocas las diferencias entre EAM y EAU, lo que puede representar la concentración a la que se encuentran los metabolitos.

La separación cromatográfica nos permitió obtener una fracción etanólica (fenólica) y otra acuosa (Figura 2). Y una vez transcurrido el tiempo de desecación de la fracción fenólica, obtuvimos 0.56 gr de cristales en la EAM y 0.7 g por EAU (Figura 3), correspondiente a un 5.33% y 2.79% del peso seco utilizado para la extracción respectivamente.

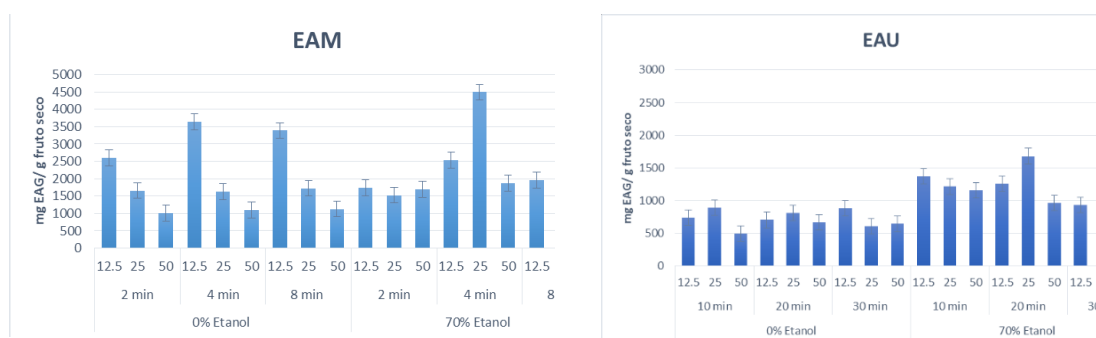


Figura 1. Gráficas de Concentración total de fenoles (CTF), mediante la EAM (a) y EAU (b).



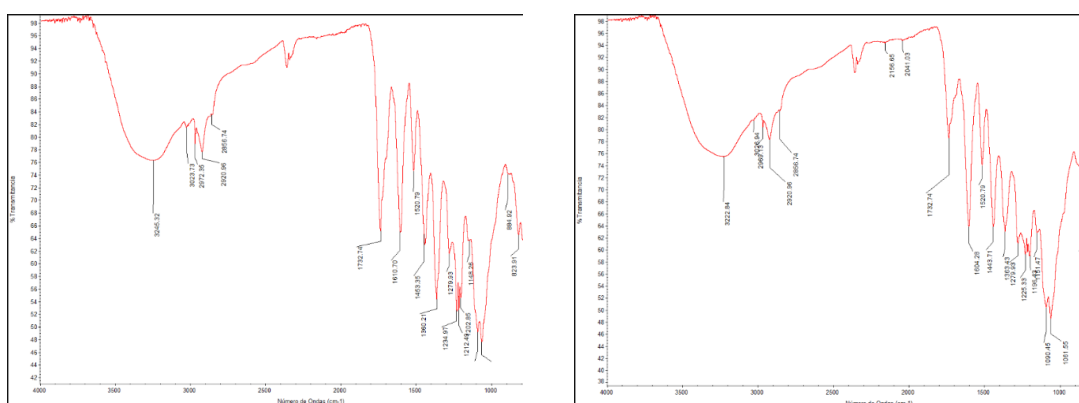
Figura 2. Fracciones acuosa y fenólica (rojiza) obtenidas por separación cromatográfica.



Figura 3. Cristales de la muestra sólida aislada (fracción fenólica)

Tabla 1. Tamizaje fitoquímico de EAM y EAU.

Reactivo	Resultado		Metabolito
	EAM	EAU	
Molish	+	+	Azúcares reductores
Felhing	+	+	Azúcares
Flavonoides, flavonas y flavonoles	+	+	Heterósidos flavónicos
Shinoda (flavonas)	+	+	Flavonoides
Costantinescu	+	+	Flavonoides
Dimroth	+	+	5-hidroxi flavonas
Ácido sulfúrico	+	+	Flavonoides
Leucoantocianinas (flavandiol- 3,4)	+	+	Leucoantocianinas
Antocianinas	+	-	Antocianinas
Liebermann-Buchard	-	-	Saponinas esteroidales y triterpenos
Rosenthaler	-	-	Saponinas esteroidales y triterpenos
Sales férricas	+	+	Taninos hidrolizables y condensados
Ensayo de la gelatina	-	-	Taninos
Oxidación de taninos	+	-	Taninos cetequicos
Ácido clorogénico	-	-	Ácido fenólico
Ácido gálico	-	-	Ácido gálico
Baljet	+	+	Heterósidos cardiotónicos
Legal	-	-	Heterósidos cardiotónicos
Raymond	-	-	Grupos metilénicos en heterósidos
Keller-Kiliani	-	-	Heterósidos cardiotónicos
Keller-Kiliani modificado por Euw-Richstein	-	-	Heterósidos cardiotónicos
Keller-Kiliani para digitoxa	-	-	Heterósidos cardiotónicos
Meyer	-	-	Alcaloides
Wagner	+	+	Alcaloides
Hager	-	-	Alcaloides
Dragendorff	-	-	Alcaloides

**Figura 4.** Espectro de Infrarrojo de la a) EAU y b) EAM.

La caracterización por infrarrojo confirmó la presencia de fenoles en nuestro extracto, pues los picos en 3245.3 cm^{-1} para EAU (Figura 4) y 3222.8 cm^{-1} para EAM indican la presencia de OH de fenoles; mientras que las señales entre los 1260 y 970 cm^{-1} indican enlaces C–O que bien pueden pertenecer a carbonilos, éteres o metóxidos. Por otro lado,

también se observan claramente enlaces C -Caromático a los 1600 cm¹ y 1450 cm⁻¹ aproximadamente, así como ácidos carboxílicos a los 1732 cm⁻¹ en ambos espectros.

Los ensayos realizados para determinar la capacidad antioxidante, mostraron un mayor porcentaje de inhibición por ABTS la muestra asistida por ultrasonido, con 59.95 ±1.66, mientras que por microondas mostró 18.74 ± 2.36; sin embargo, con DPPH el porcentaje de inhibición fue mayor (74.023 ±1.28) que el de ultrasonido (67.30 ±1.34). por lo anterior se puede apreciar que existe una mayor inhibición por parte de los extractos asistidos por microondas, lo que indica que dicho porcentaje está directamente relacionado con la cantidad y tipo de compuestos fenólicos extraídos.

IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se pudo observar que la cantidad de compuestos fenólicos no necesariamente se relaciona con la mayor concentración utilizada, de igual forma se observó que el etanol al 70% es mejor disolvente para extraer compuestos fenólicos que el agua. Y se determinó que el mejor método para extraer compuestos fenólicos es microondas, utilizando una potencia de 100 W, una temperatura de 60° C y un tiempo de 4 minutos. Ya que permite obtener un rendimiento de hasta 5.33% respecto al peso seco del tejocote.

Pudimos notar que Además de compuestos fenólicos nuestro extracto mostró presencia de azúcares y flavonoides principalmente, aunque también alcaloides y taninos. Por las dos técnicas utilizadas fue posible evidenciar que el extracto obtenido efectivamente mostraba estructura fenólica como lo mostró la caracterización por IR.

Los extractos obtenidos demostraron tener actividad antioxidante como se observó con los porcentajes de inhibición obtenidos por dos ensayos diferentes, ABTS y DPPH, mostrando un mayor porcentaje en general el extraído por microondas, confirmando un mayor contenido de compuestos fenólicos en las muestras asistidas por esta técnica; y aunque falta aún más investigación que contribuirá a conocer el efecto cardioprotector de *Crataegus mexicana*, ya se tiene mayor certeza respecto a los compuestos presentes en éste y su posible actividad benéfica en humanos.

V. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Agradezco a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, en especial al IIZD y sus investigadores, por compartir su conocimiento y otorgar las herramientas para llevar a cabo este proyecto; de igual forma agradezco a CONACyT por la oportunidad brindada.

REFERENCIAS

- [1] B. Cervantes, J. J. Ornelas, A. A. Gardea, et al., "Compuestos fenólicos de tejocote (*Crataegus spp.*): su actividad biológica asociada a la protección de la salud humana" *Rev Fitotec Mex*, Vol. 41 no. 3, pp. 339 – 349, junio 2018.
- [2] "Características de las defunciones registradas en México durante 2017", INEGI, Comunicado de prensa núm. 525/18 31 de octubre de 2018.
- [3] I. Ignat, I. Volf, V. I. Popa, "A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables", *Food Chem*, Vol. 126, no. 2011, pp. 1821–1835. Diciembre 2010.
- [4] I. Pallardo, "El espinillo blanco, en el corazón de la salud. *Medicina e Investigación*", Vol. 4 no. 1, pp. 35 – 41. agosto 2015.

Extracción de compuestos polifenólicos asistida por microondas y ultrasonido de *Crataegus Mexinaca* (Tejocote) (B)

Lessli Aneth Guerrero Dimas
Universidad Autónoma de Coahuila
Facultad de ciencias químicas
Ing. Cárdenas Valdez S/N, República,
25280 Saltillo, Coahuila
lessli_guerrero@uadec.edu.mx

Asesora: Lluvia Itzel López López
Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Instituto de investigación de Zonas Desérticas
Altair 200, Col del Llano, 78377 San Luis, S.L. P
lluvia.lopez@uaslp.mx

Resumen — Se realizó la extracción asistida por microondas y ultrasonido de los frutos de *Crataegus mexicana* variedad doméstica. Se determinó el contenido total de fenoles en las diferentes condiciones de extracción, encontrando los mejores parámetros de tiempo de extracción, proporción muestra:solvente y tipo de solvente. Se realizó un tamizaje fitoquímico para determinar los principales metabolitos secundarios tanto para la extracción asistida por microondas como por la de ultrasonido. La fracción de compuestos fenólicos fue purificada utilizando cromatografía de columna empacada con Amberlita, obteniendo un sólido cristalino naranja claro, que fue caracterizado por infrarrojo. Además, se determinó su capacidad antioxidante por las técnicas de ABTS y DPPH.

Palabras clave — Extractos, antioxidante, *Crataegus*.

Abstract — Microwave and ultrasound-assisted extraction of the fruits of *Crataegus mexicana* domestic variety was performed. The total phenol content was determined under the different extraction conditions, finding the best extraction parameters as time, sample: solvent proportion, and type of solvent. A phytochemical screening was performed to determine the main secondary metabolites for both microwave and ultrasound-assisted extraction. The phenolic compound fraction was purified using column chromatography packed with Amberlite, obtaining a light orange crystalline solid, which was characterized by infrared. In addition, its antioxidant capacity was determined by ABTS and DPPH techniques.

Keywords — Extracts, antioxidant, *Crataegus*

I. INTRODUCCIÓN

Crataegus sp. (tejocote) es un árbol perene ampliamente distribuido en México, donde se han encontrado 15 de las 1200 especies reportadas en el mundo, la especie de mayor importancia es *C. mexicana*, su fruto se utiliza principalmente como alimento, especialmente en la elaboración de mermelada y jalea. Sin embargo, también se puede utilizar para la extracción de pectinas, como forraje y en la medicina tradicional debido a que representa una solución alternativa para el tratamiento de ciertas enfermedades de alta incidencia en México.

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que son esenciales para la reproducción y el crecimiento de las plantas, estos son sintetizados como parte del mecanismo de defensa en condiciones de estrés y protegen a las plantas de enfermedades (Cervantes-Paz y col. 2018). Estos compuestos constituyen un amplio grupo, los cuales son producidos por el metabolismo secundario de la planta y son considerados compuestos bioactivos (Méndez-Flores y col. 2018). Al igual los compuestos fenólicos presentan una amplia variedad de moléculas que tienen una estructura de polifenoles, estos se dividen en diferentes clases dependiendo del número de anillos de fenol que contienen y los elementos

estructurales que unen estos anillos entre sí. Los principales grupos son flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, estilbenos y lignanos (Ignat y col. 2011).

Estos compuestos pueden ejercer su actividad biológica a través de diversos mecanismos de acción, que incluyen su interacción con algunas enzimas, factores de transcripción, receptores, membranas y a través de su capacidad para neutralizar radicales libres. Se ha reportado que los compuestos fenólicos presentan la capacidad de inhibir a la lipasa pancreática, lipoproteinlipasa y glicerolfosfato deshidrogenasa, lo que resulta en la disminución de la absorción de triglicéridos (Cervantes-Paz y col. 2018). Por esta razón los frutos, las hojas, las flores y raíces de *Crataegus* se utilizan en la medicina naturista de todo el mundo en forma de infusiones, tinturas, extractos y cápsulas, además de utilizarse como medicamento herbolario como cardiotónico (Pallardo-Fernández y col. 2016). Sin embargo, con las especies mexicanas, son pocos estudios tanto clínicos como fitoquímicos reportados, algunos de ellos describen los compuestos y la actividad antioxidante de las flores y la piel del fruto (Banderas-Tarabay y col. 2015). Con estos antecedentes, se plantearon como objetivos del presente trabajo el realizar extractos de tejocote (*C. mexicana*) utilizando como fuentes de irradiación las microondas y el ultrasonido, realizar un tamizaje fitoquímico para determinar los principales metabolitos secundarios presentes en las extracciones, purificar la fracción fenólica por cromatografía en columna, y caracterizar por infrarrojo y determinar la capacidad antioxidante por las técnicas de ABTS y DPPH. Los extractos obtenidos podrían ser fuente y útiles en diversos tratamientos como diabetes, arritmias cardíacas, insuficiencia cardíaca, entre otras., para lo cual primero hay que explorar su química y ensayos in vitro.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Obtención de la muestra

Los frutos de *Crataegus mexicana* variedad doméstica se recolectaron en el mes de noviembre de 2018, se lavaron, se les quitó la semilla, y se secaron a 50 °C. Se molieron y tamizaron, obteniendo un polvo color naranja claro que se dispuso en lugar fresco, seco y en resguardo de la luz.

B. Extracción Asistida por Microondas y Ultrasonido

Para establecer las mejores condiciones de extracción tanto en microondas como ultrasonido, se realizó un diseño experimental completamente al azar con un arreglo factorial (Tabla 1). Una vez determinadas las mejores condiciones en cada caso, se realizó una extracción a mayor volumen y se purificó utilizando Amberlite XAD16N. Para ello la resina se activó con metanol, se dispuso en una columna de vidrio a razón de 1:20 con el extracto. La elución con agua desionizada se descartó y se colectó la fracción con etanol (absoluto grado analítico). Para la preparación del extracto asistido por microondas se utilizó el equipo CEM MARS 6 (potencia 100 W y temperatura 60 °C), mientras que el asistido por ultrasonido fue en un baño ultrasónico Branson 1510 (43 MHz a temperatura ambiente).

Tabla 1: Condiciones de reacción

Microondas			Ultrasonido		
Concentración	Disolvente	Tiempo (minutos)	Concentración	Disolvente	Tiempo (Minutos)
1:20	30% Etanol	2	1:20	30% Etanol	10
1:20	30% Etanol	4	1:20	30% Etanol	20
1:20	30% Etanol	8	1:20	30% Etanol	30
1:20	70% Etanol	2	1:20	70% Etanol	10
1:20	70% Etanol	4	1:20	70% Etanol	20
1:20	70% Etanol	8	1:20	70% Etanol	30
1:40	30% Etanol	2	1:40	30% Etanol	10
1:40	30% Etanol	4	1:40	30% Etanol	20
1:40	30% Etanol	8	1:40	30% Etanol	30
1:40	70% Etanol	2	1:40	70% Etanol	10
1:40	70% Etanol	4	1:40	70% Etanol	20
1:40	70% Etanol	8	1:40	70% Etanol	30
1:80	30% Etanol	2	1:80	30% Etanol	10
1:80	30% Etanol	4	1:80	30% Etanol	20
1:80	30% Etanol	8	1:80	30% Etanol	30
1:80	70% Etanol	2	1:80	70% Etanol	10
1:80	70% Etanol	4	1:80	70% Etanol	20
1:80	70% Etanol	8	1:80	70% Etanol	30

C. Determinación del contenido de fenoles totales.

El contenido de fenoles totales de cada una de las extracciones por microondas y ultrasonido se realizó por el método de Folin-Ciocalteu, de acuerdo a lo reportado en la literatura (George y col. 2005), con las siguientes modificaciones: 20 μ L de una dilución de la muestra (1:100), se mezcló con 100 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu, se agitó por 1 min y se mantuvo en oscuridad por 4 min. Posteriormente se añadió 75 μ L de carbonato de sodio (100 g/L), se agitó y se dejó en reposo con protección de la luz por 2 horas. Al término del tiempo, se midió la absorbancia a 750 nm en un lector de microplaca EpochTM marca BioTek. La absorbancia de las muestras se comparó con una curva estándar de ácido gálico para estimar la concentración total de fenoles en cada muestra, la cual es expresada como el promedio \pm desviación estándar en miligramos de ácido gálico por gramo (mg AG/g) de fruto seco.

D. Pruebas fitoquímicas

Se realizó un tamizaje fitoquímico para determinar los principales metabolitos presentes en ambos extractos (microondas y ultrasonido).

E. Caracterización por Infrarrojo

Se llevó a cabo la caracterización por espectroscopia de infrarrojo, utilizando un equipo Termo Scientific NICOLET iS10-ATR, los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente con 25 scan.

F. Actividad antioxidante

Se llevó a cabo la determinación de la capacidad antioxidante de las extracciones por microondas y ultrasonido por los métodos de ABTS y DPPH. Para el ensayo de inhibición

del radical ABTS, éste es generado por mezcla de una solución acuosa de ABTS (7 mM) y persulfato de potasio (2.45 mM), se incubó a temperatura ambiente en oscuridad por 12-15 h para promover la generación del radical. Se diluye con metanol al 80% hasta dar un valor de absorbancia de 0.700 ± 0.002 . Posteriormente, las muestras se trataron de la forma siguiente: 1900 μL de la solución diluida de ABTS con 100 μL de la muestra (31.25 ppm) y se lee a 734 nm. La capacidad de inhibir el radical se calcula de acuerdo a la ecuación

$$\% \text{Inhibición} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{control}}] * 100 \quad (1)$$

donde A_{control} es la absorbancia de la reacción control (conteniendo todos los reactivos menos la muestra), A_{muestra} es la absorbancia de la muestra. El ácido gálico es usado como referencia. Para el ensayo de inhibición del radical DPPH, 100 μL de una dilución de la muestra (1:20), se colocó por triplicado dentro de los pocillos de una microplaca, se añaden 100 μL de la solución de DPPH (0.4 mM), se incubó en oscuridad por 30 min. Posteriormente se lee en un lector de microplaca (Epoch™ marca BioTek) a 517 nm. Se utilizó la siguiente la misma ecuación mostrada anteriormente para determinar el porcentaje de inhibición. El reactivo Trolox es utilizado como referencia.

III. RESULTADOS Y DISCUSIONES

En este trabajo se llevó a cabo la extracción de los polifenoles a partir de la planta *Crataegus mexicana* utilizando como método asistido por microondas y ultrasonido, utilizando las condiciones más favorables para cada método.

A. Extracción y purificación de la fracción fenólica

Se determinó la cantidad de fenoles totales expresado como mg AG/g de fruto seco mediante la técnica Folin-Ciocalteu. En la figura 1, se observa que las condiciones de 1:80 como proporción muestra:solvente, tiempo de 8 minutos y etanol al 70% son las que proporcionaron una mayor concentración de polifenoles. Para la extracción para ultrasonido los parámetros más favorables fueron una proporción 1:20, tiempo 30 min y solvente etanol 70%. Con estas condiciones se realizó una extracción a mayor volumen, pesando 5.25 g para microondas y 21 g para ultrasonido, en un volumen de 420 mL de etanol al 70%.

B. Purificación de la fracción fenólica por cromatografía

Se realizó la extracción por microondas pesando 21g del fruto en 420mL de Etanol al 70%, mientras que por ultrasonido se pesó 25.01g de fruto en 500mL de Etanol al 70%. Para llevar a cabo la purificación fenólica de los extractos, se preparó una columna con amberlite la cual se activó con Metanol y se hizo pasar nuestra muestra realizando lavados con Etanol, al término de la obtención de la fracción fenólica esta se colocó a secado por 48hras a temperatura ambiente. Obteniendo cristales color ámbar teniendo un rendimiento del 4.23% por el método de microondas y 2.19% en ultrasonido.

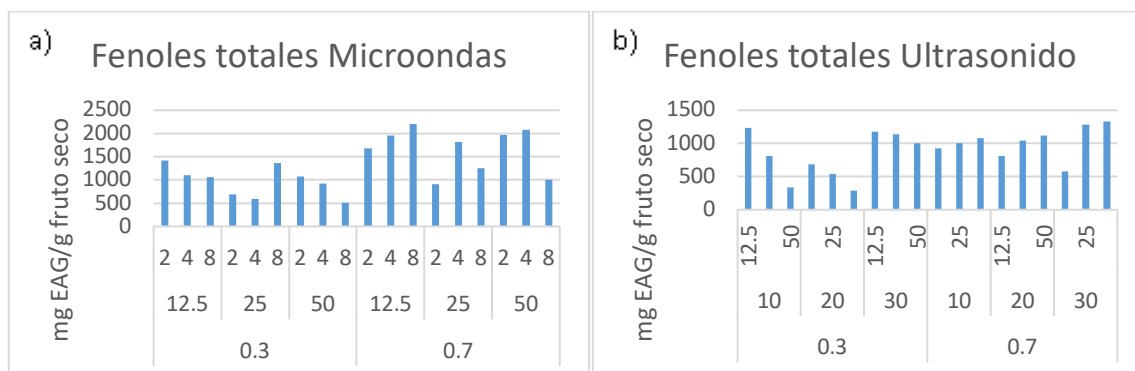


Figura 1: Determinación de fenoles totales a) extracción por microondas y b) por ultrasonido

C. Caracterización

Se llevó a cabo una caracterización fitoquímica para determinar los principales grupos de acuerdo a su reactividad. La tabla 2 muestra que tanto la extracción por microondas como ultrasonido, mostraron el mismo patrón de grupo de compuestos, lo cual dio positivo para carbohidratos, flavonoides, antocianinas, taninos y cumarinas por el método de Baljet.

Tabla 2: Fitoquímica

Grupo	Reacción	EAM/EAU	Grupo	Reacción	EAM/EAU	
Carbohidratos	Molish	+	Saponinas	Espuma	-	
	Fehling	+		Lieberman	-	
	Extracto acuoso	Shinoda		+	Buchard	-
					Rosenthaler	-
Flavonoides	Constantinesco	+	Taninos hidrolizables y condensados	Taninos	+	
			Dimroth	+	Gelatina	-
	Leucoantocianinas	Ácido sulfurico	-	Oxidación de taninos	+	
				Leucoantocianinas	+	Ácido clorogénico
Antocianinas	Antocianinas	+	Cumarinas	Baljet	+	
				Legal	-	
				Raymond	-	

D. Determinación de la actividad antioxidante por ABTS Y DPPH

Se llevó a cabo la determinación de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir del fruto *Crataegus mexicana* variedad doméstica donde los resultados mostraron porcentaje de 14.77% y 29.17% para microondas y ultrasonido respectivamente con el método de ABTS y 88.05 y 73.89 % con la técnica de DPPH para microondas y ultrasonido respectivamente

Tabla 3. Porcentaje de inhibición de los extractos

Extracción	ABTS	DPPH
Microondas	14.77 ± 6.10	88.05 ± 0.19
Ultrasonido	29.17 ± 8.51	73.89 ± 2.49

E. Caracterización por infrarrojo

La espectroscopia de infrarrojo se usó para la identificación de los grupos funcionales presentes en las moléculas del producto obtenido, la figura 2 a y b corresponde al FT-IR de la muestra por microondas y ultrasonido donde logramos observar la presencia de los principales grupos funcionales como son los hidroxilos presentes en 3222cm^{-1} , anillos aromáticos en 1446cm^{-1} y grupos carbonilos en 1060cm^{-1}

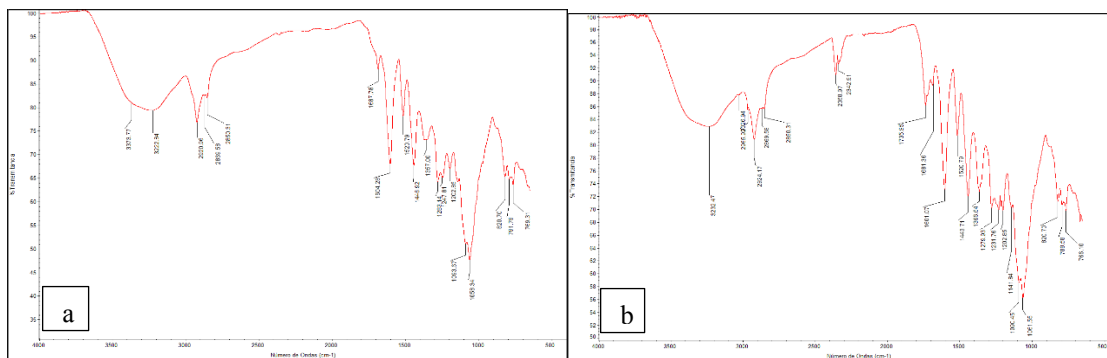


Figura 2a y b: FT-IR de los principales grupos funcionales de compuestos polifenólicos.

IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las extracciones realizadas a diferentes condiciones se analizaron para la obtención de fenoles totales en cada una, según nuestros resultados la concentración máxima de compuestos fenólicos se obtuvo con la condición 1:20 en 70% Etanol tanto en microondas como ultrasonido por 4 y 30 minutos respectivamente, la concentración máxima obtenida fue de 2085mg/g de planta por microondas y 1331mg/g de planta por ultrasonido. Se puede concluir que el fruto *Crataegus mexicana* presenta actividad antioxidante debido a los resultados en las pruebas ABTS y DPPH

V. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo brindado por el comité organizador del 21° Verano de la Ciencia de la Región Centro 2019 y por la Universidad de San Luis Potosí, al igual que el apoyo de las estudiantes Carolina Chimone Moreno y Karen Alondra Sánchez Cardona.

REFERENCIAS

- BANDERAS-TARABAY, J.A., CERVANTES-RODRÍGUEZ, M., GRADA-SÁNCHEZ, M., ESPÍNDOLA-LOZANO, M., CUEVAS-ROMERO, E., NAVARRO-OCAÑA, A., MÉNDEZ-ITURBIDE, D. (2015). Antioxidant-mediated protective effect of hawthorn (*Crataegus mexicana*) peel extract in erythrocytes against oxidative damage. *African Journal of Food Science*, 98(4) 208-222.
- CERVANTES-PAZ, B., ORNELAS-PAZ, J.J., GARDEA-BÉJAR, A.A., YAHIA, E.M., RIOS-VELASCO, C., ZAMUDIO-FLORES, P.B., RUIZ-CRUZ S., IBARRA-JUNQUERA V. (2018). Compuestos fenólicos de tejocote (*Crataegus* spp.): Su actividad biológica asociada a la protección de la salud humana. *Revista Fitotec*, 41, 339-349.

- IGNAT I.; VOLF, I., POPA, V.I. (2011). A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem*, 15, 1821-1835.
- MÉNDEZ-FLORES, A., HÉRNANDEZ-ALMANZA, A., SÁENZ-GALINDO, A., MORLETT-CHÁVEZ, J., AGUILAR, C.N., ASCACIO-VALDÉS J.A. (2018). Ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenolic compounds from *Nephelium lappaceum* L. (Mexican variety) husk. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 12, 676-681.
- GEORGE, S., BRAT, P., ALTER, P., AMIOT, J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived product. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1370-1373.
- PALLARDO FERNÁNDEZ I. (2015). El espino blanco, en el corazón de la salud. *Medicina e Investigación* 2016; 4 (1): 35 – 41.

Extracción y caracterización de mucílago de linaza para la protección solar de la piel

Alma Marina Silos Vega

Universidad Autónoma de Aguascalientes
Avenida Universidad 940, C.P. 20130
silos_vega@yahoo.com

Asesor: Juan Carlos Ramírez Granados

Universidad de Guanajuato, Sede Mutualismo
Mutualismo 303, Col. Suiza, C.P. 38060
jcramirezr@ugto.mx

Resumen — La linaza tiene un alto contenido de mucílago que es fácil de extraer mediante procesos fisicoquímicos. Esta investigación tuvo como finalidad evaluar la capacidad fotoprotectora del mucílago de linaza en disolución acuosa y en crema. Se determinó su factor de protección solar *in vitro* a través de mediciones de absorbancia e implementando una metodología propuesta previamente. Se obtuvieron factores de protección solar de 7.006 para el mucílago en disolución acuosa y 8.106 en la crema. El mucílago de linaza brinda una alternativa para ser utilizado como ingrediente activo o sinergista para la elaboración de fotoprotectores amigables con el cuerpo humano y el ambiente.

Palabras clave — mucílago de linaza, fotoprotectores, factor de protección solar.

Abstract — The flaxseed has high mucilage content that is easy to extract by means of physicochemical processes. The purpose of this research was to evaluate the photoprotective capacity of flaxseed mucilage in an aqueous solution and in a cream. The sun protection factor was determined *in vitro* through absorbance measurements and a methodology previously proposed. Sun protection factors of 7.006 and 8.106 were obtained for the mucilage in aqueous solution and in a cream, respectively. The flaxseed mucilage provides an alternative to be used as an active or synergist ingredient in the elaboration of friendly photoprotectors to the human body and the environment.

Keywords — flaxseed mucilage, sunscreens, sun protection factor.

I. INTRODUCCIÓN

El debilitamiento de la capa de ozono ha llevado a un aumento de la transmisión de la radiación ultravioleta (UV) que incide sobre la superficie terrestre, resultando en un incremento de la incidencia de cáncer de piel en todo el mundo desde los años setenta [1]; con esto, el uso de agentes de protección solar se hizo más popular y frecuente. Se conoce como protector solar a los distintos productos que se aplican sobre la piel con la finalidad de prevenir y minimizar los efectos dañinos de la radiación UV. Una de las medidas para determinar la eficacia del protector solar es a través del factor de protección solar (FPS).

Las radiaciones UV de mayor energía son las de tipo C, con longitudes de onda de 100 a 280 nm, pero éstas junto a otras radiaciones son retenidas casi totalmente por la capa de ozono en la atmósfera. Sin embargo, las radiaciones UV de tipo A y B si pasan la capa de ozono y alcanzan la superficie terrestre, tienen una longitud de onda de 320 a 400 nm y de 280 a 320 nm, respectivamente [2]. La radiación UVA y UVB causa envejecimiento de la piel, desarrollo de quemaduras solares, lesiones precancerosas y cancerosas, e inmunosupresión [3].

Aunque en la actualidad existen diversos principios activos que se emplean en la composición de los protectores solares, el uso prolongado y continuo de estos productos químicos pueden llegar a tener efectos nocivos para la salud. Por lo anterior, es necesaria la creación de protectores solares que no tengan los efectos nocivos de los productos

químicos. Se han reportado estudios de fotoprotección natural con numerosas plantas con función de actividad antisolar, estos productos pueden estar solos en la formulación o combinados con componentes sintéticos para reforzar el FPS [4]. Además, los productos naturales brindan a la piel propiedades biológicas como hidratación, efecto antiirritante, efecto repelente, entre otros; los cuales usualmente no se encuentran en los productos químicos.

El presente trabajo se realizó con el objetivo de crear un protector solar a partir de ingredientes naturales más seguros como el mucílago de linaza. Se midió la absorbancia espectral del mucílago, su coeficiente de extinción y su FPS en solución y en una crema protectora mediante una metodología *in vitro*.

II. MARCO TEÓRICO

A. Radiación solar

La luz solar natural que percibimos en la Tierra está compuesta por UVB (0.3%), UVA (5.1%), luz visible (62.7%) y luz infrarroja (31.9%) (González y col., 2009). Los efectos de la radiación UV son acumulativos y dosis-dependientes, y están relacionados con la duración, frecuencia e intensidad de la radiación [5].

B. Protectores solares

Se conoce como protector solar a los distintos productos que se aplican sobre la piel con la finalidad de prevenir y minimizar los efectos dañinos de la radiación UV absorbiéndola, dispersándola o reflejándola [6]. Los protectores tópicos pueden ser físicos o inorgánicos (pantallas) o químicos u orgánicos (filtros). Los *protectores inorgánicos* son cremas que contienen partículas que dispersan los fotones por difracción y reflexión. Actúan como barreras físicas y bloquean radiaciones UV de 290 a 760 nm. Los protectores *orgánicos* absorben fotones que ocasionan quemaduras, pero permiten el bronceado porque no evitan por completo la transmisión de UVA [7]. Las formulaciones de protección solar incorporan una gran variedad de productos químicos como los derivados del 3-bencilideno alcanfor, ácido 4-aminobenzoico, ácido cinámico, salicilato, benzofenona, ácido fenilbencimidazol, avobenzona, óxido de zinc y dióxido de titanio. Para obtener una protección UV de amplio espectro, usualmente se agrega más de un ingrediente activo a la formulación. Por esta razón, es importante distinguir qué ingredientes activos contienen los productos, ya que algunos ofrecen sólo cobertura UVA o UVB. Además, existen varios productos químicos de protección solar de los cuales se han notificado efectos adversos [5].

C. Factor de protección solar

El factor de protección solar indica el número de veces que el fotoprotector aumenta la capacidad de defensa natural de la piel frente al eritema previo a la quemadura por radiación UVB [7]. El FPS es un sistema de clasificación numérica para indicar el grado de protección proporcionado por un producto de protección solar. Se define como la relación de la cantidad mínima de energía UVB requerida para producir un eritema mínimo en la piel con protección solar y la cantidad de energía requerida para producir el mismo eritema en la piel desprotegida. El FPS es una medida de protección contra el UVB ya que es aproximadamente 1000 veces más eritemogénico que el UVA [3].

D. Linaza (*Linum usitatissimum*)

La linaza es una semilla producida por las flores azules de la planta de lino (*Linum usitatissimum*). La linaza es rica en ácido α -linoleico ($\Omega 3$), fibra soluble y fitoestrógenos; es ovalada con un borde puntiagudo y mide entre 4 a 6 mm de longitud [8]. La semilla de linaza tiene un alto contenido de mucílago de fácil extracción mediante procesos fisicoquímicos. Su caracterización espectral permite conocer la manera en que absorbe radiación UV.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Extracción del mucílago de linaza

Se pesaron 100 g de linaza que luego fue lavada con agua potable y jabón durante 2 min para retirar el polvo y suciedad. Una vez limpias, las semillas de linaza se hidrataron con 750 ml de agua destilada. Se colocaron en un vaso de precipitado las semillas con el agua, se cubrió con plástico para que no le cayera polvo o alguna otra sustancia extraña y se dejó en agitación magnética a 150 rpm durante 20 h. Posterior a esto, se colocó la alícuota en refrigeración a 10 °C durante 24 h. Después de este tiempo se filtró y eliminaron las semillas de linaza con tela de gasa. A continuación, se calentó el sobrenadante a 65 °C durante 8 h y se midió su pH con tiras reactivas antes, durante y después del calentamiento. Terminado este lapso se dejó enfriar a temperatura ambiente para luego precipitar el mucílago acuoso. Para esto, se agregó etanol en una relación 1:3 (solución acuosa: etanol). Se realizó una segunda etapa de filtración, donde el mucílago precipitado se separó de la fase acuosa utilizando papel filtro y se desechó la fase acuosa. A continuación, se eliminó el resto del solvente que quedó en el mucílago precipitado mediante calentamiento en un horno a 70 °C durante 7 h. Finalmente, se molió en un mortero el mucílago seco. Se pesó el mucílago extraído en una balanza analítica y se almacenó a temperatura ambiente en un vaso de precipitado.

B. Caracterización del mucílago de linaza

1) Absorbancia espectral y coeficiente de extinción

Se preparó una disolución de 5 ml de agua destilada con una concentración de 2 g/l de mucílago de linaza. Se midió su absorbancia de 200 a 1000 nm (a intervalos de 10 nm) para determinar su absorbancia espectral y la longitud de onda de mayor absorbancia. Una vez obtenido este dato, se elaboraron nueve disoluciones con concentraciones menores a la original (1.8, 1.6, 1.4, 1.2, 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 g/l). Se midió la absorbancia de estas disoluciones a la longitud de onda de mayor absorbancia. Con los datos de absorbancia se realizó una curva de calibración y se obtuvo la ecuación de la recta que mejor se ajusta a las mediciones. La pendiente de la recta de ajuste está relacionada con el coeficiente de extinción a través de la Ley de Beer-Lambert. Este parámetro define cuán fuertemente una sustancia absorbe luz a una longitud de onda dada y por unidad de masa.

2) Medición de FPS *in vitro* del mucílago de linaza

Se midió el FPS *in vitro* a una solución de agua destilada con mucílago de linaza, y a una crema base con mucílago. Para la primera se elaboró una disolución con una concentración de 2 g/l de mucílago para su análisis por espectrofotometría. Los espectros UV se obtuvieron

utilizando un espectrómetro UV/Vis. Se colocó la disolución en una celda para la medición de la absorbancia en el rango de 290 a 320 nm, con intervalos de 5 nm. Para la medición de la crema se preparó una crema base con manteca de karité (1.45 g), aceite de coco (1.45 g), cera de abeja (1.45 g) y una solución de mucílago de linaza (5 ml con concentración de 2 g/l), para su análisis por espectrofotometría. Se midió la absorbancia de la crema en el rango de 290 a 320 nm, a intervalos de 5 nm. Luego, se colocó una pequeña porción de la crema entre dos portaobjetos, se frotaron uno con el otro para obtener una fina capa de crema y después se colocó la muestra verticalmente en el espectrómetro para su análisis. Las mediciones fueron realizadas por triplicado y el FPS *in vitro* fue calculado de acuerdo con la Ec. 1 desarrollada por Mansur y col., 2016:

$$FPS \text{ espectrofotométrico} = FC \cdot \sum_{290}^{320} EE(\lambda) I(\lambda) Abs(\lambda) \quad (1)$$

donde FC es un factor de corrección, EE (λ) es el efecto eritemogénico de la radiación de longitud de onda λ , I (λ) es la intensidad del sol en la misma longitud de onda y Abs (λ) es la absorbancia de la solución en dicha longitud de onda.

Los valores del efecto eritemogénico (EE) versus la intensidad de la radiación (I) para cada longitud de onda fueron obtenidos por Sayre en 1979 y se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Producto del efecto eritemogénico (EE) y la intensidad de radiación (I) en varias longitudes de onda [9].

Longitud de onda (nm)	290	295	300	305	310	315	320	TOTAL
EE (λ) x I (λ)	0,0150	0,0817	0,2874	0,3278	0,1864	0,0839	0,0180	1,000

Fuente: Sayre R, Desrochers D, Marlow E.

IV. RESULTADOS

A. Extracción del mucílago de linaza

La cantidad obtenida de mucílago seco triturado fue de 2.6 g por cada 100 g de linaza. Castañeda y col. (2019) mencionan en su estudio que el mejor rendimiento de extracción de mucílago de linaza (9.8%) se obtiene a una temperatura y tiempo de 85-90°C y 4.5-5 h, respectivamente y con una relación de semilla y agua de 1:20. También se menciona que la temperatura y el tiempo de los métodos de extracción (agitación magnética y ultrasonido) afectan el rendimiento de extracción de mucílago de linaza. Mientras que Fekri y col. (2008) obtuvieron un rendimiento de extracción de 8.6 % a una temperatura de 75°C durante 3 h con agitación magnética.

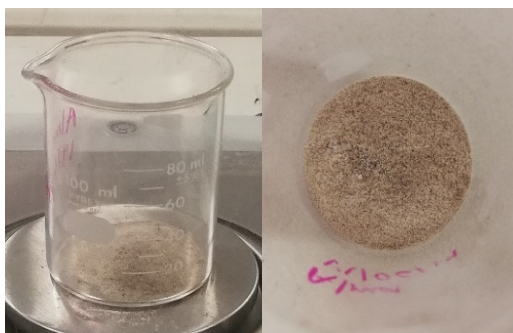


Fig. 1 Mucílago de linaza seco y triturado.

B. Absorbancia espectral y coeficiente de extinción del mucílago de linaza

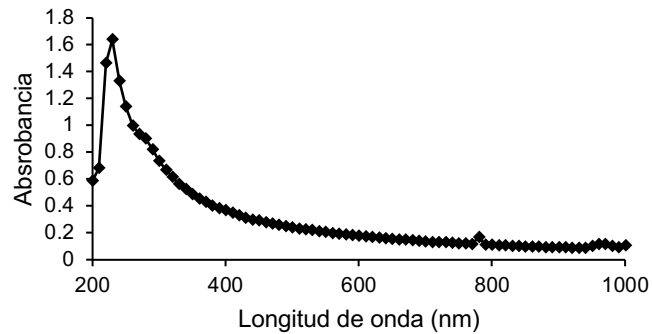


Fig. 2 Absorbancia espectral de una disolución con mucílago de linaza entre 200 y 1000 nm.

En la Fig. 2 se muestra la absorbancia espectral de una solución con 2 g/l de mucílago de linaza. La máxima absorbancia de este mucílago se produce a 230 nm.

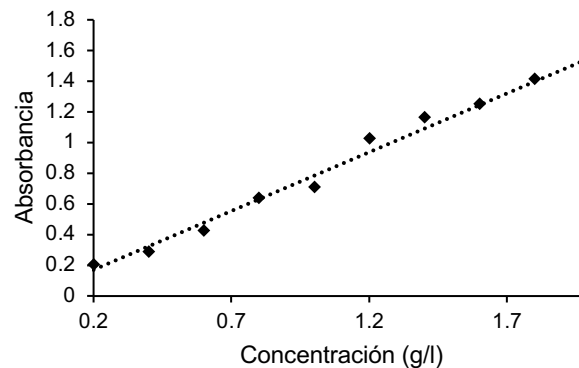


Fig. 3. Curva de calibración para el mucílago de linaza.

En la Fig. 3 observamos la curva de calibración para el mucílago de linaza y los resultados de la regresión lineal para estas mediciones. Aquí se observa que la absorbancia del soluto es directamente proporcional a su concentración; es decir, a mayor concentración mayor absorbancia. Estos datos fueron corroborados con los obtenidos en el estudio de Morales, 2018. Todas las concentraciones fueron medidas a 230 nm, longitud de onda de máxima absorción para el mucílago de linaza. El coeficiente de extinción del mucílago de linaza resultó ser $\varepsilon = 1.2844 \text{ l/z (g cm)}$.

C. Medición del factor de protección solar *in vitro*

El valor de FPS para la disolución con mucílago de linaza fue de 7.006; mientras que para la crema con mucílago de linaza (espesor de 0.44 mm) el FPS *in vitro* fue de 8.106. Se puede aumentar el FPS empleando una mayor concentración de mucílago de linaza en las preparaciones.

V. CONCLUSIÓN

La extracción del mucílago de linaza fue sencilla mediante el método implementado y de buen rendimiento. La alta solubilidad de este mucílago facilita su manejo práctico. La disolución acuosa y la formulación de crema base con mucílago de linaza tuvieron factores

de protección solar de 7.006 y 8.106, respectivamente. El mucílago de linaza es una alternativa para ser utilizado como ingrediente activo o sinergista para la elaboración de fotoprotectores amigables con el cuerpo humano y el ambiente. Cabe mencionar que, a mayor concentración de mucílago de linaza mayor es la absorción de radiación UV. Se puede realizar un estudio para incrementar el rendimiento del proceso de extracción. También sería deseable desarrollar una metodología para medir el FPS *in vitro* de materiales que no son solubles en etanol, tales como los mucílagos, para obtener estimaciones que sean más confiables.

VI. AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad de Guanajuato y a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por las facilidades y el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano. Al Dr. Juan Carlos Ramírez Granados por su tiempo y dedicación a la enseñanza brindada en la estancia de verano.

REFERENCIAS

- [1] Abaroa S. & Granados L. Bloqueadores solares. Profeco, Brújula de compra. 27 de junio de 2011.
- [2] González Pumariéga M, Vernhes Tamayo M, Sánchez Lamar Á. La radiación ultravioleta. Su efecto dañino y consecuencias para la salud humana. *Theoria*. 2009; 18 (2): 68-80.
- [3] Rai R, Shanmuga S, Sirinivas CR. Update on photoprotection. *Indian Journal of Dermatology*. 2012; 57 (5): 335-342.
- [4] Cuadrado Vega O. Cosmética solar: el envejecimiento prematuro y la protección solar. *CSV*. 2011; 3 (1): 133-144.
- [5] Sánchez Saldaña L, Lanchipa P, Pancorbo J, Regis A & Sánchez Eliana. Fotoprotectores tópicos. *Revista peruana de Dermatología*. 2002; 12 (2).
- [6] Hellwig T, Gripenrog E, Templeton K. Shining the light on sunscreen. *US Pharm*. 2012;37 (4):36-39.
- [7] Arenas R. *Dermatología. Atlas, diagnóstico y tratamiento*. 5ta ed. México, D.F.: McGraw Hill; 2013.
- [8] Ojeda L, Noguera Machado N, Herrera H. La linaza (*Linum usitatissimum* L.) y su papel nutraceúutico. *Saber, Universidad de Oriente, Venezuela*. 2017; 29, 712-722.
- [9] Mansur MC, Leitão SG, et.al. "In vitro and in vivo evaluation of efficacy and safety of photoprotective formulations containing antioxidant extracts". *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2016; 26 (2): 251-258.
- [10] Castañeda Cachay A, Zavaleta Gutiérrez N & Siche R. Optimización del proceso de extracción del mucílago de *Linum usitatissimum* utilizando un diseño secuencial. *Scientia Agropecuaria*. 2019;10 (1): 19-28.
- [11] Fekri N, Khayami M, Heidari R & Jamee R. Chemical analysis of flaxseed, sweet basil, dragon head and quince seed mucilages. *Research Journal of Biological Sciences*. 2008; 3(2): 166-170.
- [12] Morales Acosta J.P. Formulación de un protector solar a base de extracto de maíz (*Zea mays*) y determinación de su calidad. *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba*; 2018.

Fabricación de celdas solares basadas en películas nanométricas de GaAs

Lendy Marisol Hernández Gaytán

Universidad Autónoma de San Luis Potosí
(UASLP) Facultad de Ciencias
Av. Parque Chapultepec #1570, Col. Privadas
del Pedregal,
C.P.78210 San Luis Potosí, S.L.P. México
lendysol7@gmail.mx

Asesor: Irving Eduardo Cortes Mestizo

CONACYT-Coordinación para la Innovación y
Aplicación de la Ciencia y la Tecnología
(CIACYT)
Av. Sierra Leona #550, Col. Lomas 2ª Sección,
C.P.78210, San Luis Potosí, S.L.P. México
Irving.cortes@uaslp.mx

Resumen — A lo largo de los años se han estudiado diversos materiales para la creación de celdas solares. Sin embargo, se ha tenido un particular interés en GaAs, ya que es un material que puede llegar a alcanzar una eficiencia del 28%, porcentaje muy cercano a el máximo teórico calculado por el límite de Shockley–Queisser (SQ). En este trabajo se estudió el diseño de estructuras de celdas solares de GaAs a través de software de diseño asistido por computadora (TCAD), con el fin de optimizar una propuesta mediante la reducción de perdidas por efecto de recombinación. Las estructuras fueron fabricadas por MBE (Epitaxia de Haces Moleculares) y caracterizadas por Respuesta I-V antes y después de ser contactadas.

Palabras clave —Celdas Solares, GaAs, TCAD, MBE, Respuesta I-V.

Abstract — Over the years, various materials for the creation of solar cells have been studied. However, there has been an interest in GaAs, since it is a material that can reach an efficiency of 28%, close value to the maximum theoretical for the Shockley-Queisser (SQ) limit. In this work, the structure design of GaAs solar cells was studied, through Technology computer-aided design (TCAD) with the aim to optimize a proposal by means of the reduction of losses due to recombination effect. The structures were manufactured by MBE (Molecular Beam Epitaxy) and characterized by Respuesta I-V before and after being contacted.

Keywords —Solar Cells, GaAs, TCAD, MBE, Respuesta I-V.

I. INTRODUCCIÓN

La importancia de las celdas solares ha ido aumentando debido a la reciente demanda energética, ofreciendo una fuente de energía limpia y sustentable. Actualmente se han estudiado diversos materiales para la creación de estas, pero se ha encontrado un particular interés en GaAs, compuesto binario cuyo ancho de banda es de 1.424 eV, el cual alcanza una eficiencia del 28%, porcentaje muy cercano al máximo teórico predicho por el límite de Shockley – Queisser(SQ) [1].

Teóricamente la eficiencia es muy buena, pero a lo largo de la fabricación se tienen pérdidas considerables, lo cual representa un punto clave e interesante para este trabajo, las perdidas estudiadas fueron de recombinación y eléctricas. Los efectos de recombinación existentes como lo son Radiativa, SRH(Shockley Read Hall) y Auger fueron considerados. Se encontró que la recombinación que más afecta es del tipo SRH, fenómeno que se reducía al implementar la región FSF (Front Surface Field) [2], capa que en la estructura de la celda evita que los portadores fotogenerados se recombinen en los estados superficiales. En cuanto a las perdidas eléctricas, los contactos tienen un papel importante al tratar de minimizar perdidas según se ha estudiado previamente.

La elaboración de las celdas se llevó a cabo a través de un método físico como lo es epitaxia por MBE, el cual fue desarrollado en los laboratorios Bell por A.Y. Cho y J.R. Arthur. Esta técnica permite controlar el crecimiento de hasta una monocapa atómica por lo cual se puede utilizar para depositar puntos cuánticos, compuestos y películas delgadas, entre otros, de manera muy controlada. El equipo utiliza un ultra alto vacío que favorece un depósito con alto grado de pureza.

En el proceso de crecimiento, se incorporó una técnica llamada reflexión de electrones difractados de alta energía (RHEED, del inglés *reflection high-energy electron diffraction*) donde un haz de electrones de alta energía incide sobre la superficie de la muestra a un ángulo rasante. RHEED permite monitorear *in situ* la interacción con la red cristalina del sustrato, lo cual se puede observar en una pantalla de fosforo en donde se forma un patrón de difracción que nos brinda información acerca de la calidad cristalina del depósito [3].

II. METODOLOGÍA

El desarrollo de este trabajo se dividió en tres secciones las cuales se describen a continuación:

A. Diseño y Simulación de celda

Para la fabricación de la celda solar se llevó a cabo un estudio previo, bajo un software comercialmente disponible de diseño asistido por computadora (TCAD), el cual nos permitió el estudio de la secuencia de capas que componen las celdas solares, se emplearon modelos de transporte ópticos y eléctricos en el proceso numérico, se consideró el efecto de la unión semiconductor – metal por la resistencia del contacto y la barrera de Schottky para análisis de pérdidas eléctricas y en el modelado se incluyó las pérdidas de recombinación: Auger, Radiativa y SRH.

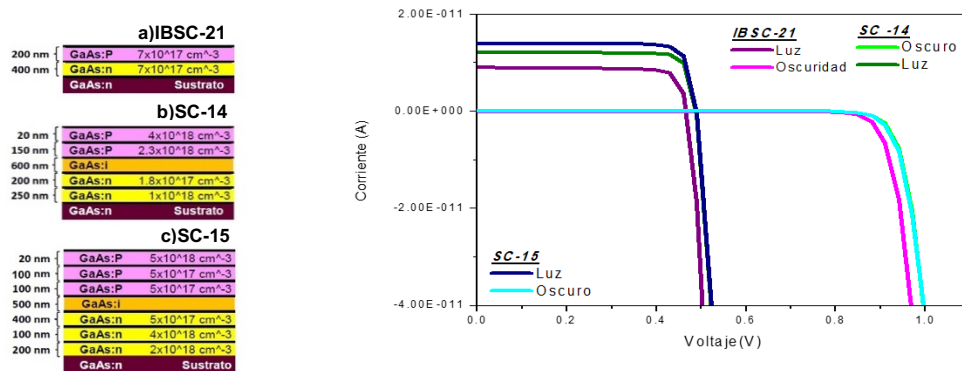


Fig.2. Estructuras y Simulación TCAD de celdas.

En este trabajo se diseñaron 3 estructuras. Se parte de una unión simple p-n no optimizada como referencia y denominada IBSC-21 (Figura 2a). La estructura SC-14 (Figura 2b) se incluyó a este estudio siendo de tipo p-i-n. La última estructura SC-15 (Figura 2c), se le añadió una capa FSF (Campo de superficie frontal) con el fin de reducir pérdidas eléctricas y la recombinación en la superficie. Las simulaciones ejecutadas nos permitieron determinar

grosor y dopación óptimo para cada una de las capas de las celdas bajo un análisis de diagrama de bandas, espectro de absorción y curva IV (Figura 2d) .

B. Crecimiento por MBE

El crecimiento de las estructuras propuestas se desarrolló por MBE utilizando un sustrato GaAs(100) tipo n. La preparación del crecimiento consiste en adherir el sustrato a un porta sustrato de molibdeno (moliblock) e introducirlo al equipo días antes del crecimiento debido a que es necesario pasar de presión atmosférica a el ultra alto vacío que utiliza el sistema.

Para realizar esta técnica se introdujo a la cámara de crecimiento nitrógeno líquido, se degasaron las celdas de Be, Si, Ga, As a 910°C, 1150°C, 950°C, 285°C , respectivamente. Posteriormente, se incorporó al reactor el moliblock con la muestra sobre el manipulador, el cual cuenta con un mecanismo que lo permite rotar teniendo así un crecimiento homogéneo de material. Las presiones de la cámara se monitorearon durante todo el crecimiento ya que el sistema debe estar a alrededor de 1×10^{-10} torr. La tasa de crecimiento de GaAs fue de 0.8 $\mu\text{m/h}$, bajo las siguientes condiciones: $T_{\text{As}} = 280^\circ\text{C}$, $T_{\text{Ga}} = 913^\circ\text{C}$, $P_{\text{As}} = 2.3 \times 10^{-6}$, $P_{\text{Ga}} = 2.4 \times 10^{-7}$.

A manera de ejemplo, se describe el crecimiento de la estructura SC-15:

1. Se creció una capa de 200 nm GaAs dopada con Si a temperatura de 1083°C, se abrieron obturadores de Ga, As, Si durante 15 min.
2. Se eleva la temperatura de la celda de Si a 1105°C, se abren obturadores Ga, As, Si nuevamente durante 7 min 30 s para crecer una capa de 100nm.
3. Se disminuye la temperatura del Si a 1038°C y se abren obturadores durante 30 min para crecer una capa de 400 nm.
4. Se crece una capa intrínseca de GaAs por lo cual solo se abren obturadores de Ga, As durante 37 min 30 s para crecer una capa de 500 nm.
5. Para el crecimiento de la capa tipo p se dopa el GaAs con Be a temperatura de 732°C. Se abren obturadores de Ga, As, Be durante 7 min 30 s. Para crecer una capa de 100nm.
6. Se eleva la temperatura de la celda de Si a 750°C. se abren los obturadores de Ga, As y Be durante 7 min 30 s para crecer una capa de 100nm.
7. Se vuelve a elevar la temperatura de la celda de Be a 796°C . Se abren los obturadores de Ga, As y Be durante 1 min 30 s para crecer la última capa de 20 nm.

Durante el crecimiento se obtuvieron patrones de difracción RHEED que se muestran en la figura 3a y 3b con los cuales se podía inferir una buena calidad cristalina del material después del depósito, esto se comprobó al finalizar el crecimiento, ya que la estructura SC-15 se observó homogénea y reluciente tal como se puede apreciar en la figura 3c.

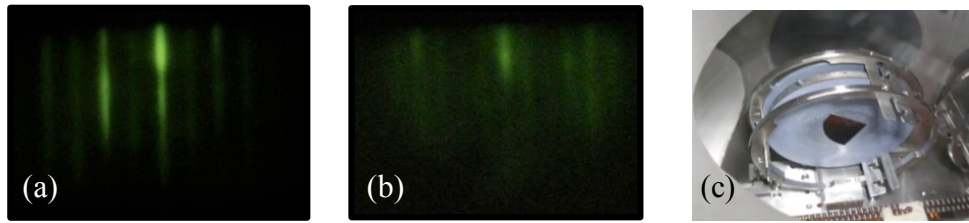


Fig.3 a)Patrón de difracción RHEED 2x [0, 1, 1]. b)Patrón de Difracción RHEED 4x [0,-1, 1] . c)Estructura SC-15 al finalizar el crecimiento.

C. Evaporación de Metales para contactos

Para los contactos de las estructuras IBSC-21, SC-14 y SC-15 se utilizó un sistema de depósito de metales por evaporación marca INTERCOVAMEX modelo TE12. Este proceso se realizó en dos fases.

Fase 1: Contacto de tipo n (Inferior). En esta fase se evaporaron 70 mg de Sn (Estaño), 35 mg de plata (Ag) y 70 mg de zinc (Zn) en este orden. El contacto obtenido varía según la celda tal como se observa en la figura 3

Fase 2: Contacto de tipo p (superior). Para esta fase se evaporó solamente 75 mg de plata (Ag). El contacto formado es de aproximadamente 0.3 mm de diámetro tal como se muestra en la figura 4 para cada una de las celdas.

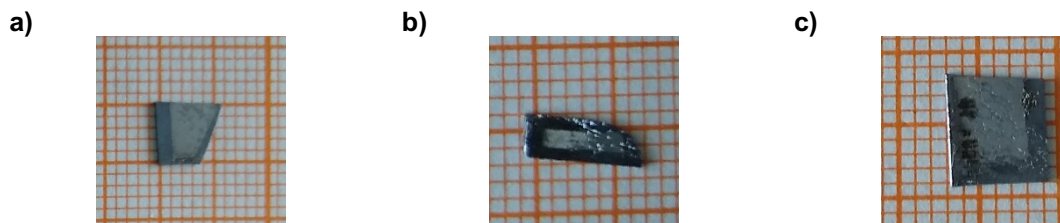


Fig.3 Contactos de tipo-n de celda IBSC-21(a), celda SC-14(b), Celda SC-15(c)

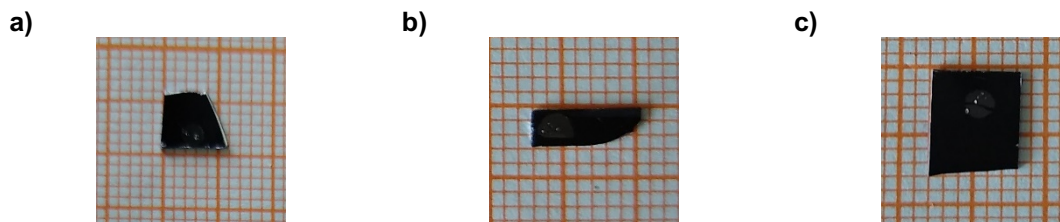


Fig.4. Contactos de tipo-p de celda IBSC-21(a), celda SC-14(b), Celda SC-15(c)

III. RESULTADOS

El estudio de las celdas solares mediante el proceso de optimización numérica por TCAD permitió diseñar dos celdas que presentaran mecanismos que las hicieran resistentes a las pérdidas más comunes exhibidas por dispositivos fotovoltaicos basados en arseniuros. En primer lugar, se implementó una estrategia de diseño que permitiera obtener la relación entre espesor y dopaje que optimizara tanto la respuesta espectral como eléctrica de la celda solar, manteniendo el total del grosor de las capas en menos de 1.5 μm . Se realizó el diseño

de capas FSF y BSF en la muestra SC-15 con la intención de reducir el efecto de las pérdidas SRH, contrastada con la muestra de referencia. Finalmente, el grosor y dopaje de la capa tapa fue optimizado con la intención de mejorar la unión metal-semiconductor y reducir las pérdidas eléctricas asociadas a esta. El resultado numérico obtenido indica que las eficiencias máximas teóricas para los dispositivos diseñados pueden alcanzar una eficiencia del 25%, de acuerdo con el proceso de optimización.

Posterior al proceso de crecimiento por MBE previamente descrito, la caracterización de cada una de las celdas fue realizada mediante la medición de Respuesta I-V obtenida con un sistema de simulación solar SS150W bajo una incidencia AM 1.5G y un multímetro Keithley. A continuación, se muestra la comparación de las respuestas de las celdas sin contactos obtenidas en la figura 5, con una gráfica de densidad de corriente y potencia generadas. Posteriormente después de la evaporación de contactos en las celdas se volvieron a hacer las mediciones, con el objetivo de tener menores caídas de voltaje, lo cual se vio reflejado en la figura 6. La respuesta corriente-voltaje nos dio a conocer los parámetros que describen el desempeño de una celda solar: la densidad de corriente en corto circuito (J_{sc}), Voltaje de circuito abierto (V_{oc}), potencia máxima (P_m), densidad de corriente máxima (J_m), voltaje máximo (V_m) y Factor de forma (FF) de cada una de las celdas. Estos parámetros están contenidos en la tabla 1.

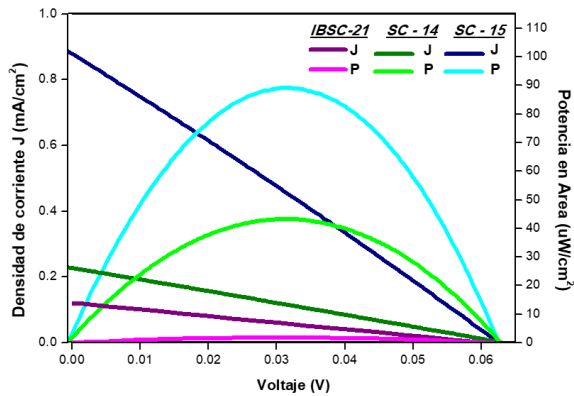


Fig.5 Gráfica de Densidad de corriente y Potencia para las celdas IBSC-21, SC-14 y SC-15 antes de ser contactadas.

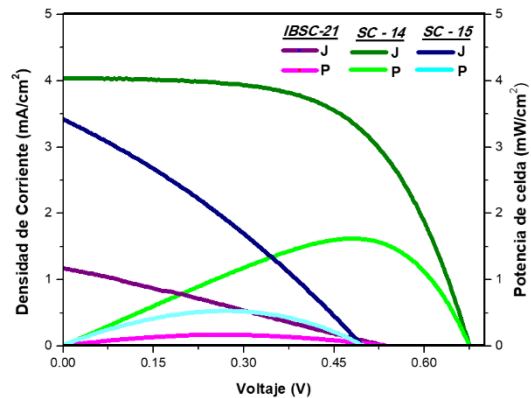


Fig.6 Gráfica de Densidad de corriente y Potencia para las celdas IBSC-21, SC-14 y SC-15 después de ser contactadas.

Tabla 1. Parámetros de las celdas solares contactadas.

	J_{sc} (mA/cm ²)	V_{oc} (V)	P_m (mW/cm ²)	J_m (mA/cm ²)	V_m (V)	FF
IBSC-21	1.1	0.53	0.16	0.59	0.27	0.27
SC-14	4	0.67	1.6	3.2	0.49	0.57
SC-15	3.4	0.49	0.51	0.26	0.9	0.3

IV. CONCLUSIONES

En este proyecto se realizó y optimizó la secuencia de capas nanométricas que conforman una celda solar basada en GaAs, utilizando parámetros reales como lo es el efecto de superficie sobre el material y la función de trabajo de los contactos, que permitieron la optimización del diseño antes del crecimiento por MBE. El estudio numérico indicó que es necesario optimizar la capa superior de la muestra, ya que las propiedades de esta controlarán las propiedades eléctricas de la muestra y la recombinación en la superficie. Así mismo, el modelo desarrollado indica que en condiciones ideales las muestras diseñadas pueden alcanzar una eficiencia del 25%, siendo reducida en un 10% cuando condiciones reales son consideradas.

El crecimiento mediante MBE demostró ser una valiosa herramienta para el desarrollo de celdas solares, ya que permite obtener películas nanométricas con el dopaje adecuado, manteniendo la calidad cristalina del material con un ultra grado de pureza. Para contrastar el resultado numérico se realizó la caracterización eléctrica de las muestras mediante un simulador solar AM1.5G. Se obtuvo que la celda SC-14 y la celda SC-15 presentaron un aumento en la eficiencia de 10 y 3 veces, respectivamente, superando el desempeño de la celda no optimizada IBSC_21. Los favorables resultados fueron producto de la implementación de la nueva estrategia de realizar un análisis numérico donde se añaden capas extras en la estructura tradicional de la celda tipo p-i-n y a la optimización de cada una de ellas por simulación.

En este trabajo se demostró que en las instalaciones del laboratorio de nanoestructuras de la CIACYT-UASLP es posible desarrollar celdas solares, cubriendo todas las etapas de este proceso. Se contribuyó en el diseño asistido por computadora, en el crecimiento por MBE, en el depósito de electrodos mediante evaporación de metales y en la caracterización eléctrica del dispositivo a través del análisis de curvas corriente-voltaje.

V. AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo financiero por parte de CEMIE-SOL 22, FRC-UASLP, C19-FAI-05-18.18, CONACYT-México a través de las subvenciones: INFR-2015-01-255489, CB 2015-257358, PNCPN2014-01-248071 y las cátedras CONACyT (Proyecto No.44) para la realización de este proyecto.

Agradezco al 21° Verano de la Ciencia de la Región Centro y 25° Verano de la ciencia UASLP por la oportunidad y el apoyo otorgado para la realización de este trabajo de investigación.

Se extiende un enorme agradecimiento al Dr. I.E. Cortes Mestizo quien dirigió este proyecto, Así mismo al Dr. V.H. Méndez García y Dra. L.I. Espinoza Vega, así como a sus estudiantes de Doctorado C.A. Mercado Ornelas y L.F. Perea Parrales y compañeros de verano por la colaboración en este trabajo, conocimiento compartido, amabilidad y apoyo brindado lo cual hizo de mi estancia una experiencia muy grata.

REFERENCIAS

- [1] X. Wang, M. Ryyan Khan, J.L. Gray, et al., “Desing of GaAs Solar Cells Operating Closet o the Shockley-Queisser Limit”, *IEEE Journal of Photovoltaics*, Vol. 3, pp. 737-744, Apr. 2013.
- [2] A. Hemmani, B.Dennai, A. Nouri, H.Khachab and B.Dekkich, “Effect of the FSF and BSF Layers on the performances of the GaAs Solar Cell”, *Journal of Ovonic Research*, Vol.13, pp. 307-314, Dic. 2017.
- [3] Sulabha K. Kulkarni, *Nanotechnology: Principles and Practices*, Ed. Springer. India, 2015.

Filogenia molecular de las Arseniato reductasas (ACR2) en plantas y hongos

Eduardo Torres Martínez

Universidad Autónoma de Zacatecas
Unidad Académica de Ciencias Biológicas
Av. Preparatoria, Col. Hidráulica,
98068 Zacatecas, Zac.
elpira1997@hotmail.com

Asesor: César Díaz Pérez

Universidad de Guanajuato
Departamento de Ingeniería Industrial
El Mayorazgo, Ignacio Zaragoza No. 749, Centro
38900 Salvatierra, Gto.
sasa.97@live.com

Resumen — Los organismos a través del tiempo se han visto obligados a modificarse para poder sobrevivir en un ecosistema dinámico, han llegado al punto donde puede absorber cantidades de MP sin sufrir daños letales. En este artículo realizamos un análisis filogenético del gen ACR2 en plantas y hongos usando la herramienta NCBI se hizo una base de datos con todas las secuencias similares a la de interés, también se utilizó ClustalW para los alineamientos, MegaX para la elaboración del árbol. Obtuvimos el árbol filogenético, así como los diferentes dominios de las 385 secuencias proteicas utilizadas.

Palabras clave — *Arabidopsis thaliana*, metales pesados, Arsénico.

Summary — Organisms over time have been forced to change in order to survive in a dynamic ecosystem, they have reached the point where they can absorb amounts of MP without suffering lethal damage. In this article we made a phylogenetic analysis of the ACR2 gene in plants and fungi using the NCBI tool, a database was made with all the sequences similar to the one of interest, ClustalW was also used for the alignments, MegaX for the tree elaboration. We obtained the phylogenetic tree, as well as the different domains of the 385 protein sequences used.

Keywords — *Arabidopsis thaliana*, heavy metals, Arsenic.

I. INTRODUCCIÓN

A lo largo del tiempo todos los organismos han tenido que superar distintas modificaciones en el ecosistema, que van desde desastres naturales hasta la modificación de manera antropogénica, por lo que han tenido que desarrollar distintos mecanismos para soportar estos cambios. Una de las problemáticas que afectan más a los organismos son los metales pesados (MP), los cuales son aquellos elementos químicos con una alta densidad (mayor a 4 g/cm³), masa y peso atómico por encima de 20, con estas características son considerados aluminio (Al), bario (Ba), berilio (Be), cobalto (Co), cobre (Cu), estaño (Sn), hierro (Fe), manganeso (Mn), cadmio (Cd), mercurio (Hg), plomo (Pb), arsénico (As), cromo (Cr), molibdeno (Mo), níquel (Ni), plata (Ag), selenio (Se), talio (Tl), vanadio (Va), oro (Au) y zinc (Zn) [1, 2].

El As presenta principalmente dos formas químicas de gran relevancia una es el arseniato (As V), el cual en las plantas es absorbido por el sistema radical por medio de PHT1:1 y PHT 1:4 (transportadores de fosfato de alta y media afinidad) [3], dentro de este tejido sufre una reacción de óxido reducción para formar arsenito (As III) esto es por medio de la enzima arseniato reductasa (ACR2), para después ser transportado a la parte aérea para ser almacenado en las vacuolas del tejido [4].

Hay dos grupos más de organismos que son relevantes en este tema Hongos y Bacterias; en los hongos la tolerancia al arsénico es proporcionada por el grupo de genes ACR1, ACR2 y ACR3. ACR1 codifica un factor de transcripción putativa que regula la transcripción de ACR2 y ACR3, posiblemente al detectar directamente los niveles de As celulares. ACR2, al igual que en las plantas codifica para una enzima arseniato reductasa y se ha demostrado que ACR3 codifica un transportador de salida de As (III) expresado en membrana plasmática. El grupo de genes, por lo tanto, proporciona un mecanismo para detectar, reducir y expulsar As. Sin embargo, una segunda vía para la desintoxicación está presente en la levadura en forma de vacuolas: el As (III) citosólico complejado con glutatión puede ser secuestrado en este compartimiento a través de un transportador de tipo ABC, YCF1, que también transporta conjugados de otros compuestos nocivos [5].

Por otra parte, las bacterias adquirido herramientas para sobre llevar este tipo de contaminación, en estos organismos el As es expulsado por diferentes mecanismos, el principal es cuando el As (V) ingresa a la célula a través de los transportadores de fosfato mientras que el arsenito lo hace a través de las acuagliceroporinas. Dentro de la célula, ambos oxianiones pueden llevar a cabo sus efectos tóxicos. Por otra parte, el arsenito se une a la proteína represora ArsR, provocándole un cambio conformacional que resulta en la liberación de la región reguladora del operon, promoviendo así su transcripción. De esta forma el As (V) puede ser reducido por la arsenato reductasa (ArsC) a arsenito, el cual a su vez es expulsado a través de la proteína de membrana ArsB [6, 7].

Hoy en día conocemos la base molecular de la evolución propuesta por Darwin. Las mutaciones del ADN son la fuerza productora de variabilidad sobre la que actúa la selección natural. La mutación se considera un proceso aleatorio, aunque está influenciado por una amplia variedad de factores, como lo son el modo de vida de los organismos, el tiempo de generación, o la tasa metabólica [8].

Además, genes distintos tienen tasas evolutivas distintas que dependen de la estructura y función de las proteínas que codifican.

Muchas proteínas están formadas por dos o más unidades compactas, discretas y plegadas en forma independiente dentro de su estructura terciaria llamadas dominios o dominios proteicos. Constituyen las unidades funcionales y estructurales fundamentales de las proteínas. Los dominios proteicos que poseen las mismas características estructurales se agrupan en las denominadas familias de dominios y pueden encontrarse presentes en proteínas muy distintas. Por otro lado, tenemos las familias de proteínas que son aquellas que poseen un ancestro común, están constituidas por secuencias de aminoácidos similares y se han desarrollado a través de una evolución divergente.

Distintas regiones del genoma presentan patrones y tasas de mutación diferentes, relacionados con el estrés replicativo (número veces que se copia por generación), la recombinación, la metilación del ADN o el posicionamiento de los nucleosomas. Debido a la naturaleza poblacional del proceso evolutivo, algunas de estas mutaciones se perderán con el tiempo, pero otras se fijarán en la población (lo que conocemos como sustituciones). En lo que respecta a la inferencia filogenética, las sustituciones son una fuente de información muy valiosa que nos permite establecer relaciones de parentesco y estudiar la naturaleza del proceso evolutivo.

Para poder ver este proceso y cambios se han creado diferentes métodos y representaciones como lo es un cladograma, este es un diagrama ramificado que indica las relaciones filogenéticas al interior de un grupo biológico. Contiene un número n de taxones terminales, los cuales forman el grupo de estudio o grupo interno; además, hay un taxón que es el grupo externo y sirve para enraizar el árbol. El grupo hermano es el taxón que está más cercanamente emparentado con otro. De estas filogenias se deriva la sistemática molecular, o las filogenias moleculares que es una representación gráfica de todos los grupos evaluados a nivel de moléculas (secuencias de ADN completas o de un solo gen, secuencias de RNA o secuencias proteicas).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Se generó una base de datos con la ayuda de Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome), y se modificaron los siguientes parámetros Max target sequences = 2000, Expect threshold = $1e-10$ y Word size = 6, se insertó la secuencia proteica *acr2* en *Arabidopsis thaliana* (NP_568119) [9], se realizó la búsqueda en bases de datos de plantas (green plants (taxid:33090)) y en hongos (Fungi (taxid:4751)), estas secuencias fueron sometidas a un proceso de depuración para eliminar todos los fragmentos pequeños, esto se hizo con el software Estimating Phylogenies of Species (EpoS v.0.9) [10], fueron alineadas utilizando el programa ClustalW 2.1.

Después se procedió a buscar los dominios con ayuda de la herramienta Conserved Domain Database (CDD) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) con la opción Batch CD-Search, se procedió a una revisión manual para eliminar los dominios que no son de interés (Dominios de interés: *acr2p*, *Cdc25*, *RHOD*).

Los alineamientos finales se realizaron con Muscle (v.3.8.31), se corrigieron manualmente con el programa SeaView (v.4.7).

Los arboles filogenéticos fueron realizados con el programa MegaX, utilizando la matriz de sustitución Jones–Taylor–Thornton [11], y la inferencia evolutiva se determinó empleando el método de *Maximum Likelihood*, con *LG model*, usando *Gamma Distributed With Invariant sites (G+I)*, los límites de confianza fueron estimados por 1000 repeticiones de *bootstrap*. Para colocar la raíz del árbol se utilizó como grupo exterior a las proteínas de *A. thaliana* (AII82178.1, AII82177.1 y AII82181.1), las cuales fueron obtenidas de un estudio que se realizó simultaneo a este con un enfoque diferente.

III. RESULTADOS

El primer paso a seguir para generar la filogenia de una proteína es obtener un juego de datos de trabajo, que en este estudio consistió en secuencias de proteínas homólogas. En una búsqueda inicial se obtuvieron 643 secuencias en total (Tabla 1). Este resultado no es de extrañar, dada la gran redundancia de información entre las diferentes bases de datos y a que se siguen generando más y más secuencias. De hecho, este problema no sólo ocurre

entre diferentes bases de datos, sino también dentro de una misma base; esto se hizo evidente en los pasos de depuración de secuencias.

Fuente	Tipo de organismo	Número de secuencias	Descripción
NCBI	Plantas	207	Secuencias obtenidas de la búsqueda en la base de datos green plants (taxid:33090)
NCBI	Hongos	436	Secuencias obtenidas de la búsqueda en la base de datos Fungi (taxid:4751)

Debido a la redundancia, se siguió un protocolo de limpieza o eliminación de secuencias repetidas y de fragmentos de proteínas. Después de tres rondas de limpieza se obtuvieron 385 secuencias en total: 115 secuencias de plantas y 270 secuencias de hongos.

Posteriormente las 385 secuencias se alinearon para identificar familias preliminares y para hacer un análisis de dominios. Usando este alineamiento se procedió al análisis de las secuencias más parecidas entre sí, encontradas con base en su distribución dentro del árbol guía (producido con clustalW). Se encontró un total de 26 grupos distintos. En la figura 1 podemos observar las familias de dominios y tamaños de las diferentes secuencias de proteínas, datos obtenidos de CDD.

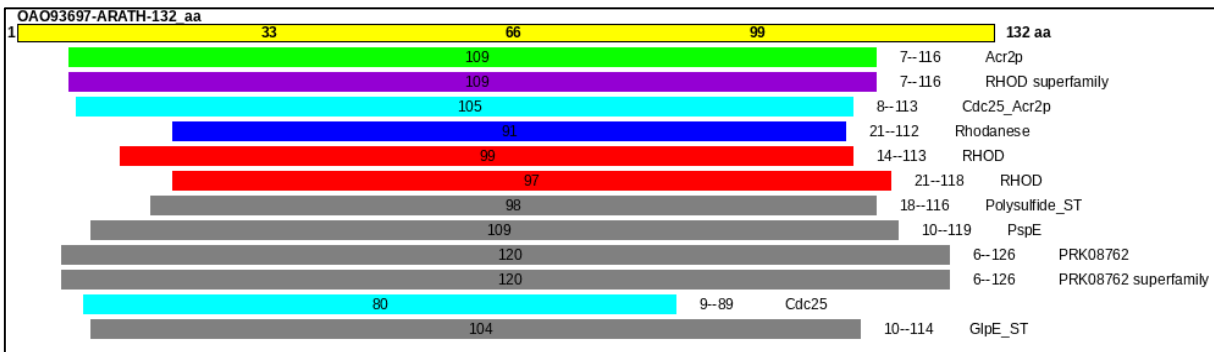


Fig. 1. Representación gráfica de dominios y tamaños de las secuencia NP_568119.

Se efectuó un refinamiento del alineamiento (por que los programas existentes para realizar alineamientos múltiples pueden introducir errores al construir el alineamiento, sobre todo cuando se manipula un gran número de secuencias) por inspección visual utilizando el editor SeaView, con base en los resultados de los alineamientos de las búsquedas con Blastp. Este último alineamiento fue el utilizado en la construcción del árbol filogenético (Fig. 2).

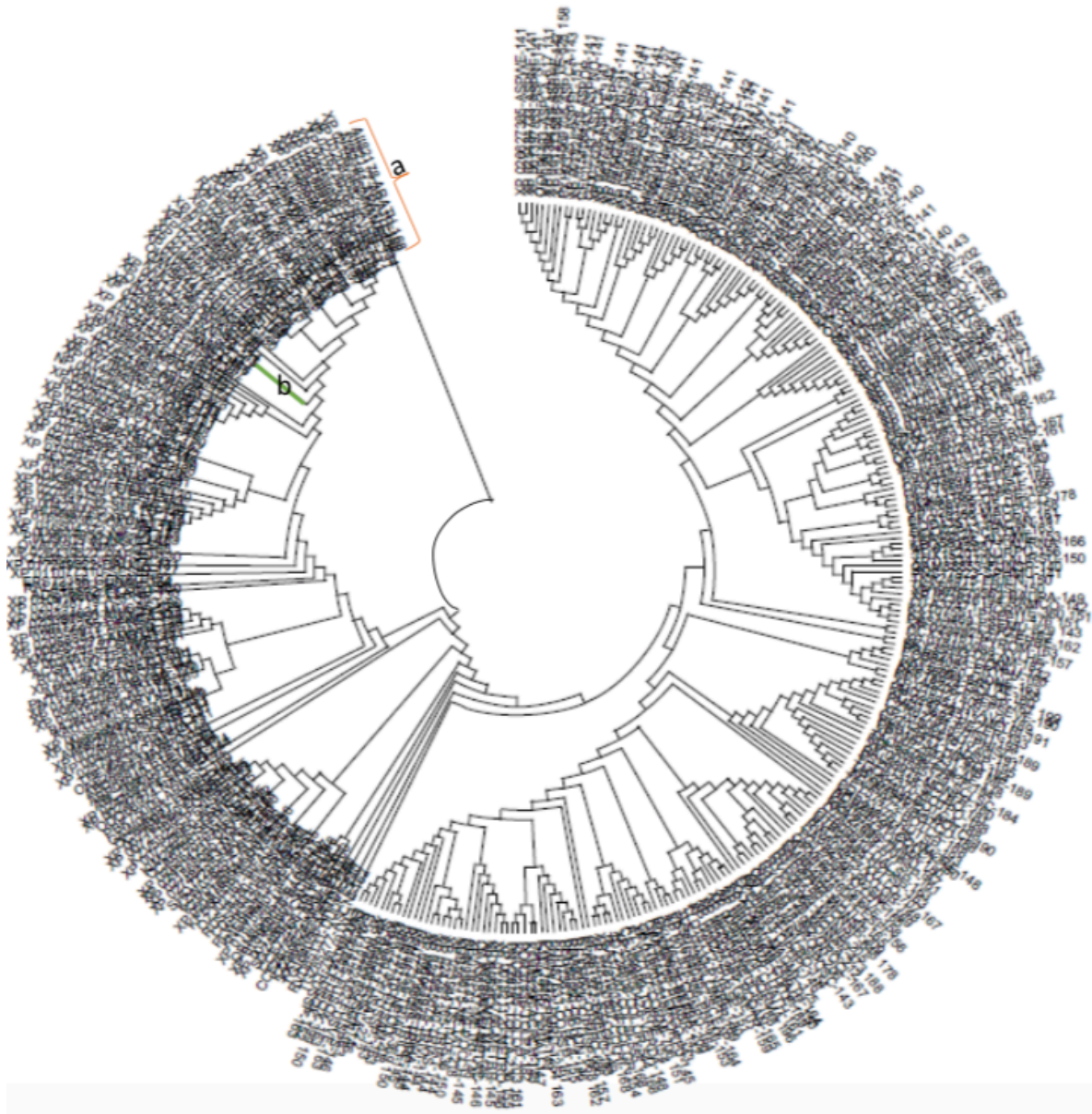


Fig. 2. Árbol filogenético de las secuencias analizadas: a) Raíz de árbol. b) Línea terminal de la secuencia de *A. thaliana*.

IV. CONCLUSIONES

En este trabajo se identificaron un total de 385 secuencias de proteínas pertenecientes a la familia de proteínas transportadoras ROHD y se llevó a cabo el primer análisis filogenético de esta familia.

Las RHOD es una familia de dominios proteicos donde esta *acr2* y *cdc25* los cuales son los encargados de resistencia al As y a otros MP, el tamaño de estos dominios es aproximada de 109 aa.

Esta familia de proteínas ha tenido y seguirá teniendo una importancia en la investigación de remediación por su alto transporte dentro de los organismos tanto en hongos como en plantas.

En conclusión, la familia de las CHR representa un grupo de proteínas antiguo, con una distribución filogenética amplia y cuya historia evolutiva ha estado sujeta a varios eventos de duplicación, fusión, y/o sustitución de dominios, por lo que es posible que sus miembros participen en funciones adicionales al transporte de As.

V. RECONOCIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Guanajuato, a la Universidad Autónoma de Zacatecas y al CONACyT por las facilidades y el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano.

REFERENCIAS

- [1] Shimada, A.M. Nutrición animal. 3 Ed. México (México): Trillas, 388 p. 2005.
- [2] Concon, J.M. Heavy metals in food. In: Food Toxicology, Part B: Contaminents and Additives. New York, Dekker, 3(4), p.1043-1045. 2009.
- [4] Dhankher OP, Rosen BP, Mckinney EC, Meagher RB, Hyperaccumulation of arsenic in the shoots of *Arabidopsis* silenced for arsenate reductase (ACR2). Proceedings of the National Academy of Sciences 103, 5413-8. 2006.
- [4] Shin H, Shin HS, Gary RD, Maria JH. Phosphate transport in *Arabidopsis*: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. Plant J 39:629–642. 2004.
- [5] Ghosh M, Shen J, Rosen BP. Pathways of AsIII detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci USA 96: 5001–5006. 1999.
- [6] Bhattacharjee H & Rosen B, Arsenic Metabolism in Prokaryotic and Eukaryotic Microbes. In: Nies D, Silver S, eds. Molecular Microbiology of Heavy Metals. Springer Berlin Heidelberg, Microbiology Monographs vol. 6. 371-406. 2007.
- [7] Branco, R., A.P. Chung & P.V. Morais. Sequencing and expression of two arsenic resistance operons with different functions in the highly arsenicresistant strain *Ochrobactrum tritici* SC1124T. BMC Microbiol 8:95. 2008.
- [8] Bromham, L. Why do species vary in their rate of molecular evolution? Biology Letters, vol. 5, no. 3, pp. 401–404. 2009.
- [9] The Kazusa DNA Research Institute, The Cold Spring Harbor and Washington University in St Louis Sequencing Consortium & The European Union Arabidopsis Genome Sequencing Consortium. Sequence and analysis of chromosome 5 of the plant *Arabidopsis thaliana*. NATURE. VOL 408. 823-826. 2000.
- [10] Thasso, G., M. Brinkmeyer and S. Böcker. EPoS: a modular software framework for phylogenetic analysis. BIOINFORMATICS. Vol. 24:20. 2399–2400. 2008.
- [11] Jones DT, Taylor WR, Thornton JM, The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. Computer Applications in the Biosciences 8: 275-282. 1992.

Generación de líneas transgénicas de pez cebra que contengan el sensor de la actividad de calcio GCaMP6

Karla Nalini Albor Martínez

Universidad Autónoma de Aguascalientes
Av. Universidad # 940, Ciudad Universitaria,
C.P. 20131, Aguascalientes, Ags.
karlaalbor@hotmail.com

Asesor: Luis Roberto Rodríguez Ortiz

CONACYT-Instituto de Neurobiología – UNAM
Departamento de Neurobiología Celular y Molecular
Boulevard Juriquilla #3001,
C.P. 76230, Juriquilla, Querétaro.
lrrodriguezor@conacyt.mx

Resumen — Se presenta el uso del sistema de transposones Tol2 y los diferentes procesos moleculares que se llevaron a cabo con el propósito generar de un vector de clonación capaz de destacar la actividad de calcio GCaMP6 en neuronas por medio de marcadores fluorescentes, utilizando el método de la microinyección de embriones para la generación de una línea transgénica de pez cebra.

Palabras clave — Sistema Tol2, vector de clonación, GCaMP6, microinyección

Abstract — This work shows the use of the Tol2 transposon system and the different molecular processes that were carried out with the purpose of generating a cloning vector capable of highlighting GCaMP6 calcium activity in neurons by means of fluorescent markers, with microinjection of embryos as method for the generation of a transgenic zebrafish line.

Keywords — Tol2 system, cloning vector, GCaMP6, microinjection

I. INTRODUCCIÓN

El pez cebra es uno de los modelos animales más completo utilizado para diversos de estudios científicos, debido a que es posible obtener descendencia de manera rápida, su mantenimiento es fácil y además presenta un buen nivel de homología genética con el hombre. Estas características han permitido estudiar de forma eficiente la transgénesis y sus efectos, principalmente por las alteraciones en el fenotipo del organismo en etapa temprana de desarrollo. Se decidió emplear en este organismo el sistema Tol2, ya que es ideal para combatir principales limitaciones que existen en la generación de líneas transgénicas de pez cebra por lo cual al utilizarlo es posible: 1) Reducir los pasos para la clonación, como la elección de enzimas de restricción o los métodos de PCR, 2) Aumentar las tasas de transgénesis basadas en plásmidos y 3) Facilitar la detección de embriones transgénicos.

Con ayuda del sistema de transposones Tol2 se planea construir un vector que permita generar una línea transgénica de pez cebra que contengan el sensor de la actividad de calcio GCaMP6s.

II. MARCO TEÓRICO

Sistema Tol2kit

El sistema Tol2kit utiliza clonación basada en recombinación específica del sitio (tecnología *gateway*) para permitir el ensamblaje rápido y modular de construcciones [promotor] -

[secuencia de codificación] - [etiqueta 3'] en un *esqueleto de transposón Tol2*. Incluye un vector de destino y una variedad de clones de entrada ampliamente útiles, incluidos los promotores *hsp70* y *beta-actina*; proteínas fluorescentes citoplasmáticas, nucleares y localizadas en membrana; entre otras características. Tol2kit facilita enormemente la transgénesis del pez cebra y simplifica el intercambio de clones. [1]

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. SnapGene

Aplicación que permite realizar de manera fácil y rápida planear, simular y visualizar la clonación de ADN y reacciones de PCR, así como otros procedimientos moleculares.

B. NanoDrop

Espectrómetro de espectro total (220-750 nm), mide concentraciones utilizando 1 µl de la muestra de interés, es capaz de medir muestras muy concentradas sin necesidad de una dilución previa.

C. Microscopio de Epifluorescencia

Microscopio de epifluorescencia con cámara adaptada para obtener imágenes.

D. QIAquick Gel Extraction Kit

La purificación del producto de PCR a partir de bandas cortadas del gel de agarosa siguiendo el protocolo del fabricante (QIAGEN). Las bandas de agarosa se cortaron y se eluyen con el buffer QG y se transfieren en columnas para centrifuga. El ADN se extrae de la columna con 50 µl de agua y se cuantifica su concentración en el NanoDrop.

E. GeneJET Plasmid Miniprep Kit

A partir de los inóculos previos en cultivo líquido con el material genético de interés y de acuerdo con el protocolo del fabricante (Thermo Scientific). Se transfirió alrededor de 1.5 ml del inóculo a un tubo de esta capacidad, se centrifugó para formar un pellet el cual se resuspendió con RNAsas, las bacterias se lisan y se neutralizan y posteriormente se centrifugan para transferir el sobrenadante a la columna. La columna se lava y el ADN se extrae con 50 µl de agua y se cuantifica su concentración en el NanoDrop.

F. PCR

Materiales: Buffer 10X (sin Mg), 10 mM dNTP's, 50 mM MgCl₂, cebadores, ADN molde, Taq polimerasa, H₂O µQ, termociclador.

Con LR76 y LR77:

Desnaturalización: 94°C x 1 min.
30 ciclos
Desnaturalización: 94°C x 30 seg.
Alineación: 54°C x 30 seg.
Síntesis: 72°C x 2 min 40 seg.
Síntesis final: 72°C x 3 min.

Con LR78 y LR79:

Desnaturalización: 94°C x 2 min.
30 ciclos
Desnaturalización: 94°C x 30 seg.
Alineación: 52°C x 30 seg.
Síntesis: 72°C x 4 min 30 seg.
Síntesis final: 72°C x 4 min.

Con LR83 y LR81:

Desnaturalización: 94°C x 5 min.
20 ciclos
Desnaturalización: 94°C x 30 seg.
Alineación: 54°C x 30 seg.
Síntesis: 72°C x 1 min 30 seg.
Síntesis final: 72°C x 3 min.

G. Restricción enzimática

Materiales: Buffer 10X, ADN, enzimas utilizadas: *HindIII*, *Sall*, *SacI*, *BamHI*, *SmaI*, *KpnI*, *EcoRI*, *PstI* y *XhoI*. La reacción se deja incubando a 37°C por un mínimo de 1 hora, después se inactiva la enzima con calor a 65°C por 25 minutos.

H. Ligación

Materiales: Vector destino, inserto, buffer 10X, Ligasa T4, H₂O μQ. Calcular la concentración necesaria de inserto dependiendo de la proporción inserto:vector que se requiera. Para esto se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración inserto} = \frac{(\text{ng vector})(\text{tamaño kb inserto})}{\text{tamaño kb vector}} \times \frac{3}{1} \quad (1)$$

En un tubo eppendorf limpio se agregan todos los componentes de la reacción y se deja incubando a temperatura ambiente por un mínimo de 2 horas o hasta por 24 horas.

I. Transformación bacteriana por choque térmico

Materiales: células competentes XL1-Blue, ADN, placas con medio LB y antibiótico, hielo, thermoblock.

En tubos de 1.5 ml agregar el ADN de interés y 100 μl de células competentes, tener un control (+) para el antibiótico correspondiente y un control (-) al cual solo se le agregan células. Incubar en hielo por 30 minutos, transferir al thermoblock a 42°C por 90 segundos e incubar en hielo por 5 minutos. En condiciones estériles agregar 800 μl de medio LB e incubar las muestras por 1 hora a 37°C con agitación. Luego centrifugar por 1 minuto a 12,000 rpm y en condiciones estériles decantar los tubos para eliminar el sobrenadante y con el restante resuspender el pellet formado. Colocarlo en la placa con medio LB y antibiótico asegurándose de cubrir toda el área de la placa con el asa. Incubar las placas a 37°C durante toda la noche, no más de 16 horas.

J. Cruza de peces, obtención de embriones y microinyección.

Un día anterior a la microinyección se separa por la tarde a un macho y dos hembras, la pecera tiene una división intermedia que permite que el macho y las hembras no interactúen

en el mismo espacio. Al día siguiente, se quitan las divisiones de las peceras para que el macho y las hembras puedan aparearse.

Para recolectar los embriones se hacen pasar por una coladera para que queden atrapados en ella y con una piseta se limpian para remover todos los residuos. Los embriones se depositan en una caja petri y se revisan en el estereoscopio para comprobar su viabilidad, posteriormente se depositan en los carriles de la placa con agarosa alineándolos bien con ayuda del asa en punta con movimientos suaves para no dañarlos.

El capilar de microinyección se llena con el material a microinyectar evitando formar burbujas y se coloca el en el microinyector. El microinyector se ajusta para verificar el tamaño de la gota a depositar en el embrión, esto se comprueba poniendo la punta del capilar a un lado del embrión para medir el tamaño de la gota y que esta sea aproximadamente una decima parte del tamaño total del embrión.

La microinyección debe realizarse en la célula y no en el corion. Si el material a microinyectar contiene algún colorante, esto es fácil de identificar, ya que si se queda en el corion este color se va a difundir muy rápido. Este procedimiento es más exitoso si los embriones se encuentran en una sola célula por lo que todo el procedimiento desde la recolección de embriones debe de ser muy ágil y rápido.

IV. RESULTADOS

Se utilizaron los vectores p5E-*h2afx*, p β -actin y el vector p-CMV así como el vector destino pDestTol2pA2, además el vector pELAVL3-GCaMP6s. El vector p β -actin se descartó después de comprobar por enzimas de restricción que posiblemente se trataba de una duplicación de p5E-*h2afx*.

A. Obtención de GCaMP6s

Se obtuvo el fragmento de 1,748 pb a partir de pELAVL3-GCaMP6s por medio de una PCR (ver figura 1a) se comprobó la obtención de este fragmento de interés utilizando los siguientes primers:

LR76-DrGCaMP1F- gccaagAattCcaccctca LR77-DrGCaMP1R- gcacccgCggccgCatcttc

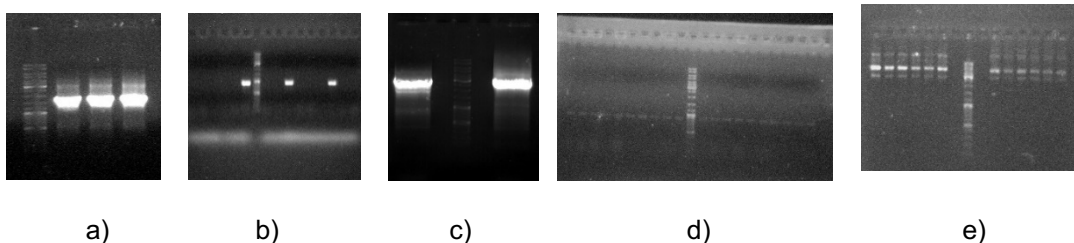


Fig. 1. a) Bandas de GCaMP6s de 1.8 kb, b) colonias positivas p5E-*h2afx*- GCaMP6s de 1 kb, c) Bandas de p5E-*h2afx*-GCaMP6s completo 2.7 kb, d) p5E-*h2afx*-GCaMP6s en vector destino pDestTol2pA2 con tamaño de 1 kb, e) primeras 6 muestras restricción con *EcoRI* y segundas 6 muestras restricción con *KpnI* ninguna banda corresponde a los cortes

B. Ligación de GCaMP6s al promotor p5E-h2afx y transformación de células competentes XL1-Blue por choque térmico.

Con una PCR en colonia se verificaron los resultados a partir de las cajas en donde crecieron las colonias con la ligación (ver figura 1b). Se obtuvieron varias colonias positivas para el amplicón buscado de 1kb aproximadamente, para flanquear parte del promotor p5E-h2afx y parte de GCaMP6s se utilizaron los primers:

LR83-DrPH2afx1F- cagctaaaagtgaatttctc y LR81-DrGCaMP2R- cgagatccttatcgcatcg

Para comprobar la presencia del inserto p5E-h2afx-GCaMP6s completo de 2,676 pb (ver figura 1c), se utilizaron los primers:

LR78-DrProm2GCaMP1F-ccatggggatccaaataatg y LR79-DrProm2MP1R-gtaaaacgacggccaggatcc

C. Restricción de p5E-h2afx-GCaMP6s con BamHI y ligación al vector destino pDestTol2pA2 digerido con Sall, SmaI y BamHI.

Se transformaron células competentes XL1-Blue por choque térmico con la ligación y se hizo una PCR en colonia con los primers LR83 y LR81. Los resultados observados en el gel de electroforesis no fueron muy convincentes (ver figura 1d), a pesar de esto se siguió trabajando con el material obtenido y se llevó a cabo la restricción del vector completo con las enzimas *KpnI* (2 cortes) y *EcoRI* (1 corte).

Con SnapGene se simuló la restricción para conocer el patrón de los fragmentos cortados, la restricción enzimática no mostró los resultados esperados (ver figura 1e). Se repitió la ligación de pDestTol2pA2 con p5E-h2afx-GCaMP6s, y en esta ocasión el resultado de la PCR en colonia mostró bandas positivas mucho más fiables (ver figura 2a). Se hizo una modificación en las enzimas de restricción utilizadas a *PstI* (4 cortes) y *XhoI* (2 cortes), sin embargo, las bandas obtenidas nuevamente no coincidieron con el patrón esperado (ver figura 2b).

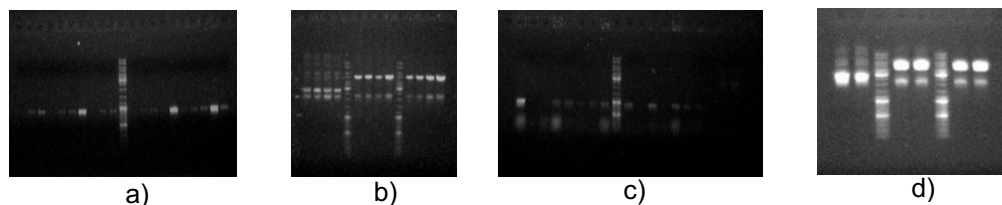


Fig. 2. a) ligación pDestTol2pA2-p5E-h2afx-GCaMP6s tamaño de 1 kb, b) izquierda pDestTol2pA2-p5E-h2afx-GCaMP6s, en medio restricción del vector con *XhoI*, derecha restricción con *PstI* ninguna banda corresponde a los fragmentos buscados, c) ligación pDestTol2pA2-p5E-h2afx-GCaMP6s tamaño de 1 kb, izquierda ligación 5:1 y derecha 10:1, d) izquierda pDestTol2pA2-p5E-h2afx-GCaMP6s, en medio restricción del vector con *XhoI*, derecha restricción del vector con *PstI* ninguna banda corresponde al peso de

D. Repetición de la ligación pDestTol2pA2-p5E-h2afx-GCaMP6s con proporción 5:1 y 10:1

Se aumentó la cantidad de inserto contra la del vector destino, con la PCR en colonia realizada se obtuvieron algunas muestras positivas (ver figura 2c) con las que se hizo la misma restricción con las enzimas *Pst*I (4 cortes) y *Xho*I (2 cortes). No se obtuvo el patrón de las bandas correspondientes a los fragmentos esperados de los cortes (ver figura 2d), lo cual pudo deberse a la eficiencia de la ligación pDestTol2pA2-p5E-h2afx-GCaMP6s.

E. Microinyección de embriones de pez cebra con mRNA transposasa, Tol2-pELAVL3-GCaMP6s y rojo fenol.

Se realizó la microinyección como se describe en la metodología. Los embriones se depositaron en una caja petri con Blue E3 y después de 6 horas de su fertilización se les añadió 0.5 ml de PTU (1-fenil-2-tiourea), esta inhibe la melanogénesis al bloquear todos los pasos dependientes de la tirosinasa en la vía de la melanina. [2]

A las 24 horas post fertilización se observan los embriones en el microscopio de epifluorescencia para separar aquellos que presenten fluorescencia pero sin exponerlos por mucho tiempo al paso del láser. Se fotografiaron a 10X en tres campos diferentes: en campo claro, con el filtro azul para evidenciar las neuronas con fluorescencia en verde y con el filtro verde para descartar la auto-fluorescencia del embrión.

En la figura 3 se puede observar a dos embriones con fluorescencia, indicando la integración exitosa del material genético microinyectado. Estos resultados sirven como ejemplo de la acción del sistema Tol2 y es un posible pronóstico de lo esperado una vez que el trabajo con el vector pDestTol2pA2-p5E-h2afx-GCaMP6s sea viable.

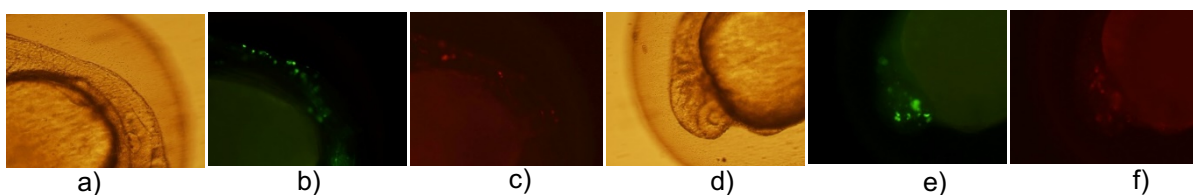


Fig. 3. Embriones observados en microscopio de epifluorescencia a 10X 24 horas post fertilización. a) y d) campo claro, b) y e) con el filtro azul se observa que las neuronas fluorescen en verde, c) y f) con el filtro verde se comprueba que las neuronas fluorescentes en verde no sean a causa de autofluorescencia.

a) CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El sistema de transposones Tol2, es una herramienta que hace más eficiente la generación de vectores de clonación utilizados para la transgénesis en organismos, permite ahorrar mucho tiempo al trabajar con los componentes ya incluidos en el kit los cuales hacen más eficiente la construcción de un vector de clonación con el cassette de información deseado, sin embargo, es importante asegurarse y comprobar durante todo el proceso que se está trabajando y utilizando el material genético correcto para así tener un rango mínimo de error durante la obtención del vector de clonación final.

Con el trabajo realizado es posible dar seguimiento a la generación del vector de clonación que contenga el sensor de la actividad de calcio GCaMP6s con la ayuda del Tol2kit, siendo necesarios ciertos ajustes y revisiones a los componentes con los que se llevaron a cabo los procedimientos moleculares, para que de esta manera puedan generarse las líneas transgénicas de pez cebra deseadas.

b) RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Agradezco al Instituto de Neurobiología, a los coordinadores del 21° verano de la ciencia región centro, a mis compañeros del proyecto y al doctor encargado por el apoyo brindado durante la estancia de verano.

REFERENCIAS

- [1] K. Kwan, E. Fujimoto, C. Grabher, B. Mangum, M. Hardy, S. Campbell, J. Parant, H. Yost, J. Kanki and C. Chien, "The Tol2kit: A Multisite Gateway-Based Costruction Kit for Tol2 Transposon Transgenesis Constructs", *Developmental Dynamics*, Vol. 236, pp. 3088-3099, Nov. 2007.
- [2] J. Karlsson, J. Von Hofsten and P. Olsson, "Generating Transparent Zebrafish: A Refined Method to Improve Detection of Gene Expression During Embryonic Development", *Marine Biotechnology*, Vol. 3, [Issue 6](#), pp. 522-527, Nov. 2001. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs1012601-0053-4> [consultado en 2019]

Generación de mutantes de los factores de transcripción que regulan la filamentación en *Cándida dubliniensis*

Rubí Durán Ramírez

Universidad Autónoma de Coahuila
Carretera Torreón-Matamoros Km. 7.5 Torreón,
Coah. TELS/FAX. (871)757-17-85, 729-36.47
rubi_duran@uadec.edu.mx

Asesor: Eugenio Mancera Ramos

CINVESTAV Unidad Irapuato
Km 9.6 Lib. Norte Carretera Irapuato-León
C. P. 36824, Irapuato, Gto.
eugenio.mancera@cinvestav.mx

Resumen — En este proyecto se muestra el trabajo realizado en *Cándida Dublniensis*, el cual consta de la mutación de genes importantes que intervienen como factores de transcripción en la filamentación de *Cándida*. Para realizar la mutación se utilizó como técnica el bloqueo de genes, mejor conocido como knockout mutants. Dicho experimento se ha llevado a cabo con el objetivo de generar una colección de mutantes que a su vez ayudarán en la comprensión de los factores ortólogos entre las especies *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

Palabras clave — *Cándida*, filamentación, mutación.

Abstract — This project shows the work done in *Candida dublniensis*, which consists of the mutation of important genes that intervene as transcription factors in the candida filamentation. To perform the mutation was used as the gene knockout technique, better known as knockout mutants. This experiment has been carried out with the objective of generate a collection of mutants which in turn will help in understanding the ortholog factors between the species *C. albicans* and *C. dubliniensis*.

Keywords — *Candida*, filamentation, mutation.

I. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas las enfermedades causadas por hongos oportunistas, conocidas como micosis, se han convertido en unas de las principales causas de enfermedades en pacientes inmunosuprimidos y hospitalizados. Numerosos factores han contribuido al aumento de las incidencias de estas micosis. Gran parte se debe al incremento de la población de individuos inmunocomprometidos, a consecuencia del uso generalizado de antibióticos de amplio espectro, a la práctica de terapias inmunosupresoras, procedimientos quirúrgicos invasivos, entre otros. [1]

Las especies del género *Cándida* son comensales del microbiota de humanos. Los cuales, cuando las condiciones dentro del huésped lo permiten, pueden llegar a evadir la respuesta inmune y ocasionar diversas enfermedades, desde infecciones en mucosas y piel hasta infecciones sistémicas, donde logran invadir los órganos internos con una alta mortalidad. Aproximadamente el 90% de las infecciones son causadas por cinco especies: *Cándida albicans*, *Cándida glabrata*, *Cándida tropicalis*, *Cándida parapsilosis*. y *Cándida krusei* [1, 2]

Uno de los fenotipos asociados a virulencia mejor estudiados en *C. albicans*, especie de mayor prevalencia, es la transición morfológica de levadura a filamento. Característica que comparte hasta cierto punto con *C. dubliniensis*, considerada la especie filogenéticamente más cercana a *C. albicans* [3]

Sin embargo, a pesar de su cercanía *C. dubliniensis* muestra una menor prevalencia en estudios epidemiológicos, así como una menor virulencia inferida en modelos de infección. La baja virulencia de *C. dubliniensis* se cree que es atribuida en gran parte a su baja capacidad de filamentación bajo ciertas condiciones en comparación con *C. albicans* [4,5]

En *C. albicans* se han descrito diversos factores de transcripción (FT) que participan en la regulación de la transición de levadura-filamento bajo condiciones específicas en el humano. Por ejemplo, el FT GLN3 promueve la filamentación en respuesta a condiciones limitantes de nitrógeno, mediante la expresión de la proteína Mep2. Así como también se conoce que la delección del FT HAP5 provoca defectos en el crecimiento filamentoso bajo varias condiciones en *C. albicans*, y que en condiciones dependientes de carbono provoca la hiperfilamentación de la célula.

La regulación génica se encuentra principalmente bajo el control de los FT. La función biológica de cada FT está determinada por el conjunto de genes que regula. Los FT se unen a secuencias regulatorias en cis en los promotores o potenciadores, y mediante esta interacción proteína-DNA activan o reprimen a los genes cercanos en cuestión. Los FT generalmente están compuestos por múltiples dominios que median su función, como el dominio de unión a DNA, el dominio de unión con otras proteínas o FT. Debido a que los FT son considerados los reguladores maestros de la célula, el estudio de estos podría ayudarnos a comprender las diferencias en la regulación de la expresión génica entre especies cercanas.

En este trabajo, se describe la generación de las mutantes nulas de los FT GLN3 y HAP5 en *C. dubliniensis*. Los cuales se han descrito participan en la transición morfológica levadura-filamento en *C. albicans*, fenotipo asociado a la virulencia [6]

II. METODOLOGÍA

La generación de las mutantes de los FT en *C. dubliniensis* se llevó a cabo en diversas etapas, las cuales se detallan a continuación se detallan.

A. Asignación de genes

Se asignaron 2 FT que previamente se identificaron estuvieran asociados a filamentación en *C. albicans*.

B. Amplificación de los flancos 5' y 3' del gen blanco y marcadores de selección

Mediante PCR se amplificaron en la cepa de referencia CD36 de *C. dubliniensis* las regiones 5'y 3'adyacentes al gen blanco. Los marcadores de selección que se utilizaron fueron HIS1 para la disrupción del primer alelo y LEU2 para el segundo alelo. Estos se amplificaron por PCR de los plásmidos PEM001 y PEM002 respectivamente.

Posteriormente, los marcadores de selección fueron flanqueados por las dos regiones de homología 5'y 3' adyacentes al gen blanco.

C. Purificación de DNA

Para la purificación de los productos de PCR fusión, se utilizó el kit QIAquick PCR purification, siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente se cuantificó la concentración en el Nanodrop.

D. Transformación del primer alelo

Para la transformación se tomó de un precultivo en YPD, con células 10^4 , una colonia aislada y se diluyó en 10 ml de YPD fresco, el cual se incubó a 30 °C por una noche hasta alcanzar una DO a 600 nm de 1.6 y 2.2, lo que representa 10^8 células/ml.

Una vez alcanzada la DO se centrifugaron los cultivos a 5000 x g, y se suspendieron en agua. Posteriormente se añadió TE 10x y acetato de litio 1M, se dejó incubar en roller drum a 150rpm por 60 min a 30°C. Tras incubar se añadió DTT 1M y se incubó 30 min más.. Después se añadió agua y se centrifugó a 5000 x g. Seguido de ello se lavaron las células con agua, se centrifugaron nuevamente, para después suspender las células en sorbitol 1M, ambos pasos manejaron en frío. Se resuspendieron las células en sorbitol 1M y se mantuvieron en hielo. De las células obtenidas se tomaron 100 uL y se añadió el producto de PCR de fusión previamente purificado y cuantificado. Se electroporó en las siguientes condiciones: cubeta de .2 cm, 1.6 kV, 200 Ω , 25Uf.

E. Elección de cepas mutadas

A las células electroporadas se les agregó 1 ml de medio YNB+glucosa y estas fueron sembradas en placas de medio SD –HIS. Tras 48 hrs a 30°C se observó el crecimiento y se seleccionaron colonias aisladas para verificar por PCR la inserción del marcador de selección.

F. Transformación de segundo alelo

Se repitió el mismo proceso antes mencionado en la transformación del primer alelo, sin embargo, se utilizó el marcador de selección LEU2.

G. Verificación de mutación completa

Una vez completada la electroporación del segundo alelo se añadió a las células 1 ml de medio YNB+glucosa y estas fueron sembradas en placas de medio SD –HIS –LEU. Tras 48 hrs a 30°C se observó el crecimiento y se seleccionaron colonias aisladas para verificar por PCR para flancos y ORF.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las especies de *Candida* al ser organismos diploides obligados y al no tener un ciclo sexual completo, son necesarias dos rondas de transformación. Por lo que, la construcción de las mutantes nulas requiere de un poco más de trabajo. Algunas de las dificultades presentadas en este trabajo, fue la amplificación de los flancos adyacentes al gen blanco, así como también la verificación de la inserción de los marcadores de selección, esto podría ser por varias causas, una de ellas las condiciones utilizadas en los programas de PCR, así como también a los oligos utilizados, los cuales habían sido previamente diseñados.

A pesar de que el proceso en la generación de la colección de mutantes en los FT que participan en filamentación continua, el trabajo realizado contribuyó en la generación de dos mutantes en los FT, HAP5 y GLN3.

HAP5 fue el gen con el que se trabajó durante toda la estancia, y del cual se logró obtener la mutante nula.

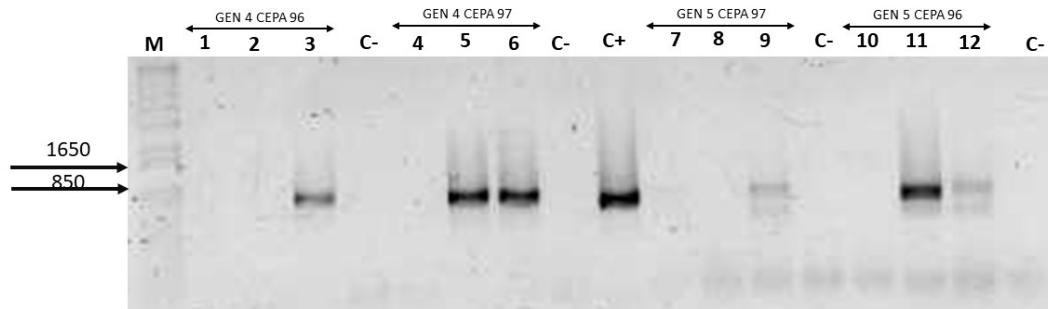


Fig. 1. Gel de agarosa 1%. Verificación de la inserción del marcador del extremo 5' en gen 4 y gen 5.

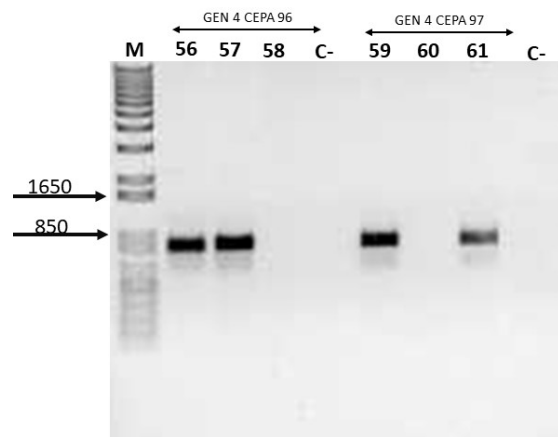


Fig. 2. Gel de agarosa 1%. Verificación de la inserción del marcador del extremo 3' en gen 4.

IV. CONCLUSIONES

Las especies de *Cándida* son levaduras de gran interés. Debido a que son patógenos de humanos con una alta incidencia, además de que estas especies, son un buen modelo que presenta varias ventajas. Una de ellas es que se han descrito diversas técnicas de aproximaciones experimentales en estas especies. La generación de mutantes por electroporación mostró tener una alta eficiencia en especies de *Candida*. Ya que por medio de esta se logró generar la mutante nula en *C. dubliniensis*, en un periodo de tiempo relativamente corto.

V. RECONOCIMIENTOS

En estas líneas expreso de la manera más sincera mi gratitud a CINVESTAV Unidad Irapuato y sobre todo al Doctor Eugenio Mancera y su equipo de trabajo por abrimme las puertas a esta experiencia que ha dejado gran huella en mí.

Por el gran apoyo durante la estancia, los buenos tratos y el conocimiento compartido, gracias.

REFERENCIAS

- [1] N. Whibley and S. L. Gaffen, "Beyond *Candida albicans*: Mechanisms of immunity to non-*albicans* *Candida* species," *Cytokine*, vol. 76, no. 1, pp. 42–52, 2015.
- [2] S. A. Turner and G. Butler, "The *Candida* Pathogenic Species Complex," *Candida Pathog. Species Complex*, vol. 4, no. 9, pp. a019778–a019778, 2014.
- [3] O. R. Homann, J. Dea, S. M. Noble, and A. D. Johnson, "A Phenotypic Profile of the *Candida albicans* Regulatory Network," *PLoS Genet.*, vol. 5, no. 12, p. e1000783, 2009.
- [4] G. P. Moran, D. C. Coleman, and D. J. Sullivan, "Candida *albicans* versus *Candida dubliniensis*: Why Is *C. albicans* More Pathogenic?," *Int. J. Microbiol.*, pp. 1–7, 2012.
- [5] A. P. Jackson *et al.*, "Comparative genomics of the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*," *Genome Res.*, vol. 19, no. 12, pp. 2231–2244, 2009.
- [6] E. Mancera, C. Frazer, A. M. Porman, S. Ruiz-Castro, A. D. Johnson, and R. J. Bennett, "Genetic Modification of Closely Related *Candida* Species," *Front. Microbiol.*, vol. 10, p. 357, 2019.

Generación de mutantes en el hongo patógeno *Sporothrix schenckii* (A)

Ángela Paola González Jorge

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Carretera Irapuato - Silao km 12.5
Colonia El Copal
pao.gonzalez.1737@gmail.com

Asesor: Héctor Manuel Mora Montes

Universidad de Guanajuato
División de Ciencias Naturales y Exactas,
Noria Alta s/n, Col. Noria Alta. Guanajuato, Gto.
CP 36050, México.
hmora@ugto.mx

Resumen — *Sporothrix schenckii* agente causante de la esporotricosis humana, actualmente se distribuye en todo el mundo, especialmente en zonas tropicales y subtropicales. La infección se caracteriza por la presencia de nódulos cutáneos o subcutáneos ulcerados, la vegetación viva o muerta es el principal reservorio del hongo. En este proyecto se habla sobre el método de la transformación genética por *Agrobacterium tumefaciens* para producir mutantes de *S. schenckii* con la implementación del gen *Gp70* y *ROT2*.

Palabras clave — *Sporothrix schenckii*, Transformación, *Agrobacterium tumefaciens*, *Gp70*, *ROT2*.

Abstract — *Sporothrix schenckii*, a causative agent of human sporotrichosis, is currently distributed worldwide, especially in tropical and subtropical areas. The infection is characterized by the presence of ulcerated cutaneous or subcutaneous nodules, the living or dead vegetation is the main reservoir of the fungus. This project talks about the method of genetic transformation by *Agrobacterium tumefaciens* to produce *S. schenckii* mutants with the implementation of the gene *Gp70* and *ROT2*.

Keywords — *Sporothrix schenckii*, Transformation, *Agrobacterium tumefaciens*, *Gp70*, *ROT2*.

I. INTRODUCCIÓN

La esporotricosis, causada por el hongo dimorfo *Sporothrix schenckii*, afecta a humanos y animales, la infección generalmente ocurre por inoculación traumática de suelo, plantas y materia orgánica contaminada con el hongo durante actividades ocupacionales. La esporotricosis se asocia con actividades rurales como la agricultura, la floricultura o la caza, pero más recientemente en felinos. El accidente introduce los conidios en el tejido subcutáneo. Los conidios se unen a la matriz de proteínas extracelulares como la fibronectina, laminina y colágena. Allí ocurre la multiplicación local del hongo e inicia un proceso inflamatorio lento. Por otra parte, en ocasiones, puede ocurrir por otras vías. [1]

Se presenta en la naturaleza en forma micelial (fase infectiva); cuando un hospedero es infectado el hongo desarrolla la forma de levadura (fase parasitaria). El color de la levadura es un tanto más claro y cremoso que el color marrón del micelio. La infección por *Sporothrix* ha aumentado en personas inmunocomprometidas, principalmente aquellos HIV+. [2]

El género del hongo *Sporothrix* incluye diferentes especies, tales son: *S. schenckii*, *S. brasiliensis* y *S. globosa*, capaces de causar enfermedad humana y animal; las otras dos son *S. mexicana* y *S. albicans* no son asociadas con ninguna enfermedad; una de estas especies, *S. brasiliensis* es el agente causal de un brote importante de esporotricosis en

Brasil. En estudios realizados y en particular en México, la especie predominante es *S. schenckii*. [2-3]

Sporothrix schenckii se caracteriza por presentar algunos factores de virulencia. Entre ellos se distinguen: adhesinas, que unen al hongo a proteínas extracelulares (fibronectina, elastina y colágeno). La producción de melanina, que lo protege de la destrucción oxidativa en tejidos y en el interior de los macrófagos. Proteasas, que son esenciales para el crecimiento del hongo *in vivo*. [4-5]

II. MARCO TEÓRICO

A. Transformación genética

La transformación genética es la introducción controlada de ácidos nucleicos en un genoma receptor. *Agrobacterium tumefaciens* son bacterias Gram negativo que se encuentran en el suelo. Tienen la capacidad de integrar establemente parte de su material genético dentro del genoma de su hospedero, invaden heridas de diversas plantas e inducen a la planta a producir tumores, éste lo forma la planta debido a la transferencia a su genoma de un fragmento de DNA de la bacteria llamado T-DNA presente en el plásmido Ti así produce moléculas utilizadas por la bacteria. Además, tiene la capacidad de transferir ADN entre reinos diferentes. [5]

El impacto de este hallazgo ha tenido grandes aplicaciones en diversos campos de la biología vegetal, agricultura y biotecnología. El mecanismo de transferencia del ADN ha permitido el desarrollo de vectores para la introducción de genes foráneos. La Transformación de hongos por *A. tumefaciens* además de permitir la integración de genes foráneos puede ser usada para diferentes estudios moleculares y la posibilidad de producir fenotipos alterados. [6]

III. METODOLOGÍA

La transformación de *Sporothrix schenckii* fue mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Para llevar a cabo la transformación se preparó un preinóculo de las cepas desde un día anterior con medio LB para *Agrobacterium* y YPD para *S. schenckii* y sus respectivos antibióticos. Después se preparó medio de inducción con y sin Acetoseringona, y enseguida se midió la absorbancia de las cepas a 600 nm y se ajustaron a 0.2 se colocó en medio de inducción 5 ml, en seguida se dejó en inducción por 4 horas. Luego se cosecharon los conidios de *S. schenckii* y se prepararon diluciones para dejarse a una concentración de 1×10^6 células/ml.

Se colocó 100 μ l de *Agrobacterium* y 100 μ l de conidios en cajas petri con celofán en forma circular estéril en medio YPD para posteriormente incubarse de 2-3 días a 28 °C. Pasado ese lapso de tiempo las membranas de celofán se transfirieron a cajas petri con medio YPD a un pH de 4.5 para el crecimiento de *S. schenckii* adicionando higromicina B (8.0 μ l x ml) y cefotaxima (0.142 μ l x ml) para acabar con *Agrobacterium*. Los cultivos se inocularon de 3-5 días a 28°C.

Después de la obtención de las transformantes se cortaron las colonias con un bisturí estéril, y se colocaron en placas con medio YPD con un pH 4.5 más higromicina B, y se

incubaron durante 3-4 días a una temperatura de 28°C, cuando estas ya crecieron se realizaron sus posteriores pases en medio YPD sólido y líquido para preservarse.

B. Extracción de DNA genómico

Con el cultivo de la cepa de interés se colocaron en tubos eppendorf y se centrifugaron a 11 000 rpm, después se descartó el sobrenadante, así hasta formar una pastilla. Se agregó 500 µl de buffer de extracción y se mezcló en vortex, luego se adiciono 500 µl de fenol/cloroformo/isomilico (25:24:1) se agito en vortex 10 min. Después se centrifugo a máxima velocidad a 1300 rpm 3 min.

Se transfirió la fase acuosa a tubos nuevos y se adiciono 500 µl de cloroformo, se centrifugo por 5 min, de nuevo se transfirió la fase acuosa a tubos nuevos agregando 0.54 volúmenes de isopropanol (1 ~ 300 µl). Se mezcló por inversión y se volvió a centrifugar 5 min. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se dejó secar bien la pastilla para después resuspender la pastilla en 200 µl de agua estéril, se agregó 5 µl de RNAasas, y alrededor de 30 min a 37 °C inactivar a 65 °C por 5 min.

C. PCR

Se realizó una PCR de la manera siguiente: Se agregó en tubos eppendorf el oligo directo y reveso 1 µl de cada uno, adicionando la enzima (Dream) 0.2 µl, luego 2 µl de buffer y 1 µl de los DNTPs, finalmente 12.8 µl de agua. Los 18 µl en total, se repartieron 9 µl en cada tubo, y posteriormente agregando la muestra, en nuestro caso fue en DNA genómico de nuestros cultivos colocando 1 µl incluyendo nuestro control negativo (de la cepa silvestre de *S. schenckii*) y el control positivo (pbGghg). Por último, se lleva al termociclador a las siguientes condiciones siguientes: Desnaturalización 30 segundos a 94°C. Hibridación 30 segundos a 58.2°C. Extensión 1 minuto a 72°C. Extensión final 5 minutos a 72°C por 29 ciclos.

IV. RESULTADOS

Se obtuvieron 14 cepas transformantes de *S. schenckii* y *S. brasiliensis* con el gen *ROT2* y *Gp70*.

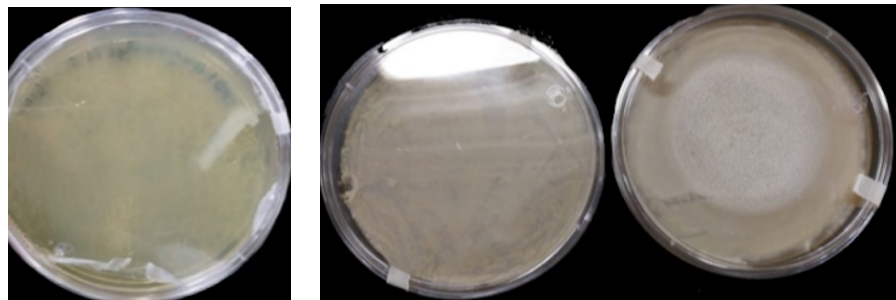


Fig. 1 a) Transformante de Agl1 + *S. schenckii*. Control negativo. b) Transformante de *S. schenckii* y *S. brasiliensis*. Control positivo.

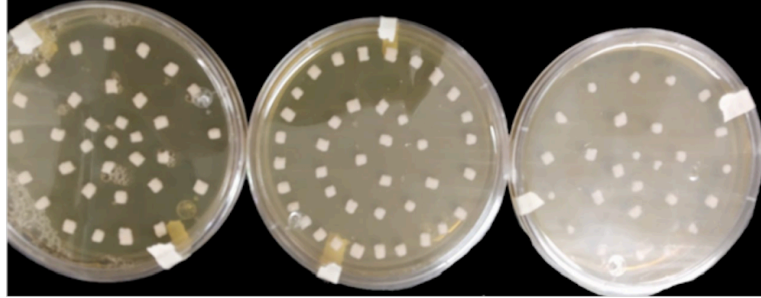


Fig. 2 *S. schenckii* con *ROT2* y *S. brasiliensis* con *Gp70* en medio YPD con higromicina B. Colonias cortadas de las transformantes, a 1 día de incubarse.

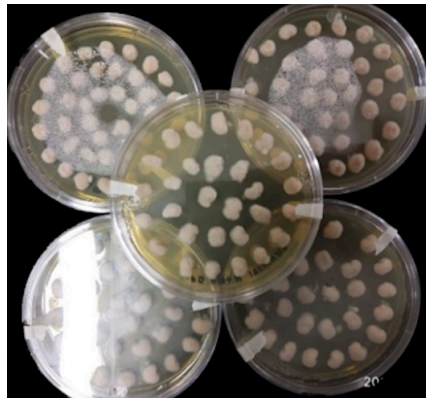


Fig. 3 *S. schenckii* y *S. brasiliensis*. Crecimiento a 4 días después de su incubación.

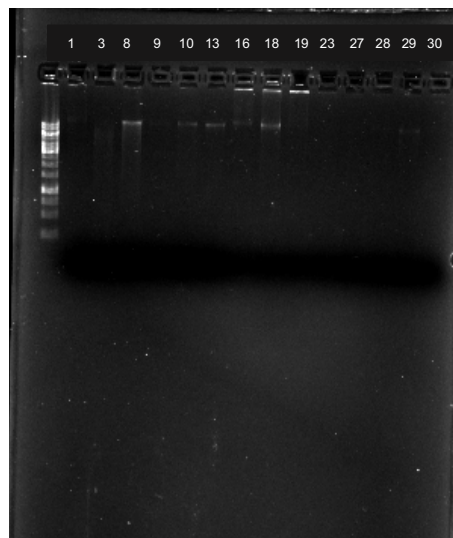


Fig. 4 ADN genómico extraído de nuestras muestras con *ROT2*.

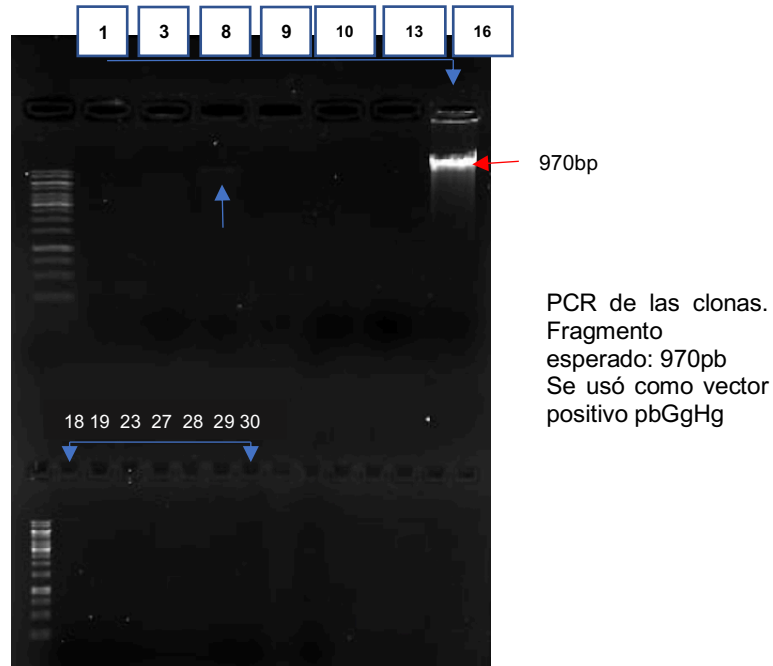


Fig. 5 PCR de ADN genómico de clonas de *S. schenckii* con *ROT2* silenciado, usando los oligos del promotor y terminador de triptófano.

V. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La transformación fue llevada a cabo por medio de *Agrobacterium tumefaciens*, la cual permitió la integración de una construcción para silenciar al gen *ROT2* y *Gp70* en, *S. schenckii* y *Gp70* en *S. brasiliensis*. Se sabe que la proteína *Gp70* es un antígeno importante y adhesina expresada en la superficie celular del hongo, y puede tener una función clave en la inmunomodulación y respuesta del huésped, mientras que el gen *ROT2* es un gen involucrado en la glucosilación ligada a la proteína *N* de *S. schenckii*. [7-8]

Mediante los procedimientos ya mencionados, se obtuvieron 14 transformantes, aunque en la PCR se puede observar 2 positivas, esto se debió a que se extrajo poco ADN genómico y las muestras se habían llevado a 200 µl de agua, por ello, se perdió cierta cantidad debido a que estaba muy diluido. En cambio, en la PCR se aprecia que *ROT2* es perceptible en el fragmento esperado de 970bp, debido a que quedó intacto a esos errores, por lo que nos indica que el gen se encontraba en nuestras mutantes de manera satisfactoria; sin embargo, pueden ser mejorados en la técnica.

VI. CONCLUSIONES

En este proyecto se logró generar mutantes en el hongo de *S. schenckii* con la finalidad de implementar el gen *Gp70* *S. brasiliensis* y *ROT2*. De esta forma la transformación con *A. tumefaciens* de este hongo fue de manera exitosa.

Concluyendo que la manipulación genética tiene un potencial enorme, ya que, incorpora con cierta facilidad DNA foráneo a su cromosoma con gran estabilidad. Esto facilita el diseño

de proyectos de investigación. No menos importante sería manipular genéticamente los hongos para mejorar las funciones radicalmente.

VII. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad de Guanajuato por la estancia, y al Dr. Héctor M. Mora Montes por darme la oportunidad de participar en este proyecto. Así como también a Anayeli Márquez Márquez por su paciencia y compartirme de su conocimiento, Adriana López Ramírez por sus consejos y guía en el laboratorio. Finalmente, a la universidad de ITESI y a mis profesores por darme la motivación de realizar esta experiencia.

REFERENCIAS

- [1] Bastos, M. (2011). *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. Recuperado 25 julio, 2019, de <https://cmr.asm.org/content/24/4/633.short>
- [2] Hernández, F. Dra.. (2017c, 23 enero). ESPOROTRICOSIS. Recuperado 25 julio, 2019, de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/ esporotricosis.html>
- [3] Carrada, T. (2012b, 24 mayo). Esporotricosis: Avances recientes en el diagnóstico de laboratorio, histopatología y la epidemiología en México. Recuperado 7 julio, 2019, de <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2012/pt123d.pdf>
- [4] OSANA LIMA, C. (2001, 9 agosto). Implicación de los componentes de la pared celular fúngica en la adhesión de *Sporothrix schenckii* a la fibronectina humana. Recuperado 19 julio, 2019, de <https://iai.asm.org/content/69/11/6874.short>
- [5] Gil, M. (s.f.). *Sporothrix schenckii*: características, morfología, tratamiento. Recuperado de <https://www.lifeder.com/sporothrix-schenckii/>
- [6] Luna-Herrera, L. (2017, 11 enero). TRANSFORMACIÓN DE SPOROTHRIX SCHENCKII MEDIADA POR AGROBACTERIUM TUMEFACIENS: GENERACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE MUTANTES INSERCIONALES | Luna-Herrera | JÓVENES EN LA CIENCIA. Recuperado 25 julio, 2019, de <http://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/1068>
- [7] Mora-Montes, H. M., da Silva Dantas, A., Trujillo-Esquivel, E., de Souza Baptista, A. R., & Lopes-Bezerra, L. M. (2015). Current progress in the biology of members of the *Sporothrix schenckii* complex following the genomic era. *FEMS Yeast research*, 15(6), fov065.
- [8] Robledo, C. (2012a, 12 agosto). Isolation and functional characterization of *Sporothrix schenckii* ROT2, the encoding gene for the endoplasmic reticulum glucosidase II. Recuperado 20 julio, 2019, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878614612001055>
- [9] Castro, R. A. (2013a, 7 octubre). Differences in Cell Morphometry, Cell Wall Topography and Gp70 Expression Correlate with the Virulence of *Sporothrix brasiliensis* Clinical Isolates. Recuperado de <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0075656>

Generación de mutantes en el hongo patógeno *Sporothrix schenckii* (B)

Perla Botello Rosales

Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Ciencias Químicas
Av. Dr. Salvador Nava s/n
C.P. 78290, San Luis Potosí, S.L.P.
perla_botellorosales@hotmail.com

Asesor: Héctor Manuel Mora Montes

Universidad de Guanajuato
División de Ciencias Naturales y Exactas
Noria Alta s/n, Col. Noria Alta
Guanajuato, Gto. CP 36050, México.
hmora@ugto.mx

Resumen — *Sporothrix schenckii* es un hongo patógeno dimórfico responsable de la esporotricosis, enfermedad crónica causada por la inoculación traumática del hongo. El gen *CWH41* codifica para una enzima glicosil hidrolasa, que interviene en la *N*-glicosilación, proceso indispensable para la viabilidad celular, virulencia y patogenicidad del hongo. En este trabajo se pretende generar transformantes silenciadas del gen *CWH41* en *S. schenckii* vía RNA de interferencia; para analizar su efecto en ciertas actividades bioquímicas y en la interacción patógeno-hospedero, ofreciendo la posibilidad de identificarlo como blanco potencial de tratamiento antifúngico.

Palabras clave — *Sporothrix*, silenciamiento, *CWH41*, plásmido.

Abstract — *Sporothrix schenckii* is a dimorphic pathogenic fungus responsible for sporotrichosis, a chronic disease caused by traumatic inoculation of the fungus. The *CWH41* gene encodes for a glycosyl hydrolase involved in protein *N*-glycosylation, an essential process for fungal viability, virulence, and pathogenicity. This work is intended to generate silenced transformants of *S. schenckii*/*CWH41*, via interfering RNA; to analyze its effect on certain biochemical activities and on the pathogen-host interaction, offering the possibility of identifying it as a potential target for development of new antifungal drugs.

Keywords — *Sporothrix*, silencing, *CWH41*, plasmid.

I. INTRODUCCIÓN

Sporothrix schenckii es un hongo dimórfico causante de una micosis subcutánea llamada esporotricosis, caracterizada por generar lesiones en piel, tejido subcutáneo y vasos linfáticos adyacentes a las lesiones y en algunos casos puede presentarse en otros órganos. Esta micosis cosmopolita tiene mayor prevalencia en zonas tropicales y subtropicales (1), siendo México uno de los países con mayor incidencia (2).

Los componentes de la pared celular de *Sporothrix schenckii* (polisacáridos estructurales, glicolípidos y glicoproteínas), cumplen funciones estructurales indispensables, así como en la transducción de señales, protección a cambios ambientales y anclaje de factores de virulencia que ayudan a colonizar las células huésped.

La glicosilación de proteínas es un proceso muy conservado entre eucariontes, donde de manera seriada se adicionan carbohidratos a una proteína. Existen dos tipos principales de glicosilación: la *N*- y la *O*-glicosilación. La *N*-glicosilación es esencial para la viabilidad y virulencia de los hongos, por lo que es un blanco potencial para el diseño de nuevos fármacos antifúngicos (3). Este proceso involucra la participación de una gran cantidad de enzimas, cuya función esta relacionada con la virulencia y patogenicidad del

hongo. Para estudiar estas enzimas y evaluar su papel en las interacciones patógeno-huésped, se ha propuesto la generación de cepas silenciadas (1).

El gen *CWH41* codifica para una enzima glicosil hidrolasa de la familia 63 que interviene en la *N*-glicosilación. Las mutantes de este gen en *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans* mostraron una reducción significativa en la actividad de α -glucosidasa I, morfología celular anormal, cambios en la composición de la pared celular y en consecuencia, mayor sensibilidad a agentes que la perturban (3). El silenciamiento de este gen en *Sporothrix schenckii* vía RNA de interferencia, nos ayudará a descubrir si está o no implicado en la viabilidad, patogenicidad y virulencia del hongo.

II. METODOLOGÍA

A. Materiales

Medio LB + ampicilina Se utilizó para la propagación de *E. coli* DH5 α y AGL1, se preparó con peptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1.0%, suplementado con ampicilina 100 μ g mL⁻¹, los cultivos se incubaron a 37°C con agitación constante a 200 rpm durante 24 h para. Cuando se requirió se adicionó 2% de agar.

B. Soluciones

- Polietilenglicol/Cloruro de Magnesio (PEG 8000 30%/MgCl₂ 30mM).
- Tris-EDTA-NaOH- SDS (TENS). Tris-base-acetato-EDTA (TAE).
- Oligonucleótidos :promotor y terminador del triptófano de *Aspergillus nidulans* así como el directo y reverso de los fragmentos sentido y antisentido.

C. Construcción de un plásmido para el silenciamiento del gen *CWH41* en *Sporothrix schenckii*

1) Comprobar que el plásmido *pSilent-1* contenga el fragmento sentido mediante PCR

Al comenzar el proyecto se proveyó un plásmido *pSilent* que ya contaba con el fragmento sentido, para corroborarlo se llevó a cabo una PCR utilizando 1 μ L de plásmido, 0.5 μ L de los oligonucleótidos del promotor y el terminador del triptófano, 1 μ L de amortiguador 10X DreamTaq (MgCl₂ 20mM), 0.5 μ L de deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) 2.5 mM, y 0.1 μ L de la enzima (DreamTaq 5U μ L⁻¹), llevando a un volumen final de 10 μ L con agua. A continuación se realizó una electroforesis en gel de agarosa, empleando bromuro de etidio a una concentración de 20 ng μ L⁻¹ como agente intercalante. Como amortiguador de la disolución de la agarosa y de corrida de la electroforesis se usó TAE 1X y como marcadores de peso molecular se emplearon marcadores lineales de 1Kb. Los geles fueron analizados en un foto-documentador ChemiDoc XRS+System (BIO-RAD).

2) Obtención del fragmento antisentido

Se realizó una digestión enzimática con las enzimas BglII y Stu I al vector de mantenimiento pJET con el fin de recuperar el fragmento antisentido. Después de esto se realizó una electroforesis en un gel de agarosa para confirmar que el tamaño del

fragmento cortado correspondiera a 241 pb, se recuperó del gel de agarosa, utilizando el kit Gene JET Gel Extraction (Thermo SCIENTIFIC), obteniéndose 2 eluidos.

3) Digestión de pSilent-1 + fragmento sentido

Se abrió el plásmido pSilent mediante una digestión enzimática con BgIII y StuI. La correcta digestión del plásmido se ratificó mediante electroforesis en gel de agarosa.

4) Ligación del fragmento antisentido

Utilizando 6 μ L del primer eluido del fragmento antisentido, 2 μ L del vector pSilent+sentido previamente digerido y un 1 μ L de T4 DNA ligasa con 1 μ L de su respectivo buffer se llevó a cabo la reacción de ligación, incubándose a 14°C durante toda la noche.

5) Transformación de *E. coli* DH5 α y extracción de los plásmidos

Se transformaron células competentes de *E. coli* mediante el método de choque térmico. Se sembró en placas de medio LB adicionado con ampicilina y se dejaron incubando toda la noche a 37°C, como control positivo se usó el vector pJET +fragmento antisentido y como control negativo células sin transformar. Las colonias transformantes se seleccionaron y se pasaron a medio LB con ampicilina sólido y líquido. De estas últimas se extrajo DNA plasmídico, siguiendo la modificación del protocolo de Chen Zhou, et al., 1990 y se realizó electroforesis en gel de agarosa. Se preservaron en glicerol las colonias transformantes.

6) PCR de DNA plasmídico extraído

Se realizó una PCR de los plásmidos extraídos utilizando oligonucleótidos correspondientes al promotor y terminador del triptófano después se corrió en un gel de agarosa las reacciones para corroborar que el tamaño de la banda correspondiera con el esperado (2624 pb), a continuación se recuperó este fragmento mediante el uso del Gene JET Gel Extraction (Thermo SCIENTIFIC). Se eluyó en 15 μ l de Buffer de elución; obteniéndose 2 eluidos.

7) Ligación al plásmido pGEM-T

Se ligó el fragmento previamente eluido al vector de mantenimiento pGEM-T empleando una cantidad de 6 μ L del primer eluido, 0.5 μ L del plasmido pGEM-T, 6 μ L de la enzima T4 y 7.5 μ L de su buffer. Se dejó incubar a 14°C toda la noche.

8) Transformación de *E. coli* DH5 α

Con el plásmido resultante se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α . Se sembró en placas de medio LB con ampicilina y X-gal, el control positivo contenía el plásmido pSilent y el negativo las células sin transformar. Se seleccionaron las colonias transformantes (coloración blanca) y se pasaron a medio LB con ampicilina sólido y líquido, de esas últimas se extrajo DNA plasmídico siguiendo el protocolo ya mencionado.

A. ANÁLISIS DE RESULTADOS

A. El plásmido pSilent contiene el fragmento sentido

Se verificó que el plásmido pSilent provisto contuviera el fragmento sentido mediante una PCR. Se utilizó como control el vector pSilent vacío. Los resultados se muestran en la Figura 1A, los carriles 1 y 2 contienen el producto de PCR de pSilent vacío, el amplicón se localiza en las 2100 pb aproximadamente (se esperaba un tamaño de 2142 pb). Y para las muestras de pSilent+ sentido (carriles 3 y 4), el tamaño del amplicón se localiza en las 2400 pb aproximadamente, esperándose un tamaño de 2383 pb. Este resultado confirma que el fragmento sentido sí se encontraba en el vector pSilent.

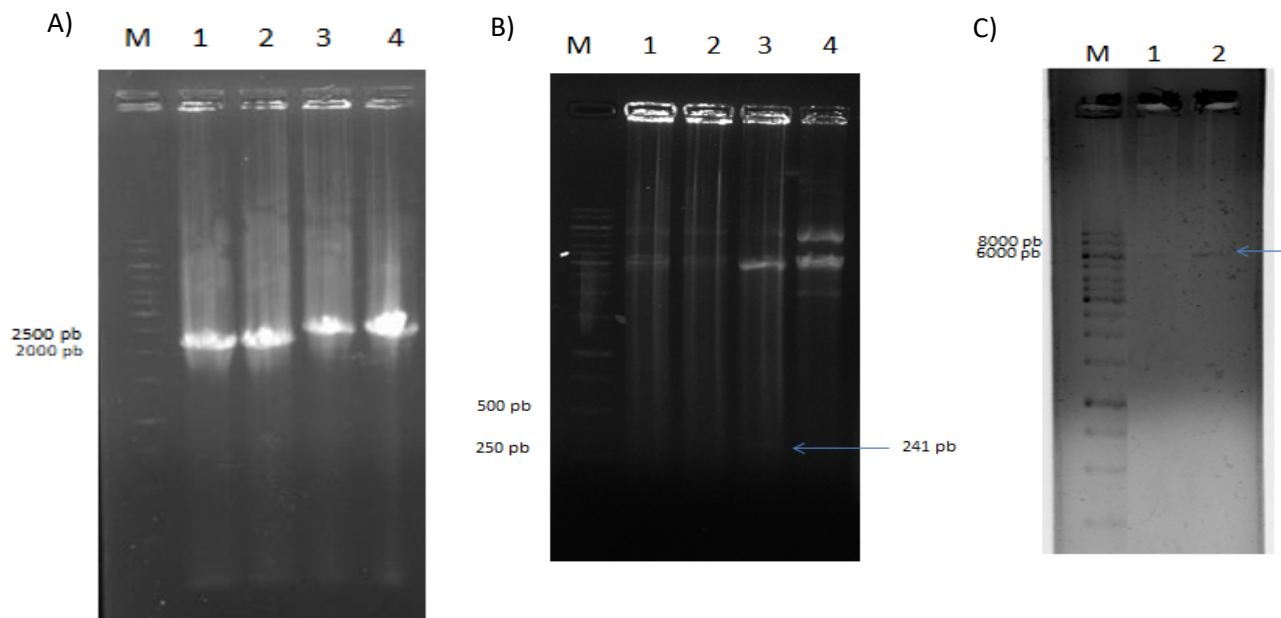


Fig. 1 A) Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR. En el carril 1 y 2 pSilent vacío; en los carriles 3 y 4 pSilent + fragmento sentido. B) Electroforesis en gel de agarosa de la digestión con Bgl II y Stu I del plasmido pJET en carriles 1-4. C) Electroforesis en gel de agarosa de la digestión del plásmido pSilent + sentido con las enzimas Bgl II y Stu I.

B. Obtención del fragmento antisentido y ligación.

Después de realizar una digestión enzimática en pJET, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa en el que se confirmó la obtención del antisentido (Figura 1B). El tamaño de la banda corresponde al tamaño del fragmento: 241 pb. De igual manera se realizó una digestión con las mismas enzimas para abrir el plásmido p-Silent+ sentido, el tamaño de la banda obtenida (7297 pb) corresponde a lo esperado (Figura 1C).

C. Transformación de *E. coli* DH5 α

Una vez obtenido el antisentido se ligó al vector pSient y se transformó *E. coli*. Se obtuvieron un total de 11 colonias que mostraron crecimiento en el medio con ampicilina, se les extrajo DNA plasmídico y se realizó PCR y digestión enzimática con el propósito de

ratificar que contuvieran el fragmento del promotor a terminador. Según los resultados arrojados por la electroforesis (Figura 2A), solamente la clona 8 contiene el fragmento, pues es la única que muestra una banda en los 2600 pb aproximadamente.

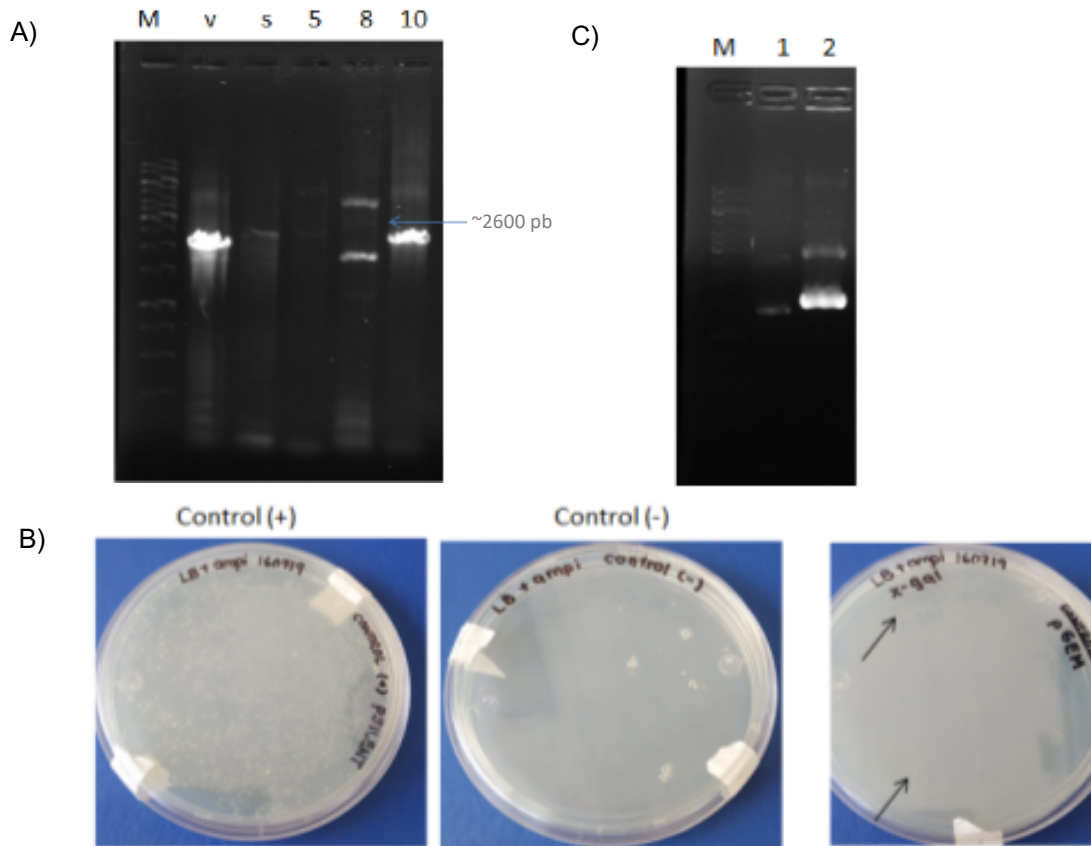


Fig. 2 A) Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR del DNA plasmídico extraído de las colonias transformantes. En el carril 1 se observa el pSilent vacío y en el 2 pSilent+sentido; en los siguientes carriles se observan los amplicones de los diferentes números de colonias transformantes. B) Electroforesis en gel de agarosa del DNA plasmídico obtenido de las 2 colonias de *E.coli* transformadas con pGEM-T. C) Controles positivo y negativo de transformación, transformantes (colonias blancas) de *E.coli* con el vector pGEM-T.

D. Ligación al plásmido pGEM-T

Se purificó el fragmento de interés (promotor-sentido-intron.antisentido-terminador) y se ligó al vector de mantenimiento pGEM-T, se transformó *E.coli*, y se sembró en medio LB+ampicilina+ X-gal. Se obtuvieron 2 colonias transformantes (Figura 2B).

Posteriormente se extrajo DNA plasmídico corriendo muestras de estos en gel de agarosa para observar su integridad (Figura 2C), se guardaron en glicerol las colonia positivas, subsiguientemente se pretendía realizar PCR y digestiones de este DNA extraído, pero debido a la falta de tiempo se concluyó en este punto la investigación.

B. CONCLUSIONES

En este proyecto se generó un casete de silenciamiento para el gen *CWH41* en *Sporothrix schenckii*, vía RNA de interferencia.

C. RECONOCIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, principalmente a la Secretaria de Investigación y Posgrado por las facilidades y el apoyo otorgado para la realización de esta estancia de verano. Asimismo agradezco a la Universidad de Guanajuato por la hospitalidad y el apoyo brindado durante mi estancia, especialmente a mi mentora en laboratorio y directora del proyecto la M.C. Luz Adriana López Ramírez por su dedicación, apoyo y orientación durante toda mi estancia de investigación. Asimismo agradezco a mi compañera y guía en laboratorio Anayeli Márquez Márquez por su paciencia, amabilidad y consejos brindados desde que llegué al laboratorio. Agradezco también a mis padres, por ser los principales promotores de que realizara esta estancia, sin su apoyo, no hubiera sido posible realizarla.

REFERENCIAS

- (1) Barros, M. B., de Almeida Paes, R., & Schubach, A. O. (2011). *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clinical microbiology reviews*, 24(4), 633–654. doi:10.1128/CMR.00007-11
- (2) Carrada, T. (2012). Esporotricosis: Avances recientes en el diagnóstico de laboratorio, histopatología y la epidemiología en México. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*, 59(3)
- (3) Lopes, L., Lozoya, N., Lopez, L., Martínez, J., Teixeira, M., Felipe, M., Flores, A. y Mora, H. (2015). Functional characterization of *Sporothrix schenckii* glycosidases involved in the N-linked glycosylation pathway. *Medical Mycology*, 53 (1), 60-68.

Generación de mutantes en el hongo patógeno *Sporothrix schenckii* (C)

César Augusto Zúñiga Venegas

Universidad Autónoma de Aguascalientes
Centro de Ciencias Básicas
Avenida Universidad 940, C.U., 20130
Aguascalientes, Ags.
al223887@edu.uaa.mx

Asesor: Héctor Manuel Mora Montes

Universidad de Guanajuato
División de Ciencias Naturales y Exactas,
Departamento de Biología, Noria Alta s/n, Col.
Noria Alta, CP 36050, Guanajuato, Gto.
hmora@ugto.mx

Resumen — *Sporothrix Schenckii* es el hongo dimórfico causante de la infección micótica llamada esporotricosis, y recientemente ha aumentado el número de casos referentes a esta infección. Para lograr implementar nuevos tratamientos contra la esporotricosis es necesario profundizar el estudio de la participación del gen *SsMNT1*, que codifica la enzima 1,2 manosil transferasa encargada de la síntesis de glicanos involucrados en procesos de glicosilación de proteínas, por lo tanto, es de gran interés conocer como participan estas glicoproteínas en la patogenidad durante la interacción de *Sporothrix s.* con el hospedero. Por lo que se pretende en el presente trabajo silenciar el gen *SsMNT1* por medio de células transformantes y así observar si se anulan ciertas actividades bioquímicas o si estas aumentan.

Palabras clave — gen *SsMNT1*, Glicosilación, transformantes, esporotricosis, silenciamiento del gen

Abstract — *Sporothrix Schenckii* is the dimorphic fungus that causes the fungal infection called sporotrichosis and recently the number of cases concerning this infection have increased. To implement new treatments against sporotrichosis, It is necessary to deepen the study of participation of the *SsMNT1* gene, which encodes the 1,2 mannosyl transferase enzyme responsible for synthesis of glycans involved in glycosylation processes of proteins, therefore, it is of great interest to know how these glycoproteins participate in the pathogenesis during the interaction of *Sporothrix s.* with the host. Therefore, it is intended in this study to silence the *SsMNT1* gene by means of transforming cells and thus observe whether certain biochemical activities are canceled or on the contrary whether they increase.

Keywords — *SsMNT1* gene, glycosylation, transformants, sporotrichosis, gene silencing.

I. INTRODUCCIÓN

S. schenckii es un hongo patógeno y dimórfico. Es el agente etiológico de la infección llamada esporotricosis, la cual afecta a animales y humanos [1]. La infección en el humano se produce a través de inoculación en heridas de la piel por plantas o animales contaminados. Las proteínas presentes en la pared celular de *S. schenckii*, así como de algunos hongos semejantes, se relacionan con la patogenidad del hongo debido a que inducen respuestas inmunes anómalas. La pared celular de *Sporothrix* tiene glicoproteínas con un alto contenido de manosa y unidades de ramnosa, que se sintetizan por glicosiltransferasas localizadas en el retículo endoplásmico y el complejo Golgi. En *Sporothrix schenckii* se sabe muy poco acerca de las enzimas que son codificadas por la familia de genes *MNT1/KRE2* [2]. Sin embargo, el producto del gen *MNT1* se ha caracterizado como una enzima que participa en la síntesis de glicanos unidos a enlaces *N*- y enlaces *O*- que son uniones a un grupo amida de la cadena lateral del aminoácido asparagina (Asn) y a un grupo OH de la cadena lateral de los aminoácidos serina o treonina (The/Ser) respectivamente [3]. Por lo tanto, el silenciamiento del gen *SsMNT1* podrá permitir

determinar si se anula ciertas actividades bioquímicas o al contrario si estas aumentan confiriendo la patogenicidad que presenta la pared celular de *Sporothrix*.

II. MATERIALES Y MÉTODO

Microorganismos utilizados.

Sporothrix schenckii ATCC 4821.

Escherichia coli DH5 α .

Medio de cultivo y condiciones de crecimiento para *Sporothrix Schenckii*

La cepa de *Sporothrix* se creció en medio YPD (extracto de levadura, 1%; peptona de gelatina, 2%; glucosa, 3%), a pH de 4.5 para el desarrollo de conidios e hifas, y en el mismo medio a pH de 7.8 para la obtención de levaduras. Todas las incubaciones en medio líquido se realizaron con agitación orbital de 120 rpm.

Amplificación del gen de interés por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se efectuaron 4 reacciones de PCR en temociclador T100® (Bio-Rad, USA).

Una reacción correspondió para la amplificación del inserto de interés, SsMnt1 454aa, en sentido mientras que la segunda reacción para el inserto de interés, SsMnt1 454aa, en antisentido, las cuales se prepararon con 1 μ L de oligonucleótido sentido y 1 μ L de oligonucleótido antisentido, 1 μ L de dNTPs, 0.2 μ L de enzima Dream Taq Pol, 2 μ L de buffer 10X Dream Taq, 13.8 μ L agua libre de DNasa y RNasa obteniendo un volumen total de 20 μ L en cada uno de los dos tubos de reacción finalmente se repartió el contenido de cada uno de los dos tubos en dos volúmenes de 9.5 μ L de mezcla obteniendo 4 tubos a los cuales a dos se les adicionó 1 μ L de cDNA, uno para la mezcla de reacción sentido y la otra para la mezcla de reacción antisentido, mientras que al otro par de tubos mezclas se le adiciono 1 μ L de DNAg como control.

Las condiciones de reacción para la amplificación del gen de interés SsMnt1 454aa fueron: 96 °C / 3 min, 96 °C / 30 seg, 58 °C / 30 seg, 72 °C, 72 °C / 5 min, 12 °C / ∞ .

Electroforesis de los productos en el gel de agarosa

Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0.8% en buffer TAE 1X (Tris 40mM, ácido acético 20mM y EDTA1mM). La electroforesis se realizó a 100 V.

Los geles fueron inspeccionados bajo iluminación UV y capturados en imagen en un analizador ChemiDoc MP (BioRad).

Purificación del gen amplificado SsMnt1 454aa por PCR

Los fragmentos obtenidos de 308 pb de las diferentes amplificaciones por PCR fueron purificados por medio del GeneJET Gel Extraction Kit® (ThermoFisher Scientific, USA), obteniendo 3 eluidos por cada fragmento del gen sentido y antisentido.

Ligación de los productos purificados al vector de mantenimiento pJET1.2/blunt y pCR 2.1 TOPO

El producto purificado de la secuencia sentido se ligó en vector de mantenimiento pCR 2.1 TOPO y el producto purificado de la secuencia antisentido se ligó en pJET1.2/blunt.

Para el constructo de la secuencia sentido en pCR 2.1 TOPO se requirió 1 μL de eluido, 0.5 μL de solución del vector pCR 2.1 TOPO y 1 μL de solución salina y 3.5 μL de H_2O estéril, y finalmente se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 5 minutos.

Para el constructo de la secuencia antisentido en pJET1.2/blunt se requirió 2 μL de eluido, 5 μL de H_2O , 10 μL de Buffer y 1 μL de enzima Blunting, después se incubaron las muestras en hielo por un breve momento y posteriormente se añadió 1 μL de enzima ligasa y 0.5 μL de solución de pJET1.2/blunt y finalmente se incubó la mezcla de reacción toda la noche a temperatura ambiente [4].

Transformación de células *E. Coli DH5 α* químicamente competentes

Se colectaron alícuotas de 25 μL de células competentes *E. Coli* en diferentes tubos eppendorf, en donde a uno se le añadió todo el volumen del constructo de la secuencia sentido en pCR 2.1 TOPO, a un segundo tubo se le añadió todo el volumen del constructo de la secuencia antisentido en pJET1.2/blunt y se usaron 3 tubos como controles, dos como controles positivos en cual cada uno contenían diferente vector de mantenimiento cerrado y un negativo que contenía solo células competentes, posteriormente se aplicó un choque térmico de 42 $^{\circ}\text{C}$ por 50 segundos con agitación y finalmente se agregó 200 μL de medio LB en hielo, se procedió a incubar por 1 hora a 37 $^{\circ}\text{C}$ y finalmente se sembraron en placas LB + Ampicilina excepto la para la transformación de la secuencia sentido que fue sembrada en placa LB + Kanamicina. Por último, se dejaron incubar las muestras toda la noche.

Extracción de ADN plasmídico

Se seleccionaron 14 transformantes con la secuencia antisentido ligadas en pCR 2.1 TOPO y un transformante con la secuencia sentido en pJET1.2/blunt para ser incubadas en 2 μL de medio líquido LB+ Amp/K a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 24 horas con agitación orbital a 200 rpm. Posteriormente se centrifugaron las muestras por 3 minutos a 11,00 rpm en tubos eppendorf, luego se tiró el sobrenadante. La pastilla obtenida se resuspendió en su propio sobrenadante y luego se le agregó 300 μL solución Tris-EDTA-NaOH- SDS (TENS) y 150 μL de acetato de sodio 3M pH 5.2 para romper las lisar las células y precipitar DNA genómico. Finalmente, se centrifugaron por 15 minutos a 11, 000 rpm para después ser lavados con 900 μL de etanol al 100%l y nuevamente centrifugado por 2 minutos a 11,00 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se lavó 2 veces con etanol al 70% para eliminar el exceso de sales y por último, se resuspendieron en 30 μL de H_2O estéril.

Digestión de plásmidos

Se realizaron dos digestiones por cada DNAP transformado con la secuencia sentido y antisentido. Entre cada digestión se precipitó el DNAP con 20 μL de solución Polietilenglicol/Cloruro de Magnesio (PEG) y 30 μL amortiguador TE, luego se centrifugo por 15 minutos a 11,000 rpm, se tiró el sobrenadante y se resuspendió en 8.5 μL de H_2O .

Para la primera digestión del DNAp con secuencia sentido se requirió 2 μL de DNAp, 6.5 μL de H_2O , 1 μL de Buffer y 0.5 μL de enzima HindIII, y se incubó a 37 °C por 2 horas. Para la segunda digestión se realizó con 1 μL de Buffer y 0.5 μL de enzima XhoI.

Para la primera digestión del DNAp con secuencia antisentido se requirió 2 μL de DNAp, 6.5 μL de H_2O , 1 μL de Buffer y 0.5 μL de enzima BglII, y se incubó a 37 °C por 3 horas. Para la segunda digestión se realizó con 1 μL de Buffer y 0.5 μL de enzima StuI.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el silenciamiento del gen SsMNT1 454aa, el cual contiene 4 exones, se requirió del diseño de oligonucleótidos con base a la secuencia de aminoácidos del gen MNT1, por lo que se recuperó un fragmento de 308 pb y haciendo uso de las enzimas Xho I, Hind III, Stu I y Bgl II como adaptadores.

En la figura 1, se observa la amplificación por PCR del ADN genómico y ADN complementario por medio de los oligonucleótidos sentido y antisentido se recuperaron fragmentos de 308 pb, uno correspondiente a la secuencia sentido y otro a la secuencia antisentido.

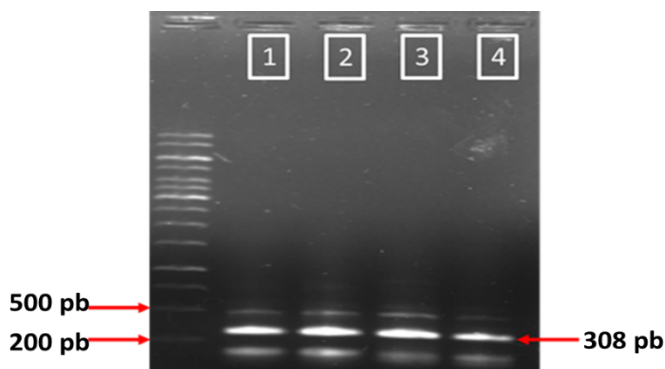


Figura 1. El carril 1 y 3, corresponden a DNAg sentido y antisentido, respectivamente, y el carril 2 y 4, corresponden a DNAc sentido y antisentido, respectivamente.

Las bandas obtenidas de los fragmentos sentido y antisentido se purificaron usando el GeneJET Gel Extraction Kit® (ThermoFisher Scientific, USA). El purificado obtenido de la secuencia sentido y antisentido se ligó al vector de mantenimiento pCR 2.1 TOPO y pJET1.2/blunt, respectivamente. El producto de la ligación posteriormente se usó para transformar células químicamente competentes de *E. Coli* DH5 α , por lo que se seleccionaron 14 colonias transformantes con el fragmento antisentido ligado a pJET1.2/blunt y una colonia transformante con fragmento sentido ligado en pCR 2.1 TOPO, siendo la única obtenida, con la finalidad de extraer ADN plásmidico.

Se seleccionaron los plásmidos de las clonas 4, 7 y 11 con la secuencia antisentido ya que estos presentaron un patrón electroforético distinto, figura 2.

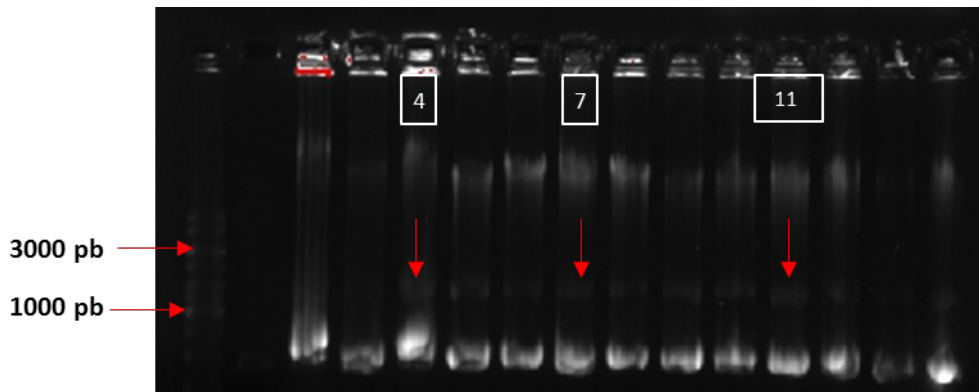


Figura 2. El carril 4, 7 y 11 corresponden a DNAs de las clonas con secuencia antisentido, respectivamente.

Finalmente, se evaluaron las clonas por digestiones con las enzimas de restricción Hind III y XhoI para liberar el fragmento sentido de 308 pb alojado en el vector de mantenimiento pCR 2.1 TOPO, con un tamaño de 3,931 pb y las enzimas de restricción Bgl II y Stu I para liberar el fragmento antisentido de 308 pb alojado en el vector de mantenimiento pJET1.2/blunt, con un tamaño de 2,974 pb. Los cuales fueron cortados como se muestran en la figura 3.

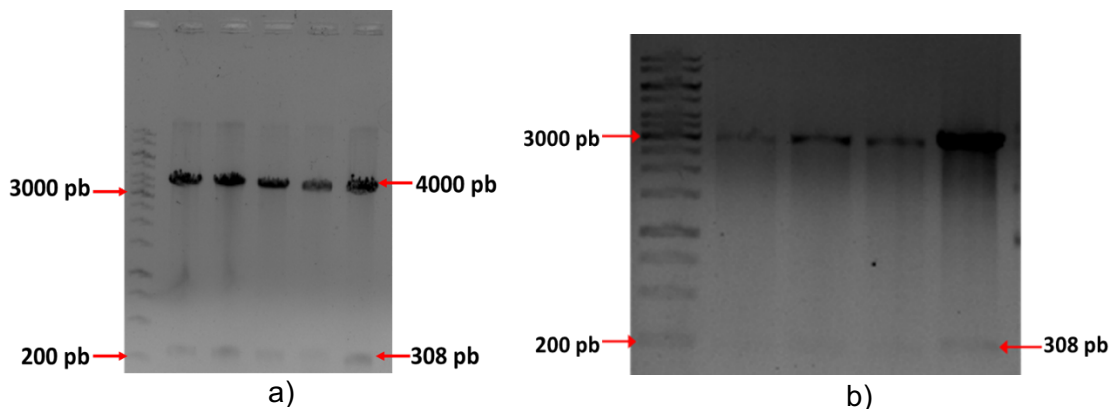


Figura 3. a) Fragmento sentido liberado con 308 pb y plásmido pCR 2.1 TOPO vació en ~4000 pb. b) Fragmento antisentido liberado con 308 pb y plásmido pJET1.2/blunt vació en ~3000 pb.

IV. CONCLUSIONES

Con la finalidad de lograr un constructo posteriormente el cual logré el silenciamiento del gen *MNT1* 454aa de *Sporothrix schenckii*, se requirió del diseño de oligonucleótidos altamente específicos, así como la elección adecuada de las enzimas de restricción utilizadas. Por lo tanto, se logró recuperar los fragmentos sentido y antisentido contenidos en los vectores de clonación pCR 2.1 TOPO y pJET1.2/blunt, respectivamente, lo cuales serán ligados en el vector de silenciamiento pSilent-1 para transformar células químicamente competentes *E. coli* DH5 α .

V. AGRADECIMIENTOS

Manifiesto mi más profundo agradecimiento a Adriana López y Ricardo Zúñiga por el tiempo compartido durante la elaboración de mi proyecto, la paciencia que me brindaron y por ser fuente de conocimiento teórico y práctico. Agradezco al Dr. Hector M. Mora Montes por permitirme participar y colaborar desarrollando el presente proyecto. Este proyecto fue apoyado la Universidad Guanajuato como sede receptora y apoyada por fondos por la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

REFERENCIAS

1. L.R. Travassos, and K. Lloyd, *Sporothrix schenckii* and related species of *Ceratocystis*. *Microbiol. Rev.* 44: 683-721. (1980)
2. D.F. Díaz, L.A. Pérez, J.A. Martínez and H.M. Mora, Role of the fungal cell wall in pathogenesis and antifungal resistance. *Curr Fungal Infect Rep* 6: 275-282. (2012)
3. A. Hernández, H. M. Mora, A. Álvarez, D. F. Díaz, C. I. Robledo and A. Flores, Isolation of *Sporothrix schenckii* MNT1 and the biochemical and functional characterization of the encoded alpha1,2-mannosyltransferase activity. *Microbiology* 158: 2419-2427. (2012)
4. ThermoFisher: CloneJET PCR Kit. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1231> Consultado el 5 de Agosto de 2019.

Hidrólisis enzimática de residuos agroindustriales de la región de Guanajuato

María José Martínez Pauli

Universidad Autónoma de Coahuila
Facultad de Ciencias Químicas
Ing. J. Cárdenas Valdez s/n, Col. República,
C.P. 25280 Saltillo, Coah.
mariamartinezpauli@uadec.edu.mx

Asesor: Ricardo Morales Rodríguez

Universidad de Guanajuato
División de Ciencias Naturales y Exactas
Noria Alta s/n, Noria Alta,
C.P. 36050 Guanajuato, Gto.
ricardo.morales@ugto.mx

Resumen — Este trabajo presenta la hidrólisis enzimática sobre dos tipos de biomasa lignocelulósica (bagazo de agave y rastrojo de maíz) sometidos previamente a diferentes pretratamientos. Se utilizó la enzima *Cellulase from Trichoderma Reesei* de Sigma Aldrich™ y se evaluó la liberación de azúcares reductores por medio de la técnica de (DNS). La mayor concentración de glucosa producida se encontró en bagazo de agave pretratado a mayores temperaturas (120°C) y con presencia de H₂SO₄ a concentraciones de 2 a 6.

Palabras clave — Hidrólisis enzimática, bagazo de agave, rastrojo de maíz.

Abstract — This work reports enzymatic hydrolysis over two types of lignocellulosic biomass (agave bagasse and corn stubble) which were previously pretreated. Sigma Aldrich's™ Cellulase from Trichoderma Reesei was used and the release of reducing sugars was evaluated through the (DNS) technique. The highest concentration of glucose produced was found in pretreated agave bagasse at higher temperatures (120 ° C) and with the presence of H₂SO₄ at concentrations of 2 to 6.

Keywords — Enzymatic hydrolysis, agave bagasse, corn stubble.

I. INTRODUCCIÓN

Los residuos agroindustriales son aquellos desechos generados durante la producción de un producto primario, donde estos primeros constan de gran parte de la materia prima por lo cual se han tratado de aprovechar para obtener productos secundarios que pueden ser beneficiosos como alternativas renovables [1].

Entre los subproductos generados en la industria mexicana se encuentran el bagazo de agave y el rastrojo de maíz, obtenidos de la producción del tequila y del cultivo del maíz respectivamente. Estos materiales se caracterizan por estar compuestos en parte por celulosa que es un polisacárido que está compuesto por varias moléculas de glucosa unidas entre sí, y mediante algunos procesos estas cadenas pueden ser rotas para obtener el monosacárido debido a que la glucosa es un azúcar fermentable y puede ser utilizada para producir energías renovables [2,3].

En este trabajo se analizarán dos tipos de biomasa con diferentes pretratamientos para conocer qué tipo de material y tratamiento produce más glucosa, la cual se puede utilizar en la fermentación para la obtención de productos como el bioetanol [1].

II. MARCO TEÓRICO.

La biomasa lignocelulósica, también llamada lignocelulosa, es un material compuesto en mayor parte por celulosa, hemicelulosa y lignina (que son largas cadenas polisacáridos),

junto a otros compuestos [1]. Este material se trata a través de la hidrólisis enzimática, un proceso mediante el cual se liberan azúcares fermentables y se lleva a cabo en condiciones más suaves que la hidrólisis ácida, donde las enzimas rompen las cadenas de celulosa para convertirse en glucosa. Este tipo de reacción se ha trabajado con bagazo de caña de azúcar con dos pretratamientos alcalino-oxidativo: utilizando hidróxido de sodio e hidróxido de calcio, presentando los mejores resultados el primero mencionado [4].

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Biomasa. Se estuvo trabajando con dos tipos de biomasa lignocelulósica: bagazo de agave (BA) y rastrojo de maíz (RM) de la región de Guanajuato. Ambos materiales ya se encontraban pretratados a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido sulfúrico (H₂SO₄), con un rango de 0 a 120 °C y 0 a 10 respectivamente. Estos materiales se encuentran compuestos por 41.9% de celulosa en el BA [5] y 45% igualmente de celulosa en el RM [6].

Enzima. Se utilizó la enzima Cellulase from *Trichoderma Reesei* de Sigma Aldrich™, celulosa comercial.

Hidrólisis enzimática. La hidrólisis enzimática se llevó a cabo durante 48 horas a 50 °C, durante las cuales se tomó muestra a las 0, 24, y 48 horas. Se utilizaron 26 muestras pretratadas, cada una de ellas se trabajó por duplicado siendo un total de 52 reacciones. En tubos Eppendorf™ de 0.6 mL se agregó 0.05 gramos de biomasa, después se les agregó 520 µL de buffer, donde primero se añadió 260 µL, se agitó y se agregó el volumen restante de buffer, luego se dejó asentar. Se tomó una muestra de 2 µL para la prueba DNS al tiempo cero y después de agregó 4 µL de la enzima. Al final, se colocaron tubos en un termociclador de la marca Perkin Elmer™ con una capacidad de 48 tubos [4].

Determinación de azúcares reductores: Se utilizó ácido 3,5 dinitrosalicílico, siguiendo la metodología de Xiao, (1994). Se realizó una curva de calibración con glucosa.

IV. RESULTADOS

Con los datos de absorbancia y la ecuación de la curva de calibración se obtuvieron los datos de concentración.

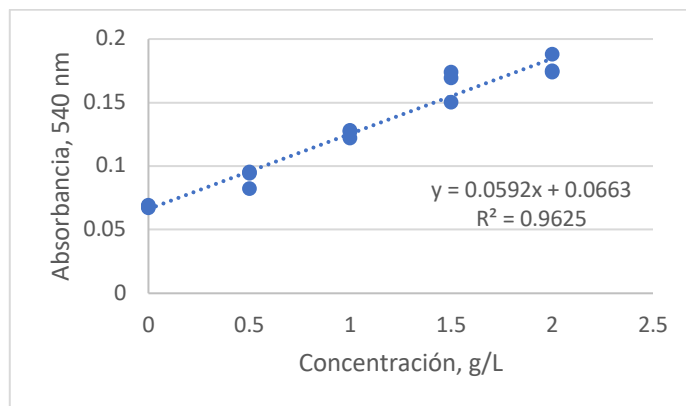


Figura 1. Gráfica de la curva de calibración.

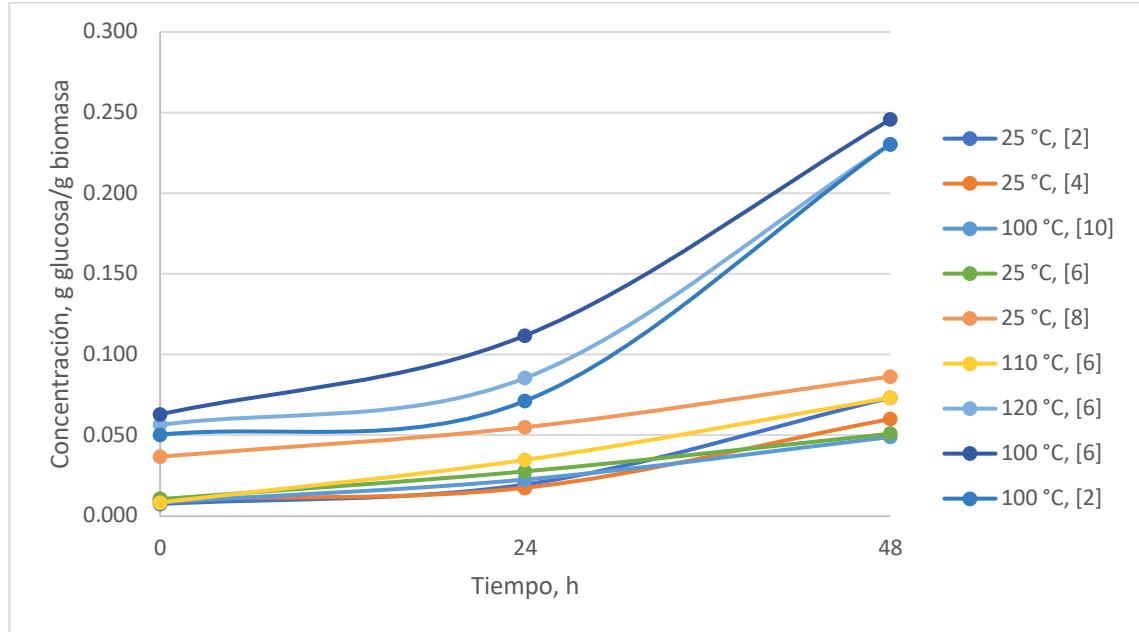


Figura 2. Gráfica de las muestras de rastrojo de maíz (a las condiciones que fueron pretratadas) en concentración en g glucosa/ g de biomasa contra tiempo en horas.

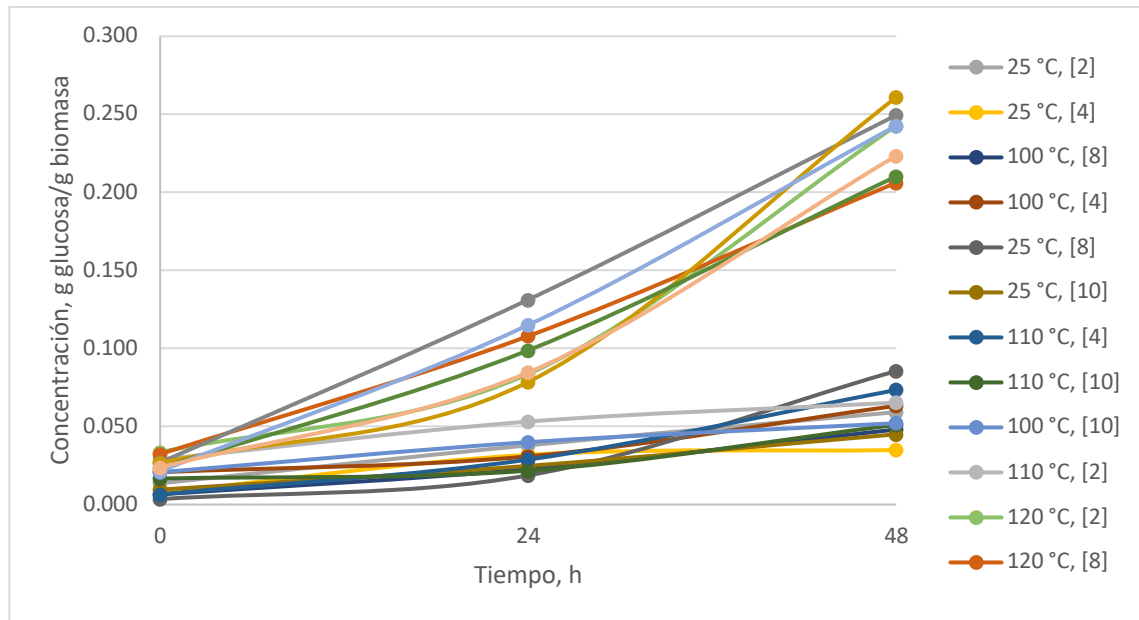


Figura 3. Gráfica de las muestras de bagazo de agave (a las condiciones que fueron pretratadas) en concentración en g glucosa/ g de biomasa contra tiempo en horas.

Al final la reacción se obtuvieron los datos de concentración de gramos de glucosa liberados por gramos de biomasa donde los mejores resultados se muestran a continuación.

Tabla 1. Tipos de biomasa y pretratamientos con los mejores resultados.

Material	Muestra	T, °C	[H ₂ SO ₄],	t ₀	t ₂₄	t ₄₈
RM	W1	120	6	0.057	0.086	0.230
BA	Z1	120	2	0.033	0.084	0.243
RM	C2	100	6	0.063	0.112	0.246
BA	F2	120	8	0.032	0.108	0.206
BA	I2	120	4	0.027	0.131	0.249
BA	L2	100	2	0.027	0.078	0.261
RM	O2	100	2	0.050	0.071	0.230
BA	R2	100	6	0.023	0.099	0.210
BA	U2	120	6	0.021	0.115	0.243
BA	X2	110	6	0.024	0.085	0.223
RM	W1	120	6	0.057	0.086	0.230

Se observa que las muestras con los mejores resultados fueron aquellos pretratados a una temperatura de 100 a 120 °C y con concentraciones de varían desde 2 a 6 de H₂SO₄, además de que el material con más liberación de glucosa fue el bagazo de agave.

V. DISCUSIÓN (O ANÁLISIS DE RESULTADOS)

Se consideró que el tiempo de 48 horas es demasiado ya que los resultados de liberación de glucosa a las 24 horas presentan un buen rendimiento. El mejor material para trabajar esta reacción a nivel industrial es el bagazo de agave, como se muestra en los resultados, ya que las muestras de este material se repitieron más en la tabla 1. También se puede tomar en cuenta que se podría trabajar con otro tipo de hidrolisis, como la ácida, y comparar resultados a las mismas condiciones [8, 9].

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Cumpléndose el objetivo de este proyecto, se concluye que aquellas muestras con mayor liberación de glucosa fueron aquellos pretratados a altas temperaturas y con una concentración de ácido de baja a media, por lo cual se le puede escalar la hidrolisis enzimática para estos materiales con buenos resultados si se cumplen con estas condiciones.

VII. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Se agradece a la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato por el material, el tiempo, y los conocimientos otorgados para poder llevar a cabo este proyecto durante la estancia de verano.

REFERENCIAS

- [1] W. G. Cortés Ortiz, "Materiales lignocelulósicos como fuente de biocombustibles y productos químicos". Tecno Esufa. Vol. 16, pp. 43, 2011.
- [2] N. Mejías Brizuela, E. Orozco Guillen, N. Galáan Hernández, "Aprovechamiento de los residuos agroindustriales y su contribución al desarrollo sostenible de México". Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales. Vol. 2, pp. 28, 2016.
- [3] INIFAP, Rastrojos: manejos, uso y mercado en el centro y sur de México. ISBN: 978-607-37-0170-9. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Aguascalientes, México, 2013.
- [4] P. A. Meléndez Hernández, Análisis del pretratamiento de bagazo de caña de azúcar para la obtención de azúcares fermentables [Tesis de licenciatura]. Universidad de Guanajuato, Guanajuato, GTO, 2017.
- [5] G. Iñiguez, N. Acosta, L. Martínez, J. Parra y O. González, "Utilización de subproductos de la industria tequilera. Parte 7. Compostaje de bagazo de agave y vinazas tequileras". Revista Internacional de Contaminación Ambiental. Vol. 21, pp. 37-50, 2005.
- [6] I. Ramos Sevilla, "Caracterización química de tres residuos lignocelulósicos generados en la región del Cantón Alausí". Revista del Instituto de Investigación FIGMMG-UNMSM. Vol. 20, pp. 4, 2017.
- [7] Z. Xiao, R. Storms, A. Tsang, "Microplate-based filter paper assay to measure total cellulase activity". Biotechnology and Bioengineering. Vol 88, pp. 832-837.
- [8] J. Saucedo, A. Castro, J. Rico, J. Campos, "Optimization of acid hydrolysis of bagasse from Agave tequilana Weber". Revista mexicana de ingeniería química. Vol. 9, pp. 658-664.
- [9] A. Longoria. "Producción de etanol a partir de la fracción celulósica del rastrojo de maíz blanco". XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Queretaro, México, junio de 2011.

Identificación de bacterias ácido lácticas

Emmanuel Armando Mata Coria

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Carr. Irapuato-Silao km 12.5 El Copal,
36821 Irapuato, Gto.
280055mata@gmail.com

Asesora: Dra. Guicela Ramírez Bernal

Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca
Romualdo del Campo # 501, Frac. Rafael Curiel,
C.P. 79060
guicela.ramirez@uaslp.mx

Resumen — Los cultivos iniciadores, constituidos principalmente por bacterias ácido lácticas (BAL), son adicionados para producir características químicas y sensoriales en los productos alimenticios. En el presente trabajo fueron aisladas e identificadas un total de 9 cepas mediante pruebas bioquímicas y un método miniaturizado de identificación BBL Crystal. Los resultados mostraron que las bacterias aisladas de muestras de leche sin pasteurizar, crema y queso artesanal, pertenecen al género *Streptococcus*. Se ha reportado en leche y los quesos artesanales elaborados con leche sin pasteurizar, los microorganismos lácticos que son aislados con mayor frecuencia son los cocos, como fue observado en este trabajo. Posteriormente se confirmará la identificación mediante una técnica molecular (reacción en cadena de la polimerasa PCR).

Palabras clave — Bacterias ácido lácticas, lácteos, identificación microbiana.

Abstract — Starter cultures, consisting mainly of lactic acid bacteria (BAL), are added to produce chemical and sensory characteristics in food products. In this work, a total of 9 strains were isolated and identified by biochemical tests and a miniaturized BBL Crystal identification method. The results showed that bacteria isolated from samples of unpasteurized milk, cream and artisan cheese, belong to the genus *Streptococcus*. It has been reported in milk and artisan cheeses made with unpasteurized milk, the lactic microorganisms that are most often isolated are coccus, as observed in this work. Subsequently, the identification will be confirmed by a molecular technique (PCR polymerase chain reaction).

Keywords — Lactic acid bacteria, microbial identification, dairy products.

I. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos cultivables y no cultivables transforman naturalmente la mayoría de los alimentos y bebidas fermentados. La fermentación tradicional de alimentos a partir de la microbiota autóctona presente en estos, representa un patrimonio cultural sumamente valioso en la mayoría de las regiones, y alberga un enorme potencial genético de cepas valiosas. Los enfoques holísticos para la identificación y perfiles completos de microorganismos cultivables y no cultivables en alimentos fermentados son de interés para los microbiólogos alimentarios (Tamang *et al.*, 2016).

Los quesos artesanales frecuentemente se elaboran con leche sin pasteurizar y sin la adición de microorganismos iniciadores, generando con ello riesgos para la salud del consumidor. Los cultivos iniciadores contienen microorganismos vivos adicionados con el objeto de hacer uso de su metabolismo microbiano para producir características químicas y sensoriales en los productos alimenticios. Estos cultivos están constituidos principalmente por bacterias ácido lácticas (BAL), los géneros más utilizados en la Industria Láctea con este fin son principalmente pertenecientes a los géneros

Lactococcus, Lactobacillus y Leuconostoc (Alvarado *et al.*, 2007; Tamang *et al.*, 2016).

La búsqueda y obtención de cepas que posean características tecnológicas benéficas, tales como buena actividad acidificante o proteolítica, y que puedan sobrevivir en productos lácteos, permiten el desarrollo de los procesos de fabricación manteniendo las características organolépticas de los quesos y otros productos lácteos fermentados, además de propiciar la obtención de alimentos seguros para el consumidor (Hayaloglu *et al.*, 2005; Alvarado *et al.*, 2007). El objetivo de este trabajo fue identificar mediante pruebas bioquímicas las cepas de BAL aisladas de leche, crema y quesos artesanales expendidos en Ciudad Valles, S. L. P., para su clasificación y posterior caracterización tecnológica.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas fueron identificadas de acuerdo a los criterios del Manual Bergey. Las pruebas de bioquímicas que se realizaron para la identificación bacteriana fueron: Tinción Gram, Catalasa, Oxidasa, Formación de tétradas, Producción de CO₂ a partir de Glucosa, Producción de CO₂ a partir de Lactosa, Crecimiento a 10°C, Crecimiento a 45°C, Crecimiento en pH 4.4, Crecimiento en pH 9.6, Crecimiento en 6.5% de NaCl y Crecimiento en 18% de NaCl (Walstra *et al.*, 2001; Ramos *et al.*, 2009).

Para la identificación también fue utilizado el Sistema de identificación miniaturizado BBL Crystal para bacterias Gram Positivas. Los paneles de este sistema contienen 29 substratos bioquímicos y enzimáticos deshidratados. Para hidratarlos se empleó una suspensión de bacterias en el fluido de inóculo, después de un período de incubación de 24 horas a 37°C en caldo MRS, se examinaron los pocillos para determinar cambios de color o presencia de fluorescencia que resultan de las actividades metabólicas de los microorganismos. La serie de colores resultante de las 29 reacciones se convierte en un número de perfil de diez dígitos que se utiliza como la base de identificación. Las series de reacciones de los 29 sustratos para una variedad de microorganismos están almacenadas en la base de datos, la identificación se deriva de un análisis comparativo entre las series de reacciones del aislado y las de la base de datos.

III. RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas y el método miniaturizado BBL Crystal. Se observó que la mayor parte de los aislamientos identificados por ambos métodos, pertenecen al género *Streptococcus* y dos al género *Tetragenococcus*, perteneciente a la familia de los *Enterococcaceae*.

Tabla 1. Identificación Por bioquímicas y el sistema miniaturizado BBL Crystal

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	Bioquímicas	BBL Crystal
1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	Streptococcus	Streptococcus
2	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	++	Tetragenococcus	Streptococcus
3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	Streptococcus	Streptococcus
4	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	++	++	Tetragenococcus	Streptococcus
5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	Streptococcus	Streptococcus
6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	Streptococcus	Streptococcus
7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	Streptococcus	Streptococcus
8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	Streptococcus	Streptococcus
9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Streptococcus	Streptococcus

A (Tinción Gram); B (Catalasa); C (Oxidasa); D (Formación de tétradas); E (Producción de CO₂ a partir de Glucosa); F (Producción de CO₂ a partir de Lactosa); G (Crecimiento a 10°C); H (Crecimiento a 45°C); I (Crecimiento en pH 4.4); J (Crecimiento en pH 9.6); K (Crecimiento en 6.5% de NaCl); L (Crecimiento en 18% de NaCl);

IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En diversos trabajos se ha observado que en los quesos artesanales los microorganismos lácticos más aislados en los primeros días posteriores a su elaboración son los cocos, y se podría explicar por su elevado número de éstas bacterias en la leche, como fue observado en este trabajo (Cogan 1997; Estepar *et al.*, 1999; Rodríguez 2007).

V. CONCLUSIONES

La elaboración de quesos con leche no pasteurizada, repercute en la incidencia del tipo de bacterias ácido lácticas en dichos productos.

Es posible que el clima cálido húmedo que predomina en la zona también sea un factor que determina el tipo de bacterias presentes en leche y quesos.

VI. RECONOCIMIENTOS

Este trabajo no se habría podido realizar sin la colaboración de muchas personas que me han brindado su ayuda, sus conocimientos y su apoyo. Quiero agradecerles a todos ellos cuanto han hecho por mí, para que este trabajo saliera delante de la mejor manera posible.

Quiero agradecer a la doctora Guicela Ramírez Bernal que me ha ayudado y apoyado en todo momento. Agradecer por su guía, conocimientos, comentarios y correcciones con las que se pudo realizar de manera correcta este trabajo. Al Dr. Enrique por la hospitalidad y la estancia en su domicilio, y por la ayuda sobre traslado dentro de la ciudad.

A Bernardo Coronado Rivera, por el apoyo brindado al igual que su dirección a través de la estancia en el laboratorio y sus conocimientos.

A mi familia y seres queridos por el apoyo y ánimos que me dieron la confianza para partir y poder ser partícipe de esto, que sin duda fue una experiencia sin igual.

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí Campus Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca por las instalaciones de laboratorios, biblioteca y cafetería.

Al Instituto Tecnológico Superior de Irapuato por el apoyo económico otorgado y a las personas de Verano de la Ciencia Región Centro por la oportunidad de ser partícipe de esta experiencia.

REFERENCIAS

1. Alvarado R. C., Chacón R. Z., Otoniel R. J., Guerrero C. B. y López C.G. (2007). Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas de un queso venezolano ahumado andino artesanal. Su uso como cultivo iniciador. *Rev. Cient. (Maracaibo)*; 17(3):301-308.
2. Cogan T.M., Barbosa M., Beuvier E., Biachi-Salvadori B., Cocconcelli P.S., Fernández I, Gómez R., Kalantzopoulos G., Ledda A., Medina M., Rea M.C., y Rodríguez E. (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*; 54 (3): 409 – 421.
3. ESTEPAR, J., DeL MAR SÁNCHEZ, M., ALONSO, L. y MAYO, B. (1999). Biochemical and microbiological characterization of artisanal 'Peñamellera' cheese: análisis of its indigenous lactic bacteria. *International Dairy journal*; 9: 737-746.
4. Ramos B., Bucio A., Bautista-Muñoz C., Aranda-Ibáñez E., Izquierdo-Reyes F. (2009). Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso crema tropical. *Universidad y Ciencia, trópico húmedo*; 25(2):159-171. www.ujat.mx/publicaciones/uciencia
5. Rodríguez V.G.L. Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas a partir de leche cruda y queso paipa elaborado en los municipios de pacho (cundinamarca) y belen (boyaca) [Tesis]. Universidad de La Salle, Bogotá, Col., 2007.
6. Tamang Jyoti P., Watanabe Koichi and Holzapfel Wilhelm H. (2016). Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Frontiers in Microbiology*; 7:1-28.
7. Walstra P., Geurts T.J., Normen A., Jellema A. & Van Boekel MAJS (2001) *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Editorial Acribia S.A. España. 2001. 730p.

Identificación molecular de aislados clínicos del hongo patógeno oportunista *Candida glabrata* y de otras tres especies principales causantes de candidemia

Alexia Banda Gutiérrez

Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Coahuila
Ing. Cárdenas Valdez S/N, República, 25280
Saltillo, Coah
alexiabanda@uadec.edu.mx

Asesora:

Irene Beatriz Castaño Navarro
Instituto Potosino de Investigación Científica
y Tecnológica (IPICYT)
Camino a la Presa de San José 2055, Lomas
4ta Secc.78216 San Luis, S.L.P
icastano@ipicyt.edu.mx

Resumen — En el presente estudio se emplearon oligonucleótidos especie-específicos diseñados en el IPICYT para amplificar secuencias genómicas específicas de cada una de las cuatro especies principales causantes de candidemia. Se realizó la identificación molecular de 8 aislados de 8 pacientes atendidos en diferentes centros médicos mexicanos, identificados con el método Vitek-2® por dichas instituciones. Se corrigió el resultado dado por los hospitales de 2 de estos aislados mediante nuestro análisis molecular, lo que prueba su sensibilidad y especificidad. Así mismo, para caracterizar molecular y fenotípicamente varios aislados secuenciales de *C. glabrata* procedentes de 8 pacientes diferentes, se emplearon 30 aislados que utilizamos inicialmente para la amplificación de la región del NE (Elemento negativo) de los genes *EPA1*, *EPA6* y *EPA7*, los cuales codifican para proteínas de pared celular denominadas adhesinas, importantes en la adherencia a células epiteliales, endoteliales e inmunes.

Palabras clave — *Candida* spp, Oligonucleótidos especie-específicos, PCR, Adhesinas, EPA.

Abstract — In this study we used species-specific oligonucleotides designed at IPICYT to amplify genomic sequences of each of the four main species that cause candidemia. We performed molecular identification of 8 isolates from 8 patients treated in different mexican hospitals, previously identified with the Vitek-2® method by these institutions. With our species-specific oligonucleotides, we corrected the identification of two of these isolates, which were incorrectly identified by the hospital, confirming the high specificity and sensitivity of our PCR method. To start the molecular and phenotypic characterization of the sequential isolates, we amplified the negative element region associated to *EPA1*, *EPA6* and *EPA7* from 30 sequential isolates. These genes encode cell wall proteins called adhesins, important in adhesion to the epithelium, endothelium and immune cells.

Keywords — *Candida* spp, Species-specific oligonucleotides, PCR, Adhesins, EPA.

I. INTRODUCCIÓN

El género *Candida* está conformado por diversas especies potencialmente causantes de candidiasis, una micosis de expresión clínica variable cuya frecuencia ha aumentado en las tres últimas décadas, debido al incremento de los factores de riesgo en los pacientes inmunocomprometidos (Camacho-Cardoso et al., 2016). En México, durante el periodo 2005-2015, se registraron 2184 casos donde las principales especies asociadas con candidiasis invasiva fueron *C. albicans* (40.20%), *C. tropicalis* (17.22%), el complejo *C. glabrata* (14.04%), el complejo *C. parapsilosis* (12.73%) y *C. krusei* (6.60%) (Reyes-Montes et al., 2017). Varios estudios informan una disminución de la frecuencia de *C. albicans* y

aumentos de otras especies. Entre estas, *C. glabrata* es especialmente preocupante ya que es menos susceptible a los azoles, además de que posee la capacidad de adherirse a varios tipos de células de sus huéspedes mamíferos y a dispositivos médicos. Frecuentemente forma estructuras llamadas biopelículas gracias a proteínas de pared celular denominadas adhesinas, codificadas por la familia de genes *EPA*, los cuales se encuentran localizados en regiones cercanas a los telómeros (llamadas sub-teloméricas). La mayoría de estos genes están regulados negativamente por sus respectivos NE y también mediante la maquinaria del silenciamiento sub-telomérico (López-Fuentes et al., 2018).

Los procedimientos convencionales para realizar el diagnóstico de la candidiasis invasiva generalmente están basados en el hemocultivo, que en complemento con otras pruebas determinan la especie causante de la infección, tales como Vitek-2®, basada en la asimilación de fuentes de carbono y compuestos nitrogenados. Sin embargo, la sensibilidad y la especificidad de estos métodos son relativamente bajas. Con el fin de lograr un diagnóstico más rápido y específico para establecer una terapia exitosa, se han desarrollado procedimientos moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), cuyos resultados superan a los procedimientos convencionales en tiempo, sensibilidad y especificidad (Camacho-Cardoso et al., 2016).

Las pruebas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos (o pruebas moleculares) detectan secuencias genómicas específicas de *Candida* spp. mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). En general se amplifican los genes que codifican RNAs ribosomales (5.8S y 18S) altamente conservados, o secuencias específicas para cada especie localizadas en la región ITS (internally transcribed spacer) (Colom, Jover et al. 2006).

El objetivo del presente estudio fue comprobar los resultados de la identificación de 8 aislados clínicos realizada por Vitek-2® en el hospital del cual obtuvimos los aislados, con el método de PCR utilizando juegos de oligonucleótidos especie-específicos para cada una de las cuatro especies principales causantes de candidemia diseñados en el IPICYT. Además, iniciamos el análisis molecular de la amplificación de la región del NE de los genes *EPA1*, *EPA6* y *EPA7* de 30 aislados clínicos secuenciales de *C. glabrata* procedentes de 8 pacientes para futuros ensayos de caracterización fenotípica.

II. MARCO TEÓRICO

En el IPICYT se diseñaron 11 juegos de oligonucleótidos que amplifican regiones específicas para cada una de las cuatro especies principales causantes de candidiasis (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata*). Este método de PCR resulta rápido, sensible y altamente específico por lo que puede ser implementado en laboratorios del sistema de salud para proveer resultados en un menor tiempo y de mayor calidad, para proteger la vida de pacientes que padecen infecciones causadas por estas especies principales de *Candida*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Detección molecular de cuatro especies comunes de *Candida*.

- 1) Cepas de referencia: *C. glabrata* (BG14), *C. albicans* (ATCC MYA-2876), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) y *C. tropicalis* (ATCC 750).
 - 2) *Aislados clínicos*: Se utilizaron 8 aislados clínicos positivos para las cuatro principales especies de *Candida* diagnosticados anteriormente con Vitek-2®. Estos aislados son provenientes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) y del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN), durante el periodo de agosto de 2017 a mayo de 2018. Se utilizaron las cepas de los aislados clínicos (resguardados a -80°C en glicerol al 15%) y las cepas de los aislados clínicos enviados directamente por el hospital para su comparación.
 - 3) *Extracción de DNA*: Las levaduras se cultivaron en 5 mL de YPD líquido (extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, glucosa 2%) a 30 °C durante 24 h, con agitación continua. La extracción de DNA genómico (DNAg) se realizó mediante el método con fenol y precipitación con etanol descrito por Ausubel, modificado (Ausubel, 2009) y acoplado a Fast Prep (FP) para la lisis de las células. El DNAg se disolvió en un volumen final de 250 µL de TE (Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM, pH 8).
 - 4) *Diagnóstico por PCR con oligonucleótidos especie-específicos*: Se realizó una PCR por cada juego de oligonucleótidos especie-específicos (*C. albicans*: Ca2, *C. glabrata*: Cg2, *C. tropicalis*: Ct3 y *C. parapsilosis*: Cp1), que amplifican regiones únicas en el genoma de cada una de las cuatro principales especies causantes de candidemia diseñados en el laboratorio de Microbiología Molecular, IPICYT (Tesis de Maestría Cesia Hernández-Howell, 2014). Se utilizaron 2 µL de DNAg para cada reacción. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa del 2%.
 - 5) *Amplificación de la región ITS de aislados clínicos*: Se amplificó la región ITS del rDNA con los oligonucleótidos universales ITS1/ITS4 únicamente a los aislados clínicos AN730 y 731 para corroborar la identificación.
- B. *Análisis de PCR de aislados clínicos secuenciales de C. glabrata con tres juegos de oligonucleótidos específicos (Cg1, Cg2 y Cg3) para la amplificación de la región del NE en EPA 1, EPA 6 y EPA 7*
- 1) *Cepas de referencia*: *C. glabrata* (BG14).
 - 2) *Aislados clínicos*: Se utilizaron 30 aislados clínicos positivos para *C. glabrata* procedentes de 8 pacientes diagnosticados anteriormente con los juegos de oligonucleótidos especie-específicos. Estos aislados son provenientes del INCMNSZ e INCAN, durante el periodo de febrero de 2005 a mayo de 2018. Se utilizaron las cepas de los aislados clínicos que se encontraban resguardados a -80°C en glicerol al 15%.
 - 3) *Extracción de DNA*: Se empleó el método de extracción de DNA mencionado en la sección A.
 - 4) *Diagnóstico por PCR con oligonucleótidos especie-específicos*: Se realizó una PCR por cada juego de oligonucleótidos especie-específicos para *Candida glabrata* (Cg1, Cg2 y Cg3) que amplifican para la región del NE en los genes EPA1, EPA6 y EPA7,

diseñados en el laboratorio de Microbiología Molecular, IPICYT (Tesis de Maestría Cesia Hernández-Howell, 2014). Se emplearon aislados clínicos de fechas secuenciales y se utilizaron 2 µL de DNAg para cada reacción. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 2%.

IV. RESULTADOS

A. Detección molecular de cuatro especies comunes de *Candida*

Tabla 1. Identificación molecular realizada en el IPICYT vs Vitek-2® realizado en los hospitales

Aislado	Hospital	No. paciente	Fecha	Vitek-2®(Hospital)	PCR (aislados en glicerol)	PCR (aislados procedentes de hospitales)
AN716	INCMNSZ	288249	08/07/2017	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
AN721	INCAN	77462190	10/10/2017	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
AN730	INCAN	77462693	11/27/2017	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
AN731	INCMNSZ	292402	11/28/2017	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
AN743	INCMNSZ	293441	2/17/2018	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
AN744	INCMNSZ	274423	2/18/2018	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
AN753	INCAN	77464068	4/16/2018	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
AN759	INCMNSZ	294172	05/07/2018	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>

Dado que los resultados obtenidos por Vitek-2 discreparon de aquellos obtenidos por PCR mediante los juegos de oligonucleotidos específicos para los aislados AN730 y AN731 (resaltados en amarillo), se llevó a cabo una PCR donde se amplificó la región ITS para corroborar el resultado (Figura 2).

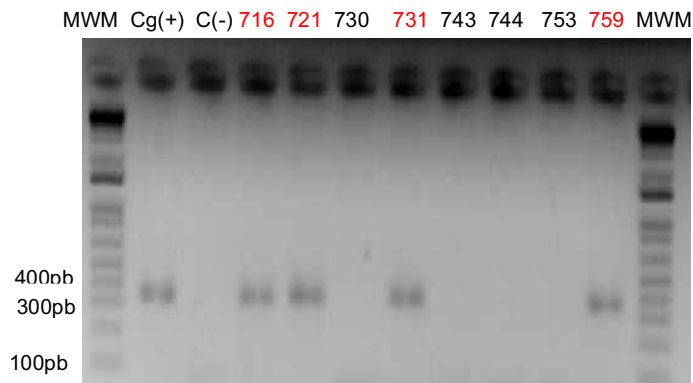


Fig 1. Ejemplo de 4 de 8 aislados clínicos que fueron identificados para *C. glabrata* con el set de primers Cg2. Tamaño de productos esperados de 327,348 y 364 pb para *C. glabrata* [Cg (+)].

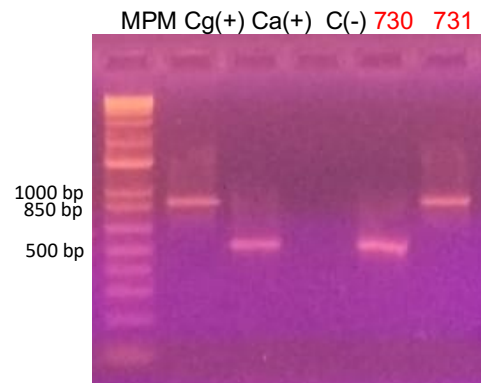


Fig 2. Amplificación de la región ITS con los primers ITS1/ITS4. Tamaño de productos esperados para *C. glabrata* de 850 pb [Cg (+)] y de 500 pb para *C. albicans* [Ca (+)].

B. Análisis de PCR de aislados clínicos secuenciales de *C. glabrata* con tres juegos de oligonucleótidos específicos (Cg1, Cg2 y Cg3) para la amplificación de la región del NE en EPA 1, EPA 6 y EPA 7

Tabla 2. Amplificación de la región del NE en los genes *EPA1*, *EPA6* y *EPA7* en aislados clínicos de *C. glabrata*.

Paciente	No. Aislado	Fecha	Cg1/Cg2	Cg3	
			NE (<i>EPA 1</i>)	NE (<i>EPA6</i>)	NE (<i>EPA7</i>)
1	MC45	Feb/07/2005	+	+	-
	MC47	Feb/15/2005	+	+	-
2	MC64	Abr/22/2008	+	+	-
	MC65	Abr/23/2008	+	+	-
3	MC67	Abr/27/2008	+	+	+
	MC70	Abr/26/2008	+	+	+
6	AN221	Nov/02/2013	+	+	+
	AN222	Nov/02/2013	+	+	+
	AN223	Nov/02/2013	+	+	+
	AN224	Nov/03/2013	+	+	+
9	AN507	Feb/17/2016	+	+	-
	AN508	Feb/17/2016	+	+	-
	AN509	Feb/17/2016	+	+	-
	AN510	Feb/17/2016	+	+	-
	AN483	Feb/20/2016	+	+	-
	AN505	Feb/20/2016	+	+	-
	AN506	Feb/20/2016	+	+	-
	AN504	Feb/26/2016	+	+	-
2	AN486	May/19/2016	+	+	-
	AN517	May/19/2016	+	+	-
10	AN511	Jun/01/2016	+	+	+
	AB541	Jun/01/2016	+	+	+
	AN551	Jun/01/2016	+	+	+
	AN512	Jun/03/2016	+	+	+
	AN542	Jun/03/2016	+	+	+
12	AN755	May/04/2018	+	+	-
	AN756	May/04/2018	+	+	-
	AN757	May/04/2018	+	+	-
	AN758	May/04/2018	+	+	-
	AN759	May/07/2018	+	+	-

V. ANALISIS DE RESULTADOS

Los juegos de oligonucleótidos diseñados en el Laboratorio de Microbiología Molecular en el IPICYT probaron ser altamente sensibles y específicos debido a que no dieron falsos

positivos ni falsos negativos. Además, se probó que tanto las cepas resguardadas en glicerol como aquellas enviadas directamente por el hospital no se encuentran contaminadas. En cuanto a los aislados AN730 y AN731 donde el hospital reportó diferentes especies, la discrepancia puede deberse a un error al momento del cultivo por parte del hospital o por una fuente externa que altere el perfil obtenido por Vitek-2, debido a que el ensayo se basa en la asimilación de nutrientes. Los oligonucleótidos omiten este tipo de contaminaciones ya que solo amplifican la secuencia específica de la especie para la que fueron diseñados (Tesis de Maestría José Oscar Arturo Hernández-Carreón, 2018). Se decidió amplificar la región ITS con los cebadores ITS1/ITS4 para finalizar la diferenciación de las especies de los aislados AN730 y AN731. La longitud de la región ITS depende de la especie y se localiza entre los genes de ARNr 18s y 26s. Se trata de secuencias que se han utilizado como marcadores moleculares para la identificación de géneros y especies de hongos (Ramírez y de la Torre, 2008). El problema con esta estrategia es que las diferentes especies generan bandas de tamaños similares, lo que dificulta su identificación, sin embargo, puede emplearse para diferenciar *C. albicans* de *C. glabrata*, puesto que se obtiene un amplicón de aproximadamente 500 pb y 850 pb respectivamente. En cuanto al análisis de PCR con los juegos de oligonucleótidos Cg1, Cg2 y Cg3 para aislados clínicos de *C. glabrata*, todos amplificaron para la región del elemento negativo en los genes *EPA1* y *EPA6*, y solo 11 aislados amplificaron para esta región cercana al gen *EPA7*; esto se debe a que posiblemente no todas las cepas poseen el NE asociado al gen *EPA7* o bien no contienen ni el gen ni el NE, mientras que aquellas que amplificaron con los tres juegos de oligonucleótidos son presumiblemente no-adherentes. Estudios documentan que la mayoría de los genes de la familia *EPA* se encuentran silenciados a excepción de *EPA1*, y que debido a mutaciones en proteínas que participan en la maquinaria del silenciamiento sub-telomérico, las células se tornan hiper-adherentes debido a que se expresan varios genes *EPA* (Castaño et al., 2006). Los aislados provenientes de los mismos pacientes tienen el mismo resultado respecto a la presencia o ausencia del NE asociado a *EPA1*, *EPA6* y *EPA7* independientemente de la fecha en la que se aisló.

VI. CONCLUSIÓN

Corregimos la identificación de dos de los aislados clínicos llevada a cabo por los hospitales con Vitek-2 mediante el uso de oligonucleótidos especie-específicos diseñados en el IPICYT, cuya sensibilidad y especificidad es de 100% al observar los resultados obtenidos en este trabajo y en los estudios previos del laboratorio. La amplificación de la región del NE de *EPA1*, *EPA6* y *EPA7* empleando aislados clínicos positivos para *C. glabrata* servirán para sustentar futuros estudios de caracterización, esto con el fin de encontrar una relación entre aquellas cepas que amplificaron con los tres juegos de oligonucleótidos, la adherencia, la formación de biofilms, la susceptibilidad al fluconazol y otros factores de virulencia.

VII. AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, a la Dra. Irene Castaño por brindarme su dirección en este proyecto y darme la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Microbiología Molecular, y a la Lic. en QFB Selene Herrera por su apoyo técnico, comentarios y aportaciones.

REFERENCIAS

- [1] Camacho-Cardoso, JL., Martínez-Rivera, MÁ., Manzano-Gayosso, P., Méndez-Tovar, LJ., López-Martínez, R., & Hernández-Hernández, F. (2017). Detección molecular de especies de *Candida* en especímenes de pacientes hospitalizados. *Gaceta Médica de México*, 153(5), pp.581-589.
- [2] Reyes-Montes, MDR., Duarte-Escalante, E., Martínez-Herrera, E., Acosta-Altamirano, G., & Frías-De León, MG. (2017). Current status of the etiology of candidiasis in México. *Revista Iberoamericana de Micología*, 34(4), pp.203-2010.
- [3] López-Fuentes, E., Gutiérrez-Escobedo, G., Timmermans, B., Van Dijck, P., De Las Peñas, A., & Castaño, I. (2018). *Candida glabrata*'s Genome Plasticity Confers a Unique Pattern of Expressed Cell Wall Proteins. *Journal of Fungi*, 4(2), pp.1-15.
- [4] Ausubel., F (2009). *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley.
- [5] Hernandez-Howell, C (2014). *Detección molecular específica y oportuna de tres especies de Candida comunes en infecciones humanas: C. albicans, C. tropicalis y C. parapsilosis*. Tesis de Maestría, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, S.L.P.
- [6] Hernández-Carreón, J (2018). *Detección molecular de cuatro especies comunes de Candida a partir de hemocultivos*. Tesis de Maestría, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, S.L.P.
- [7] Ramirez, J., & de la Torre, A . (2008). *Evaluación de los cebadores ITS3 e ITS4 para la detección de infecciones por Candida spp. en muestras de flujo vaginal y humor acuoso*. Agosto 05, 2019, de Grupo de Estudio en Parasitología y Micología Molecular Sitio web: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922008000200004
- [8] Castaño, I., Cormack, B., & De Las Peñas, A. (2006). Virulencia del hongo patógeno oportunista *Candida glabrata*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), pp. 66-69.

Identificación y caracterización de genes involucrados en la respuesta al estrés por frío para generar plantas tolerantes al cambio climático (A)

Diana Pérez Alegría

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Cerro de las Campanas s/n
C.P. 76010, Santiago de Querétaro, Qro.
diana.dtb4e@gmail.com

Asesor:

Juan Francisco Jiménez Bremont
Instituto Potosino de Investigación Científica
y Tecnológica
Camino a la Presa de San José No. 2055
C.P. 78216, San Luis Potosí, S.L.P.
jbremont@ipicyt.edu.mx

Resumen — Las poliaminas están involucradas en el crecimiento, desarrollo y respuesta al estrés en plantas. En *Arabidopsis*, el primer paso de la biosíntesis de poliaminas es catalizado por la arginina descarboxilasa, enzima limitante con dos isoformas codificadas por los genes parálogos *AtADC1* y *AtADC2*. Para el estudio del efecto de las poliaminas ante el estrés generado por bajas temperaturas se utilizó una línea silenciante simultánea de los genes *AtADC* (*amiR:ADC-L2*), la cual fue expuesta durante su germinación a 4, 10 y 22 ± 2°C. Nuestros datos muestran una modificación en la coloración y tamaño de cotiledones, así como en el desarrollo de la raíz primaria, denotando la participación de las poliaminas en la tolerancia ante este tipo de estrés.

Palabras clave — *Poliaminas, amiR:ADC-L2, estrés por frío, aclimatación, tolerancia*

Abstract — Polyamines are involved in the growth, development and response to stress in plants. In *Arabidopsis thaliana*, the first step of polyamine biosynthesis is catalyzed by arginine decarboxylase, a limiting enzyme with two isoforms encoded by the paralogs *AtADC1* and *AtADC2* genes. For the study of the effect of polyamines on stress generated by low temperatures, a line with simultaneous non-lethal silencing was used for both genes (*amiR:ADC-L2*), exposed during germination at 4, 10 and 22 ± 2 ° C. Where there was a change in the color and size of cotyledons, as well as morphological defects in the development of the primary root, denoting the participation of polyamines in tolerance to this type of stress.

Keywords — Polyamines, *amiR:ADC-L2*, cold stress, acclimatization, tolerance

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas al ser organismos sésiles, están expuestas a condiciones adversas generadas por diferentes factores físicos, químicos y biológicos que limitan su crecimiento y que les provocan diversos tipos de estrés. En este sentido, estas condiciones desfavorables pueden alterar o incluso interrumpir la homeostasis metabólica de la planta, bloqueando crecimiento, desarrollo, y si el estrés persiste, inducir de la muerte [1]. En general, estos factores adversos pueden ser clasificados como estrés biótico y abiótico. El estrés biótico es causado por la acción de otros seres vivos: animales, microorganismos y otros agentes fitopatógenos como los virus y viroides [2]. En el caso del estrés abiótico, este es causado por factores físicos y químicos ambientales, como la sequía, la salinidad, las temperaturas extremas, el estrés oxidativo, entre otros. Particularmente, el estrés generado por bajas temperaturas, es conocido por ser la principal causa de pérdida de cultivos en el mundo, al reducir el rendimiento promedio de los principales cultivos por más del 50% a partir de una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares que

afectan el crecimiento, desarrollo y la productividad de las plantas [3]. Sin embargo, a lo largo de su evolución, las plantas han desarrollado diferentes estrategias a nivel molecular para generar tolerancia al estrés abiótico, entre las cuales se encuentran: la activación de factores de señalización, la modulación de la expresión génica, la síntesis de proteínas de estrés, el ajuste del balance hormonal y la acumulación de poliaminas (PAs). Particularmente, las PAs participan en la aclimatación y sobrevivencia de las plantas ante este tipo de estrés [5]. Estas poliaminas están implicadas en múltiples procesos biológicos fundamentales, tales como, el empaquetamiento de ácidos nucleicos, la modulación de receptores de membrana y canales iónicos, la regulación de la expresión génica, la traducción y la señalización celular, razón por la que resultan esenciales para el funcionamiento de los organismos vivos [5]. En las plantas, están involucradas en la embriogénesis, organogénesis, diferenciación, promoción de crecimiento, formación de polen, desarrollo del fruto y retraso de la senescencia [6]. Adicionalmente, el incremento de PAs libres y conjugadas, así como su catabolismo, están asociados a la tolerancia a diversos tipos de estrés como la salinidad, temperaturas extremas, sequía, ozono y radiación UV, entre otros [7]. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales actúan, así como interactores aún no han sido completamente descritos. Por tal motivo, se utilizó la línea silenciante de los genes *ADC* (*amiR:ADC-L2*) [4] con bajos niveles de PAs para analizar su respuesta a una condición estresante que principalmente afecta el crecimiento y desarrollo de las plantas, el estrés por frío.

II. MARCO TEÓRICO

Las PAs más abundantes son la diamina putrescina (Put), la triamina espermidina (Spd), las tetraminas espermina (Spm) y termoespermina (tSpm). Las plantas pueden sintetizar PAs mediante dos vías. La primera deriva directamente de la ornitina mediante la enzima ornitina descarboxilasa (ODC) para producir Put. La segunda es una vía indirecta, la cual genera Put a partir de la arginina en varios pasos sucesivos catalizados por las enzimas arginina descarboxilasa (ADC), agmatina iminohidrolasa (AIH) y N-carbamoil putrescina aminohidrolasa (NCPAH). La síntesis de las PAs superiores espermidina (Spd), espermina (Spm) y termoespermina (tSpm) se lleva a cabo mediante la adición secuencial de grupos aminopropilo a una molécula amino-aceptora (Put o Spd); esta reacción es catalizada por las aminopropil transferasas espermidina sintasa (SPDS), espermina sintasa (SPMS) o termoespermina sintasa (tSPMS), respectivamente. Los grupos aminopropilo son derivados de la metionina, la cual es convertida a S-adenosil metionina y después es descarboxilada por la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC) [4]. En *A. thaliana* la biosíntesis de Put se realiza a través de la descarboxilación de la arginina [8]. En este sentido, *Arabidopsis* cuenta con dos copias de los genes *ADC* (*ADC1* y *ADC2*), una sola copia de los genes *AIH*, *NCPAH*, dos genes *SPDS* (*SPDS1* y *SPDS2*), un gen *SPMS* y *tSPMS*, y cuatro genes *SAMDC* (*SAMDC1-4*) [4].

En *A. thaliana* las semillas de la doble mutante homocigota para los genes paralogos *ADC1* y *ADC2* son abortivas. Por otro lado, la línea mutante *adc2* muestra una disminución del 75% del contenido de Put y es más sensible a estrés salino comparada con la línea parental; incluso también a la línea mutantes *adc1* [9]. En estudios realizados por diversos grupos, se han obtenido resultados que corroboran la importancia de la biosíntesis de las

PAs, como una ruta esencial para el desarrollo de la planta, donde efectos antagónicos se caracterizaron mediante el uso de inhibidores específicos de su biosíntesis [3]. Recientemente se han generado plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresan constitutivamente un microRNA artificial (amiR:ADC-L2) con el objetivo de silenciar la expresión ambos genes *ADC* a fin de estudiar el efecto de la disminución de PAs sobre procesos de desarrollo y respuesta a estrés en planta [4].

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A.- Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Wassilewskija (Ws) y de la línea amiR:ADC-L2 [2]. La superficie de las semillas se esterilizó con una solución de hipoclorito de sodio al 20% (v/v) durante 7 minutos, seguido de cuatro enjuagues con agua destilada estéril. Posteriormente, las semillas se vernalizaron a 4 °C, durante 48 h en oscuridad. Posteriormente, las semillas fueron sembradas y crecidas en placas petri con medio de Murashige y Skoog (MS) 0.2X que contenían 0.5% (p/v) de sacarosa y 0.8% (p/v) de fitagel.

B.- Ensayo de germinación

El ensayo fue llevado a cabo usando 20 semillas de cada una de las líneas por cada tratamiento por triplicado. Todas las semillas utilizadas en este estudio fueron obtenidas de plantas maduras crecidas al mismo tiempo bajo las mismas condiciones de desarrollo. Las semillas fueron germinadas y crecidas en cajas de Petri de forma vertical en cámaras de crecimiento con un fotoperíodo de 16 h de luz ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 8 h de oscuridad a 4, 10 y 22°C \pm 2. El nivel de germinación fue monitoreado cada 24 h por un periodo de 9 días. Cada semilla fue considerada como germinada un vez que la radícula emergió rompiendo la testa. El registro fotográfico, así como, el conteo de cotiledones verdes se efectuó a los 20 días post-germinación.

C.- Análisis estadístico

Se realizó un análisis de prueba *t* de Student para evaluar la significancia estadística. Se utilizó la versión 5.0b de GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, California, EE. UU.). Los datos representan la media \pm SE. Las diferencias en $P < 0.05$ fueron consideradas significativas.

IV. RESULTADOS

La línea amiR: ADC-L2 presentó un fenotipo de sensibilidad ante las bajas temperaturas aplicadas durante su germinación (10 y 4 °C), en donde es notable la reducción del largo de la raíz y del número de cotiledones (Fig 1.A), en comparación con la línea parental Ws. Respecto a los cotiledones verdes, en la Figura 1 se puede observar que la línea silenciante amiR: ADC-L2 presentó una menor cantidad de cotiledones bajo estrés por frío. Además se observó la producción de pigmentos morados a lo largo de la plántula de la línea silenciante al someterse en condiciones de frío, lo cual resulta interesante al compararse con respecto a la tasa de germinación, ya que a partir del día 4 se observa una tendencia creciente de germinación por parte de la línea amiR: ADC-L2 superior a la línea parental, principalmente a 10°C (Fig 1.B).

(Ws) a partir del 4 día de germinación a cada temperatura (Fig 1. B). Lo cual, sugiere una mayor acumulación de giberelinas, un regulador de crecimiento que induce la germinación de las semillas. Sin embargo, a los 20 días de edad, las plantulas de la línea silenciante mostraron clorosis y una tonalidad morada oscura, así como una reducción en el tamaño de la raíz primaria y los cotiledones (Fig 1. A y C), principalmente a los 4 °C y en menor proporción a los 10°C. Esto puede asociarse al papel esencial que representan las poliaminas para la aclimatación y supervivencia adecuada al frío, en parte asociada a las alteraciones en los niveles de ácido abscísico (ABA). Una fitohormona con importantes funciones dentro de la fisiología de la planta, quien participa en procesos del desarrollo y crecimiento así como en la respuesta adaptativa a estrés tanto de tipo biótico como abiótico, regulada esencialmente por los niveles de putrescina [7]. Otro fenotipo interesante fue el retraso del crecimiento de la raíz principal y las raíces secundarias en la línea seleccionada respecto a línea parental. En este sentido, se ha reportado que las PAs están estrechamente relacionadas con el crecimiento vegetal, en particular se ha observado incrementos de estas aminos durante el ciclo celular. La aplicación exógena de Spd y Spm a plantas de *Arabidopsis* genera un mayor número de raíces laterales, así como un incremento en la longitud de la raíz principal; esto mediante la regulación de los genes de las ciclinas tipo A y B, las cuales son esenciales para la transición de la fase G1/S y la G2/M, modulando de esta forma los puntos de control del ciclo celular [11]. Por otro lado, estudios con mutantes de las enzimas de la biosíntesis de las PAs han demostrado que están estrechamente ligadas al desarrollo de las plantas [9].

VI. CONCLUSIONES

La línea amiR:*ADC-L2* con silenciamiento simultáneo no letal de los genes *AtADC1* y *AtADC2* nos permitió obtener información respecto a la función de las poliaminas en la respuesta a estrés por frío.

La línea amiR:*ADC-L2* mostró diversos fenotipos cuando creció a bajas temperaturas, por ejemplo mostró una tasa de germinación mayor que la parental; sin embargo presentó una mayor sensibilidad en el crecimiento y desarrollo de las plántulas, denotando la participación de las poliaminas en la tolerancia ante el estrés por frío.

VII. RECONOCIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) y al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) por las facilidades y el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano.

Al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont, la Dr. María Azucena Ortega Amaro y la M.C. Ana Isabel Chávez Martínez del IPICYT por toda su paciencia, enseñanzas, apoyo y colaboración en el laboratorio durante la estancia de verano para el proyecto realizado.

REFERENCIAS

- [1] S. Salas, "Caracterización molecular y funcional de genes que codifican proteínas de choque térmico de plantas bajo condiciones de estrés abiótico," tesis de maestría, Biología Molecular, IPICYT, San Luis Potosí, S.L.P, 2010.

- [2] A. Montoliu, "Respuestas fisiológicas de los cítricos sometidos a condiciones de estrés biótico y abiótico," tesis doctoral, Ciencias Agrarias del Medio Natural, Universitat Jaume I, Valencia, España, 2010.
- [3] E. Bray, J. Bailey-Serres y E. Weretilnyk, "Responses to abiotic stresses. In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants," American Society of Plant Physiologists, vol. 2, pp.1158–1249, 2000.
- [4] A. I. Chávez, "Silenciamiento simultáneo no letal de los genes de arginina descarboxilasa de *Arabidopsis thaliana* mediante un microRNA artificial," tesis M.S, Biología Molecular, IPICYT, San Luis Potosí, S.L.P, 2015.
- [5] C. Guasco, J. L. Chávez, R. A. Ferriz, K. Torre, E. Elton, y T. García, "PAs: pequeños gigantes de la regulación metabólica," REB, vol. 33(2), pp. 51-57, 2014.
- [6] A. Bouchereau, A. Aziz, F. Larher, J. Tanguy, "Polyamines and environmental challenges: recent development," Plant Sci, vol. 140, pp.103-125, 1999.
- [7] K. Urano. Y, Yoshiba. T, Nanjo. T, Ito. K, Yamaguchi-Shinozaki y K. Shinozaki, "Arabidopsis stress-inducible gene for arginine decarboxylase *AtADC2* is required for accumulation of putrescine in salt tolerance," Biochem. Biophys. Res. Commun. vol. 313, pp. 369-375, 2004.
- [8] C. Hanfrey, S. Sommer, M.J. Mayer, D. Burtin y A.J. Michael, "Arabidopsis polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity," Plant J, vol. 27, pp. 551-560, 2001.
- [9] T. Kusano, T. Berberich, C. Tateda y Y. Takahashi, "Polyamines: essential factors for growth and survival," Plant, vol. 228, pp. 367-381, 2008.
- [10] A. Amrani, L. Marie, A. Anouche, J. Nicolas y I. Coué, "Genome-wide distribution and potential regulatory functions of *AtATE*, a novel family of miniature inverted-repeat transposable elements in *Arabidopsis thaliana*," Mol Genet Genomics, vol. 267, pp. 459-471, 2002.
- [11] M. Ortega-Amaro, K. Rodríguez, F. Becerra and J. Bremont, "Modulation of Arabidopsis CYCB1 expression patterns by polyamines and salt stress," Acta Physiol Plant, vol. 34, pp. 461-469, 2012.

Identificación y caracterización de genes involucrados en la respuesta al estrés por frío para generar plantas tolerantes al cambio climático (B)

Luz Jannine de la Peña Hernández

Universidad Autónoma de Aguascalientes
Centro de Ciencias Básicas
Av. Universidad # 940, Ciudad Universitaria
C. P. 20131, Aguascalientes, Ags.
Luzjannine_9808@hotmail.com

Asesor:

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

Instituto Potosino de Investigación Científica
y Tecnológica (IPICYT), División de Biología Molecular
Camino a la Presa de San Jose No. 2055
Lomas 4a Sección Cp 78216 San Luis Potosí, S.L.P.
jbremont@ipicyt.edu.mx

Resumen— El estrés causado por bajas temperaturas provoca daños severos a nivel morfológico y fisiológico en las plantas, afectando la productividad de los cultivos. Actualmente se están estudiando genes que codifican para proteínas implicadas en la resistencia al estrés por frío, incluida la superfamilia de las Proteínas Ricas en Glicina caracterizada por tener regiones con secuencias repetidas de residuos de glicina (motivos Gly_n-X) (Sachetto-Martins *et al.* 2000). Recientemente, el grupo de investigación del Dr. Jimenez-Bremont reportó la caracterización un gen de *Arabidopsis thaliana* *AtGRDP2*, el cual codifica para una proteína con un dominio rico en glicinas y presenta un motivo putativo de unión a RNA (Ortega-Amaro *et al.*, 2015). Con la finalidad de continuar con el estudio de la posible participación del gen *AtGRDP2* en la respuesta al estrés por frío, se utilizaron líneas reporteras DR5 que sobre expresan el gen *AtGRDP2* en *Arabidopsis* (*DR5::AtGRDP2*). Mediante la tinción histoquímica de GUS se evaluó la respuesta de la línea reportera al estrés por frío. Se encontró que la sobreexpresión del gen *AtGRDP2* promueve la expresión del gen reportero GUS probablemente por la acumulación de auxinas.

Palabras clave — DR5, *AtGRDP2*, auxinas, estrés por frío, *Arabidopsis thaliana*.

Abstract — The stress caused by low temperatures causes severe morphological and physiological damage to plants, affecting crop productivity. Currently, genes coding for proteins involved in cold stress resistance are being studied, including the Glycine Rich Protein superfamily characterized by having regions with repeated sequences of glycine residues (Gly_n-X motifs) (Sachetto-Martins *et al.* 2000). Recently, the research group of Dr. Jimenez-Bremont reported the characterization of an *Arabidopsis thaliana* *AtGRDP2* gene, which codes for a protein with a glycine-rich domain and presents a putative motive for RNA binding (Ortega-Amaro *et al.*, 2015). In order to continue with the study of the possible participation of the *AtGRDP2* gene in the response to cold stress, DR5 reporting lines were used that express the *AtGRDP2* gene in *Arabidopsis* (*DR5 :: AtGRDP2*). The response of the reporter line to cold stress was evaluated by histochemical staining of GUS. It was found that overexpression of the *AtGRDP2* gene promotes the expression of the GUS reporter gene probably due to the accumulation of auxins.

Keywords — DR5, *AtGRDP2*, auxin, cold stress, *Arabidopsis thaliana*.

I. INTRODUCCIÓN

El estrés en las plantas se puede definir como “la presencia de un factor externo a la planta provocado por el medio ambiente cambiante, que ejerce una influencia negativa sobre su desarrollo óptimo” [1]. Pero, aunque hay muchos factores que pueden afectar a las plantas en cuestión de estrés, hay algunas unas que logran resistir a ellos, a estas plantas se le

conoce como tolerantes.

Esta tolerancia se refiere a la capacidad de las plantas para evitar los estímulos ambientales negativos o para permanecer bajo un estado particular de estrés sin que su crecimiento se vea modificado de manera significativa [2]. Es por ello que las plantas con el paso del tiempo han desarrollado diferentes mecanismos que les permite tolerar diversos factores de estrés.

Uno de los principales tipos de estrés que sufren las plantas, es el estrés por bajas temperaturas, la temperatura tiene una influencia directa en la tasa de crecimiento de la planta; además, es determinante en procesos como fotosíntesis, respiración, y acumulación de azúcares y almidones. También, está relacionada con la germinación de las semillas, la absorción y utilización de los nutrientes, la transpiración, la floración y en general con todo el metabolismo de la planta [2]. El estrés por bajas temperaturas cada vez se vuelve más frecuente a causa del cambio climático, principalmente es causa del calentamiento global el cual ha ocasionado cambios muy drásticos de temperaturas en diferentes ecosistemas.

También el estrés por bajas temperaturas puede causar dentro de las células de las plantas el rompimiento de proteínas y enzimas, así como la permeabilidad de la membrana (se pierde la semipermeabilidad de la membrana y frecuentemente aparece un verde más intenso y anegamiento ligero en agua) [2].

Los mecanismos bioquímicos y moleculares mediante los cuales las plantas toleran el estrés causado por bajas temperaturas aún no ha sido totalmente esclarecidos; sin embargo, se han descrito algunos de ellos como la activación de cascadas de señalización que causan cambios en la expresión génica y por lo tanto se inducen modificaciones bioquímicas y fisiológicas que ayudan a mantener la homeostasis celular cuando la planta se encuentra bajo estrés, determinada por la tasa de transcripción, misma que depende de varios factores de transcripción y de sus interacciones con secuencias regulatorias en el promotor de los genes blanco [4].

Durante un estrés por bajas temperaturas se han observado cambios en los patrones de expresión génica como respuesta al estrés o bien como un mecanismo de aclimatación [5]. Se ha propuesto que algunos genes participan en la inducción de cambios bioquímicos y fisiológicos que restauran el crecimiento y desarrollo de las plantas a bajas temperaturas. En *Arabidopsis thaliana*, se han identificado genes inducibles por frío, tales como *COR* o *LTI* (low temperature induced), *KIN* (cold inducible), *RD* (responsive to desiccation), *ERD* (early dehydration-inducible) y *LEAs* (late embryogenic abundant) [6]. Además, factores de transcripción como *CBF1*, el cual regula la expresión de genes que contienen en sus promotores motivos CRT/DRE, que han sido asociados a la tolerancia por congelamiento [7].

Se ha reportado que genes que codifican para proteínas ricas en glicina (GRP) que contienen un motivo de unión a RNA son modulados por estrés abiótico, en particular por bajas temperaturas [8] Ortega-Amaro y cols., 2015 reportaron que el gen *AtGRDP2* participa en la tolerancia al estrés salino en plantas de *Arabidopsis* y lechuga. Además, la sobreexpresión del gen *AtGRDP2* promueve el desarrollo de las plantas posiblemente por una vía tipo auxina [3].

Se sabe que los niveles de transcrito del gen *AtGRDP2* responden a tratamientos de estrés por frío (datos no publicados). El grupo de investigación del Dr. Jimenéz-Bremont está interesado en caracterizar la participación del gen *AtGRDP2* en la respuesta al estrés por frío en *Arabidopsis*. En el laboratorio se cuenta con un set de plantas mutantes y sobreexpresantes del gen *AtGRDP2*, así como la línea reportera DR5 que sobreexpresa el gen *AtGRDP2*, la cual fue analizada durante esta estancia de investigación.

II. MARCO TEÓRICO

Arabidopsis thaliana es una planta herbácea de tamaño pequeño empleada como organismo modelo para el estudio de la biología molecular, la fisiología y la genética de plantas. Aunque no posee un alto valor agronómico, esta Brassicaceae presenta ventajas muy importantes para la investigación básica, tales como el tamaño pequeño del genoma organizado en 5 cromosomas (125 Mb), un ciclo de vida rápido (alrededor de 6 semanas desde la germinación hasta la aparición de semillas maduras), fácil producción de semillas, rápido cultivo en condiciones de laboratorio y gran número de líneas mutantes. Además de las ventajas naturales de la planta, la investigación de genómica funcional de *Arabidopsis* se ha visto impulsada por la disponibilidad de la secuencia completa de su genoma [9].

La línea DR5 contiene los elementos de respuesta a la auxina sintética altamente activa (AuxRE), la cual consiste en repeticiones directas en tándem de 11 pb que incluyen el elemento TGTCTC sensible a la acumulación de auxinas en las plantas [6]. Esta línea reportera de *Arabidopsis* es una herramienta importante y ampliamente utilizada para la caracterización de la respuesta tipo auxina mediante una tinción histoquímica de GUS.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Esterilización de semillas

Semillas de *Arabidopsis thaliana Col-0*, DR5 y DR5: *AtGRDP2* se lavaron por 5 minutos con una solución de cloro al 20%, posteriormente se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril. Durante dos días fueron vernalizadas a 4 °C para su posterior siembra en medio de cultivo vegetal (MS 0.2X)

B. Medio de cultivo y experimento de frío

Las semillas que previamente fueron esterilizadas se colocaron en cajas de Petri que contenía un medio Murashige and Skoog (sales de MS) al 0.2x, phytigel (0.5%), sacarosa (0.6%) , el medio fue ajustado a un pH de 7.0. Las semillas se sembraron en dos cajas de Petri diferentes y se colocaron a 22°C por 6 días, al 7 día una caja de Petri se colocó a 22°C y la otra caja se colocó a una temperatura de 4°C por 24h

C. Análisis histoquímico de GUS

Para el análisis histoquímico de GUS las plántulas después de los diferentes tratamientos se incubaron a 37°C por 24h con el buffer de la reacción GUS (5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-glucuronidasa). Posteriormente se realizó un proceso de aclaramiento de las plántulas según lo descrito por Malamy y Benfey (1997). Finalmente, las plántulas fueron analizadas bajo un microscopio Axio Imager M2 Zeiss y las imágenes adquiridas fueron procesadas

mediante el software ZEN.

D. Análisis histoquímico de GUS

Para el análisis histoquímico de GUS las plántulas después de los diferentes tratamientos se incubaron a 37°C por 24h con el buffer de la reacción GUS (5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-glucuronidasa). Posteriormente se realizó un proceso de aclaramiento de las plántulas según lo descrito por Malamy y Benfey (1997). Finalmente, las plántulas fueron analizadas bajo un microscopio Axio Imager M2 Zeiss y las imágenes adquiridas fueron procesadas mediante el software ZEN.

IV. RESULTADOS

Se analizó la expresión del gen reportero GUS en cuatro líneas independientes *DR5::AtGRDP2* en generación T3, así como en la línea DR5. Para la tinción histoquímica de GUS se utilizaron plántulas de ocho días de edad, crecidas a 22 °C en medio MS 0.2X con un ciclo de 16 hrs luz/ 8 hrs oscuridad.

Como se puede observar en la Figura 1, la expresión del gen reportero GUS en la línea DR5 se presenta en las diferentes zonas de las planta de Arabidopsis. De manera interesante al analizar las líneas *DR5::AtGRDP2* se observó que la expresión del reportero aumenta en la cofia (punta de raíz principal) y cotiledones en comparación con la línea control DR5.

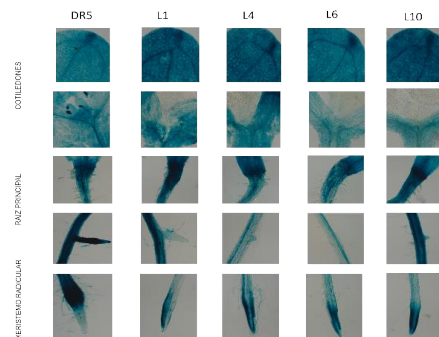


Figura 1. Análisis histoquímico de Gus de las plántulas de 7 días que se dejaron 24h a una temperatura de 22°C observados por un microscopio Axio Imager M2 Zeiss, donde se observan los cotiledones, la raíz principal y el meristemo radicular

Por otro lado, se llevó a cabo un tratamiento de frío a 4 °C durante 24 hrs (Figura 2). Se sabe que las bajas temperaturas afectan negativamente la tasa de crecimiento de las plantas. De acuerdo con lo anterior, al analizar la expresión del reportero GUS en la línea DR5 observamos una disminución importante, traduciéndose a una baja en la actividad auxínica de la planta. Sin embargo, en las plántulas *DR5::AtGRDP2* la expresión de GUS no es afectada en comparación con la línea control DR5 en las diferentes zonas, lo cual nos habla de la posible participación del gen *AtGRDP2* en la tolerancia al estrés por frío mediante una vía tipo auxina.

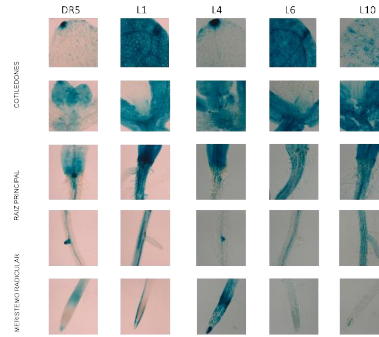


Figura 2. Análisis histoquímica de Gus de las plántulas de 7 días que se dejaron 24h a una temperatura de 4°C observados por un microscopio Axio Imager M2 Zeiss, donde se observan los cotiledones, la raíz principal y el meristemo radicular

Adicionalmente, se analizaron plántulas de 14 días de edad (Figura 3). Como se puede observar la expresión del gen reportero en la línea DR5 es baja en comparación con las plántulas de 7 días de edad (Figura 1). Por otro lado, se observó que en las líneas *DR5::AtGRDP2* se mantiene la expresión de del reportero GUS en la zona de hipocotilo y cotiledones. Por lo anterior, encontramos que la sobreexpresión del gen *AtGRDP2* puede estar implicada en la vía de respuesta a auxinas.

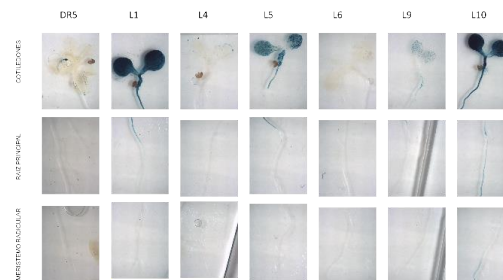


Figura 3. Análisis histoquímica de Gus de las plántulas de 14 días observados por un estereomicroscopio, donde se observan los cotiledones, la raíz principal y el meristemo radicular

V. DISCUSIÓN

Las plantas con el paso del tiempo han desarrollan mecanismos que les ayudan a sobrevivir a diferentes tipos de estrés, como es el caso del estrés por bajas temperaturas, donde se han observado cambios en los patrones de expresión génica como respuesta al estrés o bien como un mecanismo de aclimatación [5].

Uno de esos mecanismos es la producción de proteínas ricas en glicina, de las cuales se ha reportado que genes que codifican para proteínas ricas en glicina (GRP) que contienen un motivo de unión a RNA son modulados por estrés abiótico, en particular por bajas temperaturas [8]. Se a reportado que el gen *AtGRDP2* participa en la tolerancia al estrés salino en plantas de *Arabidopsis* y lechuga. Además, la sobreexpresión del gen promueve el desarrollo de las plantas posiblemente por una vía tipo auxina [3].

Los resultados del análisis del gen reportero GUS en las líneas *DR5::AtGRDP2* mostraron que se promueve la respuesta tipo auxina, acorde a lo reportado por Ortega-Amaro et al. 2015. Se encontró que la expresión de GUS en las líneas *DR5::AtGRDP2* sometidas a estrés

por baja temperatura (4°C) no se afecta en comparación con la línea control DR5. Lo anterior abre la posibilidad de una conexión molecular entre el gen *AtGRDP2* y la respuesta tipo auxina lo cual puede ser evaluado más a fondo mediante la cuantificación de la actividad de GUS y la medición de la expresión de genes relacionados con la vía de auxinas.

VI. CONCLUSIONES

La sobreexpresión del gen *AtGRDP2* en la línea DR5 enciende la respuesta tipo auxina en *Arabidopsis* tanto en condiciones de crecimiento normales como a bajas temperaturas, lo que muestra es que al sobreexpresar esta proteína con un dominio rico en glicinas se induce la acumulación de auxinas. Nuestros siguientes experimentos estarán enfocados en descubrir el porqué esta acumulando auxinas las plantas sobreexpresoras de *AtGRDP2*.

VII. RECONOCIMIENTO

Quiero agradecer al comité organizador del verano regional por darme la oportunidad de poder participar en este programa de verano científico; también a la UAA por proporcionarme un apoyo económico para mi estancia de verano.

Pero en especial quiero agradecer al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont por permitirme ser parte de su laboratorio y apoyarme durante la realización de mi proyecto; así como también a la Dra. María Azucena Ortega Amaro por apoyarme en este proyecto y en toda mi estancia en el Ipcyt. También quiero agradecer a todo el equipo del laboratorio por sus atenciones y conocimientos que aportaron en mí.

REFERENCIAS

- [1] A. Montoliu, *Respuestas fisiológicas de los cítricos sometidos a condiciones de estrés biótico y abiótico*, Tesis doctoral, Departamento de ciencias agrarias y del medio natural, UJIC, España, CS, 2010.
- [2] A. Benavides, *Ecofisiología y bioquímica del estrés en plantas*. Primera edición. México, Coah: UAAAN, 2002.
- [3] Ortega-Amaro. M.A., Rodríguez A.A., Rodríguez-Kessler M., Hernández E., Rosales S., Ibáñez A., Delgado P., Jiménez J.F. "Overexpression of *AtGRDP2*, a novel glycine-rich domain protein, accelerates plant growth and improves stress tolerance". *Frontiers in Plant Science*; vol 5, pp. 782. 2015
- [4] Agarwal P K, Jha B.. "Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signaling". *Biol. Plant*. Vol. 54, pp.201-212. 2010
- [5] Knight M.R., Knight H. "Low-temperature perception leading to gene expression and cold tolerance in higher plants". *New Phytologist*. Vol. 195, pp 737-751. 2012.
- [6] Heidarvand L. and Amiri R. "What happens in plant molecular responses to cold stress?" *Acta Physiologiae Plantarum*. Vol. 32, Num. 3, pp. 419-431. 2010
- [7] Park S., Lee C.M., Doherty, C. J., Gilmour, S. J., Kim, Y., and Thomashow, M. F. "Regulation of the *Arabidopsis* CBF regulon by a complex lowtemperature regulatory network." *Plant J*, Vol 82, pp.193-207. 2015
- [8] Yang, D. H., Kwak, K. J., Kim, M. K., Park, S. J., Yang, K.-Y., and Kang, H. "Expression of *Arabidopsis* glycine-rich RNA-binding protein *AtGRP2* or *AtGRP7* improves grain yield of rice (*Oryza sativa*) under drought stress conditions". *Plant Sci*. Vol. 214, pp. 106–112. 2014
- [9] C. Cuesta y E. Cires. "*Arabidopsis thaliana* como organismo modelo en biología". *Bol. Cien. Nat.*

R.I.D.E.A., n.º 52. pp. 175-178. 2012

- [10] T. Ulmasov., J. Murfett., G. Hagen. y T. Guilfoyle. "Aux/IAA Proteins Repress Expression of Reporter Genes Containing Natural and Highly Active Synthetic Auxin Response Elements". *The Plant Cell*, Vol. 9, pp. 1963-1971. November 1997.

Implementación de sensores de fibra óptica por medio de fuentes de luz de amplio espectro

Adalberto Pérez Guzmán

Universidad de Guanajuato
Carretera Salamanca – Valle de Santiago
km. 3.5 + 1.8 Comunidad de Palo Blanco,
Salamanca, Guanajuato. C.P. 36885, México
a.perezguzman@ugto.mx

Asesor: Julián Moisés Estudillo Ayala

Universidad de Guanajuato
Carretera Salamanca – Valle de Santiago
km. 3.5 + 1.8 Comunidad de Palo Blanco,
Salamanca, Guanajuato. C.P. 36885, México
julian@ugto.mx

Resumen — En el presente trabajo hacemos referencia al estudio de sensado de presión en gases dentro de una celda, para lo cual es necesaria la implementación de un interferómetro Mach Zehnder de fibra óptica, el cual ha sido fabricado con dos diferentes tipos de fibra, utilizando como fuente de amplio espectro la emisión espontánea de una fibra dopada con iterbio bombeada con un diodo láser de 980nm. Este sensor puede ser aplicado con diferentes gases, para lo que en las pruebas que se realizaron fue utilizado aire, arrojando excelentes resultados cambiando significativamente las franjas de interferencia que nos arroja el interferómetro conforme incrementa la presión, con un rango de medición de 5 psi a 40 psi, además de presentar una buena estabilidad en su longitud de onda.

Palabras clave — Interferómetro Mach Zehnder, fibra óptica, Sensor de fibra

Abstract — In the present work we make reference to the study of pressure sensing in gases inside a cell, for which it is necessary the implementation of a Mach Zehnder interferometer of optical fiber, which has been manufactured with two different types of fiber, using as a broad spectrum source the spontaneous emission of a fiber doped with ytterbium pumped with a 980nm laser diode. This sensor can be applied with different gases, for which in the tests that were made air was used, giving excellent results significantly changing the fringes of interference that the interferometer gives us as the pressure increases, with a measurement range of 5 psi to 40 psi, in addition to presenting a good stability in its wavelength.

Keywords — Interferometer Mach Zehnder, fiber optics, fiber sensor

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente la manipulación de gas ha sido un tema de mayor importancia dentro de la industria y la investigación debido al alto riesgo que presenta, por ejemplo: una explosión o incendio; existen diversos tipos de sensores electrónicos o mecánicos para la medición de la presión en una determinada área, ya sea una tubería o un cuarto. Pero estos sensores tienen algunas desventajas como tener algún cortocircuito en los sensores electrónicos o que su precisión no es la adecuada en el caso de los sensores mecánicos.

Otra de las desventajas es que en muchos de esos sensores es que para su lectura tiene que ser presencial, en cambio en este trabajo se busca realizar un sensor implementando un modelo óptico con fibra óptica, este nos da ciertas ventajas respecto a los convencionales, como una mayor precisión, además de ser capaz de realizar el sensado de una manera remota. Con la utilización de un interferómetro Mach Zehnder de núcleo delgado que nos dará unos patrones de interferencia con la fuente de bombeo por lo que con la interacción con la presión nos arrojará algunos cambios en la visualización de estos patrones.

II. MARCO TEÓRICO

La fibra óptica como medio de transmisión en redes de datos es muy eficaz; está constituida de un hilo muy fino de material transparente, vidrio o materiales plásticos, por el que se envían señales ópticas que representan los datos a transmitir. El haz de luz queda completamente confinado y se propaga a través del núcleo de la fibra con un ángulo de reflexión por encima del ángulo límite de reflexión total, en función de la ley de Snell, a esto se le conoce como reflexión total interna. La fuente de luz puede ser láser o un LED.

Además de su utilización en el área de comunicaciones, en los últimos años se ha incrementado el estudio del sensado y detección con fibra óptica, teniendo buenos resultados siendo comparados con los sensores convencionales, por lo que su implementación y desarrollo va en crecimiento, abarcando una gran variedad de aplicaciones.

Los sensores de fibra óptica usualmente se clasifican en dos grandes clases: extrínsecos e intrínsecos. En nuestro caso el sensor utilizado es un intrínseco, también llamados “de modulación interna”, utilizan la fibra óptica como guía de onda hasta el lugar donde la magnitud de interés se quiere medir ahí la perturbación externa actúa directamente sobre la fibra; por lo tanto, el haz luz permanece dentro de la fibra en todo momento.

Unos de los conceptos clave para este sensor es la interferencia y nos hace referencia a la interacción en una región entre dos o más ondas que se propagan en el espacio, y a través de cada punto la onda resultante es la suma de dichas ondas, cuando esto ocurre la onda total está gobernada por el principio de superposición, principio que se establece si dos o más ondas se traslapan, el desplazamiento resultante en cualquier punto y en cualquier instante se encuentran sumando los desplazamientos instantáneos.

Se debe tener en cuenta que existen dos tipos de interferencia, la que ocurre cuando las ondas de dos o más fuentes llegan a fase a un punto, la amplitud de la onda resultante es la suma de las amplitudes de las ondas de cada fuente, mientras que en el caso contrario cuando ocurre una cancelación de las ondas de cada fuente se le conoce como interferencia destructiva [1].

Uno de los arreglos con mayor sensibilidad para un sensor de fibra óptica es el interferómetro Mach Zehnder [2]. Y será el implementado como nuestro elemento transductor para la medición de la presión, haciendo una comparación de sus franjas de interferencia.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El arreglo óptico base de este proyecto está dado por los siguientes componentes:

- Diodo láser a 1μ .
- Fibra óptica.
- WDM.
- Controlador de Polarización.

- Aislador.
- Interferómetro
- Celda de gas.
- Analizador de espectros (OSA).

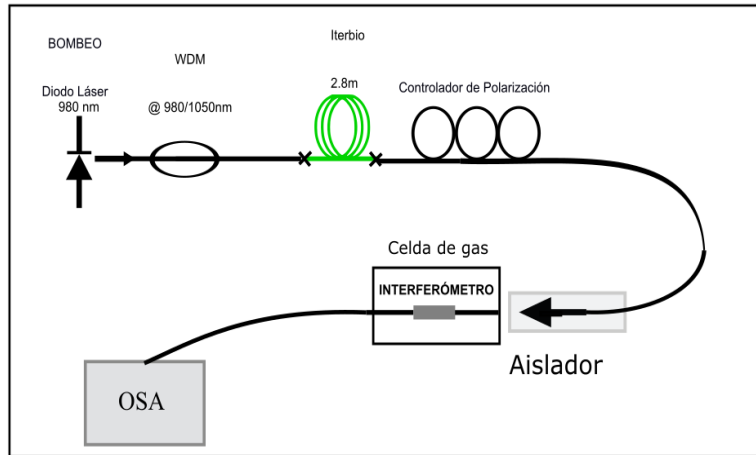


Figura 1: Arreglo óptico del sensor.

Una de las partes principales es la conformación del interferómetro, este es un interferómetro Mach Zehnder de núcleo delgado (Thin core), el cuál está conformado por la unión de fibra óptica 1060-XP y 405-HP, así que se realizaron dos empalmes de fibra, dejando en la parte de en medio un trozo de 8.5 cm de la fibra 405-HP.

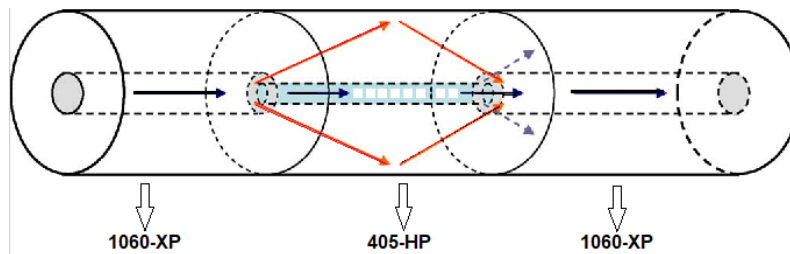


Figura 2: Interferómetro Mach Zehnder.

El interferómetro se introdujo en la celda de gas en la que se estuvo aplicando presión de 0 a 45 psi para lograr obtener un cambio en los patrones de interferencia que nos arrojaría el interferómetro junto con la fuente de emisión; los cuales observaremos desde el analizador de espectros ópticos (OSA).

IV. RESULTADOS

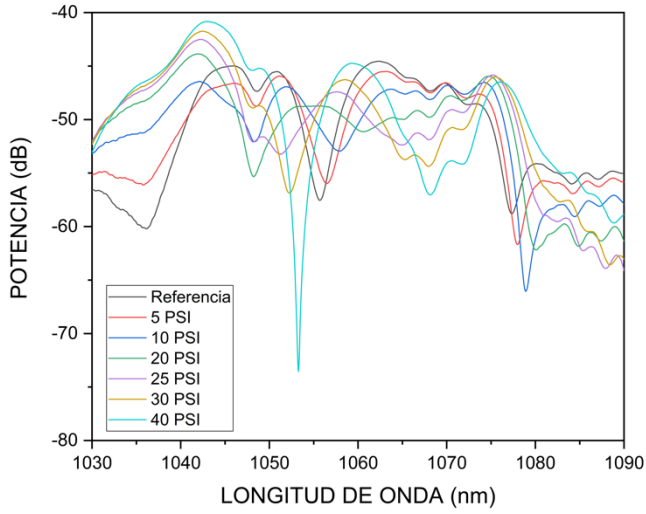


Figura 3: Patrones de interferencia a diferentes presiones.

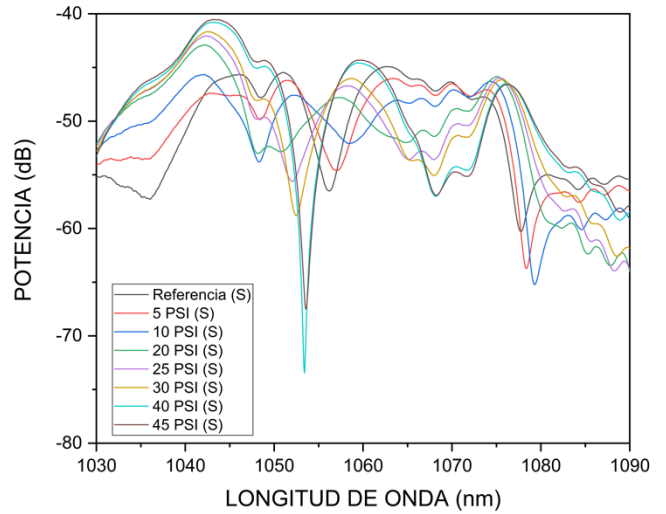


Figura 4: Patrones de interferencia a diferentes presiones de subida.

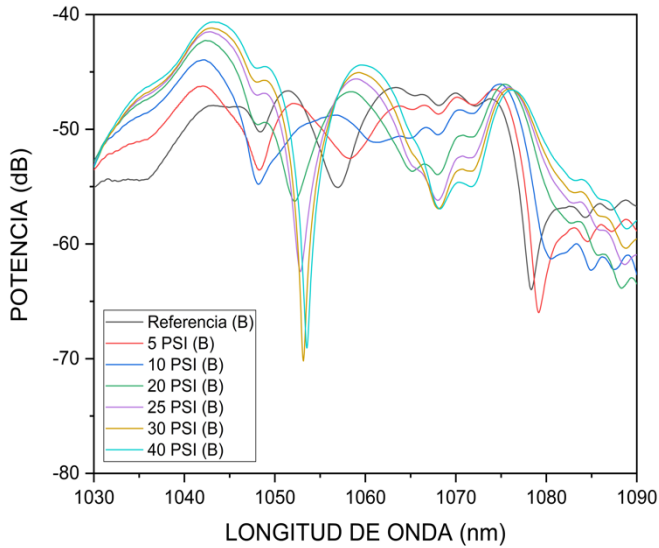


Figura 5: Patrones de interferencia a diferentes presiones de bajada.

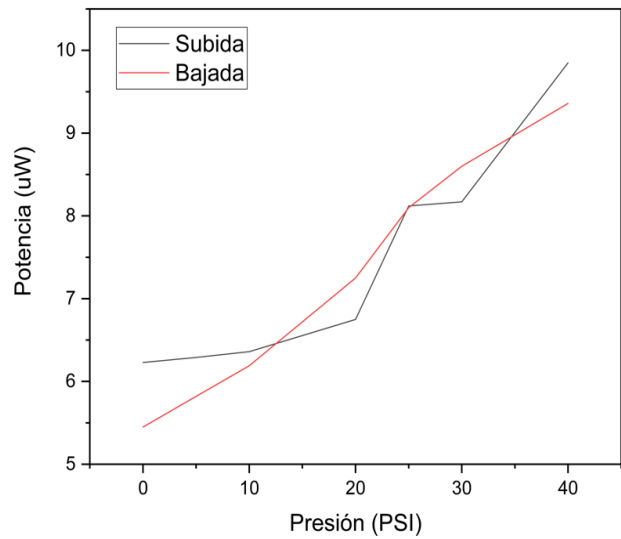


Figura 6: Histéresis de Potencia.

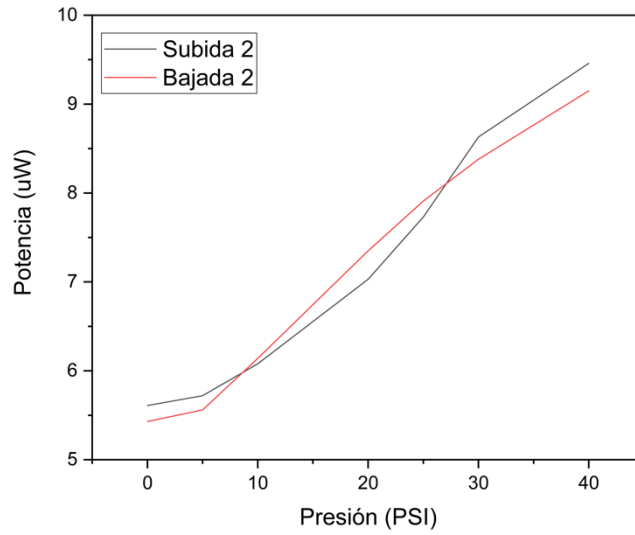


Figura 7: Histéresis de Potencia

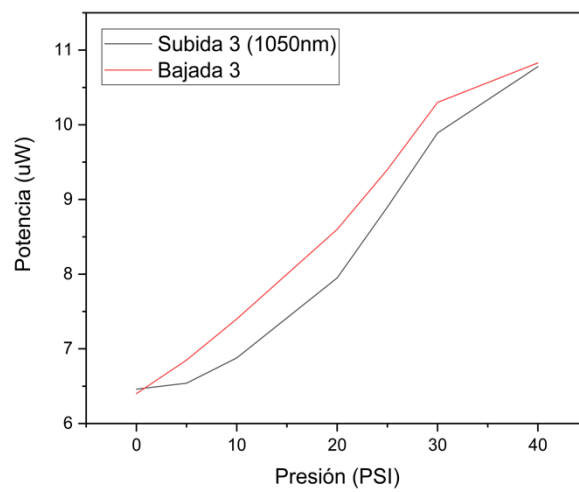


Figura 8: Histéresis de Potencia (3).

V. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Como se puede apreciar en las figuras 3 y 4, existe un cambio en los patrones de interferencia dentro del interferómetro causado por la presión dentro de la celda de gas que va desde los 5 psi hasta las 40 psi, esta parte se cataloga como la parte del sensor ya que la longitud de onda de cada franja es única en cada medición, por lo tanto, cuando el sensor está en funcionamiento y logremos ver una de estas franjas en nuestro sistema de monitoreo podremos conocer la presión que está la celda.

Observamos como las franjas se desplazan debido a la presión que se da en el interferómetro hace que este cambia su estructura y nos hace ver un corrimiento en la longitud de onda del espectro.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se logró medir la presión del gas exitosamente por medio de un sensor de fibra óptica, teniendo muy buenos resultados, saliendo como ideas de mejoramiento la realización de un sensor láser de fibra para obtener mayores potencias a la salida y buscar implementar un láser switchable.

VII. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Expreso mi sincero agradecimiento a la Universidad de Guanajuato, a los laboratorios de Fotonica y Fibras ópticas y al proyecto DAIP numero 114/2019 y a la Región Centro por hacer posible la realización de esta estancia de verano.

REFERENCIAS

- [1] J. Homola, S. Yee, G. Gauglitz, "Surface plasmon resonance sensors: review", *Sensors and Actuators B* 54(1-2), 3-15 (1999).
- [2] K. Thyagarajan, and Ajoy Ghatak. "Fiber optic essentials", John Wiley & Sons, Inc., 229 (2007).

Monitoreo de calidad del agua en algunos manantiales de Querétaro

Jesús Palafox García

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Carr. Irapuato-Silao km12.5 Noria Alta s/n
Irapuato, Guanajuato, Mexico
Jose-143@live.com.mx

Asesor: Raúl Francisco Pineda López

Universidad Autónoma de Querétaro
Centro Académico Multidisciplinario
Campus UAQ-Aeropuerto
Carretera a Chichimequillas
rufuspinedal@gmail.com

Resumen — Los manantiales son de suma importancia ya que se han aprovechado desde la antigüedad para abastecimiento de poblaciones. Para la conservación de los manantiales, es necesario realizar análisis que indiquen un estatus del manantial. Para ello en el presente trabajo se realiza una comparación entre un análisis realizado en el año 2002 y el presente, usando la determinación de la calidad del agua en manantiales de zonas áridas y templadas del estado de Querétaro. Los resultados muestran que la mayoría de los manantiales han incrementado su dureza y temperatura en estos 17 años y su calidad de agua como hábitat se ha deteriorado.

Palabras clave — Manantiales, monitoreo, conservación, calidad del agua.

Abstract — Springs are of the utmost importance since they have been used since ancient times to supply water to human populations. To achieve spring conservation, it is necessary to perform analyzes that indicate their conservation status. In this paper a temporal comparison was made using an analysis carried out in 2002 and the present. This analysis included water quality in 12 springs of arid and temperate zones of Queretaro state. Our results show that most of the springs have increased their water hardness and temperature in the period of analysis and their water quality in this habitat is deteriorated.

Keywords — Springs, monitoring, conservation, water quality.

I. INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso imprescindible para la vida, por lo tanto, es necesario mantener su calidad. En muchas localidades rurales es habitual que, junto a ellas, existan manantiales o nacimientos de agua que son emergencias de aguas subterráneas. La gestión de estos ecosistemas es compleja por los distintos usos que se hacen del agua emergente, por ello es importante conocer su calidad fisicoquímica. Aunque la calidad va asociada, en parte, al tipo de acuífero y las características de éste, los usos cercanos del suelo pueden modificar sus propiedades originadas [1].

La evaluación de la calidad del agua de los manantiales analizados en el estado de Querétaro es de suma importancia porque tradicionalmente la población asocia el agua de manantial con un recurso de buena calidad, pero conforme la población crece es posible que la calidad del agua se vea afectada debido a la presencia de Factores de Riesgos Contaminantes (FRC) que influyen los parámetros fisicoquímicos.

Hace 17 años se realizó una valoración rápida de 28 manantiales pertenecientes a la zona árida y templada de Querétaro, en los cuales se determinaron los problemas relativos a su uso y/o desuso, se analizaron los macroinvertebrados como bioindicadores de calidad del agua y con ello se propuso una metodología para la determinación de su estado de conservación [2].

En este trabajo se realizara una evaluación de la calidad del agua de 12 de los 28 manantiales analizados por Morales (2002) que se ubican en las cuencas (Pánuco y Lerma) y en diversas localidades periurbanas y rurales del estado de Querétaro como base para la toma de decisiones sobre su uso y conservación.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el final de estación de estiaje y el inicio de la estación de lluvias del 2019, se muestrearon 12 manantiales en zona templada y árida de Querétaro, pertenecientes a las cuencas de Pánuco y Lerma. En ellos se analizaron los siguientes parámetros fisicoquímicos: oxígeno disuelto, porcentaje de oxígeno disuelto, conductividad específica, TDS, ORP y PH, mediante la utilización de un equipo multiparamétrico portátil modelo Aquaread AP-2000.

Posteriormente, para la determinación de la dureza en laboratorio se recolectaron muestras, homogéneas y representativas de aproximadamente 1 L en un frasco de polietileno a vidrio de boro silicato, pueden utilizarse muestras simples o compuestas, manteniéndola en refrigeración a 4 grados hasta el momento del análisis. El tiempo máximo de almacenamiento previo al análisis recomendada es de seis meses [7]; sin embargo, las muestras fueron analizadas en menos de una semana. Para el procedimiento de estandarización del EDTA se utilizó la metodología sugerida por la Norma Mexicana NX-AA-072-SCFI-2001 (sal sódica).

Posteriormente a la titulación, se procedió a calcular la Dureza total con la siguiente ecuación.

$$[\text{Dureza total}] \text{mgCaCO}_3 / \text{L} = \frac{V_{\text{EDTA}} \times M_{\text{EDTA}}}{V_{\text{MUESTRA}}} \times 100091 \quad (1)$$

donde:

V_{EDTA} = Volumen de titulante (EDTA) para valorar dureza, ml.

M_{EDTA} = Concentración de EDTA. mol/L.

V_{MUESTRA} = Alícuota de muestra titulada, ml.

100091 = Peso atómico del carbonato de calcio (100,091 g/mol) x 1000mg/g.

De acuerdo con el procedimiento indicado en la Norma Mexicana NMX-AA-072-SCFI 2001.

III. RESULTADOS

Los 12 manantiales evaluados se muestran en la tabla 1, señalando en negritas los manantiales pertenecientes a la cuenca del Pánuco. El resto pertenece a la cuenca del Río Lerma, en la cual se muestran las variables fisicoquímicas para la determinación de la calidad del agua.

Tabla 1. Tabla comparativa de los parametros fisicoquimicos en los manantiales de Querétaro. (*Estudio realizado en 2002).

No. de manantial	Manantial	Temperatura del agua en C°	pH	Oxígeno disuelto mg/L	Porcentaje de Oxígeno disuelto(DO%)	Sólidos disueltos totales(TDS)	Conductividad $\mu\text{sec/cm}$	Dureza total mgCaCO ₃ /L	Potencial de óxido-reducción (mV)	Turbidez (NTU)
1	El Pocito	19.3	6.09	0.7	8.2	0.9	1.91	293.06	274	6.27
1.2	El Pocito*	15.7	6.73	2.11			3.78	906.66		
2	La Cueva	20.2	6.2	0.6	8.1	0.3	0.43	46.46	234	27
2.2	La Cueva*	14.7	7.62	2.82			0.638	11.33		
3	La Zorra	18	6.25	0.65	7.6	0.1	0.18	57.18	266	81
3.2	La Zorra*	19.5	7.3	3.66			0.377	4.36		
4	La huerta (Alfajayucan)	22.3	6.81	0.6	8.4	0.2	0.335	214.43	271	5
4.2	La huerta (Alfajayucan)*	17.9	7.51	1.53			0.173	57.33		
5	El bordo	22.5	6.19	0.6	9.3	0.2	0.25	203.71	263	40.5
5.2	El bordo*	15.9	7.03	5.1			0.133	41		
6	El Barena	27.6	6.16	0.58	8.21	0.3	0.29	150.10	182	52
6.2	El Barena*	16.4	7	4.3			0.161	26.2		
7	La Beata	17.63	6.73	0.59	7.7	0.1	0.09	28.59	235	24.8
7.2	La Beata*	17.4	6.92	2.76			0.074	28.66		
8	San Bartolo	18.7	7.46	0.53	6.6	0.1	0.28	60.76	220	26.8
8.2	San Bartolo*	15.7	8.37	5.45			0.111	66.66		
9	Los Vazquez	17.2	6.3	0.59	0.6	0.1	0.08	39.31	206	26.5
9.2	Los Vazquez*	14.6	8.17	8.95			0.87	30.66		
10	La canoa	20.04	5.82	0.53	7	0.4	0.612	232.3	314	18.4
10.2	La canoa*	14	7.45	2.92			0.7	263.5		
11	La huerta (Boye)	16.66	7.68	1.33	16.5	0.1	0.018	17.87	211	7.1
11.2	La huerta (Boye)*	13.5	8.03	4.62			0.09	41.73		
12	Tashal	20.21	6.81	1.27	15.1	0.5	0.829	389.56	214	34.4
12.2	Tashal*	14.6	6.95	4.15			0.714	197.2		

En el estudio realizado en 2002 se midió temperatura, pH, oxígeno disuelto, conductividad específica y dureza del agua. En el estudio actual, además de las variables mencionadas, se agregaron las mediciones de los siguientes aspectos fisicoquímicos: porcentaje de oxígeno disuelto, sólidos disueltos totales, potencial de óxido-reducción y turbidez.

Los manantiales analizados en la actualidad presentan un incremento de temperatura y dureza total con respecto a los manantiales del 2002. Las variables restantes presentaron una disminución notable en pH, DO y conductividad específica.

El intervalo de temperatura obtenido de los 12 manantiales fue de 16.56 a 27.6 °C. El pH fue de 5.82 a 7.68. Las mediciones de oxígeno disuelto mostraron un intervalo de 0.53 a 1.33 mg/L. La conductividad específica 0.08 a 1.91 microsec/cm. La dureza total de los 12 manantiales son de 17.87 a 389.56 mgCaCO₃/L. El intervalo de temperatura obtenido para los manantiales de la cuenca del Pánuco fue de 16.56 a 20.21°C y para la cuenca Lerma-Chapala fue de 17.2 a 27.6.

En la comparación entre los manantiales analizados se puede notar un cambio entre las variables fisicoquímicas analizadas en el 2002 por Morales [2], entre ellas está la temperatura que muestra un aumento considerable junto con la dureza total; éste muestra valores casi del doble de los manantiales en el 2002. El oxígeno disuelto es una de las variables que presenta mayor variación en todos los manantiales teniendo un decremento de concentración a comparación de la medición realizada en el 2002. La mayor parte de los manantiales analizados que se encuentran en la cuenca del Rio Lerma muestran las mayores variaciones en rango de los parámetros fisicoquímicos, y en varios casos se debe a las modificaciones de su entorno.

IV. DISCUSIÓN

Los resultados muestran que en la evaluación actual las variables fisicoquímicas de los 12 manantiales de los 28 analizados per Toyer [2], actualmente presentaron un aumento de temperatura del casi el doble de los valores registrados en el 2002. Si bien, los manantiales son emergencias de agua subterránea, esto podría deberse a un mayor tiempo de estancia del agua en el subsuelo.

Los manantiales pertenecientes a la cuenca del Pánuco presentaron menor afectación, con respecto al aumento de temperatura presentado entre los años 2002 al 2019 como se proyectó en los estudios realizados per Conagua [4].

La dureza analizada en este estudio presentó valores más elevados que los calculados en el 2002 indicando un aumento de sales de magnesio y calcio en los manantiales de las dos cuencas estudiadas (Pánuco y Lerma-Chapala); este aumento es posible debido al tipo de suelo en donde se encuentran los 12 manantiales, que tiende a favorecer altos niveles de dureza en el agua. Los valores obtenidos (Tabla 1) no exceden los límites permitidos que establece la Norma Mexicana NMX-AA-072-SCFI-2001, lo que implica una buena calidad del agua en este parámetro.

El oxígeno disuelto (DO) en los manantiales en ambas cuencas, presenta un decremento respecto de los niveles registrados en 2002 (Tabla 1) siendo de menor concentración en las subcuencas de la cuenca Lerma-Chapala debido a que se encuentra a la largo de áreas de mayor crecimiento urbano en municipios que se distinguen por su participación en el corredor industrial de la cuenca o por su atractivo turístico, causado repercusiones en la cuenca donde un factor que contribuye a los cambios en los niveles de DO es el aumento de residuos orgánicos, siendo la cuenca del Park= un area donde los niveles de DO en la mayoría de los manantiales no se ve muy afectados. siendo la excepcion los de Tashai y La Huerta.

En los manantiales de La Beata, San Bartolo y La Canoa que tienen una mayor presencia de materia orgánica se presentaron bajos niveles de DO (por debajo de 1-2mg/L arriba de 11 mg/L) y que son peligrosos para la vida acuática [5].

A nivel de cuenca, ambas presentaron variaciones de acuerdo con las variables medidas en los análisis realizados tanto en el 2002 como los actuales, y muestran que una relación con el crecimiento demográfico y especial de diversas localidades periurbanas y rurales del estado de Querétaro.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En conclusión, con lo ya expuesto, los 12 manantiales analizados en el 2002 en la actualidad muestran cambios importantes en sus variables fisicoquímicas, que han disminuido su estado de calidad del agua, y esto puede empeorar si no se toman las medidas adecuadas para su conservación tratando de evitar su contaminación y controlar adecuadamente el crecimiento urbano al que están expuestos.

VI. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad de Guanajuato por el apoyo para llevar a cabo mi participación en el Verano de la Ciencia Región Centro, así como a la Universidad Autónoma de Querétaro por la grata bienvenida y la disposición de los recursos necesarios. A Andrea Guadalupe Celestino y a Jesús Palafox García por su compañerismo, solidaridad, profesionalismo y entusiasmo para lograr conjuntamente este proyecto. A la UAQ por ofrecer la posibilidad y el soporte logístico y académico para mi estancia. Al equipo de trabajo sobre la protección y restauración del Río El Pueblito por su apoyo, y también al equipo de trabajo que conformamos para analizar los manantiales Queretanos.

REFERENCIAS

- [1] J. E. C. Muñoz, "Uso potable del agua de acuíferos en contacto con zonas de riesgo que usan agua residual. Retos de investigación, p. 293, 2008.
- [2] C. M. Tovar. Valoración Biotica Rápida de los Manantiales de la zona templada y semiarida de Querétaro, [PhD Thesis], 2002
- [3] G. T. d. T. d. I. c. Lerma-Chapala, Estrategia general para el estado ambiental y sustentabilidad de la cuenca Lerma-Chapala. Querétaro, 2009.
- [4] F. J. C. Trandacete, "Hidrología del Pánuco" de The nature conservancy. Querétaro, 2015. p. 39.
- [5] R.M. Ramirez, aC1MCOOL,»1 Septiembre 2004. En línea Available:
<http://www.oirncool.ca/uploads/downloads/Porqueesimportanteeloxigenodisuelto.pdf>.
- [6] H. C. Avalos. «Portal SEMARNAT,» 21 Diciembre 2010. [En línea]. Available:
<https://aguaorg.mx/wp-content/uploads/2011/02/CuencasHidrogra%CC%81ficas-1.pdf>.
- [7] DOF (2001e) Norma Mexicana NMX-AA-072-SCFI-2001. Análisis de agua -Determinación de dureza total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas-metodo de prueba- (cancela a las NMX-AA-072-1981) Diario Oficial de la Federación. Mexico, DF 19p.

Mucílago de sábila para fotoprotección

Sara Andrea Álvarez Alvarado

Universidad Autónoma de Coahuila
Facultad de Ciencias Químicas
Ing. J. Cárdenas Valdez S/N Saltillo, Coah.
saraalvarez@uadec.edu.mx

Asesor: Juan Carlos Ramírez Granados

Universidad de Guanajuato
Departamento de Ingeniería Agroindustrial
Mutualismo 303 col. Suiza, Celaya, Gto.
jcramirez@ugto.mx

Resumen — Se evaluó la capacidad del mucílago de sábila para fungir como ingrediente activo en productos de protección solar debido a la gran incidencia de problemas dérmicos en la actualidad, con un enfoque en los productos naturales y evitando el uso de productos químicos. Se extrajo el mucílago a partir de sábila (*Aloe vera* L.) y se midió su absorbancia UV en solución acuosa y en crema. A ambas muestras se les determinó su factor de protección solar por medio de un método espectrofotométrico. El mucílago resultó tener un factor de protección solar de 5.79 en solución acuosa y de 10.46 en crema. El material investigado no se recomienda como ingrediente principal en protectores solares debido a la baja protección presentada.

Palabras clave — Protector solar, mucílago de sábila, productos naturales.

Abstract — The ability of *Aloe vera* mucilage to be an active ingredient in sunscreens was evaluated due to the high incidence of dermal problems at present, with special attention on the use of natural products and avoiding chemical products. The mucilage was extracted from aloe (*Aloe vera* L). Its UV absorbance in aqueous solution and in a cream was measured. The sun protection factor of both samples was determined by a spectrophotometric method. The mucilage was found to have a sun protection factor of 5.79 in aqueous solution and 10.46 in a cream. The investigated material is not recommended as the main ingredient in sunscreens due to the low protection presented.

Keywords — Sunscreen, *Aloe vera* mucilage, natural products.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el incremento de casos de enfermedades de la piel tales como el cáncer es una noticia alarmante, por lo que el uso de protectores solares es indispensable. Sin embargo, en la actualidad existe rechazo hacia las formulaciones químicas.

Ramírez y colaboradores en el 2017 extrajeron el mucílago de la chía y lo compararon con un protector solar convencional con factor de protección solar (FPS) 50 resultando ser de similar efectividad.

Laeliocattleya en el 2018, determinó el FPS del extracto de estigmas de maíz, usando acetato de etilo y metanol, resultando ser mejor el extracto obtenido con acetato de etilo con una diferencia de 5.57 pero ambos disolventes afectan al FPS del extracto de estigmas de maíz.

Cefali y colaboradores en el 2018, trabajaron con extractos de mora y frambuesa incorporados a una formulación tópica, midieron su FPS obteniendo 54.57 y 37.32 respectivamente, pero este factor se ve afectado si el producto no se encuentra en refrigeración.

En este trabajo se busca una alternativa de protección solar elaborada con ingredientes naturales y mucílago extraído a partir de sábila.

II. MARCO TEÓRICO

La sábila (*Aloe vera* L.) es una planta perteneciente a la familia de las liliáceas, conocida por sus propiedades antibacterianas, antiinflamatorias y antioxidantes. Comúnmente es utilizada para tratar inflamaciones, irritaciones y otros problemas de la piel [4]. La sábila está conformada en su mayor parte por agua, aproximadamente el 99.4%, mientras que del resto el 60% corresponde a mucílago, el cual está constituido por azúcares, compuestos fenólicos, ácidos galacturónicos y entre otros polisacáridos [5].

Por otra parte, el cáncer de piel ocupa los primeros lugares entre los tipos de cánceres con mayor número de casos en México y en otros países. La principal causa de esta clase de padecimientos es la radiación ultravioleta (UV), la cual es producida por los rayos solares y también es utilizada en las camas de bronceado [6]. Esta radiación se divide en tres grupos principales: rayos UVA, UVB y UVC; de estos, los rayos UVC son retenidos por la capa de ozono, los rayos UVA broncean, envejecen la piel y también producen cánceres en la piel, pero los rayos UVB son los principales causantes [7]. Debido a que cada año aumenta la población con alguna enfermedad causada por la radiación UV se recomienda el uso de protectores solares diariamente. Existen diferentes tipos de protectores: los físicos, reflejan la radiación UVA y UVB impidiendo la penetración en la piel; y los químicos, absorben la radiación UVB para transformarla en energía no dañina para la piel, es decir, en calor [8].

El factor de protección solar es un índice etiquetado en los protectores solares que indica el nivel de protección contra quemaduras causadas por la exposición al sol; entre mayor sea este valor, mayor será la protección aportada. Este factor se determina con la ayuda de mediciones de absorbancia de radiación ultravioleta [9]. Este índice puede verse afectado por diferentes factores como, la absorbancia de la solución, la intensidad del sol, entre otros. Sin embargo, su valor *in vitro* puede estimarse mediante la siguiente ecuación [10]:

$$FPS = FC \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda) \quad (1)$$

Donde FPS es el factor de protección solar, FC es un factor de corrección con valor de 10, $EE(\lambda)$ es el efecto eritemogénico de la radiación de longitud de onda λ , $I(\lambda)$ es la intensidad del sol en la longitud de onda λ y $Abs(\lambda)$ es la absorbancia de la solución en la longitud de onda λ .

Cabe señalar que el producto de la intensidad de radiación en cada longitud de onda por el efecto eritemogénico es una constante reportada previamente. Los valores de este producto se muestran en la tabla 1 [10].

Tabla 1. Constantes del producto $EE(\lambda) \times I(\lambda)$

Longitud de onda (nm)	$EE(\lambda) \times I(\lambda)$
290	0.0150
295	0.0817
300	0.2874
305	0.3278
310	0.1864
315	0.0839
320	0.0180

III. MATERIALES Y MÉTODOS

La obtención del mucílago de sábila se basó en una adaptación del procedimiento descrito por Domínguez Canales y colaboradores en el 2011. A continuación, se especifican las modificaciones: la materia prima no se lavó con hidróxido cúprico y cloro, se utilizó agua potable y jabón; los cubos de materia prima se colocaron en agitación con agua por 24 h y no se maceraron; luego se colocaron en refrigeración por 24 h; después se filtraron los cubos de sábila para calentar la muestra líquida a 65 °C por 8 h y se dejó enfriar a temperatura ambiente; el resto de la metodología se llevó a cabo igual que como describen los autores a excepción del secado que se completó en 2 h a 70 °C.

Se realizaron mediciones de absorbancia basadas en el procedimiento descrito por Ramírez y colaboradores en el 2017. Se preparó una solución acuosa de 1 g/L con 0.02 g de mucílago en 20 mL de agua, se disolvió con agitación y calentamiento constante por 2 h. Una vez homogénea la muestra, se midió su absorbancia de 200 a 1000 nm con intervalos de 10 nm para conocer la longitud de onda donde la absorbancia fuese mayor. Posteriormente se prepararon nueve disoluciones con concentraciones decrecientes regulares entre 0.9 y 0.1 g/L a partir de la solución madre, a estas se les midió su absorbancia en la longitud de onda de máxima absorbancia.

A una solución acuosa con 0.2 g/L de mucílago se le calculó su factor de protección solar siguiendo el protocolo descrito por Inocente y colaboradores en el 2014 con la única excepción que no se utilizó etanol para la solución. Además, se preparó una crema protectora solar con productos naturales, hecha con aceite de coco, manteca de karité, cera de abeja, aceite esencial de lavanda y solución acuosa de mucílago de sábila 0.2 g/L, a esta crema se le midió su absorbancia y se calculó el FPS siguiendo el protocolo descrito por Ramírez y colaboradores en el 2017. El factor de protección solar se calculó de acuerdo con el método propuesto por Inocente y colaboradores en el 2014.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron dos extracciones de mucílago, se colocaron 181.17 g y 156.97 g de sábila en cada ensayo y se obtuvieron 40 mg y 30 mg de mucílago, respectivamente. La figura 1 muestra la absorbancia presentada por la solución acuosa preparada de 1 g/L.

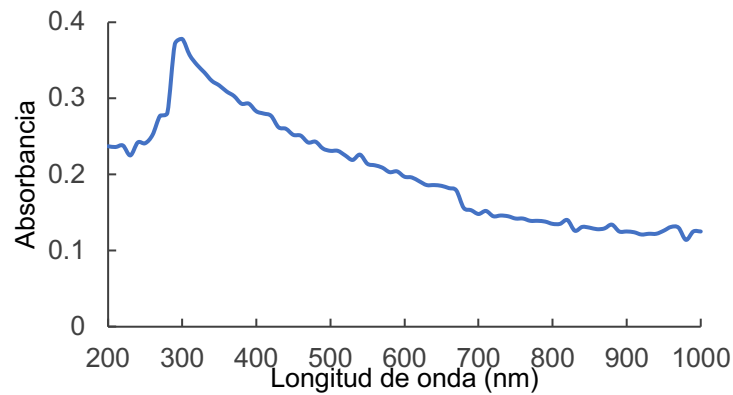


Fig. 1. Absorbancia de una solución acuosa con 1 g/L de mucílago de sábila.

En la figura 1 se puede observar que, en la longitud de onda correspondiente a 300 nm la absorbancia fue mayor con un valor de 0.378, y es en esta longitud de onda en la cual se trabajó con las disoluciones cuya curva de calibración, figura 2, nos permite determinar el coeficiente de extinción del mucílago.

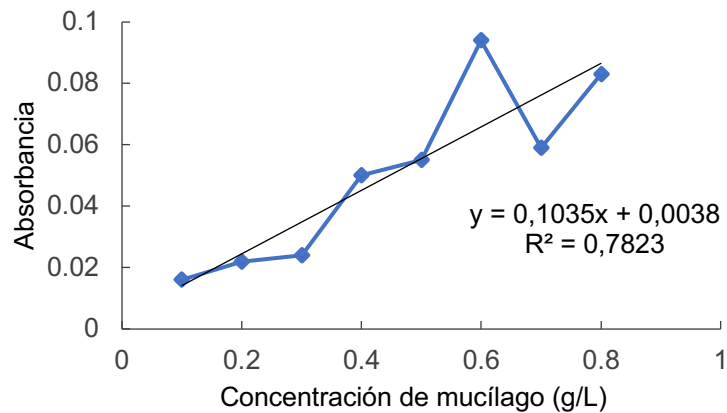


Fig. 2. Curva de calibración para el mucílago de sábila en disolución acuosa.

El coeficiente de extinción se determinó igualando la pendiente de la línea recta que mejor se ajusta a la curva de calibración, mostrada en la figura 2, con el factor ϵl de la Ley de Lambert-Beer. Donde ϵ es el coeficiente de extinción y l el ancho de la muestra. Considerando que el ancho de la muestra de la disolución fue de 1 cm, el coeficiente de extinción del mucílago de sábila resultó ser de 0.7823 L/(g cm).

Para calcular el factor de protección solar tanto de la muestra en solución como para la muestra en crema se hicieron mediciones por triplicado. Los resultados que se presentan en las tablas 2 y 3 son los valores promedios de cada dato mostrado.

Tabla 2. Absorbancias de la muestra en solución y cálculo del FPS

nm	Absorbancia	Transmitancia	EE x l	(EE x l) (A)
290	0.6087	24.6333	0.015	0.0091
295	0.6103	24.5333	0.0817	0.0498
300	0.6013	25.0333	0.2874	0.1728
305	0.5783	26.4	0.3278	0.1896
310	0.555	27.8667	0.1864	0.1034
315	0.5343	29.2333	0.0839	0.0448
320	0.5127	30.7	0.018	0.0092
FPS			5.7891	
Desviación estándar			0.0252	

Tabla 3. Absorbancias de la muestra en crema y cálculo del FPS

nm	Absorbancia	Transmitancia	EE x l	(EE x l) (A)
290	0.7417	18.1333	0.015	0.0111
295	0.8437	14.0333	0.0817	0.0689
300	1.1087	7.8	0.2874	0.3186
305	1.103	7.9667	0.3278	0.3616
310	1.0173	9.6333	0.1864	0.1896
315	0.9467	11.3	0.0839	0.0794
320	0.9357	11.6	0.018	0.0168
FPS			10.4614	
Desviación estándar			0.1821	

El factor de protección solar que presentó la crema protectora (Fig. 3) es mayor al de la solución debido a que los ingredientes utilizados también aportan protección solar.

**Fig. 3.** Mucilago de sábila, crema protectora y mucilago en solución acuosa.

En comparación con el trabajo presentado por Ramírez y colaboradores en el 2017, el mucilago obtenido a partir de chíá resultó ser un material más prometedor ya que se puede comparar con un protector solar de FPS 50.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se buscó una alternativa natural para crear o mejorar un protector solar con mucílago extraído a partir de sábila. Sin embargo, el rendimiento en la extracción de este material fue bajo por lo que es necesario optimizar el proceso. El factor de protección solar calculado para el mucílago de sábila en disolución y en la crema fue bajo; sin embargo, es posible incrementarlo si se aumenta la concentración de mucílago en las muestras. Además, debe considerarse que el mucílago no es soluble en etanol, solvente propuesto para la medición del FPS, sino que se coagula por lo que sería recomendable desarrollar una metodología más apropiada para determinar el factor de protección solar *in vitro* de materiales que no son solubles en etanol o con alta viscosidad a fin de obtener estimaciones más confiables.

VI. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo brindado por el comité organizador del 21° Verano de la Ciencia de la Región Centro 2019 y por la Universidad de Guanajuato.

REFERENCIAS

- [1] J. C. Ramírez, B. E. Gómez, C. Díaz y J. R. Gasca, "Análisis de la Absorbancia y Transmitancia Espectral del Mucílago de *Salvia hispanica* L. para la Fotoprotección de la piel", *Rev de Ciencias de la Salud*, vol. 4, no. 10, pp. 13-22, Marzo 2017.
- [2] R. A. Laeliocattleya, "The potential of methanol and ethyl acetate extracts of corn silk (*Zea mays* L.) as sunscreen", 1st International Conference on Bioinformatics, Biotechnology, and Biomedical Engineering (BioMIC 2018), Yogyakarta, Indonesia, 2018, pp. 1-8.
- [3] L. C. Cefali, J. Gomes, G. Ferreira, J. A. Ataíde y P. G. Mazzola, "*In vitro* antioxidant activity and solar protection factor of blackberry and raspberry extracts in topical formulation", *J Cosmet Dermatol* 00, 1-6, Noviembre 2018. [consultado en mayo 2019].
- [4] G. Ramírez, "Sábila (*Aloe vera*)", *NATURA M*, vol. 21, no. 1, pp. 26-31, 2003.
- [5] M. J. Patiño, "Identificación del nivel de industrialización del *Aloe vera* en Colombia", Trabajo final de grado, Ciencias Agropecuarias, U. de la Salle, Bogotá, 2016.
- [6] C. W. Schmidt, "Las radiaciones ultravioleta y el cáncer de piel. La ciencia detrás de las restricciones de edad para las camas de bronceado", *ehp*, vol. 120, no. 8, pp. A308-A313, Agosto 2012.
- [7] American Cancer Society. 2017. ¿Qué es la radiación ultravioleta (UV)? [Online]. Available: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-piel/prevencion-y-deteccion-temprana/que-es-la-radiacion-de-luz-ultravioleta.html> [consultado en 2019].
- [8] S. Abaroa y L. Granados. 2011. Protectores solares. Comparativo de precios. Brújula de Compra PROFECO. [Online]. Available: <https://www.gob.mx/profeco/documentos/protectores-solares-comparativo-de-precios> [consultado en 2019].
- [9] Food & Drug Administration (FDA). 2019. Protector solar: cómo ayudar a proteger su piel del sol. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/drugs/understanding-over-counter-medicines/sunscreen-how-help-protect-your-skin-sun#spf> [consultado en 2019].
- [10] M. A. Inocente, G. E. Tomas, J. Huamán, A. M. Muñoz, R. I. García, G. Quispe, C. J. Palomino y E. Taype, "Actividad antioxidante y fotoprotectora *in vitro* de una loción y gel elaborados con extracto estabilizado de Camu Camu (*Myrciaria dubia* Kunth)" *Rev Soc Quím Perú*, vol. 80, no. 1, pp. 65-77, Marzo 2014.
- [11] V. S. I. Domínguez, J. A. Zegbe, M. D. Alvarado y J. Mena, "Extracción y purificación de mucílago de NOPAL", *SAGARPA*, vol. 21, Octubre 2011.

Nanopartículas para SERS Raman para detectar biomoléculas

Gabriel Rodríguez Guijarro

Universidad Autónoma de Zacatecas
Unidad Académica de Física
Calzada Solidaridad esq. Paseo, La Bufa s/n,
C.P. 98060, Zacatecas, Zac.
garoqui10@hotmail.com

Asesor: Hugo Ricardo Navarro Contreras

Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Laboratorio Nacional CIACYT
Av. Sierra Leona 550, col. Lomas 2ª. Sección, C.P.
78210, San Luis Potosí, S.L.P.
hnavarro@uaslp.mx

Resumen — El ácido siálico (A.S.), recientemente ha ganado interés dado que es una biomolécula que está presente de manera normal en fluidos corporales, pero en cantidades anormales se relaciona con el padecimiento de cáncer de mama. En este trabajo buscaremos un sustrato SERS para amplificar la señal Raman de dicha biomolécula. Se probó con distintos tipos de nanopartículas (NPs) metálicas, las cuales se desempeñaron de formas distintas, lo que nos sugiere, que para realizar la señal Raman de una biomolécula hay que considerar el sistema que se forma en conjunto (NP, funcionalización y biomarcador) para obtener un desempeño ideal. Así pues, de nuestra investigación obtuvimos que las nanopartículas de plata (NPs-Ag) son las ideales para realzar el biomarcador de nuestro interés.

Palabras clave — nanopartículas metálicas, ácido siálico, SERS..

Abstract — The sialic acid, has recently gained interest given that this biomolecule is present in normal levels in bodily fluids, but in abnormal quantities is related to the suffering of breast cancer. In this research we will look for a SERS substrate to enhance the Raman signal of this biomolecule. There were tested different kinds of metallic NPs, wich performed in different ways, this suggests that to enhance the Raman signal of a given biomolecule it's necessary to consider the system as a whole (NP, functionalization and biomarker) to obtain the ideal performance. From our investigation we obtained that the silver nanoparticles (NPs-Ag) are the ideal ones to enhance the biomarker that we were interested into.

Keywords — metallic nanoparticles, sialic acid, SERS.

I. INTRODUCCIÓN

El ácido siálico es una biomolécula que de acuerdo a investigaciones previas existe en niveles elevados cuando un paciente tiene cáncer de mama [1], por lo tanto, es de gran interés obtener un método confiable para detectar los niveles de A.S. en el cuerpo humano. El efecto SERS consiste en intensificar la señal Raman de una molécula al entrar en resonancia con el plasmón de una NP metálica, por lo que ha sido propuesto como un método para la detección de concentraciones de A.S. en el cuerpo humano [2]. En este proyecto se crearon tres tipos de NPs metálicas, con el fin de comparar y describir su comportamiento como sustratos SERS para detección de A.S.

II. MARCO TEÓRICO

El término ácido siálico representa una familia de 43 derivados del ácido neuramínico, específicamente el ácido n-acetilneuramínico es la forma predominante de este tipo de ácidos y uno de los únicos que se encuentran en el cuerpo humano. Al realizar la espectroscopía Raman las bandas características más prominentes de este ácido ocurren en 1360, 1291, 1172 y 907 cm^{-1} [3]. El método de Turkevich para la síntesis de NPs metálicas

consiste en calentar una solución de sal metálica en agua y posteriormente agregar una solución también en agua de un reductor y estabilizante, tal como lo explica en una publicación hecha en el tiempo en que realizó sus estudios acerca del tema [4]. Aunque el método fue inicialmente creado para sintetizar NPs de Au también se puede utilizar para sintetizar NPs de Ag [5] y [6]. Espectroscopía Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de casi cualquier material o compuesto, permitiendo así su identificación. El análisis mediante espectroscopía Raman se basa en el análisis de la luz dispersada por un material al incidir sobre él un haz de luz monocromático. La espectroscopía Raman se puede realizar a cualquier material, por ejemplo, se ha utilizado para el estudio de nanotubos de carbono [7] y del grafeno [8]. SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering) es una técnica que consiste en un aumento de la difusión inelástica (señal Raman), procedente de determinadas moléculas en presencia de una nanoestructura metálica rugosa especialmente preparada. La aplicación de dicha técnica está estrechamente ligada a las propiedades morfológicas y superficiales de las estructuras metálicas empleadas. Esta técnica ha sido utilizada en la detección de bacterias [9] y se han postulado distintas aplicaciones para análisis medioambientales [10]. DLS (Dynamic Light Scattering) es una técnica para medir el tamaño de partículas usualmente de tamaño menor a un micrómetro. Esta técnica mide el movimiento browniano, el cual depende del tamaño de las partículas. SEM (Scanning Electron Microscope), es una técnica de microscopía electrónica capaz de producir imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra utilizando las interacciones electrón-materia. Utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen.

III. METODOLOGÍA

Se crearon tres tipos de NPs, esferas de Ag, esferas de Au y estrellas de Au. Para las esferas de Ag se utiliza el método de Turkevich, utilizando nitrato de plata (AgNO_3) como sal a reducir y citrato trisódico como reductor y estabilizante. Para realizar la síntesis se coloca una solución a 2.5 mM de AgNO_3 en agua desionizada en una parrilla Corning PC-420D con un agitador magnético a 260 rpm, se aumenta la temperatura gradualmente hasta llegar al punto de ebullición, tras llegar a esta temperatura se coloca el citrato poco a poco (una solución a 2.5 mM en agua desionizada), posteriormente ocurre el cambio de coloración lo que nos indica que es momento de dejar enfriar a temperatura ambiente. Para las NPs de Au se preparan soluciones a 2.5 mM de ácido cloroáurico (HAuCl_4) y de citrato trisódico, la de HAuCl_4 se realizó a partir de una solución madre con una molaridad $M=0.02824$ mol. Para la síntesis se realizan los mismos pasos de la síntesis de NPs de Ag, ya que se utiliza de nuevo el método de Turkevich, solamente se cambia el AgNO_3 por HAuCl_4 . Para las estrellas de Au se crean las siguientes soluciones: HEPES (base buffer) a 25mM, HAuCl_4 a 1 mM e hidroxilamina clorhídrica a 0.1 M. Para la síntesis se coloca la solución HEPES en el centro de un cuenco con hielo y sal en una parrilla de agitación, después se colocan las semillas y después la hidroxilamina. después de colocar la hidroxilamina comienza el goteo de la sal de oro con una jeringa, finalmente la solución se mantiene bajo agitación durante 15 min. Después de realizar las síntesis se realizó un lavado, el cual consistió en la filtración, centrifugación (centrífuga DLAB) y baño ultrasónico (Branson 1800).

La caracterización de la distribución de tamaños y el potencial Z se realiza con un DLS Zetasizer Nano ZS90, en el cual se colocan muestras de todas las síntesis realizadas. La caracterización de la morfología de las NPs sintetizadas se realiza mediante SEM.

La amplificación de las señales Raman se calibra mediante un espectrómetro Raman Horiba, con soluciones de A.S. a concentraciones de 200, 100, 50, 20, 15, 5 y 1 mg/dl. Una vez hechas las soluciones, se coloca en un pozo (de una placa de aluminio), 50 μ l de la solución de A.S. y 25 μ l de las NPs sintetizadas.

Para el análisis de resultados se utiliza OriginPro 9.0.

IV. RESULTADOS

Las primeras tres figuras nos muestran la morfología de las NPs en imágenes SEM. La figura 1 muestra la imagen SEM de NPs de Ag esféricas donde se observa que tienen aproximadamente un tamaño de 50 nm, la figura 2 de NPs de Au esféricas con un tamaño aproximado de 50 nm y la figura 3 de NPs de Au con crecimiento de picos, con un tamaño aproximadamente de 150 nm.

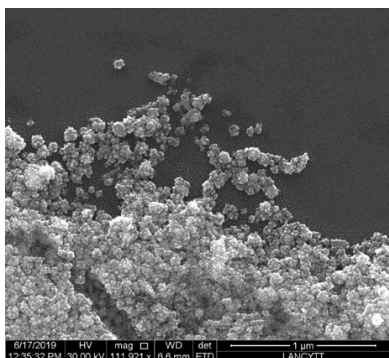


Figura 1. Imagen SEM de NPs de Ag esféricas

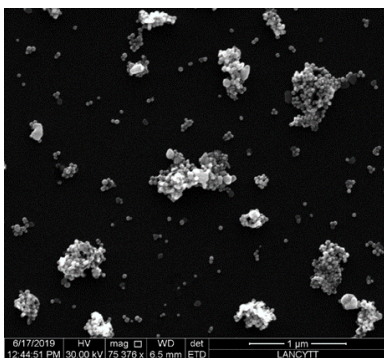


Figura 2. Imagen SEM de NPs de Au esféricas

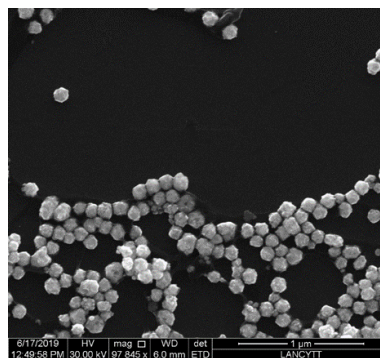


Figura 3. Imagen SEM de NPs de Au con crecimiento de picos

Las figuras 4, 5 y 6 presentan algunos de los datos obtenidos en el DLS, según el cual las NPs de Ag tienen un tamaño promedio de 52.84 nm y un potencial Z de -29.1 mV, las NPs de Au un tamaño promedio de 64.85 nm y un potencial Z de -28.0 mV (figura 4) y las NPs de Au con crecimiento de picos un tamaño promedio 212.9 nm (figura 5) de y un potencial Z de -7.44 mV (figura 6). La diferencia en el tamaño promedio de las NPs de Au con crecimiento de picos entre la microscopía SEM y el DLS se puede atribuir a la aglomeración de las mismas al realizar la medición del DLS.

Al buscar el efecto SERS en la espectroscopía Raman con las distintas NPs encontramos que solo existe un realce de la señal Raman del A.S. cuando se mezcla con NPs de Ag, con las de Au (tanto las de morfología esférica como las que tienen crecimiento de picos) se obtuvo solamente el espectro de los componentes de la mezcla de NPs y el A.S. por separado y sin ningún tipo de realce. La figura 7 muestra la curva de calibración para las distintas mezclas de concentraciones de A.S. y NPs de Ag.

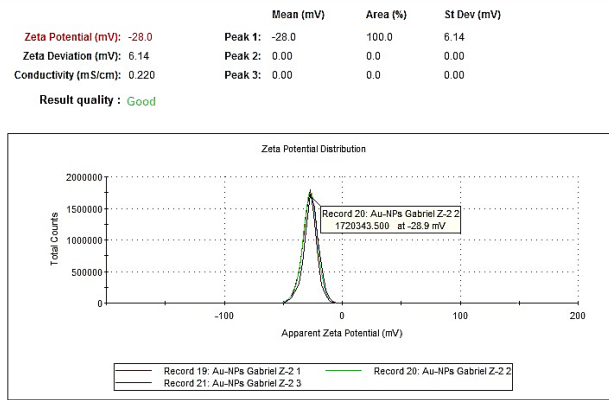


Figura 4. Potencial Z de NPs de Au esféricas

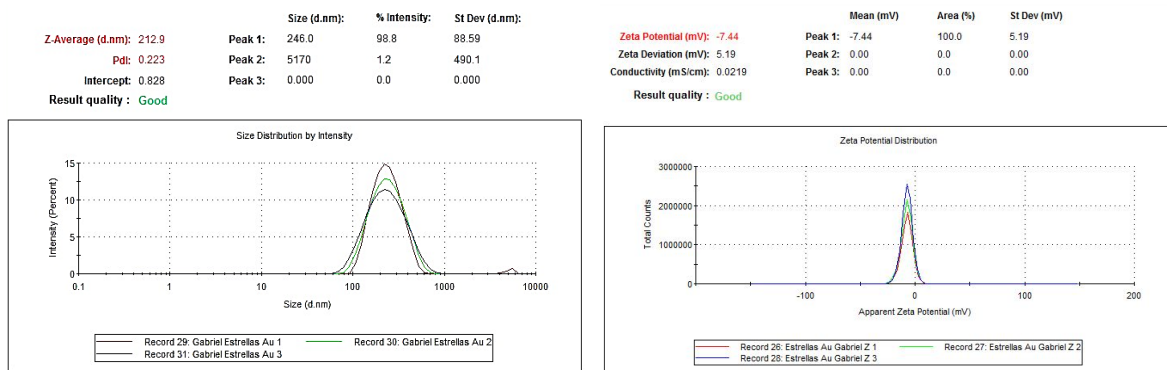


Figura 5. Distribución de tamaños de NPs de Au con crecimiento de picos

Figura 6. Potencial Z de NPs de Au con crecimiento de picos

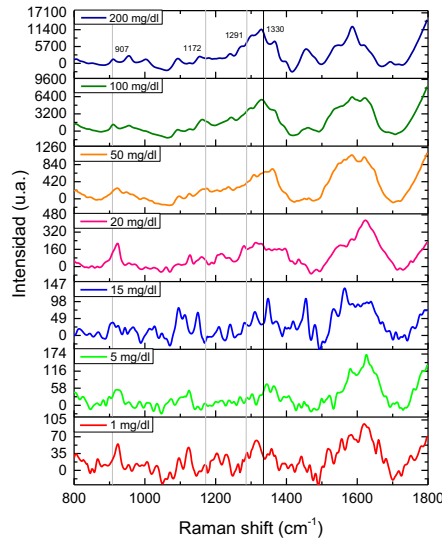


Figura 7. Curva de calibración de solución de ácido siálico y AgNPs a diferentes concentraciones

De las figuras 8 a la 11 se muestran los ajustes hechos a las distintas bandas características del A.S., las cuales todas muestran una tendencia lineal.

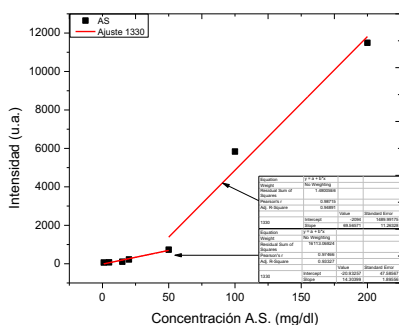


Figura 8. Intensidad Raman en el pico 1330 cm-1 respecto a distintas concentraciones de A.S.

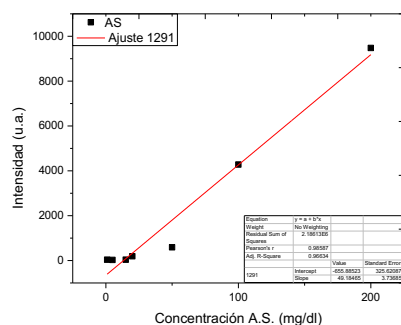


Figura 9. Intensidad Raman en el pico 1291 cm-1 respecto a distintas concentraciones de A.S.

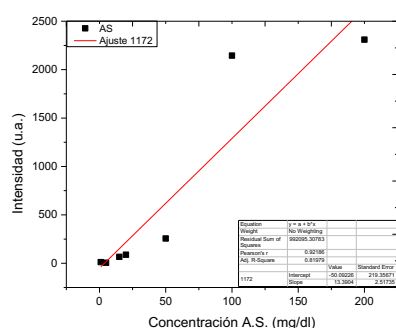


Figura 10. Intensidad Raman en el pico 1172 cm-1 respecto a distintas concentraciones de A.S.

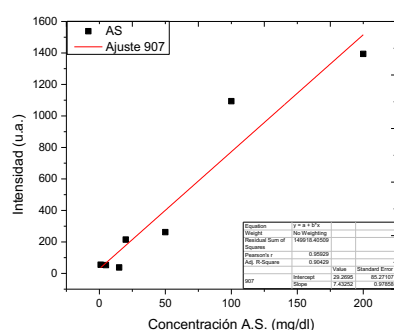


Figura 11. Intensidad Raman en el pico 907 cm-1 respecto a distintas concentraciones de A.S.

V. CONCLUSIONES

De acuerdo a los espectros Raman obtenidos con los distintos tipos de NPs utilizados en este proyecto podemos afirmar que para aumentar la señal Raman del A.S. se deben utilizar NPs de Ag envueltas en citrato trisódico, ya que al hacer las pruebas con los otros tipos de NPs, a pesar de que también estaban envueltas en citrato trisódico no se obtuvo un realce de la señal Raman, lo cual se puede atribuir a que tanto en las NPs esféricas de Au como en las NPs con crecimiento de picos de Au no se adhiere la biomolécula del A.S. y por lo tanto no se realiza la señal Raman. Los resultados obtenidos con las NPs de Ag esféricas y el A.S. confirman la utilidad de las mismas como sustratos SERS para la detección de A.S., lo cual ya ha sido utilizado en otros proyectos para la detección de cáncer de mama a través de la comparación de la señal Raman obtenida de la saliva de pacientes con una curva de referencia creada a partir del estudio de las bandas de esta biomolécula. De estos resultados podemos inferir que para realizar la señal Raman de cualquier biomolécula es necesario encontrar una nanopartícula cuyas características (material, morfología y recubrimiento) sean las adecuadas para realzar la señal Raman de la biomolécula que se desee analizar. El descubrimiento de que las NPs esféricas de Ag recubiertas con citrato trisódico son útiles para realzar la señal Raman del A.S. también puede ser un buen punto de partida para describir el por qué cierto tipo de NPs realzan la señal de ciertas biomoléculas y, por lo tanto,

en lugar de probar al azar con distintos tipos de NPs intentar directamente con las NPs que teóricamente deberían realzar la señal Raman de la biomolécula que se quiera estudiar.

VI. RECONOCIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, en específico al Laboratorio Nacional CIACYT y al CONACyT por las facilidades y el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano.

REFERENCIAS

- [1] Öztürk L, Emekli-Alturfan E., Kaşıkci1 E., Demir G. & Yarat A. Salivary Total Sialic Acid Levels Increase in Breast Cancer Patients: A Preliminary Study, *Medicinal Chemistry* (2011) 7: 443-447(5).
- [2] Hernández-Arteaga, A., de Jesús Zermeño Nava, J., Kolosovas-Machuca, E.S. et al. *Nano Res.* (2017) 10: 3662.
- [3] Vinogradova, E., Tlahuice-Flores, A., Velazquez-Salazar, J. J., Larios-Rodriguez, E., & Jose-Yacaman, M. (2014). Surface-enhanced Raman scattering of N-acetylneuraminic acid on silver nanoparticle surface. *Journal of Raman Spectroscopy*, 45(9), 730–735.
- [4] Turkevich, J., Stevenson, P. C., & Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 11, 55.
- [5] Gorup, L. F., Longo, E., Leite, E. R., & Camargo, E. R. (2011). Moderating effect of ammonia on particle growth and stability of quasi-monodisperse silver nanoparticles synthesized by the Turkevich method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 360(2), 355–358.
- [6] Pillai, Z. S., & Kamat, P. V. (2004). What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method? *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(3), 945–951.
- [7] Dresselhaus, M. S., Jorio, A., Hofmann, M., Dresselhaus, G., & Saito, R. (2010). Perspectives on Carbon Nanotubes and Graphene Raman Spectroscopy. *Nano Letters*, 10(3), 751–758.
- [8] Ferrari, A. C., & Basko, D. M. (2013). Raman spectroscopy as a versatile tool for studying the properties of graphene. *Nature Nanotechnology*, 8(4), 235–246.
- [9] Premasiri, W. R., Moir, D. T., Klempner, M. S., Krieger, N., Jones, G., & Ziegler, L. D. (2005). Characterization of the Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) of Bacteria. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(1), 312–320.
- [10] Halvorson, R. A., & Vikesland, P. J. (2010). Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) for Environmental Analyses. *Environmental Science & Technology*, 44(20), 7749–7755.

Obtención de proteínas recombinantes a partir de genes derivados de Moringa oleífera

Karen Covarrubias Flores

Universidad Autónoma de Zacatecas,
Carr. Zacatecas-Guadalajara Km. 6,
Ejido "La Escondida", Zacatecas, Zac.
karco@live.com.mx

Asesor:

Francisco Morales Domínguez

Universidad Autónoma de Aguascalientes,
Av. Universidad # 940, Ciudad Universitaria,
C. P. 20131, Aguascalientes, Ags.
jfmoral@correo.uaa.mx

Resumen — En el presente trabajo se diseñaron dos construcciones con los genes Mo (antifúngico) y Flo (antibacteriano) amplificados por PCR derivados de moringa y otra con el gen sintético Mo-Flo ambos clonados en el vector de expresión pET32. Los resultados mostraron que el gen sintético Mo-Flo no hubo inhibición en cepas de *Agrobacterium tumefaciens* tales como: EHA105, GV2260, GV3101, A4404:PBI121 y EHA105:PBI 121. Para los genes Mo y Flo, no se pudo comprobar la funcionalidad. Sin embargo, en los controles de positivos con nanopartículas sintetizadas a partir de Acelga, Rábano, Albaca y con el desinfectante comercial Microdyn; se observó una inhibición completa de las bacterias en los intervalos de tiempos de cada muestra.

Palabras clave — Enfermedades bacterianas, péptidos antimicrobianos, proteínas recombinante

Abstract — In the present work, two constructions were designed with the Mo (antifungal) and Flo (antibacterial) genes amplified by moringa-derived PCR and another with the Mo-Flo synthetic gene both in the pET32 expression vector. The results showed that there was no inhibition in strains of *Agrobacterium tumefaciens* such as: EHA105, GV2260, GV3101, A4404: PBI121 and EHA105: PBI 121, in which the synthetic Mo-Flo gene was tested. However, with Chard, Radish, Albaca and Microdyn nanoparticles that were used as controls; a complete inhibition of the bacteria was observed in the time intervals of each sample.

Keywords – Bacterial diseases, antimicrobial peptides, recombinant proteins

I. INTRODUCCIÓN

A lo largo de los tiempos, la resistencia de las bacterias a los antibióticos se ha presentado con mayor frecuencia y han ido incrementando debido al uso indiscriminado de los antibióticos y el mal manejo de estos que van promoviendo el desarrollo de la resistencia de las bacterias (3). Estos problemas han permitido que bacterias comiencen a acelerar su desarrollo de mutaciones como mecanismos de supervivencia, con el fin de evitar el efecto de estos medicamentos. Estos mecanismos de resistencia han originado, que infecciones que ya se creían erradicadas, resurjan en un momento donde no hay antibióticos con capacidad de erradicarlas y por ello, esto nos deja sin tratamientos eficaces para eliminar infecciones de este tipo (4). De acuerdo con agencias mundiales de la salud, como tal es el caso de la World Health Organization (WHO) han informado como la sociedad en la actualidad se encuentra en una era “post-antibiótica” y que la crisis de la resistencia antimicrobiana será cada vez más grave (1).

Esta situación actual de resistencia a los tipos de medicamentos convencionales ha llevado a investigadores a la búsqueda de otras alternativas que puedan prevenir y tratar estas enfermedades sin causar una resistencia de estos microorganismos. Una alternativa prometedora sería el uso de Péptidos Antimicrobianos (PAMs) ya sean naturales o sintéticos, debido a que presentan propiedades terapéuticas y cuentan con

una amplia actividad frente a hongos, bacterias y virus, además de no dejar de ser eficaces ante mutaciones las cuales provocan resistencia a los antibióticos clásicos, presentando cierta ventaja ante estos (2)

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. EXTRACCIÓN DE ADN

Se utilizó el protocolo de Lodhi et al. (1994). Para esto se pulverizó tejido de hoja de moringa, utilizando nitrógeno líquido y mortero. Se colocó de 20 a 100 mg de muestra en un microtubo de 1.5 ml, posteriormente se añadió 0.8 ml de buffer de lisis más 2.4 ml de β -mercaptoetanol al 0.3%, se mezcló y se incubó a 65° C por 15 min. Después se colocó en hielo durante 5 min y se añadió 0.5 ml de fenol-cloroformo, se mezcló y posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 5 min. Pasado este tiempo, se añadió 1 μ l de RNAsa, se incubó a 37°C por 20 min. Nuevamente se agregó y mezcló con 0.5 ml de fenol-cloroformo a mismo tubo y se centrifugó a 12000 rpm por 5 min. Se agregó y mezcló un volumen igual de isopropanol a la fase recuperada (acuosa) en un tubo limpio y se incubó a -20°C por 10 min, Posterior se centrifugó a 12000 rpm por 20 min y se eliminó el sobrenadante y se añadió 0.2 ml de etanol al 70%. Se recuperó por centrifugación se secó y se resuspendió en 30 μ l de H₂O destilada estéril.

B. AMPLIFICACIÓN DE SEGMENTOS

La amplificación de los genes fue mediante PCR con la siguiente mezcla de reacción: 2.5 μ l Buffer, 2 μ l MgCl₂, 0.075 μ l Taq, 0.5 μ l dNTPs, y 100 ng DNA. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización previa durante 1 min a 94°C, desnaturalización de 94°C durante 1 min, un alineamiento a 50°C durante 1 min, y una elongación a 72°C, durante 30 ciclos. Mediante electroforesis en gel de agarosa se corrió los productos de PCR teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz UV.

C. PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN

Se realizó la purificación de los fragmentos de ADN obtenidos siguiendo el protocolo del kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Posteriormente se realizó una ligación con el vector pGem T-easy o el vector pET32 a 4°C durante la noche utilizando lo siguiente: 1 μ l pGem T-easy 50 ng, 5 μ l, 2X Rapid Ligation Buffer, 3 μ l PCR product, 1 μ l T4 DNA Ligase.

D. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Se cultivó bacterias *E.coli cepa DH5 α* en medio LB sólido a 37°C durante 16 a 20 h, se tomó una colonia aislada y se sembró en 3 ml de LB, en agitación a 37°C durante 16 a 20 h. Posteriormente se tomó 0.1 ml del cultivo en 10 ml de LB, y se incubó en agitación a 37°C durante 3 h aprox hasta que comenzó a observarse turbio el medio. Posterior a eso se repartió el cultivo en 10 microtúbulos de 1.5 ml y se dejó enfriar en hielo durante 10 min, se metió a centrifugar a 1200 rpm durante 15s y se eliminó el sobrenadante en solución con cloro, se resuspendió la pastilla con 30 μ l de CaCl₂ con DMSO al 7%, esto se utilizó inmediatamente para la transformación.

E. TRANSFORMACIÓN DE LAS CÉLULAS COMPETENTES

Se mezcló 30 μ l de células competentes más 3 μ l del plásmido, manteniéndolo en hielo durante 20 min. Posterior se calentó a 42°C por 90 s y se transfirió a hielo

incubándolo 5 min y añadió 200 μ l de medio LB incubando en agitación a 37°C por 45 min. Antes de añadir la mezcla se prepararon medio LB sólido con ampicilina en donde se agregaron X-gal e IPTG para identificar las bacterias con dichos genes.

Las bacterias posibles transformantes se inocularon en cajas Petri conteniendo medio LB sólido con ampicilina a 37° C por toda la noche.

F. EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO

Del cultivo anterior de *E.coli* , se puso a centrifugar 1.5 ml de cultivo bacteriano a 12000 rpm por 2 min, eliminando el sobrenadante en hipoclorito de sodio, y se resuspendió la pastilla bacteriana agregando 100 μ l de Birnboim I, y se incubó en hielo por 5 min, se agregó y mezcló 200 μ l de Birnboim II, y se volvió a incubar a T.A por 5 min, se agregó y mezcló 150 μ l de solución Birnboim III, y se incubó en hielo por 5 min. Posterior a esto la mezcla fue centrifugada a 12000 rpm por 5 min y se añadió 200 μ l de cloroformo-alcohol isoamilico a la fase recuperada(acuosa) en un tubo limpio, se mezcló hasta emulsificar y se volvió a centrifugar a 12000 rpm por 5 min, recuperando la fase acuosa nuevamente se agregó y mezcló un volumen igual de isopropanol en un tubo y se incubó en hielo durante 1 min y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min eliminando el sobrenadante, y se añadieron y mezclaron 200 μ l de etanol al 70% a la pastilla formada, y se centrifugó a 12000 rpm por 5 min, eliminando el sobrenadante y añadiendo 50 μ l de H₂O destilada estéril la pastilla seca para resuspenderla, se almaceno a 4°C. Mediante electroforesis en gel de agarosa se corrió los productos de la ligación teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz UV.

G. DIGESTIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN

La preparación de muestras para la digestión se agregaron las siguientes cantidades por cada reacción a realizar: enzima de EcoR I 0.14 μ L (Kit de promega), 5 μ L DNA, 1 μ L Buffer H 10x, 3.6 μ L H₂O estéril, 0.14 μ L RNAsa y 0.1 μ L BSA , Y se tomaron 5 μ L de esta mezcla y se le añadió 5 μ L de plásmido por cada tubo, esto se incubó por 2 horas a 37°C. Mediante electroforesis en gel de agarosa se corrió los productos de la digestión teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz UV.

H. ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Preparación de suspensión de microorganismos

Se preparó una suspensión de microorganismo cultivando las diferentes bacterias en medio sólido para utilizarse, se sembró una colonia en 5 ml de medio líquido e incubó hasta encontrarse saturado el medio. Se centrifugó 1.5 ml del cultivo a 12000 rpm por 1 min, y se eliminó el sobrenadante, posteriormente, la pastilla se mezcló con 5 ml de buffer de fosfatos de potasio 0.05M pH 7 estéril y se realizó diluciones seriadas a 1:10, 1:100, 1:1000, 10000, 1:100000, 1:1000000. Posterior se agregó 10 μ l de cada dilución en medio sólido (triplicado cada disolución), hasta absorberse, ya seco se dejó incubar la noche a 25°C. Posteriormente se contaron las colonias en la dilución con 20 y 60 colonias para calcular el título de microorganismos en unidades formadoras de colonia por ml (UFC/ml), para obtener un título de 10⁶ UFC/ml. Utilizando la fórmula

$$UFC/ml = (\text{número de colonias} / 10 \mu l) \times 1000 / (\text{factor de dilución})$$

Exposición de microorganismos al agente antimicrobiano

En 4 tubos diferentes se colocó 1000 μl de la suspensión de microorganismos a un título de 1×10^6 UFC/ml, se agregó las siguientes cantidades de agente antimicrobiano: 1 mg Nanopartículas de acelga, 1 mg Nanopartículas de rábano, 1 mg Nanopartículas de albaca y 0.5 μl Microdin(+) a excepción de dos tubos que solo se agregó 900 μl individualmente se agregó 100 μl de péptidos antimicrobianos a un tubo y 100 μl Buffer de fosfatos(-) a otro, se mezclaron y se incubaron a 25°C con agitación a 150 rpm. Se realizó esta maniobra agregando 10 μl por triplicado en los diferentes tiempos (1, 2, 4, 8 y 24 hr) y se contó las colonias desarrolladas y se calculó la inactivación logarítmica expresada en unidades logarítmicas (U log), utilizando la fórmula:

$$U \log = \log_{10} (N/N_0) \quad (2)$$

donde N_0 representa las UFC/ml iniciales y N la UFC/ml sobrevivientes al tratamiento.

III. RESULTADOS

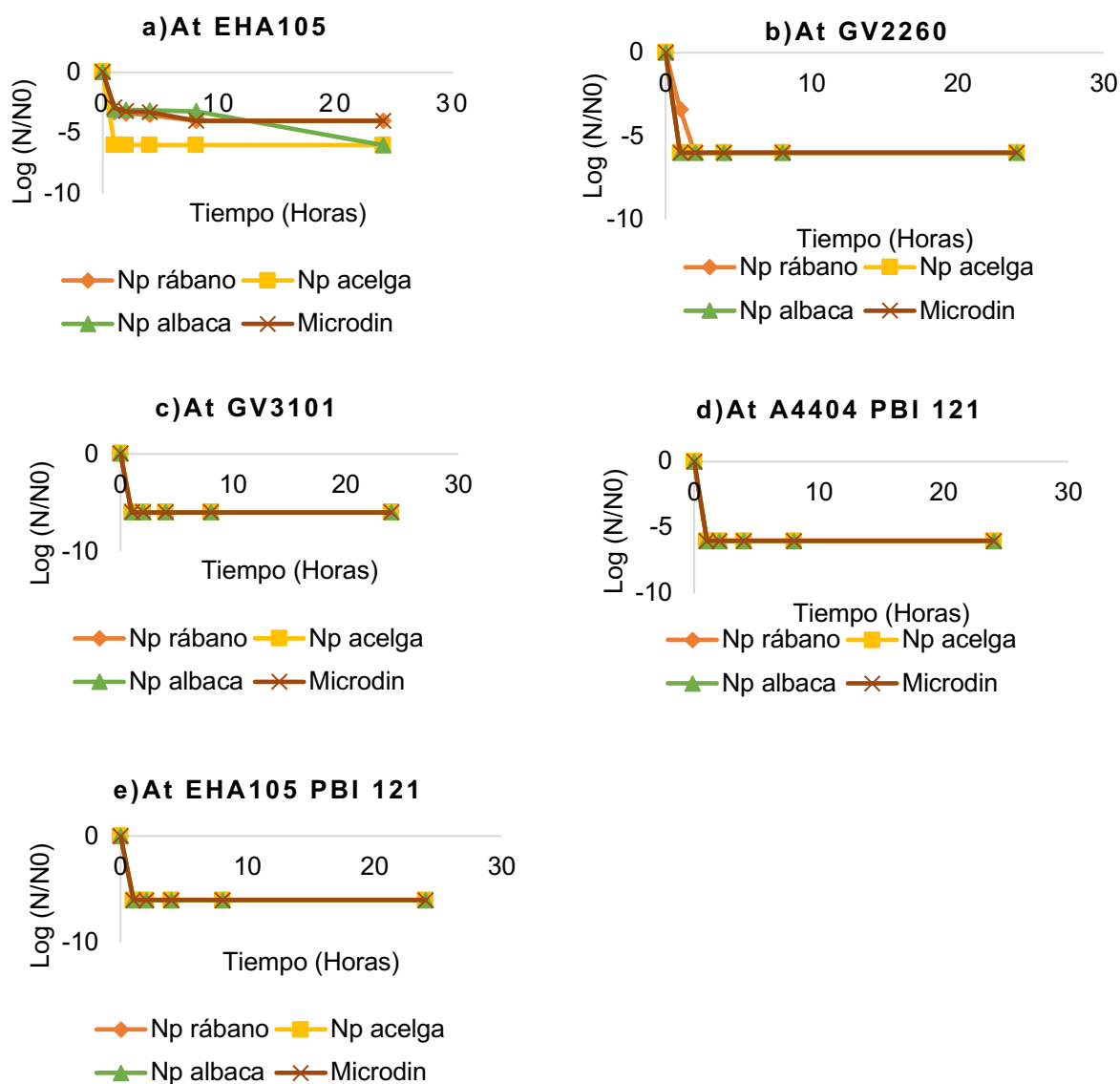


Figura 1.-Evaluación de actividad antibacteriana en las cepas: a) At EHA105, b) At GV2260, c) At GV3101, d) At A4404 PBI 121 y e) At EHA105 PBI 121. Np: Nanopartículas.

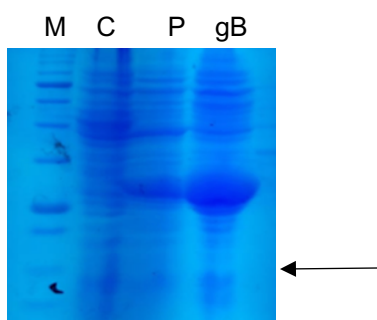


Figura 2.-Expresión de la proteína del gen sintético Mo-Flo. La flecha en la figura indica la proteína recombinante Mo-Flo (gB) gBlock/pET32 inducida IPTG/ 24 h. M) Protein Marker 5-245 kDa, C) control; bacterias sin Mo-Flo, P) Pet32 inducida IPTG/24 h.

IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Respecto al análisis funcional del gen sintético Mo-Flo, éste no mostró efecto inhibitorio con todas las cepas bacterianas evaluadas. Esto en parte pudo ser debido a una poca cantidad de las proteínas totales o a la falta de evaluación de la proteína purificada.

Sin embargo, con las nanopartículas aplicadas en casi todas las cepas de *A. tumefaciens*, se observó un efecto inhibitorio progresivo del crecimiento en los intervalos de tiempos de cada muestra hasta lograr una completa inhibición a las 24 horas de exposición. En la cepa *At GV2260*, se observó un efecto inhibitorio a partir de los 60 min y logrando una completa inhibición a los 120 min de exposición. Para las cepas: *At GV3101*, *At A4404 PBI121* y *At EHA 105 PBI 121*, se obtuvieron resultados eficientes a partir de los 60 min de exposición, ejerciendo una fuerte actividad bactericida al lograr una completa inhibición.

V. CONCLUSIONES

En este proyecto se propuso realizar la obtención de péptidos antimicrobianos e insertarlos en un vector de clonación y expresión para tener la posible producción de proteínas con dicho efecto. Con la finalidad de evaluar estas proteínas, se realizaron pruebas antimicrobianas con el compuesto obtenido en diversas cepas. Los resultados obtenidos no mostraron inhibición a estas bacterias, pudiendo deberse a la aplicación del compuesto sin purificar.

VI. RECONOCIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Aguascalientes y al CONACyT por las facilidades y el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano.

REFERENCIAS

- [1] World Health Organization, Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Available at: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en>, 2014.
- [2] G. Alberto-Téllez, J.C. Castaño, Antimicrobial peptides, ed. Infectio. Armenia, Colombia, 2010.
- [3] M Á Serra-Valdés. Microbial resistance in the current context and the importance of knowledge and application in antimicrobial policy, Rev Habanera de Ciencias Médicas, 2017 ISSN 1729-519

- [4] K Muñoz-D, G J. Arango-A., M C. Jaramillo-F. Los Antibióticos Y Su Situación Actual, Revista De La Facultad De Química Farmaceutica, Medellín – Colombia. 2019

Papel de los canales BK_{Ca} del músculo liso en la contracción de la arteria mesentérica en ratas con síndrome metabólico. Estudio piloto

Ashley Michelle García Luis

Universidad Autónoma de Aguascalientes
Facultad de Medicina
Av. Universidad 940, C.U.
C.P. 20130, Aguascalientes, Ags.
ashleyglm@outlook.com

Asesor: Dr. Ricardo Espinosa Tanguma

Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Medicina
Av Venustiano Carranza 2405, Lomas los Filtros,
C.P. 78210, San Luis Potosí, S.L.P.
espinosr@uaslp.mx

Resumen — El papel de los canales BK_{Ca} en la regulación de funciones microvasculares es ampliamente conocido, sin embargo, no se han determinado los cambios funcionales bajo la influencia del síndrome metabólico.

Se estableció un grupo MetS y durante 8 semanas se indujo una dieta hipercalórica, se realizaron experimentos de tensión isométrica en anillos de arteria mesentérica siguiendo un protocolo en el cual se evaluó la función de los canales BK_{Ca} utilizando el activador del canal NS1619 y se comparó la respuesta de relajación entre el grupo MetS y control.

Se logró apreciar una reducción en la respuesta del canal en el tejido proveniente de la rata con MetS, en comparación con el tejido proveniente de la rata control en este estudio piloto.

Palabras clave — canales BK_{Ca} , síndrome metabólico, células musculares lisas, disfunción microvascular, canales de potasio.

Abstract — The role of BK_{Ca} channels in regulation of coronary microvascular function is widely known but the functional changes underlying the deleterious influence of metabolic syndrome (MetS) have not been determined.

MetS group was established and for 8 weeks a hypercaloric diet was given, we conducted isometric tension on superior mesenteric artery rings following a protocol in which the function of BK_{Ca} channels was evaluated using NS1619 channel activator and we compared the relaxation response between MetS group and control group.

We appreciated a reduction in the response of the channel in the tissue from rat with MetS, compared to the tissue from the control rat in this pilot study

Keywords — BK_{Ca} channels, metabolic syndrome, vascular smooth muscle cell, microvascular dysfunction, potassium channels.

I. INTRODUCCIÓN

El síndrome metabólico (MetS) ha tomado un papel importante en los últimos años, debido a las múltiples complicaciones que implica su presencia. Si bien, el síndrome metabólico se define como un cuadro clínico que consiste en 3 o más de los siguientes criterios: circunferencia de la cintura de más de 102 cm (hombres) u 88 cm (mujeres), presión arterial $\geq 130/85$ mmHg, nivel de triglicéridos en ayunas ≥ 150 mg / dl, nivel de colesterol de lipoproteínas de alta densidad en ayunas < 40 mg/dl (hombres) o 50 mg/dl (mujeres) y nivel de glucosa en ayunas ≥ 100 mg/dl [1].

Cada componente del mismo, es un factor de riesgo independiente para la enfermedad cardiovascular y la combinación de estos eleva la tasa y gravedad de un espectro de afecciones cardiovasculares que incluye: disfunción microvascular, aterosclerosis

coronaria, infarto al miocardio e insuficiencia cardíaca. Se han logrado avances en la comprensión del mecanismo fisiopatológico este complejo trastorno, sin embargo, los mecanismos fisiopatológicos subyacentes para el desarrollo de la disfunción cardiovascular siguen siendo ambiguos.

En la actualidad, se sabe que existen diversos canales de potasio activados por Ca^{2+} , que se encuentran distribuidos en múltiples tejidos, tales como páncreas, vejiga, corazón y músculo liso vascular; de los cuales se han clasificado en 3 categorías de acuerdo a su conductancia: los de conductancia intermedia (IK_{Ca}), conductancia pequeña (SK_{Ca}) y los canales de gran conductancia denominados BK_{Ca} . Estos últimos, son los encargados de mediar diversos procesos fisiológicos y se ha descrito en la literatura su relevancia en la regulación del tono vascular, estos canales se activan mediante el aumento del Ca^{2+} intracelular mediado por receptores de rianodina presentes en el retículo sarcoplásmico, de manera que estos se ponen en contacto con los canales de BK_{Ca} permitiendo su activación, y así provocando el flujo de potasio al exterior de la célula generando la hiperpolarización de la misma y cerrando los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VDCC); este mecanismo le confiere al músculo liso vascular autolimitar la contracción y propiciar la vasodilatación [2]

Por lo tanto, la afección de este canal por diversos mecanismos podría tener repercusiones significativas en la regulación de procesos microvasculares.

En los últimos años, se ha visto que la actividad de estos canales está deteriorada en el músculo liso microvascular coronario de cerdos dislipidémicos y microvasos mesentéricos de ratas resistentes a la insulina.[3]

De modo que se conoce que existe disfunción vascular, pero se conoce poco si estos canales BK_{Ca} están involucrados en esta disfunción. Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación es evaluar el impacto fisiológico que tiene el síndrome metabólico en la función del canal BK_{Ca} en un modelo experimental de MetS inducido en ratas wistar macho.

II. METODOLOGÍA

A. Modelo de síndrome metabólico

Se utilizaron 3 ratas wistar macho. Los criterios de inclusión al inicio de la dieta, para ambos grupos fueron: niveles de glucosa menores de 120 mg/dl, peso corporal total de $200\text{gr} \pm 50$ y ausencia de comorbilidades.

Se asignaron 2 grupos al azar, el grupo control ($n=2$) y el grupo con síndrome metabólico MetS ($n=1$); al grupo control se le sometió a una dieta estándar y al grupo MetS a una dieta alta en grasa (41.93% grasa, 34.31% carbohidratos, 10.49% proteína) durante 8 semanas.

Cada semana se estuvo monitorizando el peso corporal total y la glucosa en sangre. Al finalizar las 8 semanas se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa, la cual consistió en la administración de 2g/kg de solución glucosada al 50% directamente a la vía oral con una cánula y se tomó la glucosa sérica de la cola de la rata a los 30, 60 y 120 minutos.

Al finalizar las 8 semanas ambos grupos se sometieron a anestesia con pentobarbital sódico via intraperitoneal y se procedio a tomar una muestra sanguínea intracardiaca para valorar los parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol y trigliceridos), posteriormente se dispuso a hacer disección abdominal media en donde se movilizó el contenido intestinal para abordar la arteria mesentrica superior, se localizó y se aislo con pinzas kelly en su extremo proximal y distal, se dispuso a hacer resección la arteria mesentérica.

El contenido fue colocado en solución fisiológica (SFN): 135 NaCl, 47 KCl, 12 MgSO₄, 12 KH₂PO₄, 11 CaCl₂; para mantener la viabilidad del tejido. Posteriormente se limpio la arteria mesentérica superior (AMS) de la grasa pericolica, tejido conectivo y anexos bajo microscopio estereoscópico y se cortaron dos en anillos de la AMS de aproximadamente 2 mm de longitud.

Para el grupo control se realizo el mismo procedimiento quirúrgico y manejo de la AMS

B. Experimento de tensión isométrica

Se montaron 2 anillos de AMS por grupo, en donde se coloco en un extremo del anillo un filamento que se conecto al transductor de fuerza isométrica (GRASS FT03); y del otro extremo del anillo se coloco un gancho, el cual fue montado en la base del baño de órgano aislado que contenían SFN incubada previamente a 37°C.

Se aplicó una precarga de 0.5 g y se dejó estabilizar por una hora el tejido para determinar la tensión basal.

Para determinar la respuesta funcional del tejido se administró Fenilefrina (Phe) a una concentración de 0.01 mM por 10 minutos para establecer la respuesta del tejido. Se procedió a agregar Carbacol 0.01 mM por 5 minutos para verificar la presencia de endotelio funcional, el cual se determina si se produce relajación del tejido. Posteriormente se lavabo cada baño con SFN para enseguida aplicar nuevamente Phe 0.01 mM) por 15 minutos para determinar la respuesta máxima de contracción del musculo liso vascular, para determinar la presencia de los canales BK_{Ca} se aplicó el activador del canal NS1619 a una concentración de 0.01 mM por 15 minutos a un anillo mientras que al otro anillo se le aplico Etanol en la mismo volumen que el NS1619, ya que este es el vehículo en el cual se encuentra disuelto el fármaco.

Análisis estadístico: Los datos fueron obtenidos en el programa Tension y fueron analizados y graficados en GraphPad Prism[®] 5.0 y Microsoft Office Excel 2007.

III. RESULTADOS

A. Prueba de tensión y presencia de endotelio vascular

En cada figura se muestra la contracción en gramos (g) en el eje y, y el tiempo de aplicación del fármaco utilizado (eje x). En la figura 1, se muestran un ejemplo del registro de tensión obtenido al realizar el protocolo antes descrito en tejido obtenido de la rata control; en la primera aplicación de Phe se puede apreciar que el músculo liso vascular muestra una ligera contracción igual a 0.3 g mientras que en figura 2 la respuesta del músculo es de 0.2 g. En ambos casos se observa que al agregar el Carbacol se produce

una disminución de la tensión en el anillo, por lo cual se concluye que ambos anillos cuentan con endotelio funcional.

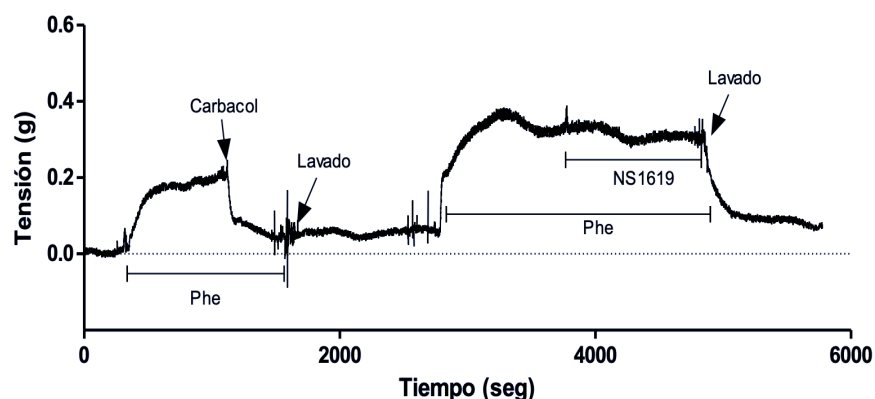


Figura 2. Grupo control: prueba de tensión realizada sobre anillo 1 en la arteria mesentérica. Aplicación de NS1619

B. Respuesta contráctil del músculo liso vascular entre el grupo control y grupo MetS

La figura 4 representa la respuesta del anillo arterial obtenido del grupo MetS, en el cual se puede observar que al momento de aplicar la Phe hay un aumento significativo en la tensión; esta acción es mediada por los receptores α_1 de la membrana provocando el aumento de los niveles de calcio intracelular, propiciando la despolarización de la membrana dando lugar a la contracción del músculo liso vascular. Sin embargo la contracción representada como tensión (g) es mayor en este grupo en comparación al grupo control (figura 2)

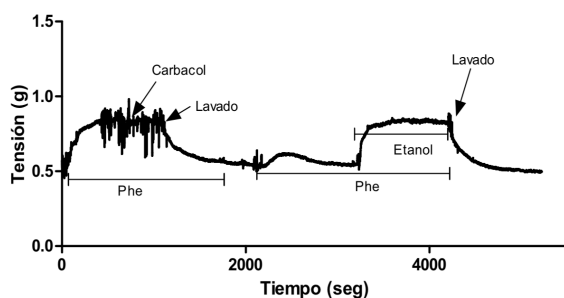


Figura 3. Grupo MetS: prueba de tensión realizada con el polígrafo sobre anillo 2 de la arteria mesentérica. Aplicación de etanol

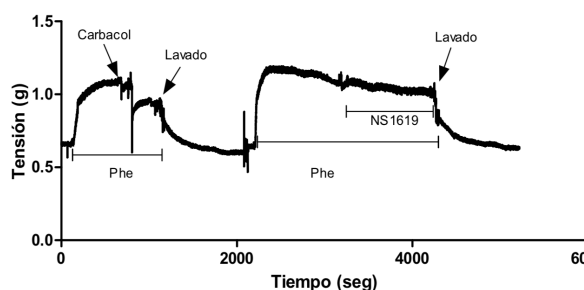


Figura 4. Grupo MetS: prueba de tensión realizada con el polígrafo sobre anillo 1 de la arteria mesentérica. Aplicación de NS1619

C. Tratamiento con NS1619

Al momento de aplicar el fármaco NS1619 la respuesta que se esperaría encontrar sería la hiperpolarización de la membrana al aumentar el flujo de salida de los iones de K^+ , lo que lleva a la disminución en el potencial de membrana y por lo tanto a la disminución de

la excitabilidad celular y/o la relajación del músculo liso, ya que actúa directamente sobre los canales BK_{Ca} [4].

En la actualidad aun no se conoce el mecanismo exacto del fármaco NS1619, no obstante se piensa que estan implicadas interacciones alostéricas entre el dominio de los poros que comprende la puerta de conducción de iones que propicia la activación de estos canales [5].

Se administró NS1619 para activar al canal BK_{Ca} en ambos grupos y se registraron para comparar la relajación tanto en el grupo control como en el grupo MetS. En la figura 5 se observa que el porcentaje de relajación (aproximadamente 20%) en el grupo MetS es menor en alrededor de un 10% en comparación con el grupo control (aproximadamente 30%), por lo que los datos hasta ahora indican una función disminuida de los canales de BK_{Ca} presentes en el músculo liso vascular perteneciente al grupo MetS.

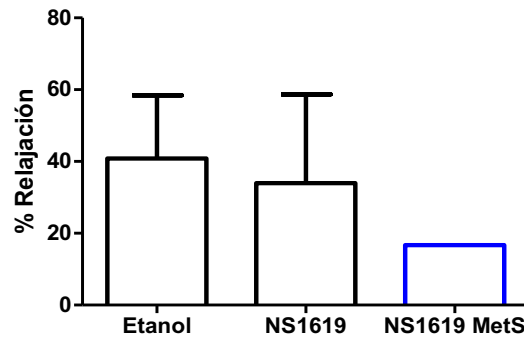


Figura 5. Porcentaje de relajación del anillo arterial entre el grupo control y MetS.

IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Por consiguiente, se sugiere que los canales BK_{Ca} se encuentran deteriorados en MetS lo que estarían disminuyendo la capacidad de relajación del músculo liso vascular debido a múltiples mecanismos asociados a cada uno de los componentes del mismo, que a su vez estaría propiciando la vasoconstricción mediada por los canales de Ca^{2+} activados por la acción de la Phe sobre los receptores α_1 , lo que explicaría la disminución en el porcentaje de relajación en el grupo MetS.

Bourbouse y col [3] realizaron un modelo in vitro con arterias coronarias de cerdos ossabaw con MetS, en donde se determinó la expresión funcional de los canales BK_{Ca} en el MetS, así como la presencia de Ca^{2+} intracelular.

Los hallazgos principales consistieron en una disminución en la función de los canales BK_{Ca} expresada en la reducción de la corriente del canal, acompañada de una vasoconstricción coronaria aumentada mediada por los canales de Ca^{2+} , lo que estaría explicando la respuesta obtenida en nuestro estudio.

Este canal esta compuesto por dos subunidades, la subunidades α (subunidad estructural) y subunidades β (subunidad reguladora).

Existen 4 fenotipos pertenecientes a la subunidad β , en el cual la subunidad β_1 se expresa en músculo liso y es capaz de mejorar la sensibilidad del canal al Ca^{2+} y esta estrechamente relacionada con la tensión del músculo liso vascular [4].

Es por ello que surge a la vez la interrogante de que probablemente algún componente del MetS se encuentre afectado al canal disminuyendo la expresion la subunidad β_1 , lo que este propiciando una alteración en la unión del calcio al canal evitando la acción del mismo y disminuyendo el proceso de relajación en el anillo arterial.

Pang y col [6] encontraron una disminución en la expresión de proteínas de la subunidad β_1 en el esfínter de oddi en un modelo de hipercolesterolemia, en donde el efecto se ve reflejado en la disminucion en la función del mismo para mantener la relajación. Esto tambien estaria explicando de igual manera la disminución significativa en la relajación en el grupo MetS en nuestro estudio.

Sin embargo, Amberg y cols [7] tambien señalaron que la expresión proteica de la subunidad β_1 disminuyó en pacientes con hipertensión, lo que redujo la sensibilidad del canal BK_{Ca} a Ca^{2+} y debilitó la corriente de K^+ ; esto tambien estaria explicando de cierta manera la disminución significativa en la relajacion en el grupo MetS en nuestro estudio, por lo tanto es necesario seguir investigando más posibilidades sobre la afeccion de esta subunidad.

V. CONCLUSIONES

Los hallazgos obtenidos en la presente investigación podrian respaldar la hipótesis de que la disfunción vascular en el síndrome metabólico reportada por otros grupos, puede estar relacionada con la disminución de la función del canal BK_{Ca} presentes en el musculo liso vascular. Sin embargo , se desconoce la naturaleza de la afección del canal BK_{Ca} , pero las posibilidades incluyen una disminución en la sensibilidad al Ca^{2+} inducida por la disminución en la expresión de la subunidad β_1 o una reducción en el número canales presentes en el músculo liso vascular.

A su vez , se podria relacionar entre síndrome metabólico y su afección a estos canales y como cada uno de los componentes del mismo, de manera aislada o en combinación son un agente potencializador contra los canales de K^+ (BK_{Ca}), a su vez considerar relevante el rol que toman estos canales en la regulación del tono vascular.

Por lo tanto, es muy importante estudiar los cambios en la expresión de proteínas de la subunidad β_1 del canal BK_{Ca} y es necesaria más investigación que nos permita identificar los mecanismos exactos involucrados en la afección de los mismos, para que en un futuro se establezcan estrategias de prevención que nos permitan disminuir las consecuencias irreversibles que conlleva el síndrome metabólico.

REFERENCIAS

- [1] Matthias Tschöp. (24 de junio de 2014). Microvascular dysfunction in the course of metabolic syndrome induced by high-fat diet. *Cardiovascular Diabetology* , 1, 1-11. 02 de julio de 2019, De *Cardiovascular Diabetology*.
- [2] Jaggar, J. H., Porter, V. A., Lederer, W. J., & Nelson, M. T. (2000). Calcium sparks in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 278, C235 – C256.
- [3] Lena Bourbouse (2009). Impaired function of coronary BKCa channels in metabolic syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297: H1629 –H1637, 2009.
- [4] Stephen T. O'Rourke. (2006). Large-conductance, calcium-activated potassium channels: Structural and functional implications. *Pharmacology & Therapeutics*, 110, 103-106.
- [5] Stefan H. Heinemann. (January 20,2012). Molecular mechanism of pharmacological activation of BK channels. *PNAS*, 109, 3552–3557.
- [6] Pang DU. (2006). Down Regulated Expression of the $\beta 1$ Subunit of the Big-conductance Ca^{2+} Sensitive K^{+} Channel in Sphincter of Oddi Cells from Rabbits Fed with a High Cholesterol Diet. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 38, 893-899.
- [7] Amberg GC, Santana LF. Downregulation of the BK channel $\beta 1$ subunit in genetic hypertension. *Circ Res* 2003, 93: 965–971

Polinomios Cromáticos

Ángel Alexis Barrera Vega

Universidad Politécnica de Querétaro
Carretera Estatal 420 s/n. El Rosario,
El Marqués, Querétaro, CP 76240 Querétaro
ing.angelbarreravega@gmail.com

Asesor: M. en C. Fidel González Gutiérrez

Universidad Autónoma de Querétaro
Cerro de las Campanas s/n, CP 76010
Querétaro, Querétaro, México.
{fglez,aglez}@uaq.mx

Resumen — El presente documento muestra el proceso de investigación de posibles aplicaciones de la teoría relacionada con polinomios cromáticos y cómputo científico. Tales como: teoría de grafos, coloreo de grafos y modelo de transporte.

De igual forma, se abordó una de las problemáticas más comunes dentro de instituciones; la gestión de la carga académica y generación de horarios, búsqueda de metodologías y aplicación de tecnologías para la resolución del problema mencionado anteriormente.

La aplicación de algoritmos matemáticos en el mundo del cómputo científico da como resultado la generación de heurísticas, las cuales, nos ayudan a resolver problemas que a simple vista son sencillos, pero que en un entorno de codificación podrían ser útiles de diferente manera y más complicados. Así, la importancia de saber qué lenguajes de programación son realmente útiles al trabajar con temas específicos y la viabilidad de que éstos trabajen en un mismo entorno.

Palabras clave — grafos, coloreo de grafos, algoritmos, planeación académica.

(Ayudan a a identificar los temas o aspectos principales del trabajo y son importantes para su indexación en bases bibliográficas. Deben ser de tres a cinco palabras clave, y pueden incluirse frases cortas que describan tópicos significativos del documento.)

Abstract — The present document shows the investigation process about possible applications about chromatic polynomials and scientific computing. Such as graph theory, graph coloring and transport model.

The investigation had an exclusive focus in one of the main problems in the university institutions day to day. The school schedule and its planning, methodologies research and the technology's application for the problem resolution previously mentioned.

The mathematics algorithms application in the scientific computing give us the result of different heuristics, which help us to solve problems that looks simple on the usual scholar environment; however, they are very complex on the coding world. There it is the importance of knowing different programming languages or having a big team of developers. All of this, to make every need work as it has to work

Keywords — graphs, graph coloring, algorithms, academic schedule.

I. INTRODUCCIÓN

El objetivo del presente documento es mostrar el proceso de investigación y desarrollo que se llevó a cabo para la codificación de una pieza de software dedicada a administrar, gestionar, auxiliar y predecir de manera inteligente la forma en la que se planifica una carga académica dentro de una institución.

En la mayoría de las instituciones existe un gran problema con la administración y planeación de la carga académica al tener una extensa y compleja información que hacen de ésta una tarea bastante tediosa, y muchas veces, es sometida a varios cambios fuera de tiempo. Algunos ejemplos de los datos que se deben de considerar en la carga cada periodo dentro de una institución son: infraestructura y su capacidad, demanda de una materia, disponibilidad y cantidad de profesores, materias de tronco común, alumnos regulares e

irregulares, cantidad de horas y horario disponible a la semana, el lugar y forma en la que se almacena la información.

Teniendo lo anterior en consideración, se planteó el problema de crear una herramienta que sea capaz de trabajar con toda la información que un administrador que conozca el funcionamiento de la institución le provea, y así, pueda planear de la forma más automatizada e inteligente posible cada programa que se desee planear.

Para el desarrollo de la aplicación se considero el problema de coloreo de grafos, un modelo matemático computacional que provee de las variables y condiciones necesarias para poder presentar una solución al problema de planeación escolar. Algunos algoritmos utilizados que se explican de forma más detallada en las siguientes secciones de esta documentación son: teoría de grafos y coloreo de grafos, así como problemas de asignación.

El cómputo científico aplicado a esta investigación y desarrollo está basado en tecnologías de inteligencia artificial, administración de bases de datos, “front-end” y “back-end” de desarrollo web.

II. MARCO TEÓRICO

La base de todo el software es la teoría de grafos, tanto para una predicción óptima de acuerdo a lo que determine el administrador, como para crear la conexión que pueda llegar a tener una materia con otra; ya sea por tener en común la misma facultad, misma carrera, salón o profesor. Por eso, es importante conocer un poco acerca de lo que habla su teoría.

- *“En términos elementales podríamos definir un grafo como un conjunto de puntos (llamados elementos, vértices, nudos o nodos) con líneas que unen pares de vértice de ellas; en algunos libros se usa red como sinónimo de grafo”.* (Álvarez Nuñez & Parra Muñoz, 2013)
- *“La teoría de grafos es un esquema que permite resolver muchos problemas interesantes y forman ya parte de la matemática actual”.* (Álvarez Nuñez & Parra Muñoz, 2013)

En la figura 1 se muestra un ejemplo de lo que representa un grafo $G = (V, E)$.

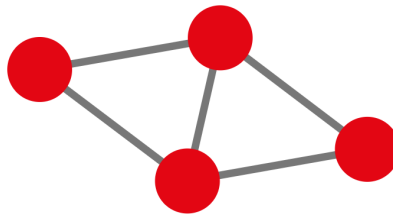


Figura 1 Grafo $G = (V, E)$

En el ejemplo anterior, cada círculo (V , vértice) representa un nodo, y cada enlace (E , arista) representa un enlace, que es lo que se utiliza como medio para tener comunicación entre los nodos.

Teniendo como base la introducción a lo que se conoce como un grafo, es importante remarcar lo que representa dentro de nuestro problema cada uno de estos elementos.

Este modelo matemático permitirá poder representar el problema que se aborda, un nodo representa una materia con características exclusivas pero no únicas; una materia puede tener el mismo profesor, la misma carrera, pero no el mismo salón, en este caso singular, la materia no puede impartirse al mismo tiempo si es que se tiene planeado que sea llevada por el mismo profesor, y esto a nivel interno podría ser caro en cuanto a tiempo dentro de la institución, pues, se deben de considerar todas variables dentro de este problema.

Por lo anterior, se implementó la teoría de coloreo de grafos para su solución, la cual es explicada a detalle después de su definición.

Fernandez Gallardo *et al* establecen en su obra la definición de coloreo de grafo “...además de un grafo G , dispondremos de una paleta de colores, esto es, un conjunto $S = \{a, b, . . .\}$ a cuyos elementos nos referiremos como los colores. Lo que realmente utilicemos (sean realmente colores, letras u otros símbolos) no será relevante, y, por supuesto, qué colores tampoco será significativo.

Una coloración de G con los colores de S consistirá en asignar a cada vértice de G un elemento de S , es decir, un color, de manera que los extremos de cada arista reciban colores distintos. No se trata de una coloración libre. Formalmente, una coloración de G con colores de S es una aplicación

$$\gamma = V(G) \rightarrow S$$

De forma que $\gamma(v) \neq \gamma(\omega)$ si $\{v, \omega\} \in A(G)$. El valor de $\gamma(v)$ que es el color que recibe el vértice v en la coloración” (Fernández Gallardo & Fernández Pérez, 2018).

En la figura 2 se muestra un ejemplo de coloreo de grafos, se utilizan las letras a, b, e para representar los colores utilizados en cada nodo del grafo. En la figura 2a se muestra el coloreo correcto para el grafo en donde dos nodos adyacentes no tienen la misma letra; por otro lado, en la figura 2b se observa que hay dos nodos adyacentes que tienen la misma etiqueta de color e lo cual no cumple con las características del coloreo de grafos.

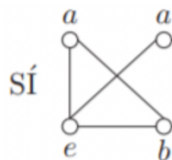


Figura 2a Coloreo correcto del grafo

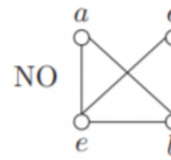


Figura 2b Coloreo incorrecto del grafo

A partir de la teoría del coloreo es como se planificó la forma en la que se debe colorear la información dentro de nuestro sistema. Sin embargo, el problema requiere de algunas limitaciones importantes a considerar para poder comenzar a colorear el grafo, los cuales se explicarán en el siguiente capítulo.

III. RESULTADOS, MATERIALES Y MÉTODOS

En esta sección se especificarán y detallarán los materiales y métodos que se utilizaron exclusivamente para el desarrollo de la herramienta, así como las tecnologías que fueron de utilidad para agilizar y optimizar el funcionamiento de la misma.

Cabe mencionar que todo lo utilizado en cada lenguaje de programación es de código abierto y no es necesario pagar por ningún tipo de licencia para el desarrollo de ésta misma. Sin embargo, puede haber opciones que puedan optimizar el funcionamiento bajo la estructura de algún framework o api que proporcione soporte.

Dicho esto, retomaremos la teoría de grafos para explicar la forma en la que el sistema fue codificado para poder tomar la decisión de cómo colorear e interpretar la información que está recibiendo.

Tomando como base el siguiente ejemplo se considera óptimo colorear: En nuestro grafo tenemos diferentes nodos, cada uno con atributos específicos que lo diferencian de todos los demás vértices a los que estará enlazado. En la figura 3 se muestran algunos de estos atributos para ejemplificarlo visualmente.

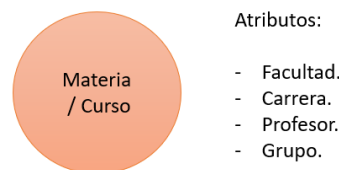


Figura 3 Atributos del nodo materia/curso

Este nodo estará conectado a otros diferentes nodos de acuerdo a los atributos que este contenga, y el enlace significará exclusivamente si la materia/curso se puede impartir en el mismo horario, o deberá de ajustarse su planificación en relación a la capacidad de la infraestructura, disponibilidad de personal y/o las horas disponibles en una semana normal de clases.

Consideremos el siguiente grafo de la figura 4:

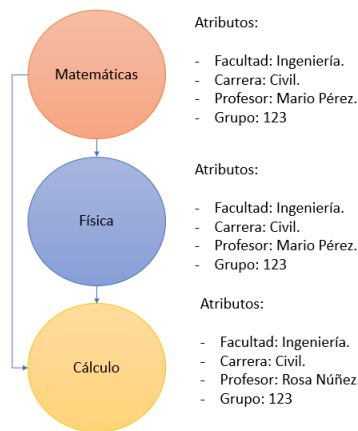


Figura 4 Grafo coloreado

Como podemos observar en la figura 4, tenemos 3 cursos con sus respectivos atributos y están conectados entre sí. De igual forma podemos ver que es un grafo que está coloreado, y cada nodo tiene un color diferente. Esto último quiere decir que cada una de las materias se deberá de dar en diferente horario debido a que estamos considerando que todas pertenecen a la misma carrera, facultad y grupo, así como dos nodos que tienen el mismo profesor.

Una de las condiciones de coloreo indica que, si los cursos pertenecen al mismo programa, automáticamente pasan a tener un enlace. Por lo tanto, cada nodo tendrá un color diferente en este ejemplo.

Ahora veamos en la figura 5, se tiene un nodo de Matematicas más que resulta ser un “clon” de nodo del grafo, es decir, representa la misma materia que otro nodo.

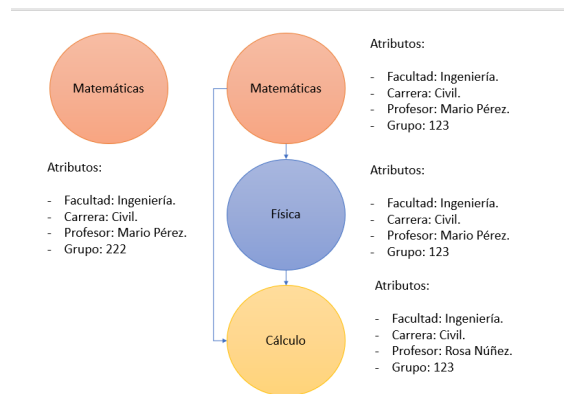


Figura 5 Proceso de clonación de materias

Considerando los atributos que tiene el nuevo nodo, podríamos concluir que al ser la misma materia y tener el mismo profesor, a pesar de ser requerida por otro grupo, no se puede dar a la misma hora, por esto no puede ser del mismo color que su materia base, y por lo tanto, se deberá impartir en otro horario, esta es otra de las reglas para colorear nodos. Otra regla dice que, si dos nodos representan una diferente materia, pertenecen a diferente grupo, pero tienen el mismo profesor, tampoco pueden ser del mismo color. Así que, no se podrían dar en el mismo horario. Con estos parámetros, el grafo quedaría como en la Figura 6.

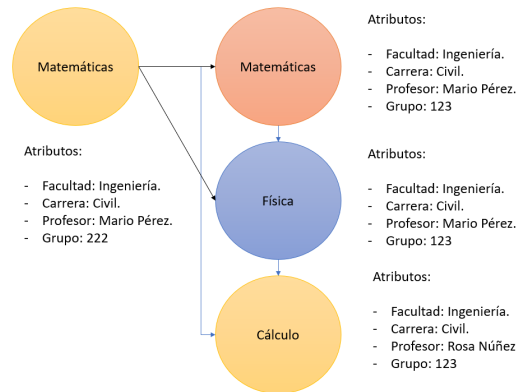


Figura 6 Proceso para agregar el nodo “clon” al grafo existente

Donde comparado con el último nodo, no es necesario un enlace, pues, al tener diferente profesor, representar un curso diferente y pertenecer a diferente grupo, ambas materias se pueden dar en el mismo horario. Cada color representa un “Cluster” dentro del sistema.

Para poder representar toda esta teoría en código, toda la información está guardada dentro de una base de datos MariaDB MySQL adaptada a las necesidades de la facultad que esté utilizando el software. Para poder visualizar esta información se utilizaron consultas por medio del lenguaje php, el cual, es la base fundamental para realizar las ejecuciones y guardar en arreglos cada uno de los datos que el administrador pasará. Posteriormente, la información obtenida se guarda en variables en el lenguaje Javascript, que posteriormente ejecuta un archivo dedicado del lenguaje php para crear, escribir y ejecutar un programa del lenguaje “Prolog”, el cual, es el que devuelve el resultado final del coloreo de nuestro grafo creado con nuestra información.

- *“Un arreglo puede definirse como un grupo o una colección finita, homogénea y ordenada de elementos” (Guerra., 2011).*
- *“PHP. Lenguaje de programación, interpretado, diseñado originalmente para la creación de Páginas web dinámicas” (php, s.f.).*
- *“MySQL. Sistema de gestión de base de datos relacional y multiusuario con más de seis millones de instalaciones” (EcuRed, 2010).*
- *“ProLog es un lenguaje de programación especialmente indicado para modelar problemas que impliquen objetos y las relaciones entre ellos. Está basado en los siguientes mecanismos básicos: unificación, estructuras de datos basadas en árboles y backtracking automático. La sintaxis del lenguaje incluye la declaración de hechos, preguntas y reglas.” (EcuRed).*

De este modo se soluciona el primer problema al que se enfrenta un administrador al gestionar su carga horaria.

El siguiente problema consiste en la asignación de aulas a las diferentes materias que se pueden llegar a elegir dentro de una interfaz, y para esto haremos referencia a la teoría del modelo de transporte.

Pineda establece en la teoría del modelo de transporte que “para desarrollar el modelo suponemos que conocemos los costos unitarios de transporte desde cada una de las plantas a cada uno de los centros de distribución, además de la oferta y la demanda en cada centro (determinar de dichos costos queda fuera del objetivo de este libro). El objetivo que perseguimos es minimizar los costos asociados con el transporte.”

Las variables de decisión las denotaremos por x_{ij} , la cual nos indica el número de bienes que serán transportados del origen i al destino j . Si además, c_{ij} son los costos por unidad trasladada del origen i al destino j , entonces la función que representa los costos de transporte de todas las unidades se calcula sumando el producto del costo unitario por el número de unidades transportadas desde cada uno de los orígenes a cada uno de los destinos, como se muestra en la ecuación 1 (Pineda, 2017).

$$Z_{min} = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n C_{ij} X_{ij} \quad (1)$$

Partiendo de la anterior teoría, nuestro modelo interpretado de forma visual sería la siguiente:

Tabla 1

Capacidad	Demanda			
	Física	Valores	Probabilidad	
Salón 1	8	13	6	28
Salón 2	25	30	23	45
Salón 3	10	15	8	30
Total	20	15	22	

Como se puede observar en la Tabla 1, se definen los costos dentro del modelo según la cantidad de alumnos que sobran al ser asignados a algún salón, y de este modo se busca minimizar los costos. Siendo explícitos, la materia se asigna al salón que menos costo genere.

IV. DISCUSIÓN (O ANÁLISIS DE RESULTADOS)

En conclusión, los problemas de aplicación de polinomios cromáticos pueden ser trasladados a un entorno digital codificado de manera efectiva para resolver problemas que tengan que ver con la toma de decisiones, al igual que su efectividad dentro de la automatización. Sin embargo, los algoritmos en ciertos casos específicos pueden llegar a ser un poco ambiguos en cuanto a su utilidad, y esto puede dar paso a diferentes formas inteligentes de dar una mejor respuesta al campo de estudio que se tomó en esta investigación.

La idea de tomar como entorno de prueba la problemática de las universidades fue para observar la efectividad y aplicación de algoritmos que necesitan tener datos procesados para poder arrojar el resultado más conveniente según el planteamiento en donde fue aplicado (en este caso el que provee dicha información es el administrador).

A pesar de lo anterior, es importante destacar que, en muchos casos, puede ser que no se llegue a la mejor solución por la cantidad de información compleja que se puede recibir, y que solamente se tenga que llegar a un resultado por medio de heurísticas de programación, en donde, depende del desarrollador la forma de llegar a la solución de dichos problemas que, entre casos de aplicación, pueden llegar a variar de forma significativa.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los modelos y algoritmos relacionados con los polinomios cromáticos aplicados a la toma de decisiones, reducción de costos y llevados a un entorno digital con el cómputo científico aplicado, son una gran opción para automatizar y resolver problemas complejos. La complejidad de una planeación para llevar modelos matemáticos a la codificación puede llevar todo un proceso de investigación para entender en qué situaciones puede llegar a ser eficiente o no el aplicar ciertos modelos matemáticos. Sin embargo, obtuvimos grandes resultados al observar que la forma en la que fueron aplicados estos algoritmos fue la

indicada para la resolución del problema planteado desde un inicio. La hipótesis inicial nos llevó a encontrar un campo más profundo de aplicación, en donde encontramos una forma creativa y de utilidad que puede ser investigada y llevada a mejores y más grandes resultados que los que se obtuvieron al encontrar que la automatización está basada en el reconocimiento de la información que la teoría de grafos puede brindar para la toma de decisiones en cualquier entorno.

Es importante destacar que el equipo que llevó a cabo la investigación contó con especialistas dentro del campo de investigación así como el desarrollador que se dedicó a interpretar los algoritmos y codificarlos según un plan de metas a alcanzar que seguirán haciendo crecer la aplicación que nació como el resultado de toda la investigación realizada en este último periodo en el verano de la ciencia 2019.

VI. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Es extendido un gran agradecimiento a la Universidad Autónoma de Querétaro y a la Universidad Politécnica de Querétaro por hacer posible la investigación. Todo esto siendo posible en conjunto de alumno e investigadores dedicados a realizar propuestas de solución a problemas complejos dentro del área de las ciencias de la computación a través de algoritmos matemáticos.

REFERENCIAS

- Álvarez Nuñez, M. F., & Parra Muñoz, J. A. (2013). Teoría de Grafos. Universidad del BÍO-BÍO. Facultad de Educación y Humanidades.
- EcuRed. (2010). EcuRed. Obtenido de <https://www.ecured.cu/Mysql>
- Fernández Gallardo, P., & Fernández Pérez, J. L. (2018). El discreto encanto de la matemática.
- Guerra.D.L. (2011). Arreglos. Obtenido de [https://www.ecured.cu/Arreglos_\(Informática\)_php](https://www.ecured.cu/Arreglos_(Informática)_php). Obtenido de www.php.net/
- Pineda, M. (2017). Modelo de transporte.

Predicción de zonas codificantes de miRNAs con Rstudio

Sara Lucía Toscano Alaniz
Universidad de Guanajuato (UG)
Lascuráin de Retana No.5, Col. Centro
Guanajuato, Gto., México
sl.toscanoalaniz@ugto.mx

Asesor: Cesaré Ovando Vázquez
Instituto Potosino de Investigación
Científica y Tecnológica (IPICYT)
Camino a la Presa San José 2055.
Col. Lomas 4 sección. San Luis Potosí S.L.P.
cesaremov@gmail.com

Resumen — En este proyecto se elaboró el prototipo de un código informático haciendo uso de técnicas de machine learning, específicamente con el programa Rstudio. Lo anterior con el fin de predecir zonas codificantes de miRNAs, dada una matriz con el genoma de un organismo de estudio. Para fines prácticos se utilizó como modelo *C. elegans*, con el cual el programa fue entrenado y puesto a prueba para cuantificar la eficacia del código. Se obtuvo una respuesta similar para los dos modelos generados tanto lineal como sigmoide, siendo el modelo de validación o de prueba aquél que presentó un mayor margen de error a comparación con el modelo de entrenamiento. Mostrando así una eficacia de predicción aceptada.

Palabras clave — bioinformática, learning machine, Rstudio, predicción miRNA.

Abstract — In this project, the prototype of a computer code was developed using machine learning techniques, specifically with the Rstudio program. The above in order to predict areas coding for miRNAs, given a matrix with the genome of a study organism. For practical purposes there was used *C. elegans* as a study model, with which the program was trained and tested to quantify the effectiveness of the code. A similar response was obtained for the two linear and sigmoid generated models, the validation or test model being the one that presented a greater margin of error when compared to the training model. Thus showing an accepted prediction efficiency.

Key words— bioinformatics, learning machine, Rstudio, miRNA prediction.

I. INTRODUCCIÓN

Recientemente se comprobó la existencia de ciertas cadenas cortas de ARN con una longitud aproximada de 21 nt, llamadas microARN (miRNA), a las cuales se les atribuye la habilidad, entre otras, de regular la producción de ciertas proteínas debido a que se adhieren a regiones de mRNA (RNA mensajero) imposibilitando su expresión. De esta manera, conociendo las regiones codificantes de miRNAs se puede generar mayor conocimiento para el tratamiento de enfermedades, como el caso del cáncer cuyos sitios genómicos se relacionan con los productores de miRNAs y por ello podrían intervenir en el desarrollo y alteración de dicho padecimiento [1].

No obstante, la identificación de los miRNAs representa un reto debido a su bajo porcentaje entre todas las cadenas cortas de RNA además de su fácil degradación. Para los científicos experimentales esto representa mayor inversión de tiempo, materiales y por ende, costo monetario. Por ello, el empleo de técnicas bioestadísticas representa una solución práctica. En el caso de los miRNAs se pretende su identificación a través de la asignación de valores únicos que confieren a estas cadenas características distinguibles a

otras cadenas cortas de RNA, haciendo una comparación entre todas ellas para lograr una selección lo más acertada posible.

En la implementación de tecnología tipo machine learning se han desarrollado ciertos programas que permiten llegar a resultados similares, los cuales se rigen bajo métodos como random forest [2].

II. MARCO TEÓRICO

Para comprender la función de los miRNAs se debe entender la biogénesis de los miRNAs, la cual se lleva a cabo en el núcleo celular siendo procesados por una proteína llamada Drosha. El transcripto primario o pre-miRNA generado es posteriormente transportado hacia el citoplasma gracias a la molécula de exportina 5. Una vez en el citoplasma son procesados por otra proteína llamada Dicer y por RISC (*RNA Induced Silencing Complex*), el cual es un complejo silenciador inducido por RNA que causa la represión de mRNA [3].

Por otro lado, las técnicas de Machine learning [4] permiten entrenar un programa computacional para fines múltiples y específicos de acuerdo a los intereses del programador. Una de las características que se atribuye a esta aplicación es inteligencia artificial, es decir la habilidad de aprendizaje automático que permite a los sistemas mejorar a partir de la experiencia sin ser programado explícitamente. Esto se logra haciendo uso de datos para aprender por sí mismos. En este caso se ejemplifica la estructura primaria de una cadena de RNA con la utilización de los símbolos paréntesis y puntos (“(”, “)”, “.”). Brindando así a Rstudio caracteres que puede manejar.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

PC con instalación de: Windows (o cualquier otro software que sea compatible con Rstudio), R, Rstudio y genoma de *Caenorhabditis elegans* obtenido de la base de datos electrónica: Wormbase.

Se creó un prototipo de algoritmo en Rstudio que permite la predicción de zonas codificantes de miRNAs. Se proporcionó al programa una matriz con la información de las secuencias de RNAs no codificantes (ncRNA), entre las cuales se encuentran las siete clases: Inc_RNA, miRNA, pre_miRNA, rRNA, snRNA, snoRNA y tRNA. Después, se seleccionaron los valores etiquetados como pre_miRNAs y se entrenó el código, el cual posteriormente fue probado.

IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se cargó a Rstudio una matriz con la información de las secuencias de RNAs no codificantes (ncRNA) (*Figura 1*). Posteriormente se convirtió a un data frame y se calculó la correlación entre dos columnas.

Se realizó una correlación de todas las variables, para visualizarlo se generó un heatmap para el cual la desviación estándar (sd) se estableció como cero, por ello en la imagen generada no se observó ninguna variación, sino una línea recta diagonal. (*Figura 2*).

Posteriormente se seleccionaron todas las filas con la etiqueta de “pre_miRNA” y se les asignó el carácter “1” para todos esos valores y así facilitar su selección entre todos los datos.

Con la data frame se generó una tabla con valores “x” y “y” con lo que se realizaron pruebas de error y entrenamiento.

Con base a lo anterior se elaboraron los modelos: lineal y sigmoide (Figura 3) así como se obtuvieron sus errores y los conteos tanto para modelo de entrenamiento y el de validación (Tabla 1).

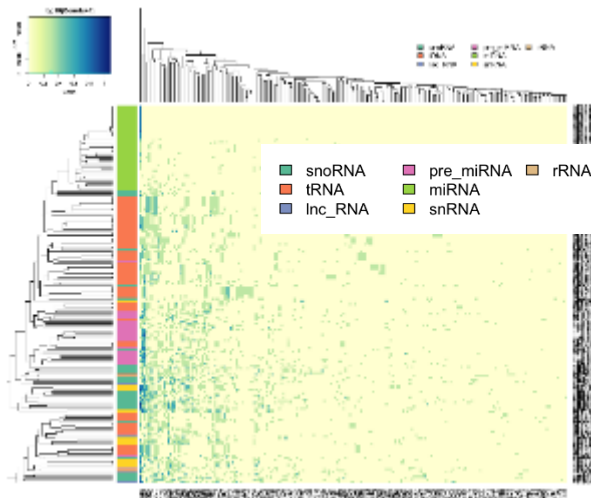


Figura 1. Matriz de las 7 clases de RNAs.

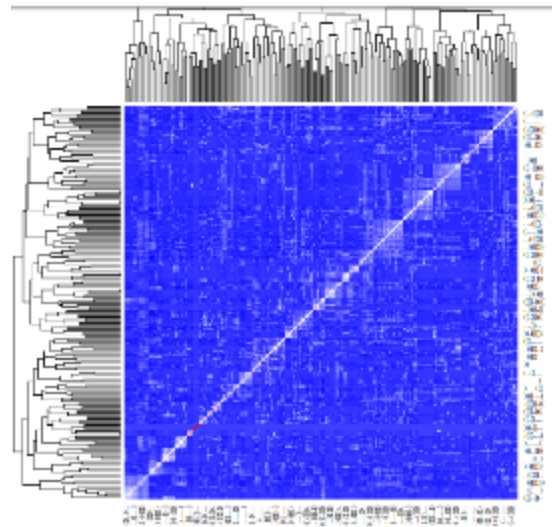


Figura 2. Heatmap de las correlaciones de todas las secuencias de ncRNAs. sd=0

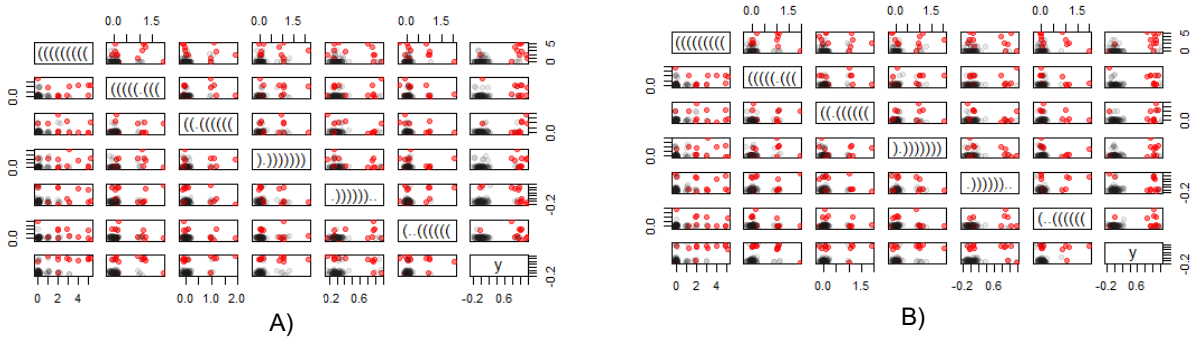


Figura 3. Plots A) Modelo lineal (modelL) B) Modelo Sigmoide (modelS)

Se realizó una tabla de validación y se calculó la correlación entre los dos modelos (Figura 4). Se realizó un PCA (Principal Component Analysis) en el cual se adjuntaron 6 componentes (Figura 4), de manera de en el siguiente paso se realizó una tabla de validación de pca. Se realizó una comparación entre las dos tablas: tabpca y tabVpca para calcular su correlación. Finalmente se predijeron valores usando ambos modelos (Figura 5).

Tabla 1.	
errorTL	0.06
errorTS	0.06
errorVL	0.11
errorVS	0.1

Tabla 2.							
		FALSE	TRUE				
contTL	0	84	2	contVS	0	84	3
	1	4	10		1	7	6
contTS	0	84	2				
	1	4	10				
contVL	0	83	4				
	1	7	6				

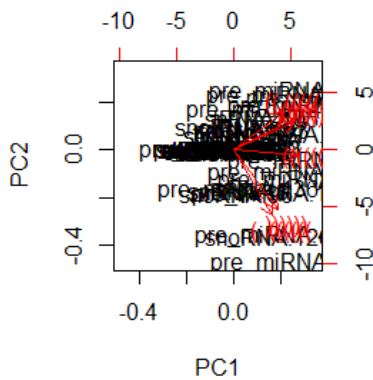


Figura 4. PCA (Principal Component Analysis) de pre_miRNAs

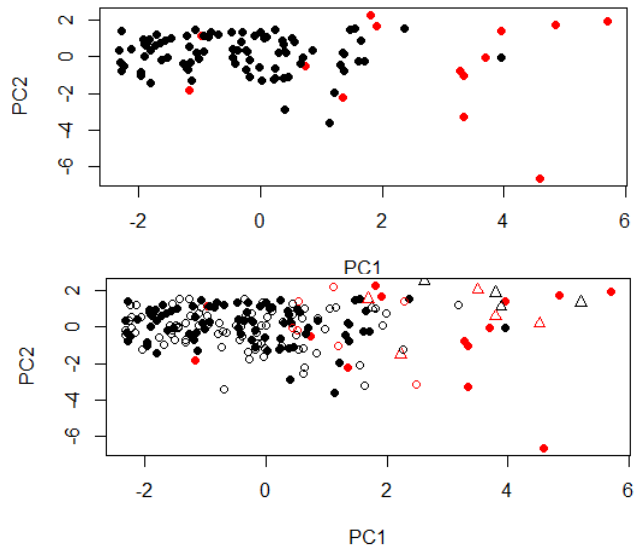


Figura 5. Correlación de tabpca (PC1) y tabVpca (PC2). **A)** tabpca (triángulos delineados) **B)** tabVpca (símbolos coloreados); los puntos rojos en PC2 representan los miRNAs “verdaderos” y los puntos negros los miRNA “falsos”. En PC1 los puntos rojos son los miRNAs “verdaderos” y los negros el programa los supone como “verdaderos”.

Por lo expuesto en la Figura 5 el programa para el PC1, es decir, el modelo de entrenamiento considera ciertos patrones de caracteres como si fuesen pre_miRNAs ya que los engloban con las características dadas por el entrenamiento.

Así pues entre los modelos lineal y sigmoide existe una diferencia mínima en cuanto al margen de error que presentan, no obstante, el modelo de validación tiene un valor de 0.11 a comparación del error de entrenamiento el cual es menor con un valor de 0.6. El hecho de haber obtenido mayor error en el modelo de prueba era esperado debido a que un modelo que cumpla especificaciones casi perfectas o con mínimo de error es estadísticamente fallido puesto que se trata de un modelo muy específico.

V. CONCLUSIONES

Dado el extenso carácter del genoma de los organismos es complicado estudiar en específico algunas situaciones de interés, por ello el desarrollo de nuevas técnicas para el estudio de secuencias específicamente herramientas bioestadísticas conllevan una ventaja experimental y monetaria. El desarrollo de software que tenga aplicaciones prácticas en materias como la biología molecular facilita además el conocimiento a otras áreas como la ingeniería genética y el desarrollo en general de la biotecnología. En este caso la importancia de la innovación es mejorar una función para acercarse a un modelo cada vez más óptimo.

VI. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Al IPICYT que permitió mi estancia en sus salones y hacer uso de su materia y servicios. A la UG por brindarme apoyo económico y darme la oportunidad de participar en el Programa de Verano de la Región Centro.

Con admiración, al Dr. Cesaré Ovando por sus atribuciones, por ser guía y fuente inagotable de paciencia.

REFERENCIAS

- [1] Fabián Flores , Miguel Ángel Martínez , Catalina Arenas, Alejandra Covarrubias y José Luis Reyes. (2007). ¡SILENCIO MENSAJEROS! QUÉ SON Y CÓMO ACTÚAN LOS MICRORNAS. 2007, de UNAM Sitio web:
http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb/numeros/2007/04/h_3erArticulo.pdf
- [2] Dimitrios M. Vitsios¹, Elissavet Kentepozidou¹, Leonor Quintais¹, Elia Benito-Gutierrez ², Stijn van Dongen¹, Matthew P. Davis^{1,*} and Anton J. Enright. (Septiembre 20, 2017). Mirnov: genome-free prediction of microRNAs from small RNA sequencing data and single-cells using decision forests. 2019, de Editorial Decision Sitio web:
file:///C:/Users/Sara/Downloads/gkx836.pdf
- [3] Y. Vladimir Pabón-Martínez. (3 de Octubre de 2011). MicroARNs: una visión molecular. 2019, de Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud Sitio web:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-08072011000300010
- [4] Alex Smola and S.V.N. Vishwanathan. (2008). Introduction to Machine Learning. 2019, de College of Engineering and Computer Science Australian National University.

Preparación de microemulsiones (MEs) de transanetol (TANE) y aceite esencial de menta (MEN) para la encapsulación de curcumina (CUR)

Liliana Sofía Farías Vázquez
Universidad Autónoma de Coahuila
Blvd. Venustiano Carranza s/n
Col. Republica Oriente
C.P 25280 Saltillo, Coahuila
lilif397@gmail.com

Asesor: René Darío Peralta Rodríguez
Centro de Investigación en Química Aplicada
Enrique Reyna H. No. 140, San José de los
Cerritos, 25294 Saltillo, Coahuila.
rene.peralta@ciqa.edu.mx

Resumen — En el presente trabajo se realizó la preparación de microemulsiones de TANE y MEN utilizando Tween 20 como tensioactivo. A las MEs se les incorporaron hasta 3 mg de CUR por ml de ME; ambas presentaron valores de diámetros promedio de partículas de entre 12 – 13 nm y potencial zeta de entre – 11 a - 47 mV.

Palabras clave — Microemulsion, aceite, tensioactivo.

Abstract — In the present work, trans-anethole and peppermint oil microemulsions were prepared using Tween 20 as surfactant. Later, 3 mg/ml of CUR were incorporated into these MEs. Both MEs presented values of average particles diameters between 12-13 nm and zeta potential values between -11 to -47 mV.

Keywords — Microemulsion, oil, surfactant.

I. INTRODUCCIÓN

Existen fármacos lipofílicos, que a consecuencia de esta característica presentan muy baja biodisponibilidad dentro del organismo; una de las posibles alternativas para mejorar su solubilidad podría ser acarrear estos fármacos en agentes de transporte, como emulsiones, liposomas nanoemulsiones y MEs [1]. Estas últimas (MEs), son sistemas compuestos de aceite, tensioactivo y agua; son visualmente transparentes, termodinámicamente estables, presentan baja viscosidad y tamaño de partícula pequeño; debido a estas propiedades las MEs, son consideradas uno de los sistemas con mayor potencial para ser utilizados como vehículos líquidos para transporte de fármacos tanto hidrofóbicos como hidrofílicos [2]. Los fármacos al ser de naturaleza hidrófoba presentan limitantes, tales como problemas de disolución y baja absorción por lo que para lograr incorporarlos dentro de sistemas como las MEs, algunos investigadores han utilizado compuestos lipófilos como aceites esenciales para mejorar estas desventajas [1].

En el presente trabajo se prepararon MEs a base de aceite esencial de menta (extraído de la planta *Mentha piperita* L.), el cual es utilizado para tratar desordenes estomacales y como fuente principal de mentol [3]; también se prepararon MEs con el compuesto transanetol (extraído del aceite esencial de anís), el cual es eficiente para cubrir olores, por ello sus aplicaciones en jabones y pastas de dientes [4]. A las MEs se les incorporó el compuesto curcumina (extraída de la planta *Curcuma Longa* L.), la cual es conocida por sus propiedades medicinales, como protección y tratamiento en afecciones cutáneas y digestivas; además es utilizada para aromatizar alimentos y posee propiedades cosméticas [5].

II. MARCO TEÓRICO

A. ¿Qué es una microemulsión?

Las MEs son dispersiones isotrópicas transparentes, termodinámicamente estables de aceite y agua estabilizadas mediante el uso de tensioactivos; estos sistemas presentan diámetros de partícula promedio entre 2 y 50 nm y pueden tener diferentes estructuras (esférica, cilíndrica, plana o en forma de esponja), dependiendo de las proporciones de los componentes. Algunas de sus aplicaciones son como membranas líquidas en extracción de metales pesados y en la industria cosmética, agroquímica y de los alimentos [6].

B. Tipos de microemulsión

En base a su estructura, hay tres tipos de microemulsiones:

- Aceite en agua (O/W) las gotas de aceite están dispersas en la fase acuosa.
- Agua en aceite (W/O) las gotas de agua están dispersas en la fase de aceite.
- Microemulsiones bi-continuas, las cantidades de agua y aceite son iguales [7].

C. Componentes de un sistema de microemulsión

Una microemulsión está compuesta por:

- Aceite: Es uno de los componentes más importantes en la formulación debido a que solubilizar al fármaco hidrófobo que puede ser incorporado a la ME para su transporte. El aceite es seleccionado de acuerdo a la solubilidad del fármaco en cuestión; esto permitirá que la cantidad del fármaco en la formulación sea adecuada para ejercer el efecto terapéutico deseado y en general, los aceites más utilizados son los ácidos grasos saturados, insaturados y esterificados [7].
- Fase acuosa: su pH se encuentra entre 7-8.
- Tensioactivos: Son sustancias anfifílicas, que están compuestas por una parte lipofílica generalmente un radical hidrocarbonado y una parte hidrofílica o polar que en general presenta grupos oxigenados. Estas moléculas anfifílicas en contacto con solución acuosa, presentan a menudo un fenómeno de auto asociación, lo cual minimiza la superficie de contacto entre las partes hidrófobas del tensioactivo y el solvente acuoso formando una estructura llamada micela; estas micelas se forman a partir de cierta concentración del tensioactivo en donde la fase acuosa se satura y pueden contener decenas y centenas de moléculas de tensioactivo; a esta concentración se le conoce como concentración micelar crítica o CMC [8]. Existen diferentes tipos de tensioactivos y se clasifican como no-iónico, zwitterionico y iónicos (catiónico y aniónico). Sin embargo, los tensioactivos no-iónicos son mayormente aceptados para fines farmacéuticos. En esta categoría se encuentra la familia de los Tweens [7]. Además de los tensioactivos, existen componentes que pueden ayudar a que la película interfacial entre el tensioactivo y la fase acuosa tenga suficiente flexibilidad para formar microemulsiones en una amplia gama de composiciones y

generalmente son alcoholes de cadena corta (etanol) y media (aminas) [4]. Estos compuestos se conocen como co-tensioactivos.

D. Diagrama ternario/pseudoternario de fases

Un diagrama pseudoternario de fases es elaborado para conocer las regiones de microemulsión presentes en el sistema. Este está representado por un gráfico triangular en donde las esquinas del mismo representan el 100 % de cada componente (agua, aceite y tensioactivo/co-tensioactivo). En caso de que una fase turbia sea seguida por una fase clara y transparente, los resultados deben ser marcados como puntos en el diagrama; las áreas cubiertas por estos puntos son consideradas como regiones de microemulsión existentes [9].

E. Microemulsiones como sistemas de encapsulación de fármacos

Algunas de las ventajas que presentan las microemulsiones como agentes transportadores de fármacos son: el poder solubilizar/incorporar fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos; su preparación es sencilla; no requieren mucha energía; pueden aumentar la eficiencia de encapsulación y biodisponibilidad de un fármaco; por su tamaño pequeño de partícula el fármaco puede no ser detectado por el sistema inmune. Sin embargo también se pueden presentar algunas desventajas como el requerimiento de grandes cantidades de tensioactivo para alcanzar su estabilidad; así como factores como temperatura y pH que pudieran afectar la misma [7].

III. METODOLOGÍA

A. Construcción de diagrama ternario/pseudoternario de fases

En viales de 4 ml se prepararon mezclas de H₂O/TANE en diferentes relaciones (99/1, 97/3, 95/5, 90/10, 85/15, 80/20; 70/30) proporcional a agua/aceite. Posteriormente, los viales fueron colocados dentro de un reactor enchaquetado de vidrio; manteniéndolos en agitación magnética y a temperatura constante (37 °C). A cada uno de los viales (en experimentos separados) se le agregó por goteo los tensioactivos: Tween20, Triton X-100 y la mezcla de Triton X-100 y mono propilenglicol. Para el sistema con MEN, el diagrama se realizó solo con el tensioactivo Tween 20, utilizando la metodología descrita anteriormente. En cuanto a las MEs de TANE/TW80/H₂O y TANE/TW20-AOT/H₂O se prepararon mezclas en diferentes relaciones (99/1, 97/3, 95/5, 90/10, 85/15, 80/20; 70/30) proporcionales a agua/tensioactivo. Posteriormente, los viales fueron colocados en el reactor enchaquetado de vidrio, con la misma temperatura y agitación que la metodología descrita anteriormente, dosificando por goteo el TANE.

B. Preparación de MEs

Los resultados obtenidos se graficaron en el programa "Origin 9.1". Se seleccionó un punto que estuviera dentro de la región de microemulsión o/w. En base a este punto se realizaron las MEs de los dos diferentes aceites (MEN y TANE) utilizando Tween 20 como tensioactivo.

C. Encapsulación de activos dentro de las MEs.

Para realizar las pruebas de encapsulación de activos, de un lote de cada microemulsión (TANE y MEN) se tomaron 2 muestras por separado de 1 ml cada uno a las cuales se les incorporaron tres diferentes activos: CUR, Metotrexato (MTX) y Paclitaxel (PTX). A cada ml de ME se le agregó hasta 3 mg de CUR, 1 mg de MTX y 1 mg de PTX. Todos los viales se mantuvieron en agitación magnética durante 24 horas para dar lugar a su incorporación dentro de la ME.

IV. RESULTADOS

A. Construcción de diagrama ternario/pseudoternario de fases

De los diagramas ternarios/pseudoternarios de fases realizados con cinco diferentes tensioactivos/co-tensioactivos se pudieron obtener diámetros de partícula promedio de entre 4 a 173 nm; siendo con el sistema TANE/Triton X-100/H₂O, el que presentó una región de ME O/W más amplia; sin embargo mostró un tamaño de partícula mayor al requerido para aplicaciones farmacéuticas (<100 nm) [10]. Por ello se decidió realizar MEs con el tensioactivo Tween 20; el cual presenta una región más estrecha pero tamaños de partícula < 20 nm.

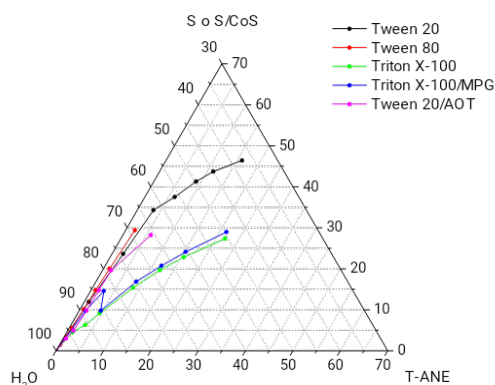


Fig. 1. Diagrama pseudoternario de fase representando las áreas de microemulsiones con los surfactantes TW20, TW80, TRITONX-100, TRITON X-100/MPG y TW20/AOT.

B. Preparación de MEs

Al realizar la ME TANE/TW20/H₂O se obtuvo una distribución de partículas bimodal; obteniendo el 75 % de partículas con un tamaño de 12.5 nm y un valor de potencial zeta de - 11.7 mV; mientras que para la ME MEN/TW20/H₂O se obtuvo una distribución de tamaño de partícula monomodal de 12.8 nm y un valor de potencial zeta de - 46.6 mV.

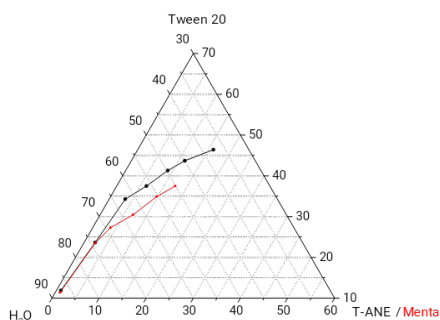


Fig. 2. Diagrama pseudoternario de fase representando las áreas de microemulsiones con las ME MENTA/TW20/H₂O (2/30/68) y TANE/TW20/H₂O (2/30/68).

C. Encapsulación de activos dentro de las MEs.

Las MEs se lograron cargar con el activo curcumina (CUR) en hasta 3 mg/ml de ME; mientras que los activos Paclitaxel (PTX) y Metotrexato (MTX) no lograron incorporarse dentro de las MEs. En la figura 3, se muestra la incorporación de estos activos en las dos diferentes MEs.

Una vez que se incorporó el activo CUR, a estas MEs se les determinó el tamaño de partícula y potencial zeta. Para el sistema TANE+CUR/TW20/H₂O se observaron distribuciones de tamaño de partícula bimodales; sin embargo para ME TANE+CUR/TW20/H₂O el 76 % de las partículas mostro un tamaño de 14.2 nm y un valor de potencial zeta de -7.1 mV; mientras que para ME MEN+CUR/TW20/H₂O el 85 % de las partículas mostro un tamaño de 13.3 nm y un valor de potencial zeta de -0.3 mV.

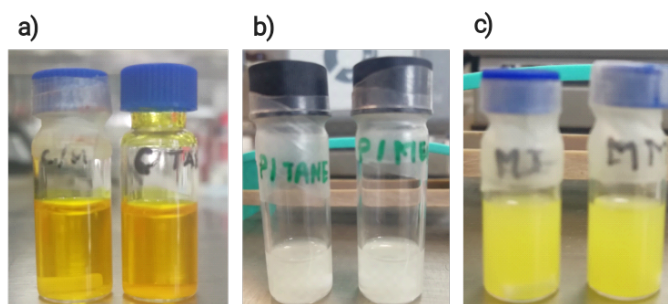


Fig. 3. a) ME MEN y TANE con CUR, b) ME MEN y TANE con PTX y c) ME MEN y TANE con MTX.

V. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se realizaron microemulsiones o/w con componentes biocompatibles, utilizando como fase oleosa el aceite esencial de menta y el activo trans-anetol, los cuales fueron capaces de incorporar hasta 3 mg de CUR por ml de ME. Se obtuvieron tamaños de partículas < 15 nm lo cual los hace ideales para ser utilizados como nanosistemas de transporte de activos (como la CUR). Estas MEs podrían ser útiles como precursores para realizar otros tipos de nanosistemas como nanopartículas núcleo – coraza o nanopartículas capa por capa.

VI. RECONOCIMIENTOS

Extiendo mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Coahuila y al Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) por el apoyo para realizar el presente trabajo. Además, quiero agradecerle al Dr. Rene Darío Peralta Rodríguez por la oportunidad otorgada de realizar esta participación y a la M.C. Cynthia Lizeth Barrera Martínez por asesorarme experimentalmente a lo largo de esta estancia. Asimismo agradezco al CONACyT, proyecto A1-S-46343, "Síntesis de microemulsiones utilizando surfactantes novedosos biocompatibles (gemini y bicéfalos) para la nano encapsulación de fármacos anticancerígenos."

REFERENCIAS

- [1] M. Nirmala, S. Allanki, A. Mukherjee And N. Chandrasekaran, Enhancing The Solubility Of Ramipril Using A New Essential Oil Based Microemulsion System, 4th Ed. Madras, Chennai: Centre For Nanobiotechnology, Vit University, Vellore, B department Of Biotechnology, Indian Institute Of Technology Madras, Chennai, 2013, P. 2.
- [2] M. Idrees, N. Rahman, S. Ahmad, M. Ali, and I. Ahmad, "Enhance transdermal delivery of flurbiprofen via microemulsions: Effects of different types of surfactants and cosurfactants.," Daru J. Pharm. Sci., vol. 19, no. 6, pp. 433–9, 2011.
- [3] A. Spornath and A. Aserin, "Microemulsions as carriers for drugs and nutraceuticals," Adv. Colloid Interface Sci., vol. 128–130, no. 2006, pp. 47–64, 2006.
- [4] F. Muzaffar, U. K. Singh, and L. Chauhan, "Review on Microemulsion as Futuristic Drug Delivery", International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, vol. 5, no. 3, 2014.
- [5] L. Garcia Ariza, J. Olaya Montes Quim, J. Sierra Acevedo And L. Padilla Sanabria, "Actividad Biológica De Tres Curcuminoides De Curcuma Longa L. (Cúrcuma) Cultivada En El Quindío-Colombia", Revista Cubana De Plantas Medicinales, Vol. 1, No. 22, Pp. 1, 3, 2017. Available: [Http://Scielo.Sld.Cu/Scielo.Php](http://Scielo.Sld.Cu/Scielo.Php).
- [6] V. Ghosh, S. Saranya, A. Mukherjee And N. Chandrasekaran, "Antibacterial Microemulsion Prevents Sepsis And Triggers Healing Of Wound In Wistar Rats", Colloids And Surfaces B: Biointerfaces, Vol. 1, No. 105, Pp. 152-157, 2013. Available: [Http://Www.Elsevier.Com/Locate/Colsurfb](http://Www.Elsevier.Com/Locate/Colsurfb).
- [7] S. Sruthi, D. P. S, R. Hema, K. Rajasekar, and L. P. S, "Microemulsion – Prophecy of Drug Delivery System," World J. Pharm. Pharm. Sci., vol. 3, no. 10, pp. 1800–1809, 2014.
- [8] J.-L. Salager, "Surfactantes en solución acuosa. Cuaderno FIRP S201-A," vol. 1, p. 22, 1993.
- [9] S. Kumar Jha, "Microemulsions-Potential Carrier for Improved Drug Delivery," Asian J. Biomed. Pharm. Sci., vol. 1, no. 1, pp. 5–9, 2011.
- [10] U. Aruna et al., "Role of Chitosan Nanoparticles in Cancer Therapy," Int. J. Innov. Pharm. Res., vol. 4, no. 3, pp. 318–324, 2013.

Producción de proteínas de fusión hIL-2 e hIFN- γ en *E. coli*

Monserrat Estefanía Marmolejo Sánchez

Universidad Autónoma de Aguascalientes
Centro de Ciencias Básicas Av. Universidad s/n
Ciudad Universitaria, C. P. 20131
Aguascalientes, Ags. México
Marmolejo19monse@gmail.com

Asesor: Antonio de León Rodríguez

Instituto Potosino de Investigación Científica y
Tecnológica-División de Biología Molecular
Camino a la Presa de San José 2055, Lomas 4ta
Secc, 78216 San Luis, S.L.P., México
aleonr@ipicyt.edu.mx

Resumen — Se realizó la producción de la proteína recombinante de fusión con hIFN- γ e hIL-2 en *E. coli* Artic ExpressBL21(DE3) con agente inductor IPTG con el objetivo de comparar la proteína de fusión en tres medios de cultivo diferentes. Esta proteína es de interés en la inmunoterapia para tratar cáncer. Se realizó una cinética de expresión por 24 hrs tomando muestra cada 3 h. Se realizó cuantificación de proteína total por la técnica de Bradford. Se llevó a cabo la identificación de la proteína mediante tinción por Coomassie y western blot. El medio mínimo con y sin extracto de levadura produjo menor degradación de la proteína de interés que el medio LB.

Palabras clave — expresión proteínas, *E. coli* Artic Express, proteína-fusión.

Abstract — The production of the recombinant fusion protein with hIFN- γ and hIL-2 was performed in *E. coli* Artic ExpressBL21 (DE3) with IPTG inducing agent in order to compare the fusion protein in 3 different culture media. This protein is of interest in immunotherapy to treat cancer. An expression kinetics was performed for 24 h. Taking sample every 3 h. Total protein quantification was performed by Bradford technique. Protein identification was carried out by Coomassie staining and western blotting. The minimum medium with and without yeast extract produced less degradation in the protein of interest than the LB medium..

Keywords — Fusion protein expression, *E. coli* ArticExpress,protein

I. INTRODUCCIÓN

Las citocinas son pequeñas proteínas que se unen a los receptores de la superficie de la célula inmunológica regulando su desarrollo, sobrevivencia y función de la. Se tienen reportes donde interferón gamma humano (hIFN- γ) recombinante tiene efecto terapéutico en carcinoma de células renales, cáncer de colon, enfermedad granulomatosa crónica y artritis reumatoide. La interleucina-2 humana (hIL-2) recombinante ha sido usada en el tratamiento de metástasis en carcinoma en células renales y metástasis de melanoma. Una proteína de fusión se obtiene a través de la tecnología del ADN recombinante a partir de la unión de dos o más dominios de proteínas o péptidos. La utilización de proteínas de fusión permite alternativas desde el punto de vista funcional, estructural y biotecnológico, ya que permite complementar funciones, por lo tanto es de interés la expresión de la proteína de fusión de las citosinas hIFN- γ e hIL-2 debido a su uso en inmunoterapia. El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel global, y en 2018 causó 9.6 millones de muertes en el 2018 de acuerdo a Organización Mundial de la Salud (OMS) [1-4].

La bacteria mesófila *Escherichia coli* es el hospedero más usado para la producción de biofármacos, debido a su rápida capacidad de alcanzar altas densidades celulares, simplicidad, bajo costo de medios de cultivo, amplio conocimiento sobre su fisiología y

genética, así como por ser inocua para el ser humano. La cepa Artic Express que es capaz de soportar temperaturas bajas (10-13°C) ha sido modificada genéticamente para coexpresar chaperonas Cpn10 y Cpn60 de la bacteria psicrófila *Oleispira* antártica que muestran altas actividades de replegamiento de proteínas en temperaturas de 4–12 °C, que ayuda a aumentar el rendimiento de proteína soluble activa producida en esta bacteria, evitando la formación de cuerpos de inclusión, de los cuales es difícil obtener un correcto plegamiento y por lo tanto, una forma activa [5-6]. Diversos aspectos deben tenerse en cuenta durante la fermentación de la producción de una proteína recombinante: selección de cepa hospedera, diseño óptimo de los vectores de expresión, medio de cultivo, condiciones de fermentación (pH, temperatura, nivel de oxigenación, etc.). *E. coli*, requiere formulación específica de medio de cultivo para su uso durante procesos como clonación, preparación de ADN y expresión de proteína [7-8]. El objetivo de este trabajo fue comparar la producción de una proteína recombinante de fusión de hIFN- γ e hIL-2 en la cepa Artic Express (DE3) de *E. Coli* en 3 diferentes medios de cultivo (LB, medio mínimo (M.M.) y medio mínimo enriquecido con extracto de levadura (M.M.e.I.).

II. MARCO TEÓRICO

La producción de biofármacos generalmente es sintética, usando bacterias aprovechando la biosíntesis de proteínas mediante la maquinaria ribosomal a través de la inducción con un plásmido modificado con características de interés específicas. El diseño de un sistema de expresión adecuado debe tomar en cuenta la bacteria (cepa) y elementos genéticos del plásmido: origen de replicación, marcador de resistencia a antibiótico, promotor transcripcional, etc.[6]. La bacteria *E. Coli* cepa Artic Express BL21(DE3) contiene gen lisogenizado del fago DE3 que codifica la ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor Lac UV3 inducible por 5 isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), siendo éste el agente inductor, adecuada para la expresión recombinante en plásmidos que transportan el promotor t7 (p. ej. el plásmido pET28A). Por su parte el plásmido pET28A contiene gen que codifica para la resistencia a Kanamicina y así como el promotor T7[8], además de contener los dominios correspondientes de la proteína de fusión interferón gamma humano (hIFN- γ) e Interleucina-2 humana (hIL-2).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Plásmido, cepa bacteriana y transformación

La clonación del plásmido se llevó a cabo a partir de *E. coli* BL21/pET28 (plásmido con construcción de interés, proteína de fusión hIFN- γ e hIL-2 y gen de resistencia a kanamicina) [3] en medio LB estéril (Composición por L: 10g de NaCl, 10g de Triptona y 5 g. de extracto de levadura). Se incubó a 180RPM y a 37°C toda la noche, se realizó extracción de plásmido mediante técnica tradicional de hidrólisis alcalina. Luego se transformó *E. coli* Artic Express BL21 (DE3) [6] con plásmido previamente extraído. Se usó la técnica de competencia por Rubidio y se transformaron mediante choque térmico [9], se usó Kanamicina (50mg/mL) para selección de células transformadas.

B. Medio y condiciones de cultivo

Se usaron 100mL de cada medio de cultivo, cada uno es su respectivo matraz de 250mL. Los 3 medios de cultivo usados fueron: LB, Medio mínimo (Composición del Medio Mínimo por litro: 5g de glucosa, 3.5 g(NH₄)₂HPO₄, 3.5 g KH₂PO₄, 1g de MgSO₄, 40μ tiamina y 100mg de Kanamicina (tiamina ni Kanamicina no se esteriliza) y elementos traza, composición litro: 27g de FeCl₃ 2g ZnCl₂, 2g CoCl₂·6H₂O, 2g Na₂MoO₄·H₂O, 1g CaCl₂·2H₂O, 1g CuCl₂·2H₂O, 0.5g H₃BO₃ (se prepara solución con todos los compuestos y se esteriliza, se ajusta a pH 7) y medio mínimo enriquecido con extracto de levadura. (adición de 5 $\frac{g}{L}$ de extracto de levadura extra).

Se inocularon 3 matraces de 250mL con 50mL de un medio de cultivo diferente en cada matraz Lb, medio mínimo y medio mínimo, de manera correspondiente, se inocularon con bacteria previamente transformada y se incubaron a 37°C a 180RPM hasta que alcanzaron una densidad óptica cuantificada a una longitud de onda 600nm (DO_{600nm}) en el espectrofotómetro cercana a 1.4. Después se realizó inducción agregando 5 isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1mM. Luego, se realizó fermentación por 24hrs con temperatura de 10°C, 180 RPM, se muestreó cada 3hrs por 24hrs.

C. Técnicas de análisis

Se hizo monitoreo de la densidad celular mediante OD_{600nm} . La concentración de proteína total se realizó mediante el método Bradford usando curva patrón con Albumina Sérica Bovina (BSA) de 0.1 a 1 mg/mL. La expresión de la proteína de fusión se determinó por el método de electroforesis poliacrilamida-dodecil sulfato al 9% (p/v) (SDS-PAGE) con una corrida de 150v durante 2hrs aprox. y se visualizó con tinción azul brillante Coomassie R250 0.1% (p/v). Para Western blot, la proteína fue transferida del SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa usando un equipo de electrotransferencia semiseco a 10v por 60 min. Para ambos análisis de SDS-PAGE se agregó volumen respectivo de cada muestra para tener una concentración final de proteína de 15μg/mL. El anticuerpo primario usado fue anti-hIFN-γ de conejo policlonal y el anticuerpo secundario era IgG anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina, la visualización del color fue desarrollado con p-nitroazul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato. Se realizó comparación a simple vista de imágenes obtenidas de la tinción Coomassie y western blot.

IV. RESULTADOS

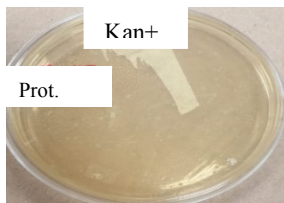


Fig. 1. Fotografía de caja de petri con colonia de *E. coli* Artic Express BL21 DE3/pET28a.

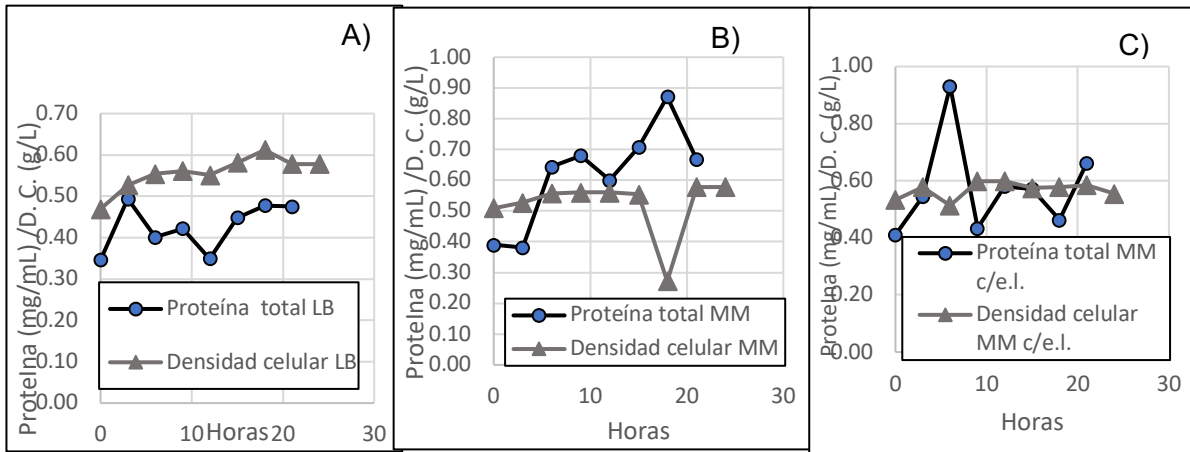


Fig. 2. Cinética de crecimiento celular y producción de proteína total de *E. coli* Artic Express BL21/pET28A en diferentes medios partir de la inducción con IPTG. A) En medio LB. B) En medio mínimo. C) En medio mínimo enriquecido con extracto de levadura.

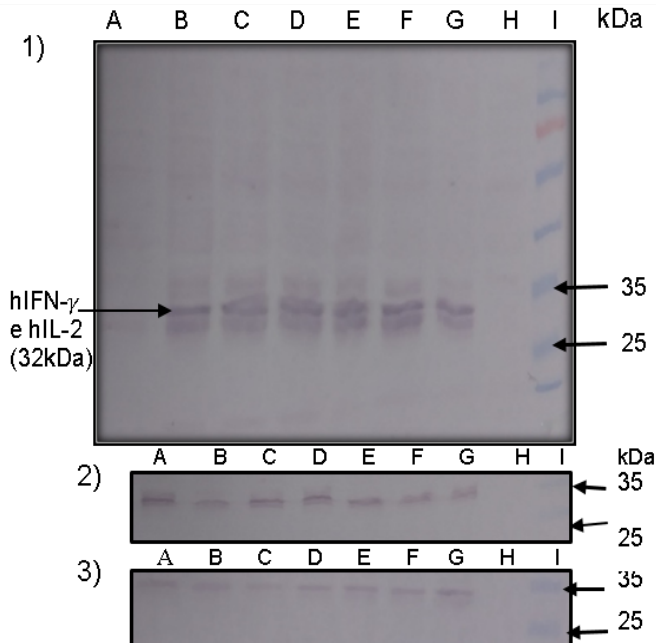


Fig.3. Fotografías de membrana de Western blot de la proteína total durante la fermentación con *E. coli* Artic Express/Pet28A de los diferentes medios. *Mismo acomodo de carriles en 1, 2 y 3) Medio LB. Carril I). Marcador de peso molecular, H) Control proteína*, A-G). Muestras 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21hrs. 2) Medio Mínimo y 3) Medio mínimo con extracto de levadura.

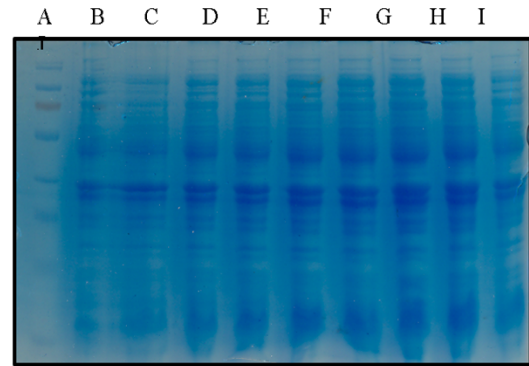


Fig. 4. Fotografía del gel SDS-PAGE teñido con Coomassie de la proteína total durante la fermentación de *E. coli* Artic Express/Pet28A con medio mínimo. Carril I). Marcador de peso molecular, B) Control*, C-J) Muestras 0, 3, 6, 9, 9, 12, 15, 18, 21hrs.

*Control, *E. Coli* Artic Express BL21 DE3 con pET28A sin gen codificante de proteína de fusión hIFN- γ e hIL-2

V. DISCUSIÓN

Cabe señalar que la expresión de proteínas como se ha mencionado tiene relación con diversos aspectos de índole biológica, por ejemplo, sistema de expresión, hospedero y genética como aspectos de diseño de proceso de fermentación, temperatura, pH, medio de cultivo, etc. [7]. Durante el presente trabajo, la adecuada implementación de la técnica de transformación genética permitió la obtención de la cepa *E. coli* Artic Express BL21 DE3/pET28A, ver figura 1, que tenía la capacidad selectiva de crecer con kanamicina, y que además expresó la proteína de fusión hIL-2 e hIFN- γ , ya que presentó bandeo característico en el western blot, ver figura 3. De acuerdo con las gráficas de la figura 2, se observa que la densidad celular durante la inducción con IPTG a 10°C se mantuvo constante para los 3 medios de cultivo debido que una temperatura de 7.5°C se detiene el crecimiento celular de *E. coli* [10], que tiene congruencia con lo observado. Por otro lado, comparando las membranas de western blot, ver figura 3, del medio mínimo y el medio mínimo enriquecido con extracto se observa que ambas no presentan degradación como el medio LB, y de manera visual se puede ver presencia de bandas un poco más perceptibles en el medio mínimo que en el enriquecido, por lo que se recomienda profundizar en una posible optimización del medio de cultivo de expresión usando el medio mínimo sin extracto de levadura, teniendo en cuenta que a pesar que la adición de extracto de levadura al ser una fuente de nitrógeno [11] promueve el crecimiento celular y por lo tanto mayor producción de biomasa esto no garantiza altos rendimientos en la expresión de proteína recombinante [12].

Por otro lado, el valor mínimo de producción de proteína total se presentó en medio LB. Comparando de las imágenes de las membranas de western blot, ver figura 3, durante la expresión de la proteína de interés con medio LB, ésta se presentó degradada, debido a la presencia de bandas difusas al alrededor del tamaño esperado de la biomolécula expresada hIFN- γ e hIL-2 (32kDa) [4]. La posible causa de lo anterior se puede deber a las escasas cantidades de carbohidratos, otras fuentes de carbono utilizables y cationes divalentes del medio LB [13] no fueron capaces de aportar la energía suficiente para la producción de las chaperonas CPn10 y Cpn60 presentes en la cepa Artic Express que son fundamentales para el prevenir el mal plegamiento de proteínas [6].

Por último, ver figura 4, se observa que conforme avanza el tiempo se obtiene una mayor degradación de proteína que se ve reflejada en una menor coloración de las bandas, esto debido al aumento de microorganismos, la disminución de nutrientes y el aumento de toxinas durante el tipo de cultivo batch [14], que fue el usado durante esta expresión de proteínas.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se logró obtener la cepa mutante de *E. coli* Artic Express BL21/pET28a DE3 con dominios de la proteína de fusión hIFN- γ e hIL-2 por transformación genética por técnica de choque térmico, lo cual se corroboró mediante la capacidad selectiva de crecer en medio de cultivo con ampicilina y western blot.

La expresión de la proteína de interés con medio LB se presentó degradada debido a la presencia de bandas cercana al peso molecular de la misma (32kDa), una posible causa de lo anterior es la falta de fuente de carbohidratos inherente a la composición de dicho medio. La densidad celular se mantuvo un comportamiento constante durante la expresión de

proteína de fusión (10° C) en los diferentes medios de cultivo, ya que *E. coli* deja de crecer a 7.5°C.

El medio mínimo y el medio mínimo enriquecido con extracto de levadura presentaron una proteína mejor conformada, por lo que se sugiere más investigación para posible optimización del medio de cultivo.

REFERENCIAS

- [1] V. E. B., Hernández, L. M. P., Maldonado, E. M., Rivero, A. P. B., de la Rosa, L. G. O., Acevedo & A. D. L. Rodríguez. "Optimization of human interferon gamma production in *Escherichia coli* by response surface methodology". *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, Vol.13, p.p. 7-13., 2008.
- [2] T., Jiang, C., Zhou & S., Ren. "Role of IL-2 in cancer immunotherapy". *Oncoimmunology*, Vol. 5, p.p. e1163462-1, e1163462-10, 2016.
- [3] World Health Organization. World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals, Geneva, 2018.
- [4] A.A., Cruz y A.D.L., Rodríguez. "Análisis de la expresión de la proteína de fusión interferon γ E Interleucina 2 en *Escherichia coli*". Memorias del XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. *Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería*. Morelia Mich., junio 2018.
- [5] M., Fathi-Roudsari, A. Akhavian-Tehrani, & N. Maghsoudi. "Comparison of Three *Escherichia coli* Strains in Recombinant Production of Reteplase". *Avicenna journal of medical biotechnology*, vol.8, p.p.16–22. (2016).
- [6] Agilent Technologies, Arctic Express Competent Cells and ArcticExpress (DE3) Competent Cells Instruction Manual. (230191-12). 2015
- [7] H. P., Sørensen & K. K. Mortensen. "Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*". *Journal of biotechnology*, vol. 115, p.p.113-128. 2005.
- [8] M., Fathi-Roudsari, Akhavian-Tehrani, A., & Maghsoudi, N. (2016). Comparison of Three *Escherichia coli* Strains in Recombinant Production of Reteplase. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 8(1), 16–22.
- [9] A., Roychoudhury, S., Basu, & D.N., Sengupta. "Analysis of comparative efficiencies of different transformation methods of *E. coli* using two common plasmid vectors". *Indian Journal of Biochemistry Biophysics*, vol. 46, p.p. 395-400. 2009
- [10] M., Strocchi, M., Ferrer, K.N., Timmis & P.N., Golyshin. Low temperature-induced systems failure in *Escherichia coli*: insights from rescue by cold-adapted chaperones. *Proteomics*, vol. 6, p.p.193-206. 2006.
- [11] Suárez, D. C., Liria, C. W., & Kilikian, B. V. (1998). Effect of yeast extract on *Escherichia coli* growth and acetic acid production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 14, p.p. 331-335. 1998.
- [12] L. M. P., Maldonado, V. E. B., Hernández, E. M., Rivero, A. P. B., de la Rosa, J. L. F., Flores, L. G. O., Acevedo, & A. D. L. Rodríguez, Optimization of culture conditions for a synthetic gene expression in *Escherichia coli* using response surface methodology: the case of human interferon beta. *Biomolecular engineering*, vol. 24, p.p. 217-222. 2007.
- [13] G. L., Rosano, & E. A., Ceccarelli. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*, vol. 5, p.p. 172-182. 2014.
- [14] V., Babaeipour, S. A., Shojaosadati, S. M., Robotjazi, R., Khalilzadeh, & N., Maghsoudi. Overproduction of human interferon- γ by HCDC of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*, vol. 42, p.p.112-11, 2007.

Producción de proteínas recombinantes antimicrobianas

Julio Ruiz Pérez

Instituto Tecnológico Superior de Purísima del Rincón
Boulevard del Valle #2301, Guardarrayas,
Purísima del Rincón, Gto. C.P. 36413
LRS15110044@purisima.tecnm.mx

Asesor:

José Francisco Morales Domínguez
Universidad Autónoma de Aguascalientes
Av. Universidad # 940, Ciudad Universitaria,
Aguascalientes, Ags. C. P. 20131,
jfmoral@correo.uaa.mx

Resumen — En este proyecto de investigación se llevó a cabo la producción de péptidos antimicrobianos empleando una cepa previamente transformada de *E. coli* con los genes *FLO* y *Mo-CBP₃* que codifican para un péptido antibacteriano y uno fúngico respectivamente proveniente de *Moringa oleifera*. A los cultivos de *E. coli* transformada se les adicionó IPTG para inducir la producción de péptidos. Los péptidos se purificaron, analizaron por electroforesis de poliacrilamida. Además, se evaluó su actividad antimicrobiana contra 5 bacterias patógenas, mostrando su mejor actividad inhibitoria contra *Klebsiella pneumoniae* y *Agrobacterium tumefaciens*, a las 24 y 8 horas de exposición, respectivamente, a una concentración de 24.17 µg/ml del péptido con lo que demuestra su gran potencialidad como fármaco o como control biológico.

Palabras clave — péptidos antimicrobianos, ADN recombinante, Moringa Oleífera

Abstract — In this research project, the production of antimicrobial peptides was carried out using a previously transformed *E. coli* strain with the *FLO* and *Mo-CBP₃* genes that code for an antibacterial and a fungal peptide respectively from *Moringa oleifera*. Transformed *E. coli* cultures were added IPTG to induce peptide production. The peptides were purified, analyzed by polyacrylamide electrophoresis. In addition, its antimicrobial activity against 5 pathogenic bacteria was evaluated, showing its best inhibitory activity against *Klebsiella pneumoniae* and *Agrobacterium tumefaciens*, at 24 and 8 hours of exposure, respectively, at a concentration of 24.17 µg / ml of the peptide, demonstrating its great potential as a drug or as a biological control.

Keywords — antimicrobial peptides, recombinant DNA, Moringa Oleífera

I. INTRODUCCIÓN

Un problema prioritario a escala mundial es la resistencia de bacterias patógenas a los antimicrobianos, debido a que amenaza la prevención y tratamiento efectivos de un gran número de infecciones y enfermedades provocadas por bacterias, hongos y virus. En la actualidad todo el mundo se encuentra en una era “post- antibiótica” en la que las infecciones mas frecuentes o las lesiones más tenues pueden ser mortales [7]. Una de las estrategias para combatir este problema es la producción de los péptidos antimicrobianos (PAM’s) que son compuestos que forma parte del mecanismo de primera defensa en plantas, insectos e invertebrados que poseen la capacidad de inhibir el crecimiento y/o establecimiento de bacterias, hongo, entre otros [1], además, por medio de técnicas de ADN recombinante son una forma viable para su producción en comparación con la síntesis química [5]. Los PAM’s poseen muchas clasificaciones, pero las más reconocidas son en base a la maquinaria biosintética y biológica productora, la función biológica del péptido (antiviral, antibacteriano, antifúngico y antiparasitario), la estructura tridimensional y a los objetivos que ataca [5]. Las principales características de los PAM’s son que están formados entre 12 a 50 aminoácidos, pueden tener o no cisteínas que forman puentes

disulfuro y a su vez le brindan estabilidad y resistencia a la proteólisis, son ricos en aminoácidos que poseen carga positiva como la arginina, histidina y leucina que proporcionan propiedades hidrofóbicas lo que facilita su interacción con los fosfolípidos de la membrana bacteriana y de otros patógenos provocándoles poros en la membrana y finalmente una lisis bacteriana [1]. Un candidato excelente para la obtención de péptidos antimicrobianos y antifúngicos es la planta *Moringa oleífera* ya que se ha demostrado que posee resistencia contra *Fusarium solani* [3]. *Moringa oleífera* posee 2 genes *FLO* que codifica un polipéptido antibacteriano y floculante y *Mo-CBP₃* codifica para un péptido antifúngico, estos genes han sido aislados mediante técnicas de ADN recombinante y obtuvieron resultados favorables [5]. Otra alternativa es el uso de nanopartículas de plata que, sintetizadas con ayuda de plantas, han mostrado tener actividad antimicrobiana [6]. Por lo cual, el objetivo de esta investigación es la producción de péptidos antimicrobianos de *FLO* y *Mo-CBP₃* en *E. coli* y el análisis de su actividad antimicrobiana; de igual manera, se evaluaron nanopartículas de acelga, albaca y rábano.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Cepas y cultivos

Se utilizó la cepa BL 21 de *E. coli* recombinante, que posee el vector pET-32a con los genes sintéticos (GB) *FLO* y *Mo-CBP₃*, que se conserva en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

B. Extracción de plásmidos y reacciones de digestión

Para verificar la presencia del vector pET-32a y los genes GB en la cepa de *E. coli*, se realizó la extracción de plásmidos mediante el método de miniprep Birnboim-Dolly. Después se continuo con la reacción de digestión en la que se emplearon 3 enzimas de restricción EcoRI, HindIII y NcoI: se preparó una mezcla con 3 µl de agua, 1 µl de buffer, 5 µl de ADN plasmídico, 0.5 µl de ARNasa y 0.5 µl de cada enzima EcoRI; se incubó a 37°C durante 2 horas; y analizó mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz ultravioleta.

C. Inducción con IPTG

Para la inducir la producción del péptido antimicrobiano por la bacteria recombinante, se inocularon 100 µl de cultivo en fase estacionaria en 10 ml de medio Luria-Bertani (LB), adicionado con 100 mg/l ampicilina, se incubaron a 37°C en agitación constante (175 rpm) hasta una DO de 0.5. Se añadió 10 µl de IPTG 0.1M y se incubó a 37°C en agitación constante (175 rpm) durante 4 horas [4]. Se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y la pastilla bacteriana se conservó en refrigeración a -4°C.

D. Extracción de proteínas totales

Para la extracción de proteínas se empleó el Manual QUIAGEN de Cartuchos de Ni-NTA Superflow® de extracción de proteínas marcadas con His. Se descongeló el sedimento de la inducción con IPTG durante 15 minutos sobre hielo y en seguida se resuspendió el sedimento en buffer NPI-10 a 2 ml por cada gramo húmedo, se añadió 1 mg/ml de lisozima, 10 µg/µl de RNasa A y 5 µg/µl de DNasa I, se incubó en hielo durante 45 minutos y se centrifugó a 10,000 x g durante 30 minutos a 4 °C y se recuperó el

sobrenadante. En un tubo aparte de tomó 5 μ l del sobrenadante y se le agregó 5 μ l de buffer X2 y se almacenó a -20°C para su respectivo análisis en electroforesis en gel de poliacrilamida.

E. Purificación de proteínas recombinantes

Para la purificación de la proteína recombinante se empleó el Manual QUIAGEN de Cartuchos de Ni-NTA Superflow® de extracción de proteínas marcadas con His. Se llenó una jeringa de 10 ml con buffer NPI-10 adaptándola la entrada del cartucho evitando la entrada de aire y se presionó el embolo sin forzar hasta que goteó la salida del cartucho a una velocidad de 1 ml/min. Con otra jeringa nueva de 10 ml se cargó con el extracto de proteínas totales, se adaptó a la entrada y presionando el embolo se vació en el cartucho. Nuevamente con otra jeringa nueva se llenó con 10 ml de buffer lavador NPI-20 y se pasó por el cartucho y finalmente se llenó una nueva jeringa con buffer NPI-250, se vació en el cartucho para que se eluya la proteína recombinante y se recupero el contenido del cartucho en un tubo falcón.

F. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se pretrató 5 μ l la proteína recombinante purificada: 5 μ l del sobrenadante de la inducción y 5 μ l de extractos totales de proteínas sedimentadas en baño maría durante 5 minutos se les añadieron 5 μ l de buffer de muestra y se incubó a en hielo por 5 minutos y se centrifugó 5 min a 12000 rpm. Se ensamblaron los vidrios del portagel y se colocó en soporte de cristales. En un vaso de precipitado de 10 ml se preparó el gel separador e inmediatamente se depositó entre los vidrios portagel hasta una altura cerca de 1 cm más hacia el fondo de espacio que el peine ocupó, después se añadió 1 ml de isopropanol y se permitió la polimerización durante 30 min, pasando el tiempo de polimerización se eliminó el isopropanol y se enjuagó el gel con agua destilada. Enseguida se preparó el gel concentrador e inmediatamente se depositó en entre los vidrios portagel sobre el gel previamente preparado, se colocó el peine en los vidrios portagel y se permitió la polimerización durante 30 min. Se ensambló soporte de cristales en la cámara de electroforesis y se agregó el buffer de corrida 5X, se retiró el peine y se cargó los pozos con 10 μ l de las muestras previamente preparadas y el marcador de peso molecular. Se conectó la cámara de electroforesis con un voltaje inicial de 50 V, una vez que la muestra rebasó el gel concentrador se aumentó el voltaje a 90 V hasta que el frente llegó al borde. Una vez alcanzado el borde, se desensamblaron los vidrios portagel, se colocó el gel en solución de tinción durante 2 horas y después se lavó en solución de destinción durante 2 días en agitación constante.

G. Cuantificación de la proteína recombinante mediante Bradford

Para la curva patrón se prepararon disoluciones de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 μ l de seroalbúmina de bovino con una concentración de 1mg/ml hasta un volumen de 10000 μ l con agua estéril, se mezcló en vortex y de las mezclas anteriores se tomó 500 μ l de cada una las disoluciones y se les agregó 500 μ l de solución Bradford, nuevamente se mezcló en vortex y se midió la absorbancia a 595 nm. La muestra de extracto total de proteínas se tomó 30 μ l y se resuspendio en 970 μ l de agua destilada y se preparó una disolución tanto la muestra de la proteína recombinante tomando 500 μ l de muestra y 500 μ l de solución Bradford como el extracto de las proteínas totales tomando 500 μ l de muestra previamente

tratada y 500 µl de solución Bradford y se midió la absorbancia a 595 nm y se calculó la concentración de proteínas purificadas y totales.

H. Evaluación de la actividad antimicrobiana

Para el ensayo antimicrobiano se prepararon suspensiones con 5 bacterias patógenas: *Agrobacterium Tumefaciens*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Rhizobium* de las cuales se tomó una colonia y se sembró en 5 ml de medio LB se incubaron a 25°C en agitación constante hasta la saturación del medio, se centrifugaron durante 5 min a 12000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento en 5 ml de buffer de fosfatos de potasio 0.05M pH 7 estéril y se realizaron diluciones seriadas de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} con buffer de fosfatos. Por triplicado se tomó 10 µl de cada dilución y se inoculó en medio LB sólido hasta que la gota se absorbió y se incubaron a 25°C durante toda la noche. Se contaron las colonias desarrolladas en la dilución que contenían entre 20 y 60 colonias y se calculó el título de microorganismos en UFC/ml hasta que se obtuvo un título de 1×10^6 UFC/ml. Una vez obtenido el título de los microorganismos se seleccionó a 5 agentes antimicrobianos: la proteína recombinante purificada, extractos totales de proteínas inducidas, nanopartículas de acelga, albaca y rábano. Se tomó como control positivo ampicilina a una concentración de 50 mg/L para *Sptreptococcus* y *Rhizobium* y 2 µl de desinfectante de frutos comercial por cada 1 ml de agua para *Agrobacterium Tumefaciens*, *E-coli* y *Klebsiella*. Por triplicado en tubos eppendorf se añadió 900 µl de la suspensión 1×10^6 de cada bacteria patógena y 100 µl de la proteína recombinante purificada, extractos totales de proteínas inducidas, control positivo y control negativo y para las nanopartículas se añadió 1000 µl de la suspensión 1×10^6 de cada bacteria patógena y 1 mg de nanopartículas de acelga, albaca y rábano. Se mezclaron perfectamente y se incubaron a 25 °C con agitación a 150 rpm. Se tomó una alícuota de 10 µl de cada dilución en intervalos de 1, 2, 4, 6, 8 y 24 h y se inoculo en medio LB sólido y se incubo a 25 °C durante 1 día. Se contaron las colonias desarrolladas y se calculó la el título después del tratamiento y finalmente se calculó la inactivación logarítmica expresado en unidades logarítmicas (U log) [2].

III. RESULTADOS

A. Análisis del vector pET 32a/GB con enzimas de restricción

Para verificar la presencia del gen sintético en el plásmido se digirió los plásmidos con enzimas de restricción EcoRI, Hind III y Nco I, para linealizar el vector y comparar la diferencia migración entre el vector pPET-32a y GB. De acuerdo con la figura 1 con la enzima Hind III se observó una diferencia de migración entre el vector pET-32a y el GB en comparación con las otras enzimas que no mostraron alguna diferencia de migración.

Análisis de la producción de los péptidos antimicrobiano.

El análisis de proteínas en gel de poliacrilamida muestra, de acuerdo con la figura 2, en el carril 1 un leve indicio del péptido recombinante; en el carril 2, con el extracto total de proteínas, una banda de mayor intensidad; y en el carril 3, que contiene sobrenadante, no se observa la banda correspondiente a PAMs. En la cuantificación mediante Bradford de las proteínas totales de la inducción y de la purificación de los péptidos recombinantes y se

obtuvo una concentración de aproximadamente de 1000.7 $\mu\text{g/ml}$ y 24.17 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

B. Evaluación de la actividad antimicrobiana

Como se observa en la figura 3a, *Spreptococcus pneumoniae* solo fue sensible a las nanopartículas de acelga y rábano logrando una inactivación completa después de 24 horas, mientras que la proteína recombinante no mostró actividad inhibitoria. *Rhizobium* mostró sensibilidad a las nanopartículas de acelga, albaca y rábano con una inhibición completa después de 1 hora de tratamiento, mientras que la proteína recombinante no mostró actividad alguna (figura 3b). Para *E. coli* se mostró inhibición completa con nanopartículas de rábano y de acelga con 1 y 2 horas de exposición, respectivamente, pero con la proteína recombinante no se logró actividad inhibitoria (figura 3c). *Klebsiella pneumoniae* mostro inhibición completa con las nanopartículas de acelga, albaca y rábano con 1 hora de exposición y la proteína recombinante logro su mejor inhibición después de 24 horas de hasta 3 U log (figura 3d). Debido a la dificultad del conteo de UFC para *Agrobacterium tumefaciens* se determinó cualitativamente la inhibición, las nanopartículas de rábano y acelga inhibieron por completo con 1 hora de exposición y las nanopartículas de albaca necesitaron de 2 horas de exposición, la proteína recombinante logró su mejor actividad inhibitoria con 8 horas de exposición.

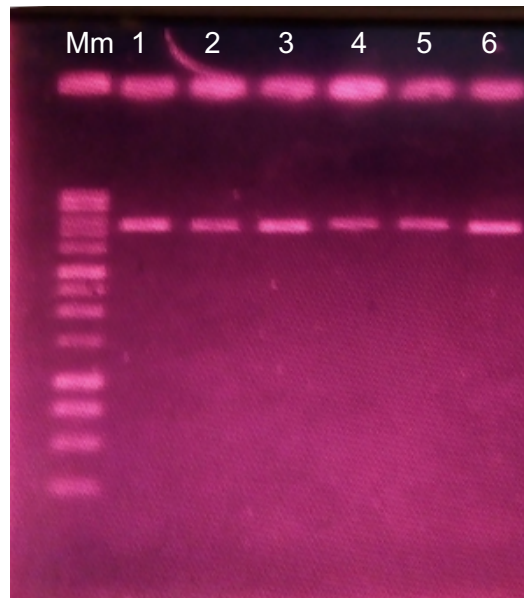


Fig. 1. Muestra representativa del gel de agarosa con la reacción de digestión del ADN plasmidico. El carril Mm contiene el marcador molecular de 1 Kb, el carril 1 contiene pPET-32a tratado con enzima EcoR1, carril 2 contiene GB tratado con enzima EcoR1, carril 3 contiene pET-32a tratado con enzima Hind III, carril 4 contiene GB tratado con enzima Hind III, carril 5 contiene pET32a tratado con enzima Nco I y el carril 6 contiene GB tratado con enzima Nco I.

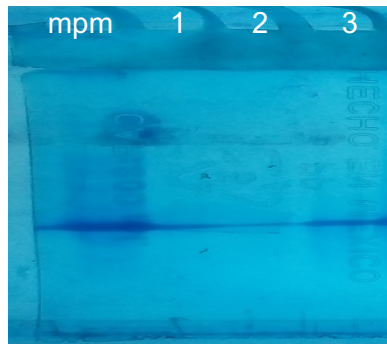


Fig. 2. Muestra representativa de la separación de proteínas mediante electroforesis en gel de poliácridamida. El carril mpm contiene el marcador de peso molecular, carril 1 posee al péptido recombinante purificado por columnas de níquel, carril 2 posee muestra del sobrenadante de la inducción y el carril 3 posee las proteínas totales del sedimento de la inducción.

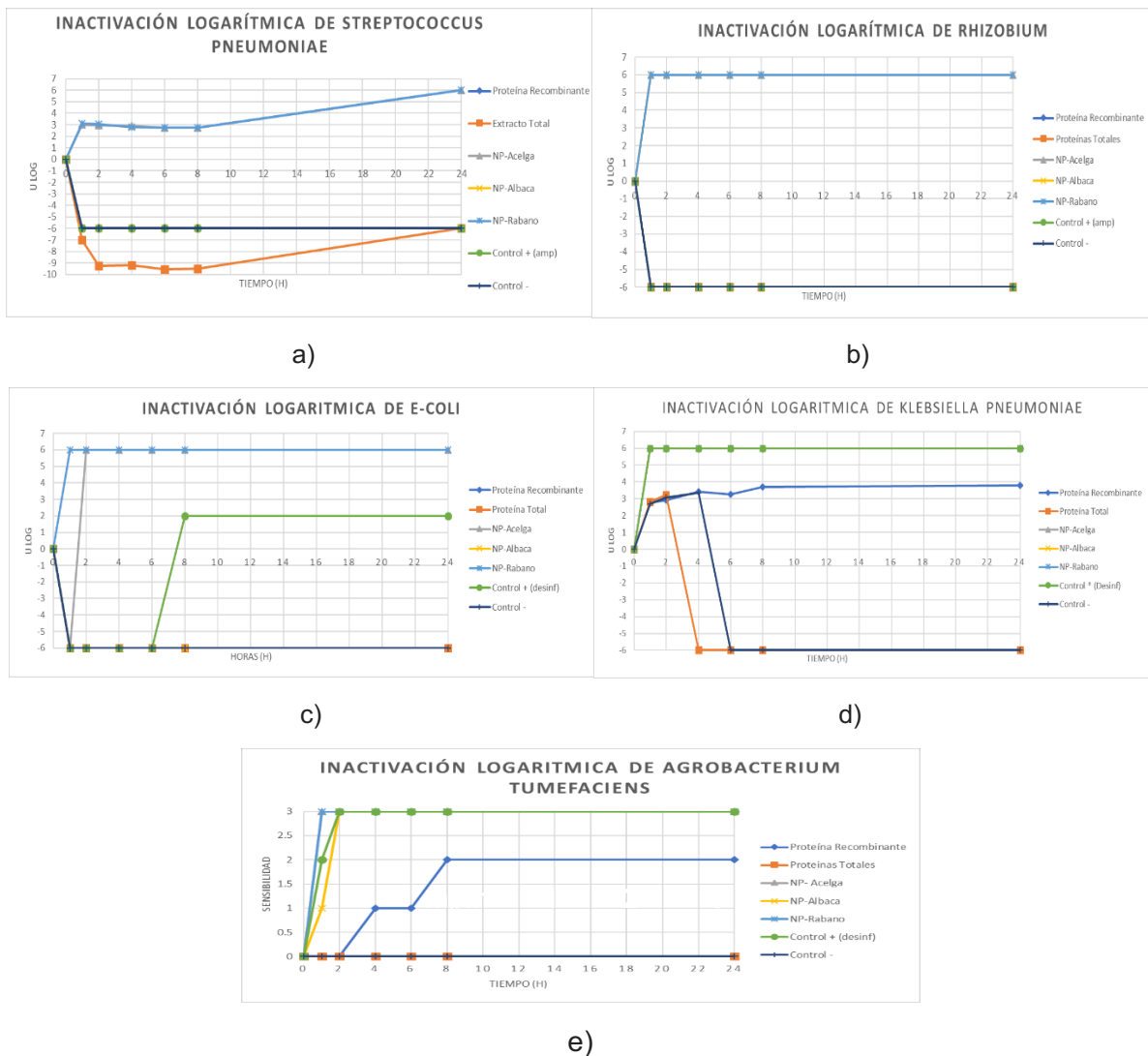


Fig. 3. Inactivación logarítmica de bacterias patógenas mediante ensayo antimicrobiano con el péptido recombinante antimicrobiano, extractos totales de las proteínas inducidas y las nanopartículas de acelga albaca y rábano.

IV. DISCUSIÓN (O ANÁLISIS DE RESULTADOS)

Los PAM's de *Moringa oleífera* poseen actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos debido a su carga neta positiva y su resistencia a la proteólisis gracias a sus puentes disulfuro. Los PAM's obtenidos mostraron actividad contra *Klebsiella pneumoniae* y *Agrobacterium tumefaciens* pero no contra el resto de las bacterias, esto es posible debido a que la concentración del PAM recombinante no es la suficiente para alcanzar un buen índice de inhibición de crecimiento porque en comparación con nanopartículas de acelga, albaca y rábano su concentración fue mucho mayor e incluso trabajos previos han logrado mayores concentraciones estos péptidos. Los datos obtenidos indican que si se logra obtener una mayor concentración del PAM recombinante se conseguiría un mejor resultado incluso podría mejorar o igualar la actividad inhibitoria de las nanopartículas y esto es posible porque con una concentración de 24.17 µg/ml se logró una inhibición cercana a las nanopartículas que poseían una concentración de 1 mg/ml contra *Klebsiella pneumoniae* y *Agrobacterium tumefaciens*, esto demuestra el gran potencial que poseen los PAM's recombinantes frente a otros agentes antibacterianos.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se logró producir y purificar al péptido antimicrobiano, se consiguió la inhibición del crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* y de *Agrobacterium tumefaciens*, y aunque no se experimentó la actividad antifúngica y la concentración del péptido recombinante es relativamente baja, los resultados de la investigación provee oportunidades para desarrollar investigaciones en el área de PAM's, la mejora del proceso de producción de los péptidos para ser empleados en producciones a gran escala debido a que son muy comprometedores estos PAM's para ser empleados como fármacos o a modo de control biológico de patógenos en plantas.

VI. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Agradezco a mis padres y hermanos por el apoyo incondicional, al Dr. José Francisco Morales Domínguez y a la Dra. Cristina Garcidueñas Piña por apoyarme en mi estadía y por motivarme a superarme en el área de investigación, al Instituto Tecnológico Superior de Purísima del Rincón por financiar parte de mi estancia, a la LB Valeria Martin del Campo Perez y al Mtro. Luis Fernando Villanueva Jiménez por confiar en mi y apoyarme en el proceso, al M.C. Daniel Alejandro Diaz García y a todos los estudiantes de doctorado del Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la UAA por apoyarme en la parte técnica.

REFERENCIAS

- [1] Castañeda-Casimiro, J., Ortega-Roque, J. A., Venegas-Medina, A. M., Aquino-Andrade, A., Serafín-López, J., Estrada-Parra, S., & Estrada, I. (2009). Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones. *Alergia, asma e inmunología pediátricas*, 18(1), 16-29.
- [2] Garcidueñas-Piña, C., Medina-Ramírez, I. E., Guzmán, P., Rico-Martínez, R., Morales-Domínguez, J. F., & Rubio-Franchini, I. (2016). Evaluation of the antimicrobial activity of

- nanostructured materials of titanium dioxide doped with silver and/or copper and their effects on *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Photoenergy*, 2016.
- [3] Jabeen, R., Mustafa, G., ul Abdin, Z., Iqbal, M. J., & Jamil, A. (2014). Expression Profiling of Bioactive Genes from *Moringa oleifera*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 174(2), 657-666.
 - [4] Portillo-Padilla, A. (2018). Diseño de construcción para la producción de péptido antimicrobiano en sistemas bacterianos. Tesina de Licenciatura. Universidad Autónoma de Aguascalientes.
 - [5] Rivera, Q., & Josafath, J. (2018). Obtención de péptidos antimicrobianos recombinantes derivados de *Moringa oleifera* Lam. y *Enterococcus* sp (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Aguascalientes).
 - [6] Tirado-Fuentes, C. (2019). Síntesis verde de nanopartículas de plata y su actividad antimicrobiana. Tesina de licenciatura. Universidad Autónoma de Aguascalientes
 - [7] World Health Organization. (2014). Antimicrobial resistance global report on surveillance: 2014 summary (No. WHO/HSE/PED/AIP/2014.2). World Health Organization.

Purificación de proteínas recombinantes

Ulrik Avilix Oliva Jara

Universidad Autónoma de Zacatecas
Carretera Zacatecas- Guadalajara Km. 6. Ejido la
Escondida. Zacatecas, Zac.
ulrik.avilix@gmail.com

Asesor: Dr. Luis Gabriel Brieba de Castro

Langebio Cinvestav
Libr. Norte carr. León km 9.6, Irapuato, Gto.
luis.brieba@cinvestav.mx

Resumen —Objetivos: Expresar y purificar proteínas recombinantes producidas en bacterias. Alcance: Aprender las técnicas básicas utilizadas en un protocolo de purificación. Metodología empleada: Comprende diferentes etapas como lo son: transformación, expresión y purificación. Resultados: Se logró obtener proteína con un alto grado de pureza. Conclusión: Las técnicas empleadas en la metodología resultaron ser eficientes, ya que se obtuvieron buenos resultados en la pureza y cantidad de proteína obtenida.

Palabras clave — Proteínas, purificación, metodología.

Abstract — Objectives: Express and purify proteins with activity in the replisome of different experimental models. Determine if the techniques used in the methodology are effective to properly perform purification. Scope: Cover correctly each stage of the procedure. Methodology used: Include different stages to carry out the purification, which are: transformation, expression, induction and purification. Results: Purification was successfully carried out obtaining in a considerable quantity the proteins that have activity in the replisome of different organisms. Conclusion: The techniques used in the methodology are efficient, due to the results obtained in the purity and quantity of proteins expressed.

Keywords — Protein, purification, methodology.

I. INTRODUCCIÓN

Desde 1982, más de 100 proteínas y péptidos terapéuticos han sido autorizados para su producción usando células bacterianas, fúngicas y de mamíferos. La ingeniería genética ha proporcionado las herramientas moleculares necesarias para la producción de proteínas heterólogas en un gran ramo de microorganismos, incluyendo bacterias y levaduras, expandiendo así las capacidades de manufactura.

Esta expresión de proteínas en sistemas heterólogos engloba la clonación de un gen específico que codifica para la proteína de interés en un vector de expresión bajo el control de un promotor inducible. El sistema de producción depende de la naturaleza de la proteína de interés [1].

II. MARCO TEÓRICO

La purificación de proteínas es un proceso que cuenta con varias etapas cuyo objetivo es lograr la concentración diferencial de la proteína de interés [2]. De forma general, la purificación de proteínas se puede dividir a partir de su forma de expresión en dos grandes grupos que determinan la estrategia a seguir: purificación de proteínas solubles e insolubles.

En el caso de las proteínas solubles expresadas intracelularmente es necesaria la ruptura de las células que la contienen. Existen varios métodos para lograr esto, como son: ciclos de congelación/descongelación repetidos, ultrasonido, homogenización por alta presión o permeabilización con solventes orgánicos. El método a escoger dependerá de cuán frágil sea la proteína y de cuán resistente sea la célula que se requiere romper. Los contaminantes en los extractos proteicos pueden incluir una variedad de macromoléculas (ácidos nucleicos,

lípidos, polisacáridos y otras proteínas) así como una serie de pequeñas moléculas. Estas últimas se pueden fácilmente separar de las proteínas por métodos basados en la talla molecular, tales como la diálisis, la ultrafiltración o la filtración en gel [3].

El principal método empleado para la purificación de proteínas solubles es el uso de "marcadores" de afinidad. Esta técnica consiste en la adición a las proteínas (generalmente en su extremo amino-terminal) de una cola de polihistidina que permite la purificación de estas por medio de una cromatografía de afinidad por iones metálicos (IMAC). La inserción de un sitio de corte de proteasa entre la "cola" de histidinas y la proteína de interés permite la eliminación de dicha cola antes de cualquier paso posterior. Este método de purificación por afinidad permite obtener elevados niveles de pureza empleando un solo paso cromatográfico [2].

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Este procedimiento comprendió varias etapas: **Transformación, expresión y purificación.**

A. **Transformación:** se usó la cepa bacteriana *E. coli* BL21 (DE3) para transformar los diferentes plasmidos para expresar las proteínas de interés. La transformación se realizó por choque térmico. El volumen de transformación se plaqueó en LB-Agar con antibiótico y se dejaron a 37°C toda la noche.

B. **Expresión de proteínas:** Se inoculó una colonia transformada en LB + antibiótico. Se dejó a 37°C a 200 rpm toda la noche (inoculo saturado). A la mañana siguiente se realizó una dilución del cultivo saturado en 1L de medio LB, con antibiótico. Se deja en agitación a 37°C, a 200 rpm hasta alcanzar OD₆₀₀ (densidad optica) entre 0.6 y 0.8.

Una vez alcanzada la OD, se indujo con 0.5mM de IPTG a 16°C y 200 rpm toda la noche.

A la mañana siguiente se centrifugaron los cultivos para obtener los pellets de bacterias. Se utilizaron botes de 250mL y se centrifugó a 6000 rpm por 10 minutos a 4°C. Los pellet se congelaron a -20°C hasta el momento de la purificación.

C. **Purificación:** Para la purificación se prepararon diferentes buffers: Lisis, Lavado 1, lavado 2 y elución. Cada uno de ellos se compone de una solución amortiguadora (Tris, Hepes, Fosfatos), fuerza ionica (dada por NaCl) y concentraciones crecientes de imidazol. Se lavaron y equilibran las columnas con las que se va a purificar. Las cuales se les pasa agua, EDTA, agua, Niquel, agua y se equilibran con buffer.

Los pellets congelados de los botes, se resuspendieron en buffer de lisis más PMSF (inhibidor de proteasas) y se sonicar. El sonicado se coloca en tubos de centrifuga de 30mL, se equilibran y se toma una muestra (será la muestra P de Pellet) y se lleva a centrifugar a 13000 rpm por 45 minutos a 4°C en el cuarto de centrifugas. Al termino se recupera el sobrenadante (fracción soluble) y se pasa por la columna, se recupera en un vaso etiquetado como FT, se pasó por la columna ahora el buffer de lavado 1 y lavado 2 respectivamente, recuperando de cada uno una alícuota, al final se pasa el buffer de elución y se recupera todo lo que salga de la columna, ya que aquí está la proteína. Se tomó muestra de cada alícuota.

De la muestra P obtenida, se centrifugó 1 minuto a 13,000rpm, el sobrenadante se pasó a otro tubo y se etiquetó como sobrenadante (SN). A las muestras tomadas se les agregó buffer de carga. Se cargó y corrió un gel de polyacrilamida (SDS-PAGE) y se realizó la tinción con coomassie para ver las bandas, en la elusión se debe de ver la banda de la proteína buscada.

Para cortar la etiqueta de polyhistidina se preparó buffer de diálisis (DTT, NaCl y amortiguador). A la fracción de elusión se le agregó una alícuota de proteasa y se colocó en una membrana de dialisis. Se dejó toda la noche en agitación a 4°C. Al día siguiente, se tomó muestra y cargó en un gel, comparando con la muestra de la elusión, correr el gel, teñirlo y ver si cortó.

- D. Concentración:** Se tomó la proteína dializada de la membrana y se colocó en un concentrador, se equilibró con otro concentrador y se metieron a centrifugar a 4000 rpm a 4°C, esto se hace hasta que la marca de agua del concentrador llegue a los 500uL. En este momento se colocó en un tubo de 0.5 mL. Se realizó una exclusión molecular, pasando por una columna Superdex para separar las proteínas por tamaño, se encendió el Akta, se lavan las bombas, el loop, y se programó, se inyectó la proteína concentrada y se corre hasta obtener los picos, y con ello, las fracciones del pico en alícuotas diferentes (figura 4). De estas fracciones obtenidas se toman muestras de cada una, se cargan en un gel, y se corre, se tiñe, se destiñe y se observan las bandas (figura 3) y se busca que correlacionen con el pico observado en el Akta.

IV. RESULTADOS

Se observa en la figura 1 un gel con el pellet, sobrenadante, FT, los lavados y la elusión donde se puede ver que se obtuvo una banda muy clara, donde se evidencia la proteína de interés

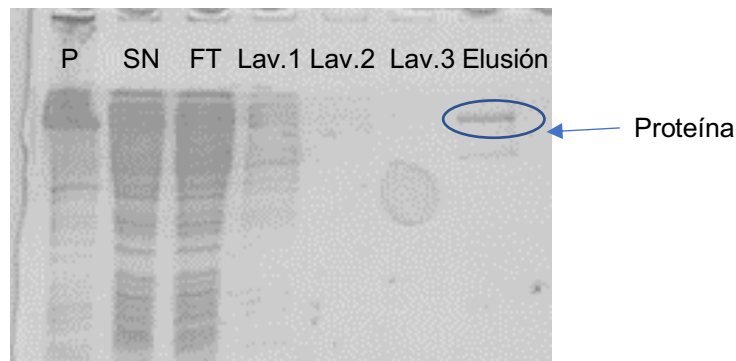


Fig. 1. Banda que evidencia la presencia de la proteína.

En el corte de la proteína se obtuvo una banda un poco más debajo de la banda de la proteína que se obtuvo en la purificación, esto significa que se hizo un corte de forma adecuada. Esto se ve en la figura 2.



Fig. 2. Del lado izquierdo se observa la banda de la purificación de proteína, a la derecha se observa la banda que corresponde al corte.

Una vez visto que se realizó adecuadamente el corte, se concentró la muestra y se pasó por una columna de exclusión molecular, el cromatograma resultante se muestra en la figura 3, donde nos arrojó diferentes fracciones donde había concentración de proteína y posteriormente se obtuvieron las bandas de la figura 4 de cada fracción.

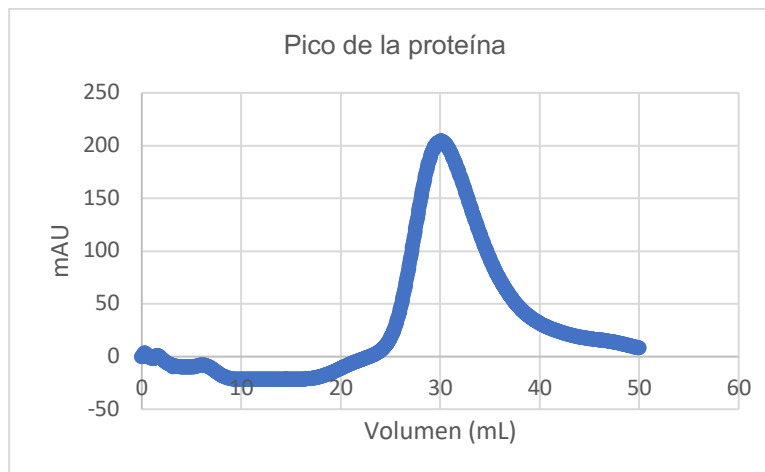


Fig. 3. Cromatograma de Heparina, obtenido de la concentración pasada por exclusión molecular

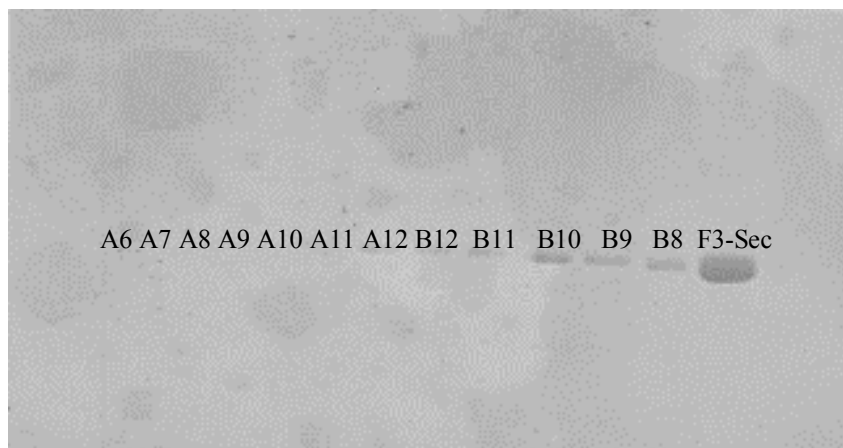


Fig. 3. Diferentes fracciones obtenidas

V. DISCUSIÓN (O ANÁLISIS DE RESULTADOS)

El proceso de purificar una proteína puede resultar complejo ya que conlleva varias etapas. El protocolo de purificación empleado se desarrollo luego de hacer una revision bibliografica de como lo hacen otros autores. Comparando y observando los resultados, se puede decir que la metodología empleada fue llevada a cabo de una forma correcta, ya que se obtuvieron buenos resultados en cada uno de las etapas de la metodología empleada.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Tras las diferentes purificaciones obtenidas en el laboratorio, se puede concluir primeramente que se aprendió y comprendió de forma correcta la metodología para llevar a cabo dicha actividad, así como que las que se realizaron fueron en su mayoría buenas purificaciones, ya que en los resultados se pudo ver que sí se hizo de una forma adecuada.

Después de haber obtenido la purificación de la proteína de interés, se puede hacer una cristalización de dicha proteína, sin embargo, por falta de tiempo ya no fue posible realizarla.

VII. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Realmente fue una experiencia asombrosa, mi más sincero reconocimiento a todo el equipo de trabajo del laboratorio número cuatro del Langebio, desde el principal doctor, Luis Brieba, hasta todo su equipo de trabajo: Rogelio, Yunuen, Francisco, Alejandro, Eduardo, Victor, Antolin, Corina y Paola. Sobre todo, de parte de Rogelio, ya que él fue el que me estuvo supervisando toda mi estancia, sin embargo, cada uno de ellos fue de una enorme ayuda, ya que desde el primer día que fui recibido, todos y cada uno de ellos me brindaron un gran apoyo y también me compartieron un poco de todo el gran conocimiento que tiene cada uno de ellos, ya que tengo el placer que además de haber sido mis compañeros, se convirtieron todos en grandes amigos.

REFERENCIAS

- [1] T. Vargas Cortez. *Expresión y purificación de proteínas recombinantes y biofármacos en Escherichia coli, utilizando la proteína smbp como proteína de fusión*. [PhD Thesis] Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, México, 2014
- [2] J. García, Z. Santana, L. Zumalacárregui, et al. "Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en Escherichia coli", *Vaccimonitor* 22(2), 30-39. Disponible en <http://scielo.sld.cu/pdf/vac/v22n2/vac06213.pdf> [consultado en 2019]
- [3] C.B. Jiménez. *La replicación*. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España. 2006.

Radio-optical alignment of radio galaxies

Lizbeth Alejandra Vázquez Nájjar
 Universidad Autónoma de Coahuila
 Facultad de Ciencias Físico Matemáticas
 Unidad Camporredondo, Edificio A.
 Saltillo, Coahuila, C.P. 25020
lizabethvazqueznajjar@uadec.edu.mx

Advisor: Heinz Andernach
 Universidad de Guanajuato
 Departamento de Astronomía
 DCNE, Sede Valenciana
 Guanajuato, Gto., C.P. 36023
heinz@astro.ugto.mx

Resumen — En imágenes de rastreos recientes del cielo en radioondas se midió la orientación de más de 2000 radiofuentes extendidas con galaxias huéspedas más brillantes que $m_r \sim 18$ mag. Para 1509 huéspedes se obtuvo la razón entre eje óptico mayor y menor, y para 857 de ellos también la orientación del eje mayor óptico. Se confirmó que la mayoría de las radiogalaxias eyectan sus chorros o lóbulos dentro $\sim 30^\circ$ del eje óptico menor, pero no se encontró evidencia que el alineamiento con el eje menor sea más fuerte en radiogalaxias de tamaño en radio mayor, ni tampoco para la presencia de una población secundaria de galaxias más brillantes de cúmulos con ejes en radio casi paralelos a su eje mayor óptico.

Palabras clave — Radiogalaxias, galaxias elípticas, rastreos del cielo en radio

Abstract — Images from recent radio surveys were used to determine the radio position angles for over 2000 extended radio galaxies with host galaxies brighter than $m_r \sim 18$ mag. For 1509 of these their optical axis ratios were obtained, and for a subset of 857 also their major axis position angle. It is confirmed that the majority of radio galaxies have their jets or lobes ejected within $\sim 30^\circ$ of the optical minor axis of their host, but no evidence is found for the minor-axis alignment to be stronger for physically larger radio sources, nor for the presence of a secondary population of brightest cluster galaxies with radio axes near to parallel to their optical major axes.

Keywords — Radio galaxies, elliptical galaxies, sky surveys in radio.

I. INTRODUCTION

Radio galaxies (RG) are almost exclusively found in elliptical galaxies and their radio emission consists of a radio nucleus (if present) at the core of the galaxy from which two oppositely directed jets are transporting relativistic particles towards diffuse outer radio lobes which often show compact emission regions (or “hotspots”) indicating the place where these jets collide with the intergalactic medium. In the past, several authors have studied the relation between the optical major axis and the ejection axis of the radio jets, most of them, but not all, finding a moderate trend for these jets to be aligned to within $\sim 30^\circ$ of the optical minor axis (see Battye & Browne 2009, BB09 hereafter, and references therein). However, these samples were often limited in size and scope, and different physical characteristics were claimed by different authors as the prime cause for this alignment.

In the present work we aim to construct a sample of elliptical galaxies with extended radio emission which, in combination with previously published samples, should be large enough to be subdivided into subsamples according to various parameters. We use standard cosmological parameters: $H_0 = 70 \text{ km s}^{-1} \text{ Mpc}^{-1}$, $\Omega_m = 0.3$ and $\Omega_\Lambda = 0.7$.

II. MATERIALS AND METHOD

Since 2012 one of us (H.A.) has compiled a list of extended radio galaxies identified with optical or infrared (IR) objects, including their exact position, spectroscopic or photometric redshift, their brightness in optical or IR, and the angular and linear extent of their radio emission. The compilation is based on a systematic inspection of major radio survey images and on a review of over 500 publications in the literature. From over 9000 objects in the June 2019 version of this compilation we selected 2360 objects with declination $> -25^\circ$ and brighter than ~ 18 th magnitude in r-band, such that good quality data on their optical orientation and ellipticity would be available from current optical surveys. This compilation was originally dedicated to giant radio galaxies (GRGs) with a projected linear radio size (LLS) larger than 1 Mpc, but is gradually being extended to include smaller RGs, such that our sample has a range in LLS from 10 kpc to 4.3 Mpc, with median of 440 kpc, and lower and upper quartiles of 270 and 670 kpc. The “largest angular (radio) size” (LAS) ranges from $10''$ to 1° with a median of $\sim 3'$, and lower and upper quartiles of $1.9'$ and $5.0'$. Although most quasars appear star-like on optical images, we did not exclude quasars from the beginning, so as to keep those which are hosted by galaxies of measurable optical shape.

For these 2360 objects we extracted radio images covering their full radio extent from the radio surveys NVSS (Condon et al. 1998), FIRST (Helfand et al. 2015), TGSS-ADR1 (Intema et al. 2017), and VLASS (Lacy et al. 2019). In order to recognize the structure of the radio galaxy, low- and high-resolution images of each one were displayed simultaneously with ObitView (<http://www.cv.nrao.edu/~bcotton/Obit.html>) and Aladin (Bonnarel et al. 2000), the latter to determine their “radio position angle” (RPA, measured from N through E). Whenever radio jets or distortions of the radio emission away from the host galaxy were present, the RPA was measured or estimated closest to the host galaxy position, and in the absence of jets the RPA was chosen along the major source axis (e.g. from one to the other hotspot). For bent-tailed sources the tangent to the jets at the host was used. This way, the RPA was measured for 2028 of the 2360 RGs by one of us (L.V.).

We then searched the Sloan Digital Sky Survey (SDSS DR14, Abolfathi et al. 2018) database for optical shape parameters like the optical major axis PA (or OPA in what follows, named deVPhir, deVPhii in SDSS) and the minor-to-major axis ratio b/a (deVABr, deVABi) as well as their errors, in both the r- and i-band. The median difference between the r- and i-band OPAs was only 2° , so we used the r-band OPA whenever this difference was below 10° , and whenever the relative error of the r-band axis ratio was less than 0.2. Otherwise we ignored the OPA. We also excluded the shape parameters of all objects classified photometrically as “star”, i.e. quasars with no detected host galaxies around them. This resulted in 1453 SDSS objects with decent axis ratios, but, following BB09, we considered their OPAs only for $b/a < 0.8$.

For the objects not covered by SDSS we then searched the VizierR catalog browser (Ochsenbein et al. 2000) for matches with the SkyMapper DR1 survey (Wolf et al. 2018) which offers shape parameters for galaxies. For 181 objects with Decl $< 0^\circ$ we found 172 matches, of which we excluded those with stellarity class > 0.65 and major axis < 3 pixels, for being too compact. This left 79 objects with axis ratios, for which we kept OPAs only for seven objects which had both, an error in OPA of $< 10^\circ$ and an axis ratio of $b/a < 0.8$. We further

obtained optical shapes for 106 objects from the DECaLS survey DR7 (Dey et al. 2019), but we accepted OPAs only for 59 objects with $b/a < 0.8$. For the 67 DECaLS objects in common with SDSS we found good agreement in the shape parameters. For the remaining 387 objects with measured RPAs but no optical shape parameters (excluding those we already rejected from SDSS), we searched HyperLEDA (Makarov et al. 2014) within a radius of 3", finding 244 matches. We used 173 of these which had axis ratios with errors less than 0.2 and accepted their OPAs for 104 objects with $b/a < 0.8$.

III. RESULTS AND ANALYSIS

For the sample of 2028 RGs for which we had measured RPAs, our search for optical shape parameters resulted in 1509 objects with available axis ratio b/a . For 857 of these we also had their OPAs and calculated the acute difference angle $dPA = |RPA - OPA|$, such that for $dPA=90^\circ$ the radio axis is aligned with the optical minor axis and for $dPA=0^\circ$ with the major axis. Spectroscopic redshifts are known for 85 % of the 1509 RGs, and for 87 % of those with both RPA and OPA, and for all others reliable photometric redshifts were found in various references, like Brescia et al. (2014), Bilicki et al. (2014, 2016) and others. The median redshift is 0.12 and the maximum is 0.38. All except 11 objects have Galactic latitude $|b| > 10^\circ$, and 134 are GRGs ($LLS > 1$ Mpc), of which 92 have both RPA and OPA.

We confirm the trend for minor-axis alignment (Fig. 1), as well as the trend reported by BB09 for the minor-axis alignment to strengthen for rounder (larger b/a) galaxies (Fig. 2). However, while BB09 used a larger sample of ~ 5000 early-type galaxies (their figures 5 and 7, right panels) these authors did not publish their sample, nor did they include parameters like LLS, redshift, radio morphology and radio luminosity, or the host's rank in a galaxy cluster. Here we try to consider the possible relevance of these parameters.

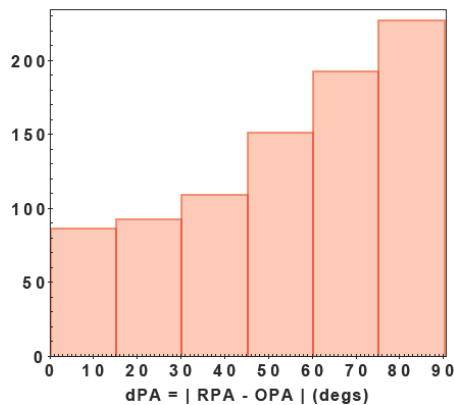


Fig. 1. Distribution of the radio-optical misalignment angle for all 857 objects.

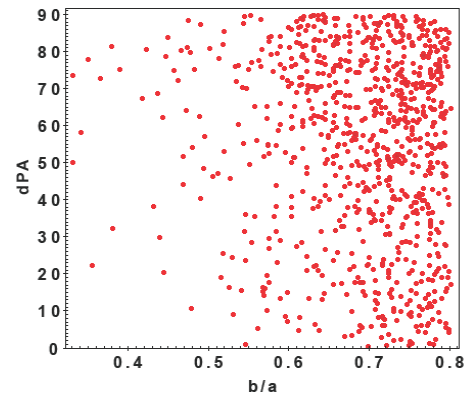


Fig. 2. Radio-optical misalignment angle ($^\circ$) as function of the optical axis ratio.

Palimaka et al. (1979) reported a trend for the minor-axis alignment to become stronger with the LLS of the radio sources. Indeed, figure 3 shows that all but one of the GRGs with $LLS > 2$ Mpc have a $dPA > 50^\circ$. However, a Kolmogorov-Smirnov (KS) test comparing the

dPA distribution of 200 RGs with LLS > 700 kpc with that of 210 RGs with LLS < 250 kpc shows no evidence for any difference in dPA ($p_{KS} = 0.23$). For those 652 objects of our sample for which the radio-morphological FR type (Fanaroff & Riley 1974) was well determined, we compared the 195 RGs with of type FR I with 457 of type FR II, and found a median dPA of 54.9° and 63.6° for FR Is and FR IIs, respectively, with a high significance ($p_{KS} = 0.002$) of being drawn from different populations. However, a decision on whether this difference is primarily due to FR type or radio luminosity (see figure 4 in Best 2009), requires our determination of the latter.

Separating the 857 radio galaxies with dPA values at their median redshift of 0.132, we find no evidence for any difference in the distribution of dPA for the low- and high-redshift halves of the sample ($p_{KS} = 0.16$). Likewise, the 28 quasars do not show any difference in their dPA distribution from the 829 galaxies, but the axis ratio b/a is higher for the quasars at the $p_{KS} = 0.018$ level, most likely because their bright optical nucleus makes them appear rounder on optical images. Finally, no significant trend is seen between the linear radio extent (LLS) and the axis ratio (b/a) of their host galaxies.

Brightest cluster galaxies (BrCIGs) have been claimed to have a more bimodal distribution of their dPA with a secondary, smaller maximum at $dPA = 0^\circ$ (Andernach & Ramos Ceja 2009). Our present sample was assembled independent of the latter one but does contain (albeit incomplete) tags indicating whether an RG host is also a BrCIG. Of the 114 RGs tagged as BrCIGs in our present sample we find the dPA distribution shown in figure 4. Despite the impression of a marginal peak at $dPA = 0^\circ$, neither the KS nor the Mann-Whitney U test provide any evidence for the BrCIG and non-BrCIG samples being drawn from different populations.

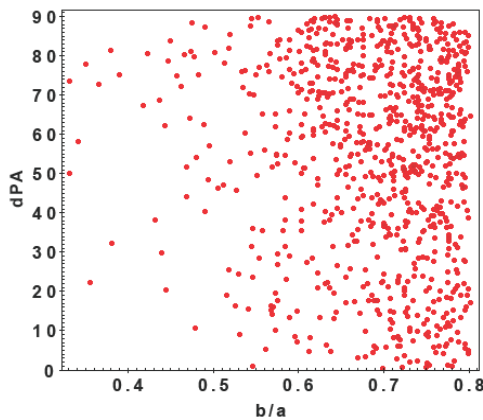


Fig. 3. Radio-optical difference angle dPA vs. largest linear size for 857 RGs.

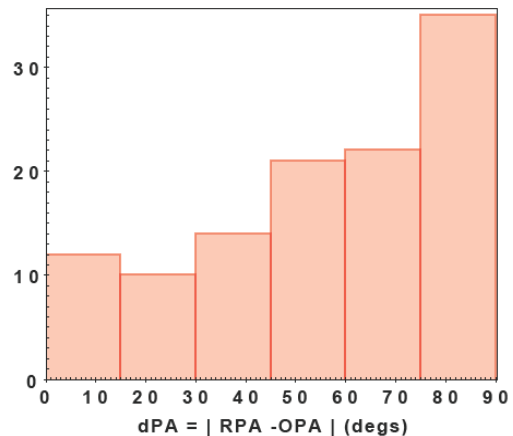


Fig. 4. Distribution of dPA for 114 RGs tagged as brightest cluster galaxies (BrCIG).

IV. CONCLUSIONS AND FUTURE WORK

We used recent radio survey images to measure the radio position angles for over 2000 extended radio galaxies with optical host galaxies brighter than 18th magnitude in r band. From available optical surveys and databases we extracted the optical axis ratio for 1509 of their host galaxies, as well as the major axis position angle for a subset of 857. We confirm the well-known trend that the majority of radio galaxies have their jets or lobes aligned to

within $\sim 30^\circ$ ($dPA > 60^\circ$) of the optical minor axis of their host, but do not find evidence for previous claims that (a) the minor-axis alignment is stronger for physically larger radio sources or (b) there is a secondary population of brightest cluster galaxies having their radio axes aligned with their optical major axes. However, the distributions of dPA for FR I and FR II sources show a stronger tendency for minor-axis alignment for the FR IIs. Given that FR IIs tend to be more radio luminous, this is in apparent contrast with BB09 (their figure 9) who found a stronger minor-axis alignment for radio-louder objects, albeit based on only the FIRST core fluxes which may underestimate the total flux for a large fraction of sources. We plan to determine both optical and radio luminosities, the latter by flux integration on survey images, which should reveal whether the dPA distribution depends more directly on radio luminosity or FR type.

The five weeks of this project were not enough to check the reliability of the optical shapes for every galaxy or quasar host. Some of these will be affected by superposed Galactic stars or other galaxies, as well as suffer from isophote twist (see e.g. Porter et al. 1991), such that a distinction will have to be made between inner and outer optical position angle. Moreover, optical shapes for many other host galaxies may be obtained from PanSTARRS1 images (Flewelling et al. 2016), and more brightest cluster galaxies may be identified from large cluster catalogues (e.g. Wen et al. 2018 and references therein).

The current selection of objects is biased towards rather large radio sources, and we shall work towards including previously published samples with known RPA and OPA as well as physically smaller sources hosted by any galaxy brighter than $m_r \sim 18$ mag, like most of those used by BB09. Where possible, we shall derive integrated radio spectral indices, to see whether they have any influence on the radio-optical alignment

V. ACKNOWLEDGEMENTS

A significant number of RGs in our sample was found by volunteers of the Radio Galaxy Zoo project (<http://rgzauthors.galaxyzoo.org>). We are grateful to the VLASS team at NRAO for a timely delivery of Quick Look images, and to F.J. Peralta for his python script to cut out images from the VLASS survey. Jean Tate helped with the extraction of optical host parameters, and H.A. benefited from research grant CIIC 218/2019 of Univ. of Guanajuato. We made use of NASA's SkyView facility (<http://skyview.gsfc.nasa.gov>) located at NASA Goddard Space Flight Center.

REFERENCES

- B. Abolfathi, D. S. Aguado, G. Aguilar, et al., "The Fourteenth Data Release of the Sloan Digital Sky Survey", *Astrophys. J. Suppl.*, Vol. 235, 42, 2018
- H. Andernach, and M. E. Ramos Ceja M. E., "Radio Properties of Brightest Cluster Members", *Proceedings of Science, PoS(PRA2009)057*, Groningen, The Netherlands, June 2009, eds. G. Heald and P. Serra; arXiv:0909.5300
- R. A. Battye, and I. W. A. Browne, "Radio and optical orientations of galaxies", *Mon. Not. Roy. Astron. Soc.*, Vol. 399, 1888-1900, 2009
- P. N. Best, "Radio source populations: Results from SDSS", *Astron. Nachr.* Vol. 330, 184-189, 2009

- M. Bilicki, T. H. Jarrett, J. A. Peacock, et al., "2MASS Photometric Redshift catalog: a 3-D census of the whole sky", *Astrophys. J. Suppl.*, Vol. 210, 9, 2014
- M. Bilicki, J. A. Peacock, T. H. Jarrett, et al., "WISE-Supercosmos photometric redshift catalog: 20 million galaxies over 3π sr", *Astrophys. J. Suppl.*, Vol. 225, 5, 2016
- F. Bonnarel, P. Fernique, O. Bienaymé, et al. "The ALADIN interactive sky atlas", *Astron. Astrophys. Suppl.*, 143, 33-40, 2000, <http://aladin.u-strasbg.fr/aladin.gml>
- M. Brescia, S. Cavuoti, G. Longo, and V. De Stefano, "A catalogue of photometric redshifts for the SDSS-DR9 galaxies", *Astron. Astrophys.*, Vol. 568, A126, 2014
- J. J. Condon, W. D. Cotton, E. W. Greisen, et al., "The NRAO VLA Sky Survey", *Astron. J.*, Vol. 115, 1693-1716, 1998 (<http://www.cv.nrao.edu/nvss/postage.shtml>)
- A. Dey, D. J. Schlegel, D. Lang, et al., "Overview of the DESI Legacy Imaging Surveys", *Astron. J.*, Vol. 157, 168, 2019 (<http://legacysurvey.org>).
- B. L. Fanaroff, and J. M. Riley, "The morphology of extragalactic radio sources of high and low luminosity", *Mon. Not. Roy. Astron. Soc.*, Vol. 167, 31P-36P, 1974
- H. A. Flewelling, E. A. Magnier, Chambers, K. C., "The Pan-STARRS1 Database and Data Products", arXiv:1612.05243, May 2016, <http://ps1images.stsci.edu/cgi-bin/ps1cutouts>
- D. J. Helfand, R. L. White, and R. H. Becker, "The Last of FIRST: The Final Catalog and Source Identifications", *Astrophys. J.*, Vol. 801, 26, 2015
- H. T. Intema, P. Jagannathan, and K. P. Mooley, "The GMRT 150 MHz All-sky Radio Survey First Alternative Data Release TGSS ADR1", *Astron. Astroph.*, Vol. 598, A78, 2017
- M. Lacy, S. A. Baum, C. J. Chandler, et al., "The Karl G. Jansky Very Large Array Sky Survey (VLASS). Science case, survey design and initial results", submitted July 2019, arXiv:1907.01981
- D. Makarov, P. Prugniel, N. Terekhova, et al., "HyperLEDA. III. The catalogue of extragalactic distances", *Astron. Astrophys.*, Vol. 570, A13, 2014, <http://leda.univ-lyon1.fr>
- F. Ochsenbein, P. Bauer, and J. Marcout, "The VizieR database of astronomical catalogues", *Astron. Astrophys. Suppl.*, Vol. 143, 23-32, 2000, <http://vizier.u-strasbg.fr>
- J. J. Palimaka, A. H. Bridle, E. B. Fomalont, and G. W. Brandie, "A preferred orientation for large radio sources relative to their elliptical galaxies", *Astrophys. J.*, Vol. 231, L7-L11, 1979
- A. C. Porter, D. P. Schneider, and J. G. Hoessel, "CCD observations of Abell clusters. V. Isophotometry of 175 brightest elliptical galaxies in Abell clusters", *Astron. J.*, Vol. 101, 1561, 1991
- Z. L. Wen, J. L. Han, and F. Yang, "Clusters of galaxies identified from all sky surveys of 2MASS, WISE and SuperCOSMOS", *Mon. Not. Roy. Astron. Soc.*, Vol. 475, 343-352, 2018
- C. Wolf, C. A. Onken, L. C. Luvaul, et al., "SkyMapper Southern Survey: First Data Release (DR1)", *Publ. Astron. Soc. Australia*, Vol. 35, 10, 2018

Reacción acrosomal en el espermatozoide de rata Wistar

Mayra Alejandra García Zamaro

Universidad de Guanajuato
División de Ciencias Exactas
Noria Alta S/N; C.P. 36050; Guanajuato, Gto.
alemiss1496@gmail.com

Asesora: Esmeralda Rodríguez Miranda

Universidad de Guanajuato
División Ciencias de la Salud
Aquiles Serdán 924, Obregon, 37320 León, Gto.
esmermmx@yahoo.com.mx

Resumen —Cuando los espermatozoides de mamífero son depositados en el tracto genital femenino son incapaces de fecundar al óvulo inmediatamente. Antes deben llevar a cabo dos procesos llamados capacitación y reacción acrosomal. Solo los espermatozoides que se capacitan pueden llevar a cabo la reacción acrosomal y podrán fecundar al óvulo. La reacción acrosomal es un evento dependiente de la concentración de Ca^{2+} externo por lo que ionóforos de Ca^{2+} inducen la reacción acrosomal de manera artificial, aun en espermatozoides no capacitados. En este trabajo, utilizamos ionomicina y A23187 como agonistas de este proceso. Nuestros datos indican que a pesar de que ambos compuestos aumentan el Ca^{2+} intracelular, la ionomicina fue más eficiente que el A23187 para inducir la reacción acrosomal en espermatozoide de rata.

Palabras clave— Espermatozoide, reacción acrosomal, capacitación, Ionomicina, A23187

Abstract —When mammalian sperm are deposited in the female genital tract they are unable to fertilize the ovum immediately. Before they must carry out two processes called “Capacitation” and acrosomal reaction. Only the sperm that are capacitated can carry out the acrosomal reaction and can fertilize the egg. The acrosomal reaction is an event dependent on the concentration of external Ca^{2+} whereby Ca^{2+} ionophore induces the acrosomal reaction artificially, even in uncapacitated spermatozoa. In this work, we use ionomycin and A23187 as agonists of this process. Our data indicate that although both compounds increase intracellular Ca^{2+} , ionomycin was more efficient than A23187 to induce the acrosomal reaction in rat sperm.

Keywords— Sperm, acrosomal reaction, capacitation, ionomycin, A23187

I. INTRODUCCIÓN

La fecundación es la fusión de dos células altamente especializadas: el óvulo y espermatozoide y es el mecanismo por el cual, las especies de reproducción sexual se perpetúan a través del tiempo. El óvulo es el gameto femenino (célula sexual femenina), se trata de una célula haploide redonda producida por el ovario y portadora del material genético. Por otro lado, el espermatozoide también es una célula haploide (n) que consiste en un cabeza, cuello, parte media y flagelo. El núcleo y el material genético se encuentran en la cabeza, a lo largo del acrosoma. El flagelo es responsable de la motilidad del espermatozoide debido a la presencia de estructuras como el axonema y un conjunto de mitocondrias que suministran la energía requerida para el movimiento del flagelo [1].

El acrosoma, que se encuentra en la región apical de la cabeza, se ha descrito como una vesícula secretora, como un lisosoma modificado [2], que contiene enzimas como acrosina, acrogranina, hialuronidasa y otras presentes en orgánulos clásicos como el peroxisoma, el lisosoma e incluso en citoplasma [11]. Cada espermatozoide está dotado de un acrosoma que varía según la especie en forma y tamaño, y su formación es un fenómeno complejo y altamente regulado en comparación con la biogénesis de otros

orgánulos y vesículas secretoras. De hecho, muchos de sus componentes proteicos se sintetizan en etapas previas al desarrollo del gameto masculino [3].

Los espermatozoides se producen en los testículos en un proceso de diferenciación altamente regulado conocido como espermatogénesis, que involucra todos los fenómenos a través de los cuales un grupo de células diploides ($2n$) se convierten en espermatozoides haploides. La principal función del espermatozoide Por otro lado es fusionarse al óvulo para formar eventualmente un nuevo individuo.

Una vez que los espermatozoides de mamífero son depositados en el tracto genital femenino, tienen que recorrer una distancia considerable hacia el óvulo. Los espermatozoides pasan un largo proceso de preparación en el que les ocurre una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos. En términos generales se distinguen por lo menos dos eventos: la capacitación y la reacción acrosomal (RA).

Capacitación: Durante la capacitación, ciertas proteínas en el líquido uterino, como las lipoproteínas de alta densidad y la albúmina permiten la extracción de colesterol de la membrana plasmática, lo que conduce a la distribución y reubicación de estas moléculas en el espermatozoide [1]. Lo anterior implica un aumento en fluidez de la membrana plasmática, una disminución en el nivel de contenido de colesterol en plasma. También ocurre un aumento en las concentraciones intracelulares de calcio y AMPc, fosforilación de residuos de tirosina en proteínas [8] y un cambio en los patrones de movimiento y motilidad de los espermatozoides [9]. La capacitación afecta la sensibilidad del gameto masculino a la diversidad de ligandos presentes en el tracto reproductor femenino, especialmente en el útero, el oviducto y ovario, que desencadenan ciertos cambios fisiológicos en el espermatozoide aumentando la probabilidad de la fusión del ovulo con el espermatozoide. Además de lo anterior, durante la capacitación, los espermatozoides tienen cambios en el patrón de nado pasando de una motilidad activada a una hiperactivada. Todos estos cambios que ocurren durante la capacitación son críticos para AR ya que, como se ha descrito, solo los espermatozoides capacitados pueden experimentar exocitosis acrosómica. La capacitación se pueden realizar in vitro mediante la incubación de los espermatozoides en un medio químicamente definido que contenga Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- , Mg^{2+} , Ca^{2+} y PO_4^{3-} , sustratos energéticos (glucosa, piruvato y lactato) y un aceptor de colesterol que generalmente es albúmina de suero bovino (BSA)

Reacción acrosomal: Por otro lado la RA consiste en la exocitosis del contenido del acrosoma debido a la fusión de la membrana plasmática con la membrana externa del acrosoma. Como consecuencia de este proceso, se generan pequeños cúmulos lipídicos a partir de ambas membranas, estabilizándose entre sí hasta que se convierten en unidades independientes. Las membranas que contienen las enzimas del acrosoma pierden continuidad y estabilidad, lo que conduce a la liberación del contenido de acrosoma al medio externo [11] Cuando la RA ha concluido, el espermatozoide ha sufrido varios cambios: a) la liberación del contenido del acrosoma, lo cual, favorece el paso del espermatozoide a través de la zona pelúcida; b) queda expuesta la membrana interna del acrosoma como un nuevo dominio de la superficie celular; y c) en el caso del segmento principal del acrosoma, la adquisición de la capacidad fusogénica de la membrana plasmática en el segmento ecuatorial del espermatozoide. Estos tres eventos son

importantes y necesarios para que ocurra la fecundación. Si la RA no ocurre el espermatozoide es incapaz de fusionarse al óvulo.

De manera paralela, ocurren cambios importantes en la concentración de segundos mensajeros como AMPc e IP₃, aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática para cationes mono y divalentes gracias a la apertura de canales iónicos.

La RA ocurre solo después de completar la capacitación y es un fenómeno dependiente de la presencia de Ca²⁺ externo, es decir, en ausencia de Ca²⁺ en el medio no ocurre la RA. Este fenómeno se puede inducir *in vitro* por una variedad de agentes químicos y biológicos, incluyendo proteínas de la zona pelúcida, ionóforos de Ca²⁺, Progesterona y ATP.

Dado que la RA es estrictamente dependiente de Ca²⁺ externo, en este trabajo evaluamos la RA en el espermatozoide de rata utilizando diferentes concentraciones de A23187 e Ionomicina, ambos ionóforos de Ca²⁺.

II. METODOLOGÍA

Animales

Se utilizaron cinco ratas macho de la cepa Wistar, con un peso de 330 a 380 g, las cuales, fueron proporcionadas por el bioterio de Departamento de Medicina y Nutrición de la Universidad de Guanajuato Camus León. La manipulación y eutanasia de los animales se realizó de acuerdo a las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio señalado en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 [5].

Obtención de muestra

Los espermatozoides de las ratas se obtuvieron del epidídimo de acuerdo a lo reportado por Bendahmane et al. (Bendahmane et al 2002). Las células móviles se obtuvieron por la técnica de swim-up en medio TYH no capacitante pH 7.4 (en mM: 119.3 NaCl, 4.7 KCl, 0.51 Piruvato de sodio, 1.71 CaCl₂ · 2H₂O, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄ · 7H₂O, 5.56 Glucosa, 20.0 HEPES). Brevemente, el epidídimo se colocó en un tubo de 2 ml, se le hicieron tres cortes luego se agregó 1 ml de medio TYH. Después de 20 minutos a 37 °C, se colectaron las células móviles que salieron al medio y se centrifugaron a 100g 1 minuto. El sobrenadante se pasó a otro tubo y se volvieron a centrifugar a 2800g 3 minutos. El paquete de células se resuspendieron en 1 ml de medio capacitante TYH pH 7.4 A partir de esta suspensión se contaron el número de células totales en una cámara de Neubauer.

Capacitación e inducción de la Reacción Acrosomal

Para la capacitación los espermatozoides se incubaron en medio TYH suplementado con 15 mM de NaHCO₃ y 4mg/ml de BSA durante 1 hora a 37 °C, a una concentración de 10 x 10⁶ / ml. Después de este tiempo, la RA se indujo agregando 10, 15, o 20µM de ionomicinay A23187 o dimetilsulfóxido (DMSO). Después de 30 minutos las células se fijaron al agregar de paraformaldeído al 12% en PBS. La RA se evaluó con la tinción de coomassie blue (Bendahmane et al., 2002). Brevemente, los espermatozoides se centrifugaron a 1500g por 5 minutos, el paquete celular se resuspendió en 50µl de PBS. Diez microlitros de esta suspensión se colocaron sobre un portaobjetos y se dejó que se

seca, después se agregó una gota 0.22% de coomassie blue en 50 % de metanol y 10 % ácido acético glacial durante 30 segundos. Luego el porta objetos se lavó con agua destilada y se agregó una gota de PBS/glicerol, se colocó encima un cubre objetos. Todas las muestras se observaron en al microscopio en contraste de fases con el objetivo de 100x. Se contaron por lo menos 100 células de las cuales el porcentaje de RA fue el número de células que no presentaron el acrosoma teñido.

Disposición final de Residuos Peligrosos Biológicos Infecciosos

Todos los residuos peligrosos se dispusieron de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 que refiere a la Protección ambiental- Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo [6].

III. RESULTADOS

En este trabajo utilizamos dos ionóforos ampliamente usados para aumentar la concentración de Ca^{2+} en diferentes modelos celulares, como inductores de la RA en el espermatozoide de rata. Como se mencionó previamente, la RA se cuantificó al contar el número de células cuyo acrosoma se encontrará teñido en azul (espermatozoides no reaccionados) y el número de células sin acrosoma (células reaccionadas) (Figura 1).



Fig. 1. Reacción acrosomal. A) Espermatozoide control (No reaccionado) y B) en presencia de ionóforos(reaccionado. Con la flecha se señala la presencia o ausencia del acrosoma.

IV.

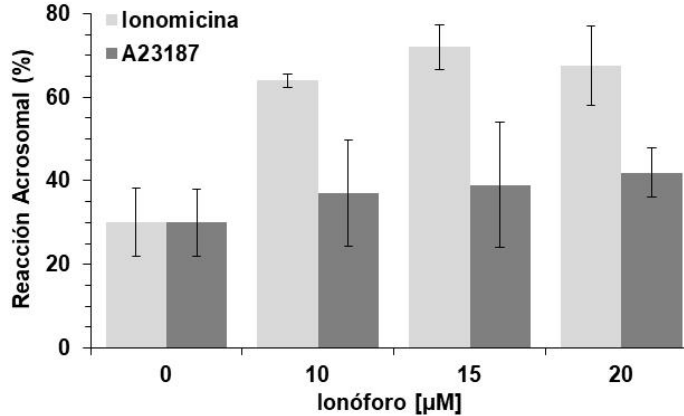


Fig. 2. La Reacción acrosomal en espermatozoide de rata se indujo como esta descrita en la metodología utilizando Ionomicina (■) o A23187 (■), se muestra el promedio de 5 ratas \pm desviación estándar.

Nuestros resultados muestran que capacitando previamente durante una hora, hubo ~30% de RA basal, es decir, en ausencia de inductor (ionóforo); estos datos coinciden con lo reportado por otros autores [7]. La presencia de concentraciones crecientes de tanto ionomicina como de A387 aumentaron el porcentaje de RA, sin embargo fue más eficiente la ionomicina que el A387. La diferencia entre ambos ionóforos es posible se deba al mecanismo que cada uno utiliza para aumentar el Ca^{2+} intracelular. Se ha reportado que los dos ionóforos mueven Ca^{2+} acoplado a un H^+ con una cinética diferente. Como se mencionó previamente, durante la RA, además de aumentar el Ca^{2+} intracelular, también aumenta el pH intracelular, por lo que la inducción de RA por estos compuestos además de aumentar el Ca^{2+} también alcalinizan a la célula. Se tendría que estudiar la cinética de los aumentos de Ca^{2+} y pH intracelulares para saber si hay alguna diferencia y sea esa la razón por la que la ionomicina sea más eficiente que el A387 para inducir la RA.

V. CONCLUSION

Obtuvimos ~30% de RA basal; la ionomicina y el A387 inducen la RA obteniéndose un mayor porcentaje con la primera que con la segunda.

VI. RECONOCIMIENTOS

Al Bioterio del Departamento de medicina y nutrición; a la MVZ Ana Cristina Araiza Martínez y a la Universidad de Guanajuato.

REFERENCIAS

- [1] Bearer EL, Friend DS. (1990). J Electron Microsc Tech. 16(4):281-97. Review.
- [2] Fawcett DW (1975). DevBiol 44: 394-436.
- [3] MorenO RD, Alvarado CP (2006). MolReprod Dev 73: 1430-1434.

- [4] Mcrorie RA, Williams WL (1974). Ann Rev Biochem 43: 777-803.
- [5] Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Recuperado de:
<http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/NOM/062zoo.pdf>
- [6] Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002,. Recuperado de:
<http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/agenda/DOFsr/DO3015.pdf>
- [7] Torres-Fuentes JL, Rios M, Moreno RD. 2015. J CellPhysiol. 230(12):3068-75.
- [8] Visconti PE, Kopf GS. 1998 Biol Reprod. Jul;59(1):1-6. Review
- [9] Yanagimachi R. (1970) J Reprod Fertil. 23(1):193-6.
- [10] Yanagimachi R (2011) 85, (1) 4–5
- [11] Zhao L, Burkin HR, Shi X, Li L, Reim K, Miller DJ (2007). Dev Biol 309:236-244.

Reconocimiento de acordes por clasificación

Leonardo Joel Cruz López

Universidad Autónoma de Aguascalientes
Av. Universidad # 940, Ciudad Universitaria,
C. P. 20131, Aguascalientes, Ags. México.
ljcruz709@gmail.com

Asesor: José Antonio Guerrero Díaz de León

Universidad Autónoma de Aguascalientes
Av. Universidad # 940, Ciudad Universitaria,
C. P. 20131, Aguascalientes, Ags. México.
jaquerrero@correo.uaa.mx

Resumen — En este reporte se muestra la implementación de clasificadores bayesianos en la detección y reconocimiento de acordes mayores en pistas de audio. Para conseguirlo, es necesario conocer la relación entre las notas musicales y sus frecuencias, y como estas se organizan para estructurar escalas y acordes. En la metodología se explica la elaboración de los algoritmos que permiten extraer características correspondientes a distintos acordes, para después utilizarlas para entrenar a los clasificadores, así como para realizar las predicciones. Los modelos de clasificación supervisada utilizados son LDA y QDA (Linear Discriminant Analysis y Quadratic Discriminant Analysis, por sus siglas en inglés), al final se muestra la comparación de los resultados entre ambos clasificadores.

Palabras clave — Acordes, Clasificador Bayesiano Óptimo, Detección.

Abstract — In this report an implementation of Bayesian classifiers for chords detection and recognition in audio files is shown. In order to start, it is necessary to know how musical notes and frequencies are related, and the way they structure into scales and chords. In methodology section is an explanation for the elaboration of the algorithms which allow to extract features for each chord, to use them for training the classifiers, so to make the predictions. The supervised classification models used are LDA and QDA (Linear Discriminant Analysis and Quadratic Discriminant Analysis), in the end is shown a comparing between the results of both classifiers.

Keywords — Chords, Optimal Bayesian Classifier, Detection.

I. INTRODUCCIÓN

Los algoritmos de clasificación no han parado de demostrar sus virtudes, pero no son del todo efectivos. Todo depende de la información de la que se dispone para hacer una clasificación. El algoritmo podrá ser más preciso si los datos con los que trabaja son más característicos, es decir, que tiendan a variar de forma significativa al pertenecer a cada clase. Por ejemplo, si se intentara etiquetar a un individuo como hombre o mujer basándose solamente en su estatura, se sabría que, si la persona es alta, la probabilidad de que sea hombre es más elevada; y si la persona es baja, la probabilidad de que sea mujer es mayor. Pero, si la persona tiene una estatura promedio, las probabilidades se ajustarían de manera que es casi igual de probable acertar o fallar al decir si es hombre o mujer, lo que implica complicaciones al hacer una clasificación.

Además, cada una de las técnicas de clasificación se ha desarrollado bajo ciertas implicaciones respecto a los datos, lo que las hace más o menos aptas para trabajar con un set de datos, dependiendo de las propiedades que este tiene. Un ejemplo notorio de este caso es el de los clasificadores LDA y QDA [1], cuyo desarrollo se basa en que los datos pertenecientes a cada clase tienen una distribución normal. Lo que diferencia al LDA del QDA es que se asume que las desviaciones estándar de los datos de cada clase son iguales;

también, implica que las probabilidades de que un individuo pertenezca a cualquier clase son las mismas y que el costo por error de cada clasificación es igual en todos los casos. Estas diferencias entre ambos análisis pueden traer consecuencias en el desempeño de los clasificadores, pues no es seguro que los datos cumplan con todas las condiciones que el LDA requiere. En tal caso, será notorio que el LDA no es factible para esta tarea una vez que se utilice para resolverla.

El reconocimiento de acordes mayores es un buen ejercicio de clasificación, pues la combinación de notas que dan forma a cada uno es individualmente característica, aunque lograr extraer la información que representa esta composición directamente de un archivo de audio requiere un procesamiento dedicado. Además, reconocer acordes puede darnos la oportunidad de demostrar la importancia de conocer la naturaleza de los datos de cada clase antes de elegir el método de clasificación que se utiliza al resolver un problema de este tipo.

II. MARCO TEÓRICO

A continuación, se presenta deducción de los clasificadores utilizados y los objetos a clasificar (acordes).

A. LDA y QDA

Para el desarrollo de los clasificadores QDA y LDA, se parte de una variable categórica Y asociada a una variable numérica X . Siendo Y la clase a la que el individuo X pertenece y \hat{Y} la clase que el clasificador a determinado para el individuo; se define una función $L(Y, \hat{Y})$ que simboliza la pérdida correspondiente a acertar o fallar en la clasificación en cada uno de los posibles casos. Lo que se busca es minimizar la pérdida de todas las clasificaciones que se realicen.

$$\min E[L(Y_i, \hat{Y}_i)] \quad (1)$$

Hay que resaltar que \hat{Y} es la función de clasificación, y esta depende de X , por lo que es posible aplicar la ley del valor esperado total (law of total expectation), para posteriormente definir ese valor esperado de la siguiente manera

$$E_{Y|X=x}[L(Y, \hat{Y}(X))] = L(0, \hat{Y}(X))P(Y = 0|X = x) + L(1, \hat{Y}(X))P(Y = 1|X = x) \quad (2)$$

Si en la función de pérdida se define que al acertar en la clasificación la pérdida es nula, se cancelará el término que implique que la clasificación fue correcta. Para minimizar el valor esperado, lo óptimo será que el resultado de la clasificación cancele el término con el valor más grande. Esta condición es la base para definir la función de clasificación $\hat{Y}(X)$ de la siguiente manera:

$$\hat{Y}(X) = \begin{cases} 0 & \text{si } L(0, 1)P(Y = 0|X = x) \geq L(1, 0)P(Y = 1|X = x) \\ 1 & \text{si } L(0, 1)P(Y = 0|X = x) < L(1, 0)P(Y = 1|X = x) \end{cases} \quad (3)$$

Debido a que el propósito de definir el clasificador es implementarlo en un programa, es viable representar su resultado como el resultado booleano de una comparación de desigualdad; de manera que si la condición se cumple el resultado será 1, y en caso contrario será 0.

$$\hat{Y}(X) = L(0, 1)P(Y = 0|X = x) < L(1, 0)P(Y = 1|X = x) \quad (4)$$

Si se sustituyen las probabilidades condicionadas según la regla de Bayes, y después de despejar, se obtiene el Bayesiano óptimo en la función de clasificación.

$$\hat{Y}(X) = \frac{P(X = x | Y = 1)}{P(X = x | Y = 0)} > \frac{P(Y = 0) L(0, 1)}{P(Y = 1) L(1, 0)} \quad (5)$$

Esta forma del clasificador sólo necesita que las probabilidades condicionales $P(X = x | Y = 1)$ y $P(X = x | Y = 0)$ sean conocidas. Estos términos representan la probabilidad de que un valor x sea parte de una u otra clase. Si consideramos que los valores que pertenecen a cada clase siguen una distribución normal, y tras despejar la sustitución de dicha distribución en la fórmula, obtenemos el clasificador QDA en su forma univariable. Donde μ es la media de los datos y σ es la desviación estándar.

$$\hat{Y}(X) = \frac{(x - \mu_0)}{\sigma_0} - \frac{(x - \mu_1)}{\sigma_1} > 2 \ln \left(\frac{\sigma_1 P(Y = 1) L(0, 1)}{\sigma_0 P(Y = 0) L(1, 0)} \right) \quad (6)$$

LDA en su forma univariable parte de asumir que las desviaciones estándar de los individuos pertenecientes a cada clase son iguales, que el costo por fallar en la clasificación en ambos casos es igual también, y que la probabilidad a priori de que el individuo pertenezca a una u otra clase es la misma. Si consideramos estas condiciones en la comparación del QDA, y despejamos los resultados, la forma del LDA es la siguiente:

$$\hat{Y}(X) = X > \frac{(\mu_1 + \mu_0)}{2} \quad (7)$$

La forma multivariable del clasificador QDA se muestra a continuación:

$$\hat{Y}_{QDA}(X) = (x - \mu_0)^T \Sigma_0^{-1} (x - \mu_0) + (x - \mu_1)^T \Sigma_1^{-1} (x - \mu_1) > 2 \ln \left(\frac{\Sigma_1 P(Y = 1) L(0, 1)}{\Sigma_0 P(Y = 0) L(1, 0)} \right) \quad (8)$$

Para la forma multivariable del clasificador LDA se toman en cuenta las mismas propiedades, por lo que su función resultante es la siguiente:

$$\hat{Y}_{LDA}(X) = x^T \Sigma^{-1} (\mu_0 - \mu_1) > \frac{\mu_1^T \Sigma^{-1} \mu_1 - \mu_0^T \Sigma^{-1} \mu_0}{2} \quad (9)$$

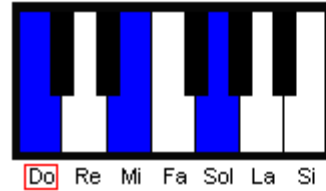


Fig. 1. Acorde de Do mayor presentado en las teclas de un piano.

B. Escalas y cordes

En la notación musical occidental se utiliza una notación basada en 12 notas. Cada una tiene un nombre y se pueden ordenar respecto a la frecuencia que representa cada una. El orden de las notas es: Do, Do#, Re, Re#, Mi, Fa, Fa#, Sol, Sol#, La, La#, Si. La sucesión puede continuar de manera indefinida volviendo a iniciar en la primera nota. En ese caso, las notas cuyos nombres se repiten tendrán frecuencias que son múltiplos de las anteriores. Para diferenciar estas notas que son múltiplos de otras se pospone un número que simboliza cuantas veces su frecuencia es múltiplo de la primera nota con el nombre.

Según la notación, una escala recibe el nombre de la primera nota que la conforma. Una escala está conformada por 8 notas, las cuales deben mantener una relación de distancia entre ellas que depende del tipo de escala y de la posición que corresponde a las notas dentro de ella. Las escalas mayores están conformadas por notas cuya distancia entre sí según su posición es de 2, 2, 1, 2, 2, 2 y 1 notas respectivamente. Como ejemplo, la escala en la cual está basada la distribución de las teclas de un piano es la escala mayor de Do, conformada por las notas Do, Re, Mi, Fa, Sol, La, Si y Do. Un acorde mayor asociado a una escala mayor está conformado por la primera, tercera y quinta nota de la escala [3]. Estas notas pueden presentarse en cualquiera de las frecuencias que estén asociadas a ella e incluso repetirse. Un ejemplo de este tipo de acordes se muestra en la Figura 1.

III. METODOLOGÍA

El algoritmo de detección de acordes inicia con la lectura y preparación de los datos, los cuales son recibidos en pistas de audio con formato wav. Estos archivos contienen los acordes que el programa aprenderá a reconocer y aquellos que servirán para ser clasificados. El análisis de cada pista lleva los siguientes pasos:

1. Asignar una frecuencia de muestreo en Hertz a la señal y conocer la cantidad total de muestras del archivo. Estos datos son utilizados para interpretar la señal en base a Hertz y facilitar la detección de las notas contenidas en el audio.
2. Para extraer múltiples muestras de un acorde desde una sola pista, se hace este análisis en distintos segmentos de tiempo, acumulando los resultados en un dataset por cada acorde.
3. Aplicar la transformada de Fourier a cada segmento de la señal. Esto permite encontrar las frecuencias senoidales y cosenoidales dentro de la señal. A los resultados se les aplica un banco de filtros [3], los cuales que permitirán corregir y ajustar las frecuencias, puesto que el sonido de un instrumento generará frecuencias muy cercanas a las

correspondientes a cada nota, pero no idénticas. Para lidiar con esto, se busca a qué nota se acerca más cada una de las frecuencias encontradas.

- Los resultados presentarán qué tanto participa una frecuencia en el sonido del acorde, lo que implica que las notas estarán distribuidas en varias octavas. El valor de una nota en cada una de sus octavas se acumula, permitiendo representar la participación de cada nota en el acorde agregando la influencia de los armónicos.

Una vez que todas las pistas han pasado por este proceso, se acumulan en un dataset de entrenamiento. La clasificación se realiza sobre una pista nueva, la cual pasa por el mismo procesamiento, devolviendo un conjunto de muestras, donde cada una será clasificada individualmente. Esto permite ingresar una pista en la que se presentan múltiples acordes y asignar un acorde en distintos momentos de ella.

IV. RESULTADOS

Las Figuras 2 y 3 presentan el desempeño de los algoritmos al entrenarse con 4 acordes. La pista 1 (clasificada en la Figura 2) corresponde a la secuencia de acordes la sostenido mayor, fa mayor, do mayor y sol mayor; cada uno de los acordes suena en un único rasgueo. La pista 2 (clasificada en la Figura 3) contiene la misma secuencia de acordes, pero cada uno suena en múltiples rasgueos y en distintas duraciones respecto a la pista de la Figura 2. La correspondencia de colores es la siguiente:

- Rojo: Do mayor
- Turquesa: Fa mayor
- Lila: La sostenido mayor
- Azul: Sol mayor

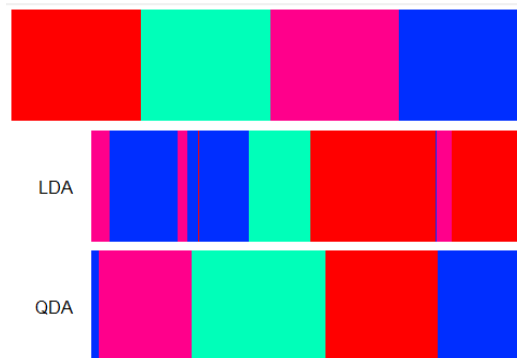


Fig. 2. Desempeño de ambos algoritmos al clasificar los acordes de la pista 1.

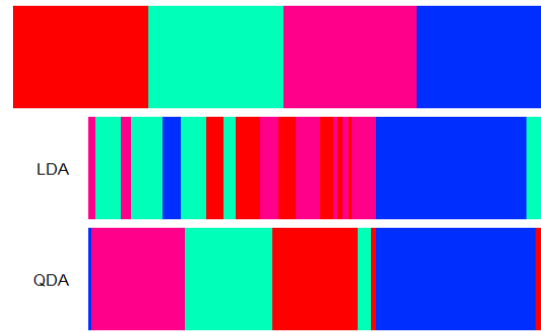


Fig. 3. Desempeño de ambos algoritmos al clasificar los acordes de la pista 2.

Los resultados de estas dos ejecuciones mostraron como el QDA tiene un mejor desempeño. Dado que las probabilidades a priori de que el acorde en cada instante pertenezca o no a cualquier clase son las mismas, y que, además, el costo por error en cualquier predicción es el mismo también, el bajo acierto del LDA indica que las desviaciones estándar de cada clase no son iguales. Hay que recordar que estas tres condiciones son asumidas en el planteamiento del LDA, por lo que al no cumplirse una de ellas, el LDA se vuelve impreciso.

V. CONCLUSIONES

En el proyecto se implementaron dos técnicas de clasificación con el propósito de reconocer acordes. Se observó que un clasificador lineal (LDA) no es suficiente para detectar los acordes presentes en la pista. Por otra parte, el modelo cuadrático (QDA) detectó los acordes presentes en la pista con los diferentes tipos de rasgueo. Cuando se presentan múltiples rasgueos (como es el caso de la pista 2) se tuvieron más errores de clasificación con respecto a un rasgueo sencillo (como es el caso de la pista 1). Dichos errores se presentan durante la transición de un acorde a otro. Los resultados de este trabajo servirán como base para futuros experimentos con otro tipo de acordes y rasgueos.

VI. AGRADECIMIENTOS

Los autores de esta investigación expresan su agradecimiento a Rubén Hernández Torres, alumno de posgrado, por sus valiosas contribuciones durante el desarrollo de este proyecto.

REFERENCIAS

- [1] McLachlan, G. J. (2004). Discriminant Analysis and Statistical Pattern Recognition. Wiley Interscience. ISBN 978-0-471-69115-0. MR 1190469
- [2] D'Amante, Elvo S.: All about chords. 1988. ISBN 0-9620941-0-2.
- [3] Fogel, I.; Sagi, D. (1989). "Gabor filters as texture discriminator". Biological Cybernetics. 61 (2). doi:10.1007/BF00204594. ISSN 0340-1200

Remoción de cationes As^{3+} , utilizando un polisacárido producido por *Ustilago maydis*

José Luis Castro Martínez

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Cerro de las Campanas S/N, Centro
Universitario, Querétaro, Qro. C.P.76010
pepinwevon@gmail.com

Asesor: José Antonio Cervantes Chávez

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Carretera a Chichimequillas S/N, Ejido Bolaños,
Querétaro, Qro. C.P.76140
cervanteschavez@gmail.com

Resumen — En este trabajo se trató de demostrar que es posible remover residuos de arsénico que contaminan mantos acuíferos, con la ayuda de un polisacárido producido por *U. maydis*. Debido al tiempo no fue posible realizar las pruebas de remoción con el polisacárido, se hizo el análisis utilizando agentes quelantes como el EDTA y el DACT, así como nanopartículas de oro y de plata. Los dos primeros no resultaron útiles para el experimento, pero se obtuvieron resultados positivos con la utilización de las nanopartículas de oro y plata.

Palabras clave — Cationes, polisacáridos, adsorción.

Abstract — In this work it was tried to demonstrate that it is possible to remove arsenic residues that contaminate aquifers, with the help of a polysaccharide produced by *U. maydis*. Due to the time it was not possible to carry out the removal tests with the polysaccharide, the analysis was done using chelating agents such as EDTA and DACT, as well as gold and silver nanoparticles. The first two were not useful for the experiment, but positive results were obtained with the use of gold and silver nanoparticles.

Keywords — Cations, polysaccharides, adsorption.

I. INTRODUCCIÓN

Dado que el agua es la sustancia más indispensable para el desarrollo y sustento de la vida en nuestro planeta, es importante que esta no contenga sustancias que perjudiquen a los organismos que la consumen. Los metales pesados son un contaminante comúnmente presente en ella debido al desecho de estos de manera indiscriminada por actividades industriales.

El arsénico es un elemento natural que se encuentra en la tierra y resulta extremadamente tóxico para el ser humano, La Norma Oficial Mexicana, PROY-127-SSA1-250-2007 establece que el límite máximo permisible de arsénico en agua es de 0.01 ppm en agua para uso y consumo humano. Los componentes del arsénico se usan para preservar la madera, como plaguicidas y en ciertas industrias [1].

Con el fin de disminuir la contaminación a causa de estas sustancias, es esencial el tratamiento de los efluentes industriales antes de ser vertidos, es por ello que actualmente se utilizan diferentes tecnologías y procesos para la eliminación de estos compuestos como lo son tratamientos biológicos, químicos y físicos. Dentro de los procesos físicos, se encuentra la adsorción que puede eliminar contaminantes como los metales pesados y ofrece muchas ventajas como su bajo costo de operación.

Ejemplos de sustancias utilizadas para procesos de adsorción son los agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el ácido (1,2-ciclohexilendinitrilo)

tetraacético monohidratado (DACT). Estos llamados secuestrantes de metales pesados pueden retener iones metálicos formando complejos cíclicos debido a sus cargas y estructura, con la ventaja de que es un efecto reversible [2].

Las nanoparticulas de oro y plata también pueden ser utilizadas para llevar a cabo procesos de adsorción debido a que los metales pueden fijarse fácilmente a estas y forman complejos que facilitan la recuperación de estas, dado que se innovan continuamente métodos para sintetizar estas partículas, se considera que se ampliara su área de aplicación.

U. maydis es un hongo fitopatógeno perteneciente al orden Ustilaginales, este crece entre los granos del maíz y es ampliamente consumido en Mexico. Este produce distintos tipos de polisacáridos potencialmente útiles para procesos de adsorción.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la producción del polisacárido se llevó a cabo la siguiente metodología:

1. Se sembraron dos cepas de *U. maydis*, 325 y 330 (colección del laboratorio de microbiología molecular-UAQ) en dos matraces diferentes de 50mL, con 20mL de medio completo suplementado con 40 μ L de ampicilina.
2. Se incubaron alrededor de 24 horas con una agitación de 150 rpm y a 28°C.
3. Luego de las 24 horas se observaron al microscopio para descartar una posible contaminación.
4. Se midió su densidad óptica en un espectrofotómetro UV/VIS a 600nm.
5. Se calculó el volumen necesario para que el medio final tuviera una densidad óptica de 0.05.
6. Se inocularon dos matraces por cada cepa con 653.5 mL de agua destilada, 46.5 mL de solución de sales inorgánicas, 2.25 g de nitrato de potasio, 7.5 g de glucosa, 45 mL de buffer de citrato pH 7 y al final con el volumen necesario de células para obtener una densidad óptica de 0.05.
7. Se incubaron por 40 horas a 150 rpm y 28°C.
8. Todo el medio se centrifugo a 10000 rpm por 8 minutos.
9. Se recuperó el sobrenadante y se disolvió en 500 mL de etanol frio al 96%.
10. Se mezcló y se incubo a 4°C por 24 horas.
11. El polisacárido suspendido en la solución de etanol se extrajo con ayuda de una pipeta Pasteur y se depositó en un tubo Falcon diferente para cada cepa.
12. El polisacárido se depositó en charolas de aluminio y se secó por 3 días a 50°C.
13. Se determinó el peso seco de este y se guardó en bolsas herméticas.

Para el análisis con agentes quelantes se llevó a cabo la siguiente metodología:

1. Se produjo una solución de trióxido de arsénico 100 ppm disolviéndolo en 10 mL de ácido clorhídrico para un volumen final de 60 mL con agua destilada.
2. Se realizaron 10 diluciones para tener concentraciones de 100 a 5 ppm.
3. La serie de soluciones se midió en el espectrofotómetro UV/VIS en un barrido de 200 a 900 nm para comprobar si había una señal.
4. Se hizo una solución de DACT 100 ppm disolviendo 12.1575mg de este en 5 mL de solución de hidróxido de sodio 0.1 M y se aforo a 50 mL con agua destilada.
5. Se realizaron diluciones de la misma manera que la solución de arsénico para que estas se encontrara en una relación equimolar.
6. Se mezclaron 1.5 mL de las soluciones de concentración homologa de arsénico y DACT.
7. Se midieron en espectrofotómetro todas las muestras de 200 a 900 nm.
8. Para el EDTA se siguió la misma metodología hasta el paso 7 con la excepción de que para una concentración de 100 ppm de EDTA se agregaron 12.4 mg.

Para el análisis con nanoparticulas se llevó a cabo la siguiente metodología:

1. 2.7 mL de cada dilución de la solución de arsénico se mezcló con 0.3mL de solución de nanoparticulas de oro.
2. Todas las muestras se midieron en el espectrofotómetro de 200 a 900 nm a las 0, 2, 4 y 24 horas.
3. Se repitió el mismo proceso utilizando las nanoparticulas de plata.

Debido a la falta de tiempo no fue posible analizar la capacidad de adsorción del arsénico por el polisacárido.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

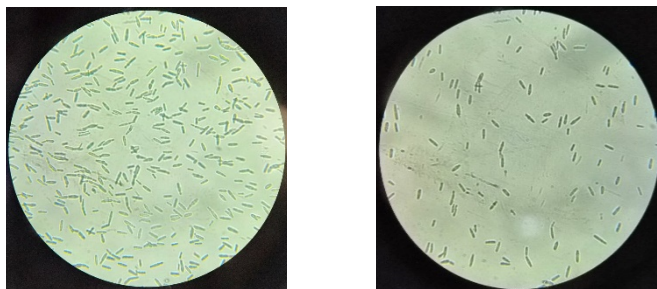


Figura 1. Cepa 330 y 325 al microscopio 40x

La contaminación se hace presente regularmente por la presencia de levaduras, que en muchos casos se puede llegar a confundir con *U. maydis*, en estos casos las diferentes cepas no se encuentran contaminadas.

El análisis con los agentes quelantes no generó resultados y esto puede deberse a que generan complejos con mayor facilidad con cationes de carga 2+ y al tratar de formar complejos con cationes de carga 3+ se pueden generar impedimentos estructurales ya que ambas moléculas son muy grandes.

Otra explicación puede ser que la solución de trióxido de arsénico resultó con un pH muy bajo, de 1.2 lo que no resulta ideal para la actividad de los agentes quelantes EDTA y DACT. Estos trabajan en un rango de pH de 3 a 6 por lo que se dificulta aún más la posibilidad de formar complejos con el arsénico [2].

Las nanopartículas de oro y plata si tuvieron una adsorción significativa debido a que estas tienen un amplio espectro de compatibilidad que aumenta aún más si a estas se les fijan grupos funcionales o moléculas con características específicas para retener cierto tipo de moléculas. La ventaja de estas es que se ha comprobado que retienen las moléculas por un amplio rango de tiempo lo que permite recolectar los residuos y reutilizarlas.

IV. CONCLUSIONES

No se obtuvieron resultados positivos sobre la capacidad de remoción de cationes de arsénico presentes en el agua utilizando agentes quelantes como el EDTA y el DACT. Con las nanopartículas se observó un mejor resultado, pero es necesario un estudio más a fondo para determinar si la implementación de nanopartículas es viable para la remoción de cationes contaminantes del agua.

En una investigación posterior se debe determinar la capacidad de remoción del polisacárido para el catión de arsénico, ya que las otras dos alternativas no generaron información útil para determinar un estándar de adsorción.

V. RECONOCIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Querétaro, al Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la UNAM (CFATA), así como a los asesores, el Dr. José Antonio Cervantes Chávez y el Dr. Ángel Ramón Hernández Martínez. Y al CONACyT por las facilidades y el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano.

REFERENCIAS

- [1] NOM-F-354-S-1980. (1980). Aceites Esenciales y Productos Aromáticos - Determinación de Metales Pesados. México, D. F.: Diario Oficial de la Federación.
- [2] Krzek, J., Apola, A., Stolarczyk, M., & Rzeszutko, W. (2007). SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF Pb(II), Fe(III) AND Bi(III) IN COMPLEXES WITH 1,2 DIAMINOCYCLOHEXANE-N,N,N', NITETRAACETIC ACID (DACT). Acta Polonicae Pharmaceutica .

Representaciones de grupos continuos

Daniel Arturo Morales Tovar

Facultad de Ciencias
Av. Chapultepec 1570,
C.P.78295, San Luis Potosí, SLP
danielarturomoralestovar@gmail.com

Asesor: Oscar Jasel Berra Montiel

Facultad de Ciencias
Av. Chapultepec 1570,
C.P.78295, San Luis Potosí, SLP
jassel.berra@uaslp.mx

Resumen— En este reporte encontraremos y explicaremos de manera teórica las representaciones irreducibles de grupos continuos, dando a conocer cada una de sus cualidades y/o características de cada uno, aunque para ello primero daremos una breve introducción sobre grupos discretos y grupos continuos, para después pasar a representaciones y a si finalmente a representaciones irreducibles. Aunque no entraremos a detalle de cuáles son sus aplicaciones, solo mostramos las definiciones más importantes para encontrar dichas representaciones irreducibles.

Palabras clave — grupos, representaciones, irreducibles.

Abstract— In this report we will find and explain in a theoretical way the irreducible representations of continuous groups, making known each of its qualities and / or characteristics of each one, although for this we will first give a brief introduction about discrete groups and continuous groups, to then go to representations and finally to irreducible representations. Although we will not go into detail what their applications are, we only show the most important definitions to find such irreducible representations.

Keywords — groups, representations, irreducible.

I. INTRODUCCIÓN

La teoría de grupos finitos, desarrollada originalmente como una rama de las matemáticas puras, puede convertirse en una diversión bella y fascinante. La teoría de grupos se transforma en una herramienta útil en el desarrollo de la física cuando se introducen las representaciones irreducibles y se inicia el cálculo de los caracteres de grupo (trazas). La mayor importancia en la física es la extensión de la teoría de grupos a grupos continuos. Las representaciones de los elementos de grupo por medio de matrices es una técnica bastante poderosa. El uso de matrices no impone ninguna limitación considerable. Se puede demostrar que los elementos de cualquier grupo finito y de los grupos continuos pueden representarse por medio de matrices, y en particular, mediante matrices unitarias. Aunque ahora la mayoría de los físicos conocen esta poderosa matemática es importante conocerla a fondo, ya que es una herramienta que podemos utilizar para la mayoría de las ramas de la física moderna. Aquí mostraremos como encontrar las representaciones irreducibles de grupos continuos y escribirlas de manera compacta por los lemas de Schur [1].

II. MARCO TEÓRICO

A. Definición de un grupo

Un conjunto G se dice que forma un grupo si existe una operación llamada multiplicación de grupos, talque $a, b \in G \Rightarrow a \cdot b \in G$, y satisface las siguientes propiedades:

1. Es asociativa, i.e. $a \cdot (b \cdot c) = (a \cdot b) \cdot c \quad \forall a, b, c \in G$.

2. Existe un elemento $e \in G$, identidad tal que $a \cdot e = a, \forall a \in G$.
3. $\forall a \in G$, existe $a^{-1} \in G$, tal que $aa^{-1} = e$.

Un grupo abeliano G es un grupo tal que su multiplicación es asociativa, i.e $a \cdot b = b \cdot a \quad \forall a, b \in G$.

B. Isomorfismo.

Dos grupos G y G' se dice que son isomorfos si existe una correspondencia uno a uno entre sus elementos y preserva la ley de multiplicación. Es decir, si $g_i \in G \rightarrow g'_i \in G'$, donde g_i es un elemento de grupo.

C. Representación de grupos.

Un homomorfismo de un grupo G a G' es un mapeo tal que preserve la multiplicación, es decir, g_1, g_2 y $g_1g_2 \in G \rightarrow g'_1g'_2 \in G'$. Si hay un homomorfismo de un grupo G a un operador $U(g)$ que actúa sobre un espacio vectorial decimos que $U(g)$ es una representación del grupo G y dimensión de $U(g)$ es la dimensión de V . Además, se dice que la representación es fiel si es un isomorfismo.

D. Definición.

Sea $U(g)$ una representación de G sobre V_1 y sea S un operador invertible en V . Luego $U'(g) = SU(g)S^{-1}$ es una representación de G en V .

E. Definición.

Dos representaciones de un grupo G , se dicen que son equivalentes si están relacionadas por una transformación de similitud.

F. Caracter de una representación.

El carácter $\chi(g)$, $g \in G$ en una representación se define como

$$\chi(g) = \text{Tr } U(g) \quad (1)$$

Si $D(g)$ es la representación matricial de $U(g)$, luego

$$\chi(g) = \sum_i D(g)^i_i. \quad (2)$$

G. Subespacios invariantes.

Sea $U(g)$ una representación de G en V , y V_1 un subespacio de V . Con la propiedad de que cualquier elemento pertenece a V_1 es decir, $U(g)|x\rangle \in V_1$, para todo $|x\rangle \in V_1, g \in G \Rightarrow V_1$ se dice que es un sub espacio invariante de V , con respecto a $U(g)$.

H. Representaciones Irreducibles.

Una representación $U(g)$ en V es irreducible si no hay subespacios invariantes no triviales en V con respecto a $U(g)$. De otra manera, se dice que es reducible.

I. Representación unitaria.

Si el espacio donde representamos a un grupo es un espacio con producto interior y si los operadores $U(g)$ son unitarios $\forall g \in G$, entonces se dice que la representación es unitaria.

Teorema 1. Si una representación unitaria es reducible entonces es descomponible.

Teorema 2. Toda representación $D(g)$ de un grupo finito en un espacio con producto interior es equivalente a una representación unitaria.

J. LEMAS DE SCHUR.

1. Sea $U(g)$ una representación irreducible de un grupo G en un espacio vectorial V y \hat{A} un operador arbitrario en V . Si \hat{A} conmuta con todos los operadores $U(g)$ tal que $\{U(g), g \in G\}$ i.e. $\hat{A}U(g) = U(g)\hat{A}$, luego \hat{A} debe ser múltiplo de operador identidad es decir $A = \lambda E, \lambda \in R$ ó C .

Teorema. Todas las representaciones irreducibles posibles de cualquier grupo abeliano son de dimensión uno.

2. Sea $U(g)$ y $U'(g)$ dos representaciones irreducibles de G en V y V' respectivamente y sea \hat{A} una transformación lineal de $V' \rightarrow V$, que satisface $\hat{A}U(g) = U(g)\hat{A} \forall g \in G$, luego:

- $\hat{A} = 0$.
- V y V' son isomorfos y $U(g)$ es equivalente a $U'(g)$.

K. ORTOGONALIDAD.

Notación. n_G : Orden del grupo; μ, ν : etiquetas de las representaciones irreducibles inequivalentes de G ; n_μ : dimensión de la representación, μ ; $D^\mu(g)$: matriz correspondiente a $g \in G$, en la representación μ ; $\chi_i^\mu(g)$: caracter de la representación μ .

Teorema. Se satisfacen las relaciones de ortonormalidad

$$\frac{n_\mu}{n_G} \sum_g D_\mu^t(g)_i^\nu D^\nu(g)_i^i = \delta_\mu^\nu \delta_i^j \delta_i^k \quad (3)$$

donde $D_\mu^t(g)_i^\nu = [D^\mu(g)_k^i]^*$.

Si G es abeliano

$$\frac{1}{n_G} \sum_g D_\mu^t(g)_i^\nu D^\nu(g)_i^i = \delta_\mu^\nu \quad (4)$$

Teorema. Los parámetros de dimensionalidad $\{n_\mu\}$, cumplen con

$$\sum_\mu n_\mu^2 = n_G. \quad (5)$$

$$\sum_g \frac{n_\mu}{n_G} D^\mu(g)_k^i D_\mu^t(g)_l^k = \delta_{gg'}. \quad (6)$$

L. CARACTERES IRREDUCIBLES.

Lema. Sea $U^\mu(g)$ una representación irreducible de g , entonces la suma de $U^\mu(g)$ sobre cualquier clase de elementos del grupo está dada por:

$$\sum_{n \in \rho_i} U^\mu(g) = \frac{n_i}{n_\mu} \chi_i^\mu E \quad (7)$$

con ρ_i la clase i -ésima, E el operador identidad y n_i el número de elementos de una clase [1,2].

M. **TEOREMA.**

Los caracteres de representaciones irreducibles inequivalentes de G, satisfacen:

Ortonormalidad

$$\sum_g \frac{n_\mu}{n_G} \chi_\mu^i \chi_i^\nu = \delta_\mu^\nu \quad (8)$$

Completitud.

$$\frac{n_i}{n_G} \sum_g \chi_i^\mu \chi_\mu^i = \delta_i^j \quad (9)$$

N. **TEOREMA.**

En la reducción de una representación $U(g)$ del grupo G en sus componentes irreducibles, el número de veces que ocurre una representación (a_μ) puede determinarse por:

$$U(g) = \sum_{\mu \oplus} a_\mu U^\mu(g) \quad (10)$$

donde:

$$a_\mu = \sum_i \chi_i^\mu \chi_i^{\frac{n_i}{n_G}}. \quad (11)$$

III. **METODOLOGÍA**

GRUPOS CONTINUOS.

a) SO (3).

El grupo SO (3) consiste en todas las transformaciones lineales en el espacio euclidiano 3-dim, que deja invariante a la longitud de los vectores.

Sean $\hat{e}_i, i = 1,2,3$, vectores talque $\hat{e}_i \rightarrow \hat{e}'_i = \hat{e}_i R_i^j \in mat(3x3)$.

Sea $\vec{x} = \hat{e}_i x^i, \vec{x} \rightarrow \vec{x}', x'^i = R_j^i x^j, |x|^2 = |x'|^2 \Rightarrow RR^t = E = R^t R; \det(R) = \pm 1$.

Si el $\det(R) = 1$. Se llama SO (3).

i) **PARAMETRIZACIÓN.**

Una rotación la podemos escribir como $R_{\hat{n}}$, el eje de rotaciones \hat{n} , y ψ es el ángulo. Como \hat{n} está determinado por el ángulo, R está caracterizada por tres parámetros (ψ, θ, ϕ); $0 \leq \psi \leq \pi, 0 \leq \theta \leq \pi, 0 \leq \phi \leq 2\pi$.

ii) **ALGEBRA DE LIE.**

Dada una dirección fija \hat{n} , las rotaciones alrededor de \hat{n} , forman un subgrupo de SO (3), que es isomorfo al grupo de rotaciones en el plano SO(2). Asociado a cada subgrupo hay un generador J_n . Todos los elementos de este subgrupo pueden representarse de la siguiente manera:

$$R_{\hat{n}}(\psi) = e^{-i\psi J_n}. \quad (12)$$

- Lema. Dado un vector unitario \hat{n} y una rotación arbitraria, podemos escribir la rotación de la siguiente manera:

$$R J_n R^{-1} = J_{n'}, \hat{n}' = R_{\hat{n}}. \quad (13)$$

Consideremos los tres ejes fijos:

$$J_1 = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -i \\ 0 & i & 0 \end{pmatrix}, J_2 = \begin{pmatrix} 0 & 0 & i \\ 0 & 0 & 0 \\ -i & 0 & 0 \end{pmatrix}, J_3 = \begin{pmatrix} 0 & -i & 0 \\ i & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad (14)$$

Donde ponemos los J_n donde $n=1, 2, 3$. De la siguiente manera:

$$(J_k)_m^l = -i\varepsilon_{klm}. \quad (15)$$

• Teorema.

1. Bajo rotaciones $\{J_k, k = 1, 2, 3\}$, puede escribirse de la siguiente manera:

$$RJ_kR^{-1} = J_lR_k^l. \quad (16)$$

2. El generador de rotaciones alrededor de un eje arbitrario \hat{n} , e

$$J_n = J_k n^k, \quad \hat{n} = \hat{e}_{kn} k. \quad (17)$$

Como $J_n = J_k n^k$ forman una base para los generadores de los subgrupos abelianos de SO (3)

$$R_n(\psi) = e^{-i\psi J_n} = e^{i\psi J_n n^k}. \quad (18)$$

• Los ángulos de Euler.

$$R(\alpha, \beta, \gamma) = e^{-i\alpha J_3} e^{-i\beta J_2} e^{-i\gamma J_3}. \quad (19)$$

• Teorema.

Los tres generadores $\{J_k\}$, satisfacen,

$$[J_k, J_l] = i\varepsilon_{klm} J_m. \quad (20)$$

iii) REPRESENTACIONES IRREDUCIBLES DE SO (3).

Un operador el cual conmute con todos los elementos de un grupo se dice que es un operador casimir.

$$J^2 = J_1^2 + J_2^2 + J_3^2 \quad (21)$$

Donde este operador es un operador casimir y tiene como propiedad

$$[J_k, J^2] = 0. \quad (22)$$

Por el lema de Shur J^2 es un múltiplo de la identidad en una representación irreducible. Sabiendo esto y por construcción, encontraremos nuestros vectores base de tal manera que sean eigenvectores. Para ello tomaremos a J^2 y J_3 como vectores base y así encontramos a:

$$J_{\pm} = J_1 \pm iJ_2 \quad (23)$$

llamados operadores de ascenso y de descenso.

Sea $|m\rangle$ un eigenvector normalizado de J_3 , en el espacio de representación V.

$$J_3|m\rangle = |m\rangle m. \quad (24)$$

Veamos que $J_+|m\rangle$.

$$\begin{aligned}
 J_3 J_+ |m\rangle &= [J_3, J_+] |m\rangle + J_+ J_3 |m\rangle \\
 J_3 J_+ |m\rangle &= J_+ |m\rangle + m J_+ |m\rangle \\
 J_3 J_+ |m\rangle &= J_+ |m\rangle (m+1)
 \end{aligned}
 \tag{25}$$

$J_+ |m\rangle$; es un eigenvector de J_3 , con el eigenvalor $(m+1)$, lo mismo para $J_- |m\rangle$ con eigenvalor $(m-1)$.

$J_+ |m\rangle \neq 0$, normalizándolo $|m+1\rangle$ entonces si aplicamos J_+ obtenemos $|m+2\rangle$; podemos repetir el proceso obtenemos $\{|m+k\rangle, k=1,2,3,\dots\}$. La sucesión termina ya que estamos estudiando representaciones finitas. Supongamos que el ultimo es $|j\rangle$,

Entonces

$$J_3 |j\rangle = j |j\rangle, J_+ |j\rangle = 0, J_-^2 |j\rangle = j(j+1) |j\rangle \tag{26}$$

Lo mismo pasa con $(J_-)^n |j\rangle; n=0,1,2,3,\dots$, suponemos que el ultimo es $|l\rangle$,

$$\begin{aligned}
 J_- |l\rangle &= 0 \\
 0 &= \langle j | J_- J_- |l\rangle = \langle j | J_- J_- |l\rangle \\
 0 &= \langle j | J_-^2 - J_3 + J_3 |l\rangle \\
 0 &= [j(j+1) - l(l-1)] \langle j | l\rangle
 \end{aligned}$$

$\Rightarrow -j=1, |l\rangle = |-i\rangle, (J_-)^n |j\rangle; n=0,1,2,3,\dots; J_-(-j) = 2j = n$, por lo tanto los posibles valores de j son

$$j = 0, \frac{1}{2}, 1, \frac{3}{2}, \dots \tag{27}$$

El número de vectores en la base construida es $2j+1$. $m=j$ y la dimensión es $2j+1$.

TEOREMA. Las representaciones irreducibles del álgebra de SO (3) están caracterizadas por j , un entero positivo o un semi-entero. La base

$$J_-^2 |j, m\rangle = |j, m\rangle (j(m+1)) \tag{28}$$

$$J_3 |j, m\rangle = |j, m\rangle m \tag{29}$$

$$J_\pm |j, m\rangle = |j, m\rangle [j(m+1) - m(m \pm 1)]^{\frac{1}{2}} \tag{30}$$

da una base que es ortonormal.

$$U(\alpha, \beta, \gamma) |j, m\rangle = |j, m'\rangle D^j(\alpha, \beta, \gamma)_m^{m'} \tag{31}$$

$$R(\alpha, \beta, \gamma) = e^{-i\alpha J_3} e^{-i\beta J_2} e^{-i\gamma J_3} \tag{32}$$

$$D^j(\alpha, \beta, \gamma) = e^{-i\alpha m'} d^i(\beta)_m^{m'} e^{-i\gamma m} \tag{33}$$

$$d^i(\beta)_m^{m'} = \langle j, m' | e^{-i\beta J_2} | j, m \rangle \tag{34}$$

Las últimas dos ecuaciones son las representaciones irreducibles de SO(3) para cualquier j .

b) SU (2). Matrices de 2x2 con $\det(1)$

Teorema. Una matriz U unitaria de 2x2, siempre se puede escribir como:

$$U = e^{i\lambda} \begin{pmatrix} \cos \theta e^{i\rho} & -\sin \theta e^{i\eta} \\ \sin \theta e^{-i\eta} & \cos \theta e^{-i\rho} \end{pmatrix} \tag{35}$$

donde $0 \leq \theta \leq \pi, 0 \leq \lambda \leq \pi, 0 \leq \eta, \rho \leq 2\pi$. Si la matriz $U \in SU(2)$, $\det=1, \Rightarrow \lambda = 0$.

La dimensión de $SU(2)$ es 3 esto quiere decir que para desarrollar el grupo necesitamos tres parámetros, por lo que podemos escribir la misma forma de $SU(2)$ como

$$D^{\frac{1}{2}}(\alpha, \beta, \gamma) \quad (36)$$

Con $\theta = \frac{\beta}{2}, \rho = \frac{-(\alpha+\gamma)}{2}, \eta = \frac{(-\alpha+\gamma)}{2}$, donde $0 \leq \beta \leq \pi, 0 \leq \alpha \leq 2\pi, 0 \leq \eta \leq 4\pi$.

Realizando otra reparametrización en la matriz A de la siguiente forma:

$$A = \begin{pmatrix} r_0 - ir_3 & -r_2 - ir_1 \\ r_2 - ir_1 & r_0 - ir_3 \end{pmatrix} \quad (37)$$

$$\text{donde } \det A = r_0^2 + r_1^2 + r_2^2 + r_3^2 = 1$$

De lo anterior se puede observar que el grupo $SU(2)$ es topológicamente una esfera en 4D y que es isomorfo esto quiere decir que es cerrado y acotado.

Ahora podemos tomar a $r_0 = [1 - (r_1^2 + r_2^2 + r_3^2)]^{\frac{1}{2}}$, así podemos escribir cualquier matriz unitaria de 2x2 como:

$$A = E - idr^* \sigma_k \quad (38)$$

y podemos ver que cumple

$$[\sigma_k, \sigma_l] = 2i \varepsilon^{klm} \sigma_m \quad (39)$$

c) MEDIDA INVARIANTE

La medida invariante para cualquier grupo está dada de la forma

$$\int f(A) d\tau_A = \int f(B^{-1}A) d\tau_A = \int f(A) d\tau_{BA} \quad (40)$$

donde $d\tau_A$ para el caso del grupo $SU(2)$ es:

$$d\tau_A = \frac{1}{8} d(\cos 2\theta) d\rho d\eta \quad (41)$$

O en ángulos de Euler tenemos:

$$d\tau_A = \frac{1}{16} d\alpha d(\cos \beta) d\gamma \quad (42)$$

Las representaciones irreducibles de $SU(2)$ satisfacen:

$$(2j+1) \int d\tau_A D_j^\dagger(A)_n^m D^{j'}(A)_{n'}^{m'} = \delta_j^{j'} \delta_n^{n'} \delta_m^{m'} \quad (43)$$

Tomando los ángulos de Euler tenemos:

$$\frac{(2j+1)}{2} \int d(\cos \beta) d^j(\beta)_n^m d^{j'}(\beta)_{n'}^{m'} = \delta_j^{j'} \quad (44)$$

Teorema de Peter-Weyl.

Las representaciones irreducibles de $D^j(A)_n^m$, forman una base completa del espacio de funciones integrales en el grupo [1,2].

$$f(A) = \sum_{j,m,n} f_j^n D^j(A)_n^M \quad (45)$$

donde:

$$f_j^n = (2j+1) \int d\tau_A D_j^j(A)_n^m f(A) \quad (46)$$

$$\sum_{j,m,n} (2j+1) D^j(A)_N^M D_j(A)^{j'n} = \delta(A - A') \quad (47)$$

$$\delta(A - A') = 16\pi\delta(\alpha - \alpha')\delta(\cos \beta - \cos \beta')\delta(\gamma - \gamma') \quad (48)$$

IV. CONCLUSIONES

Estudiar teoría de grupos puede resultar sumamente difícil y estudiar representaciones irreducibles de grupos continuos para alguien que no estudia matemáticas abstractas es muy difícil, pero logramos realizar estas representaciones con pensamiento matemático y lógico. Resulta importante estos dos grupos continuos ya que sus representaciones irreducibles, resultan ser iguales e isomorfas y no solo eso, si no que toda el álgebra de Lie detrás de ellos son iguales, esto significa que podemos decir que $SU(2) \rightarrow SO(3)$ son equivalentes. Los resultados anteriores pueden generalizarse a cualquier grupo, ya que cualquier grupo puede ser equivalente a otro grupo de menor dimensión. Estudiar un grupo nos puede ayudar a saber el comportamiento de algún otro grupo, por ejemplo, lo que acabamos de realizar. Por resaltar el grupo continuo $SO(3)$ es con el cual podemos desarrollar la mecánica cuántica, en otras palabras, es con el cual podemos estudiar la teoría cuántica del momento angular. Ya que sus representaciones irreducibles nos dan mucha información, por ejemplo las representaciones irreducibles del grupo $SO(2)$ nos da Fourier, sin embargo estudiar teoría de grupos y sus representaciones nos abren las puertas a seguir estudiando cualquier rama de la física moderna actual, por mencionar alguna podemos comenzar a estudiar gravedad cuántica de lazos (aunque para ello necesitamos más allá que solo teoría de grupos).

REFERENCIAS

- [1] ARFKEN, G.; WEBER, H.; HARRIS F. (1985). Mathematical methods for physics, Miami university, academic press 243-267.
- [2] SZEKERES P.; (2004). A course in modern mathematical physics. Cambridge university press, 2, 27-52

Síntesis de bio-coloides formados con dobles cadenas de ADN

Diana Lizbeth Quiroz Palos

Universidad Autónoma de Aguascalientes
Ciencias Exactas
Av. Universidad #940
C.P. 20100, Aguascalientes, Ags.
diana.26.quiroz@gmail.com

Asesor: Marco Laurati

Universidad de Guanajuato
División de Ciencias e Ingenierías, Campus León
Lomas del bosque #103
C.P. 37150, León, Gto.
mlaurati@fisica.ugto.mx

Resumen — En este trabajo se presenta el estudio de un sistema de partículas llamadas coloides a las cuales se le adhirieron cadenas de ADN de una bacteria perteneciente a la microbiota intestinal llamada *E. coli*, esto con el fin de modificar su movimiento y comportamiento, debido a que las partículas coloidales son de un tamaño muy pequeño presentan un movimiento aleatorio y desordenado denominado como movimiento browniano el cual disminuye o incluso desaparece al adherir las cadenas de ADN, en los resultados se puede observar como este comportamiento se puede ver afectado de una manera positiva al cubrir las partículas coloidales con las cadenas de ADN presentando un movimiento más homogéneo y estable.

Palabras clave — Partículas coloidales, ADN, PCR.

Abstract — This paper presents the study of a system of particles called colloids to which DNA strands of a bacterium belonging to the intestinal microbiota called *E. coli* were attached, this in order to modify their movement and behavior, because The colloidal particles are of a very small size, they present a random and disorderly movement called Brownian movement which decreases or even disappears when the DNA chains are adhered, in the results it can be observed how this behavior can be affected in a positive way cover colloidal particles with DNA chains presenting a more homogeneous and stable movement.

Keywords — Colloidal particles, DNA, PCR.

I. INTRODUCCIÓN

El ADN (ácido desoxirribonucleico) es la molécula que contiene la información genética de los seres vivos, durante el último medio siglo, el ADN ha sido exclusivamente orientado al área biológica estudiando su impacto biológico y sus propiedades moleculares, sin embargo, hoy en día se ha considerado como un material de construcción útil ya que puede ser flexible y rígido, eso dependiendo de la longitud de las hélices.

Existen técnicas que nos ayudan a trabajar con el ADN, una de las más famosas es la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la cual nos ayuda a la amplificación del ADN, esto quiere decir que nos ayuda a que de un fragmento o secuencia en particular del ADN podamos obtener miles de copias ya que esta amplificación va aumentando exponencialmente (Fig. 2) la cantidad de la región específica de ADN que se busca (E. Stiakakis, 2011).

Los elementos clave para una reacción de PCR son *Taq* polimerasa, cebadores, ADN molde y nucleótidos, estos se colocan en un tubo y se someten a ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento que permiten la síntesis del ADN.

Los pasos básicos de la PCR son (Fig.1):

- **Desnaturalización (96 °C):** la reacción se calienta bastante para separar, o desnaturalizar, las cadenas de ADN. Esto proporciona los moldes de cadena sencilla para el siguiente paso.
- **Templado (55 – 65 °C):** la reacción se enfría para que los cebadores puedan unirse a sus secuencias complementarias en el molde de ADN de cadena sencilla.
- **Extensión (72 °C):** la temperatura de la reacción se eleva para que la *Taq* polimerasa extienda los cebadores y sintetice así nuevas cadenas de ADN (Khan Academy, 2019).

Los resultados obtenidos por medio de una reacción de PCR se pueden visualizar y a su vez corroborar al usar electroforesis en gel, esta es una técnica en la que una corriente eléctrica impulsa fragmentos de ADN a través de una matriz de gel y los fragmentos de ADN se separan según su tamaño, por lo general se incluye un marcador de peso molecular para de esta manera poder determinar el tamaño de nuestra muestra de PCR (Fig. 3) (Reece, 2011).

En este proyecto se busca la unión de las cadenas de ADN a partículas de 1 μ esto se puede llevar a cabo gracias a que al sintetizar el ADN se le añade en el extremo 5' biotina ya que esto ayuda a que las cargas de la partícula y las cadenas de ADN no sean repulsivas si no sean atraídas y permanezcan unidas por medio de uniones covalentes.

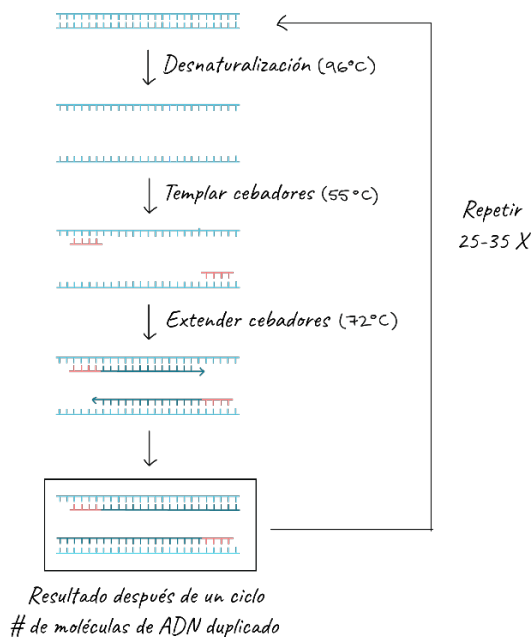


Fig. 1. En la etapa de desnaturalización la cadena de ADN se separa permitiendo que los cebadores se unan y con ayuda de la *Taq* polimerasa se vayan pegando los nucleótidos complementarios a la cadena molde para de esta forma realizar las copias de ADN (Khan, 2019).

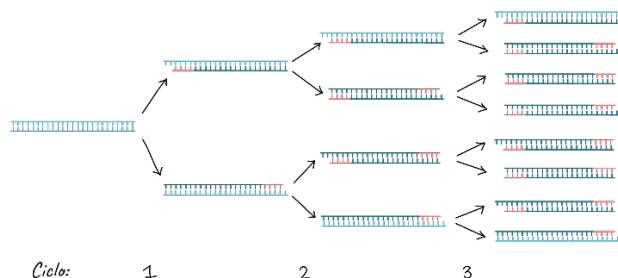


Fig. 2. Patrón de crecimiento exponencial (Khan, 2019).

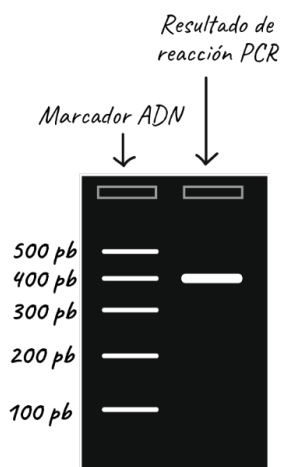


Fig. 3. Resultados de cómo se vería un gel de electroforesis, el marcador nos ayuda a identificar el tamaño del ADN sintetizado ya que todas las moléculas del mismo peso avanzan las mismas distancias (Reece, 2011).

II. METODOLOGÍA

Se colocaron los primers, la enzima y el molde de ADN con una longitud de 10 Kbp perteneciente a la bacteria *E. coli* en un tubo eppendorf el cual se llevó al termociclador por 6 horas para realizar la amplificación del ADN, posteriormente para su análisis se preparó un gel de agarosa a una concentración de 6%, en un matraz de 125 mL, se pesaron 0.18 g y se aforo a un peso de 30 g completando con buffer TAE a una concentración de 1%, se llevó al microondas, esto con el fin de disolver completamente la agarosa, se le colocó bromuro de etidio teniendo cuidado y precaución debido a que este es un compuesto mutagénico, se dejó enfriar un poco y se colocó en el molde de electroforesis procurando cubrir de manera homogénea el molde, una vez solidado se retiró el peine de los pocillos con cuidado de no rasgar el gel y se colocó de tal forma que los pocillos quedaran del lado negativo, esto debido a la carga del ADN ya que de esta forma se ayuda a la migración y separación del ADN, se llenó la cámara de electroforesis del buffer TAE al 1% hasta cubrir el gel de agarosa y se procedió al llenado de los pocillos, se colocó en uno de ellos un marcador de peso molécula, esto con el fin de poder determinar la longitud de las cadenas obtenidas en la PCR acompañado un colorante de carga, en los demás pocillos se procedió a la colocación de las muestras obtenidas en la PCR con su colorante de carga, se colocó más buffer hasta llegar a la marca indicada y se conectaron los cables a una fuente de

voltaje en la que se corrió por alrededor de 2 hrs a 70 V, una vez que se comprobó que hubo una buena amplificación el ADN se lavó y concentro, esto se realizó con ayuda de un filtro y una solución de lavado, una vez realizado esto se prosiguió a la elaboración del sistema, con la ayuda de unos cálculos se obtuvo la cantidad de partículas y ADN a utilizar, por cada partícula se buscó colorar una cantidad aproximada de 100 000 cadenas así que para esto se colocó en un tubo ependorff 1 μ l de partículas de polietileno con un radio de 1 μ m, 7.6 μ l de ADN de una longitud de 10 Kbp y 1.24 μ l de yoyo-1 el cual es un colorante fluorescente que nos ayudara para la visualización del ADN y por consecuente de las partículas, se homogenizo y se dejó por alrededor de 24 hrs en una agitador de 360° a una temperatura de 20°C, al finalizar este tiempo se llevaron lavados del sistema para retirar las moléculas de ADN que no fueron adheridas a las partículas, para finalizar la elaboración del sistema y permitir su visualización, se realizó la elaboración de una celda con ayuda de un capilar el cual se llenó por medio de capilaridad para finalmente ser sellado y llevarlo a observación para su posterior análisis.

III. RESULTADOS

Una vez realizado el sistema, este se llevó para su observación al microscopio confocal en el que se obtuvieron las siguientes observaciones.

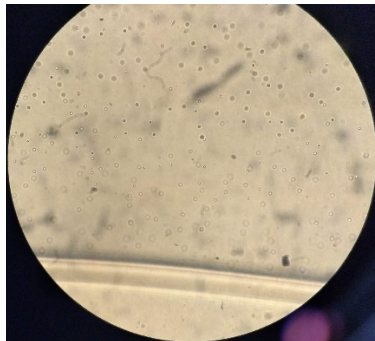


Fig.4 . Sistema observado en campo claro.



Fig. 5. Sistema observado con luz fluorescente.

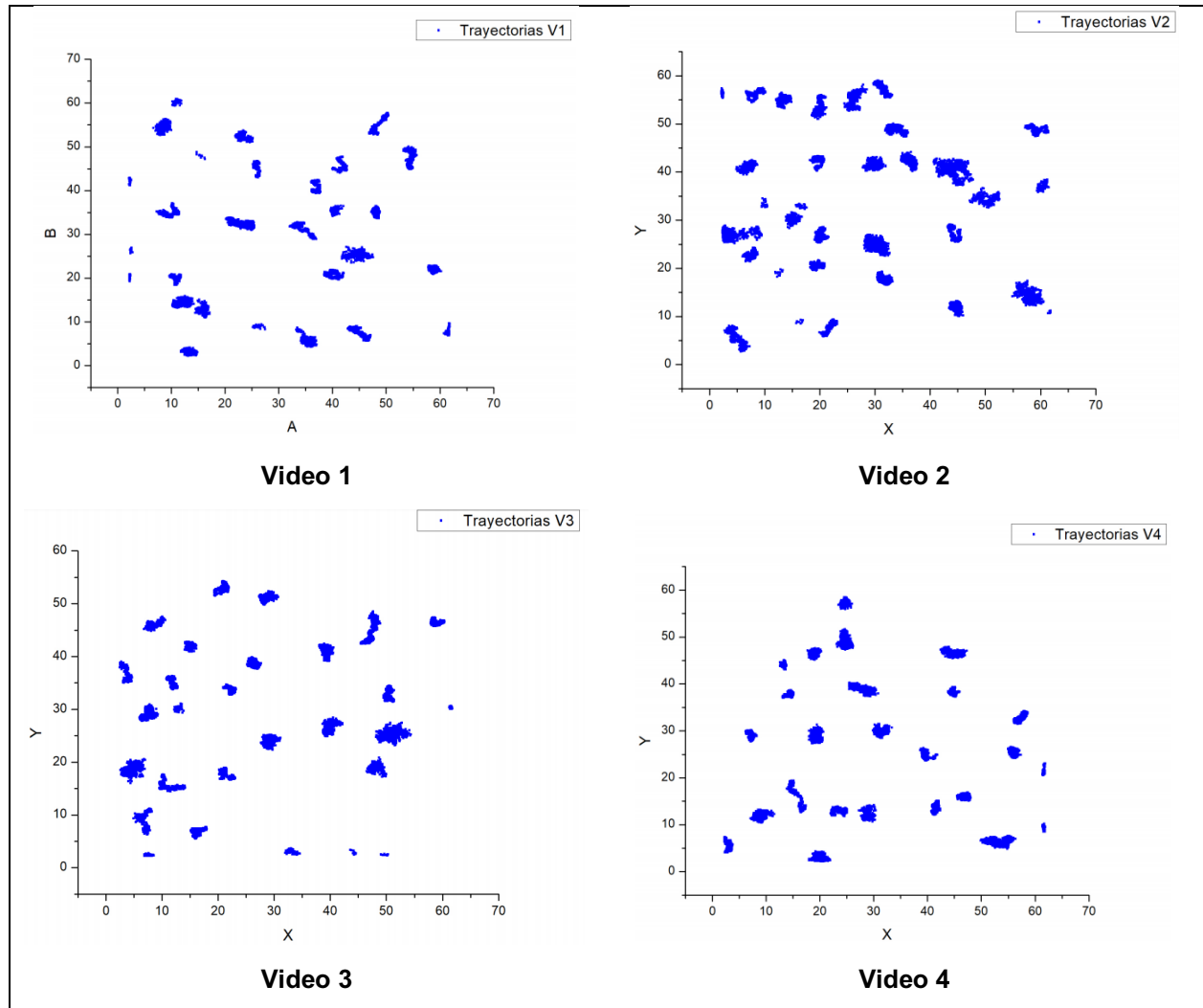
Posteriormente se tomaron cinco videos (resolución de 512 x 512 pixeles por 1000 imágenes en cada video) en diferentes regiones del capilar utilizando la luz fluorescente, estos fueron utilizados para posteriormente realizar un análisis con la ayuda del software IDL (interactive Data Language), el cual, es un lenguaje de programación utilizado para el análisis de datos.

Se localizaron aquellas partículas cuyo radio se encontraba en un promedio de 6 pixeles que es un equivalente a 0.7518 μ (1 píxel = 0.1253 μ), esto es debido a que nuestras partículas de 1 μ al ser rodeado por el ADN ha incrementado 12 μ dando un total de 13 μ como diámetro.

Se selecciono una imagen perteneciente al video la cual fue analizada con el fin de poder detectar la mayor cantidad de partículas presentes en la imagen, esto se llevó a cabo con la ayuda de filtros para de esta manera disminuir el ruido presente en la imagen y que

el programa solo detectara los puntos más brillantes y que correspondieran a un radio de 6μ y así obtener las partículas de nuestro interés en el sistema.

Se realizó un análisis de cada video para estudiar las posiciones y trayectorias de las partículas, para visualizar esto se utilizó el software ORIGIN que con ayuda de los datos obtenidos en IDL el cual nos permitió graficar las posiciones de la configuración cero y la configuración 999 así como sus trayectorias.



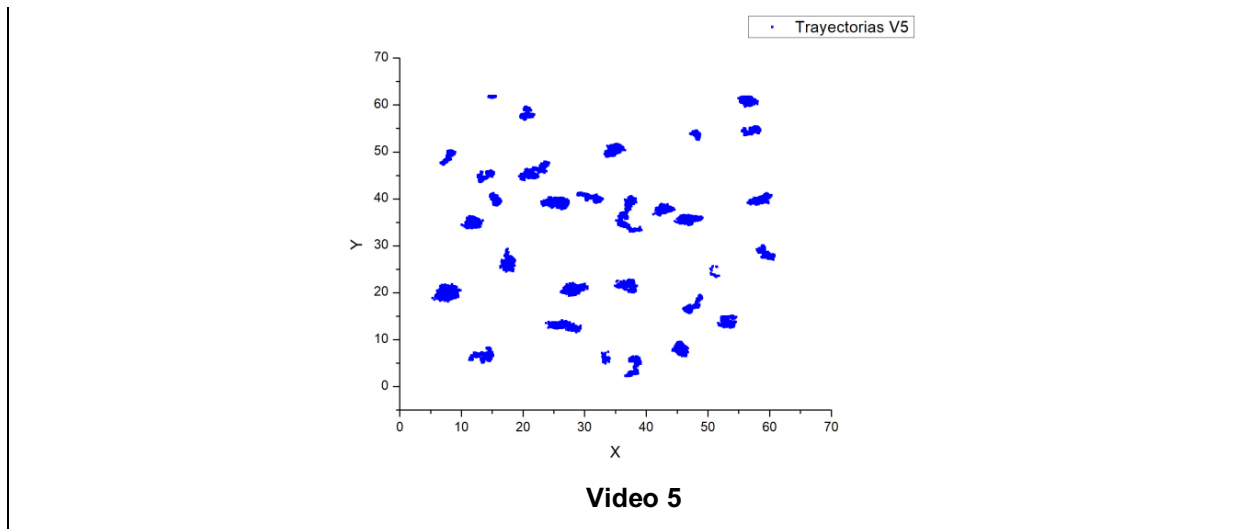


Fig.6. Trayectorias de las partículas en los videos tomados a lo largo del capilar.

Al realizar un promedio de los datos obtenidos a lo largo del análisis de los videos se obtuvo con ayuda del software IDL la función de distribución radial $g(r)$ la cual nos permite calcular la probabilidad de encontrar una partícula en un radio determinado.

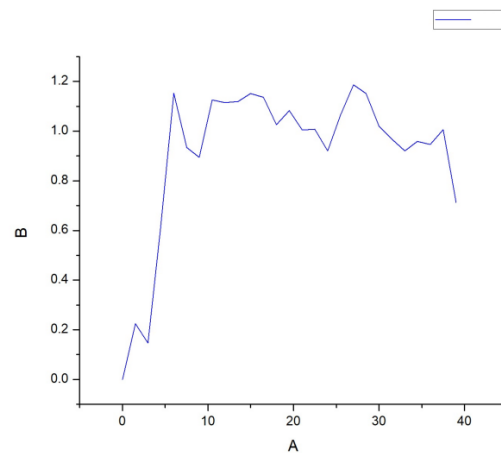


Fig.7. Grafica de la $g(r)$ obtenida con la ecuación $r + dr$ donde $r = 6$ y $dr = 1.5$.

IV. CONCLUSIONES

Se evaluó y analizó el comportamiento de las partículas coloidales a las que les adhirieron cadenas de ADN de *E. coli* de una longitud de 10 Kbp mostrando como resultado una modificación en el movimiento de estas, debido que al estar recubiertas de ADN mostraron un movimiento más homogéneo y organizado disminuyendo el movimiento browniano común en este tipo de partículas, de esta manera, también se demostró que el ADN además de ser de gran importancia para el área biológica, resulta ser un buen material de implementación para otro tipo de investigaciones.

V. RECONOCIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por las facilidades y el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano, así como a la División de Ciencias e Ingenierías por su recibimiento, al Dr. Laurati y a su alumna de doctorado Ivany Romero por el asesoramiento en el proyecto realizado en el verano.

REFERENCIAS

- E. Stiakakis. (2011). *Constructing complex materials with DNA*. Institut für Festkörperforschung. Forschungszentrum Jülich GmbH. pp. 2- 6
- Reece, J. B. et al. (2011). *Forensic evidence and genetic profiles*. 10° ed. Ed. Person, San Francisco, Ed. Person, pp. 430 – 431.
- Khan Academy. (2019). *Métodos de análisis del ADN*. Recuperado el 8 de agosto de 2019 de <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>

Síntesis de materiales magnéticos, compósitos cristalinos y nanocristalinos

Brian Zamora Martínez

Tecnológico Nacional de México en Celaya
(Instituto Tecnológico de Celaya ITC)
Antonio García Cubas Pte. #600 esquina Av.
Tecnológico, Fovissste, 38010. Celaya, Gto.
16030548@itcelaya.edu.mx

Asesor: José Luis Sánchez Llamazares

Instituto Potosino de Investigación Científica y
Tecnológica (IPICYT)
Camino a la Presa de San José #2055, Lomas 4ta
Sección, 78216, San Luis Potosí, S. L. P.
jose.sanchez@ipicyt.edu.mx

Resumen —El siguiente texto describe brevemente el apoyo brindado al grupo de investigación sobre los tópicos relacionados al estudio experimental de materiales con efecto magnetocalórico en cintas obtenidas por enfriamiento ultrarrápido, todo ello con la finalidad de conocer las aleaciones adecuadas para desarrollar tecnología de refrigeración magnética. Específicamente en tal trabajo se comenzó con la síntesis de aleaciones ErAl_2 y HoAl_2 desde el corte de las tierras raras, consecuentemente con la fundición en horno arco eléctrico y finalmente la generación de cintas por un equipo de enfriamiento ultrarrápido, lamentablemente el tiempo para realizar adecuadamente la síntesis es extenso teniendo en cuenta contratiempos tal como el mantenimiento de uno o más equipos, por lo tanto no fue posible terminarla.

Palabras clave — Efecto magnetocalórico, refrigeración magnética, tierras raras.

Abstract — The following text describes briefly all support given to the research group, which studies experimental topics related to materials with magnetocaloric effect, these materials are obtained in ribbons by a melt spinning system, all in order to know the appropriate alloys for development of magnetic refrigeration technology. Specifically the work began by the synthesis of ErAl_2 and HoAl_2 alloys, firstly with the cutting of rare earths, consequently the melting by an electric arc furnace and finally the fabrication of alloy ribbons by rapid solidification using the melt spinning technique. Unfortunately time was inappropriate for an entire synthesis of ribbon alloy, having into consideration setbacks as the maintenance of one or more instruments, thus it was not able to finish it.

Keywords — Magnetocaloric effect, magnetic refrigeration, rare earth metal.

I. INTRODUCCIÓN

La refrigeración magnética como tecnología de enfriamiento a temperatura ambiente parece ser muy prometedora en años venideros en sustitución a la refrigeración convencional basada en la compresión y expansión de gases. Su descubrimiento se remonta al siglo XX (el siglo de la física), y está perfectamente establecido que esta ciencia aplicada puede ser útil en sistemas de refrigeración a temperaturas ultrabajas (cerca del cero absoluto). Sin embargo, el desarrollo de los sistemas de refrigeración a temperatura ambiente resulta aún hoy día un reto para científicos y tecnólogos en todo el mundo [1].

La creación de una tecnología más eficiente y eficaz resultaría en un avance mundial dejando a un lado los sistemas hechos con ciclos termodinámicos de expansión y compresión de fluidos, los cuales en su mayoría son contaminantes y dañinos para el medio ambiente (CFC) [2], o bien tóxicos para el ser humano, de ahí la relevancia de apoyar la investigación en este campo de la física experimental.

No es la excepción para México, donde grupos de investigación generan conocimiento para creación, comparación y utilidad de mejores y nuevos materiales magnetocalóricos que presenten las características adecuadas para su empleo en esta nueva tecnología emergente.

El desarrollo de estos materiales *novedosos* está íntimamente relacionada con el estudio del efecto magnetocalórico (EMC) en materiales ferromagnéticos con transiciones de segundo y primer orden. Por esta razón, el EMC es un fenómeno muy interesante con investigaciones en constante crecimiento tanto en ciencia básica como aplicada alrededor del mundo en los últimos 20 años [3]. Sin embargo, su estudio práctico aún tiene algunos retos a resolver en futuros estudios, entre los que se encuentra, principalmente, la búsqueda y fabricación de aleaciones a bajo costo, que sean estable y con buenas propiedades magnetocalóricas. Diversas investigaciones han dado lugar a nuevas aleaciones entre distintos metales y elementos de las tierras raras que han demostrado tener excelentes propiedades magnetocalóricas en el rango de las temperaturas criogénicas.

II. MARCO TEÓRICO

A. *Materiales magnéticos y efecto magnetocalórico*

Los materiales magnéticos se clasifican de acuerdo a su respuesta a un campo magnético aplicado, estos pueden ser:

Ferromagnéticos: los átomos tienen momentos magnéticos permanentes orientados paralelamente entre sí que se alinean fácilmente con un campo magnético externo aplicado. Estos materiales pueden retener algo de su magnetización incluso después de remover el campo magnético aplicado. Algunos ejemplos son: níquel, hierro, y cobalto.

Paramagnéticos: también tienen átomos que poseen momento magnético que tienden a alinearse con un campo magnético externo aplicado, pero su respuesta es extremadamente débil en comparación a un material ferromagnético. Un material ferromagnético se vuelve paramagnético cuando se calienta por encima de la Temperatura de Curie T_C .

Diamagnéticos: un campo magnético externo aplicado induce una magnetización muy débil que es opuesta al campo magnético aplicado. Como fenómeno, no se suele estudiar observar mucho debido a que como los materiales que presentan paramagnetismo y ferromagnetismo son más intensos son los que presentan aplicación práctica [4].

El efecto magnetocalórico es un fenómeno propio de los sólidos ferromagnéticos que se describe como la variación de la temperatura o de la entropía al aplicar sobre ellos un campo magnético externo adiabática o isotérmicamente, respectivamente. Este efecto fue descubierto por el físico francés Pierre Weiss en 1917 [5].

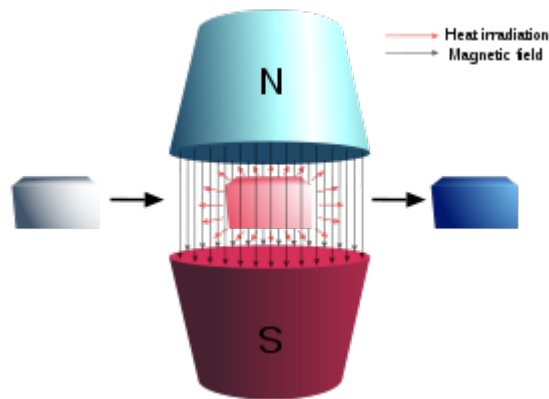


Fig. 1. Ilustración del efecto magnetocalórico.

La variación de la temperatura es debida a la alineación de los momentos magnéticos del material con el campo magnético en la región de temperatura donde el material presenta temperatura de Curie (T_C) (temperatura a la cual el material cambia su estado de paramagnético a ferromagnético) [4].

En los sistemas magnetocalóricos se distinguen dos tipos de transiciones de fase: las de primer orden, donde coexisten las dos fases en equilibrio y presentan una discontinuidad en el volumen y las de fase continua o de segundo orden, en las que se pasa de forma continua de una fase magnética a otra [6].

Para caracterizar el efecto magnetocalórico se va a hacer uso de las relaciones termodinámicas de Maxwell. Todo el proceso parte de la medición de las las isotermas de imanación $M(H, T)$ en un intervalo de temperatura en torno a las temperatura de transición, tanto de primer como de segundo orden. Una vez obtenidas las isotermas, hallamos la variación de entropía magnética mediante las relaciones termodinámicas de Maxwell [6].

B. Refrigeración magnética

La refrigeración magnética ha sido estudiada y diversos modelos de refrigeradores han sido probados en los últimos 20 años [1].

Hoy en día la tecnología no es 100% eficiente, modelos usando materiales con tierras raras has demostrado su eficacia en temperaturas criogénicas, sin embargo el principal reto es la fabricación de sistemas refrigerantes que logren alcanzar temperatura ambiente [8].

III. MATERIALES Y MÉTODOS

La síntesis de los materiales que se pretendían estudiar durante mi estancia de Verano de la Ciencia se realizó con las tierras raras Erblio (99.9% Alfa Aesar) y Holmio (99.9% Feng, China). El objetivo era preparar las aleaciones $ErAl_2$ y $HoAl_2$. Antes de la fundición se cortó el metal en una cortadora automática de baja velocidad con ayuda de un disco de metal/diamante (MetLab). El procedimiento del corte es tardado debido a la velocidad de la cortadora y depende de factores como la dureza del material.



Fig. 2. Horno de Arco Eléctrico MAM-1, Edmund Bühler.



Fig. 3. Sistema Melt-Spinning modelo SC de Edmund Bühler.

La fundición por horno arco eléctrico (Compact Arc Melter MAM-1, Edmund Bühler) y fabricación de cintas por enfriamiento ultrarrápido (Melt-Spinning SC, Edmund Bühler) fueron a las mismas condiciones que en el estudio realizado descrito en 2017 por J.L. Sánchez Llamazares, et al. [7].

IV. RESULTADOS

A causa de factores externos e infortunios del verano no se realizó por completo la síntesis de las aleaciones previstas, esto principalmente debido a la prolongación del corte de los metales de tierra rara (cortadora automática de baja velocidad) y el mantenimiento de equipos e instrumentos de síntesis y caracterización del laboratorio de tratamiento térmico y arco eléctrico de la división.

V. DISCUSIÓN

No fue posible concretar el análisis de datos experimentales, ya que la indagación y estudio de las aleaciones metálicas se realiza en la caracterización del material, misma que tuvo contratiempos ya mencionados en la sección anterior.

VI. CONCLUSIONES

El estudio minucioso de materiales con efecto magnetocalórico es todo un procedimiento de duración indefinida, por lo tanto la paciencia y dedicación son puntos muy relevantes que siempre deben tenerse en consideración; simplemente la síntesis del material puede llevar semanas o meses, la caracterización aunque en teoría *más rápida* depende fuertemente del estado de los instrumentos y su mantenimiento, una buena caracterización no se fía de una sola técnica experimental, sino que se busca ampliar el estudio y analizar el experimento desde el punto de vista de diversos instrumentos.

Además, como en toda área experimental de ciencias exactas e ingenierías, diversas réplicas experimentales deben ser puestas a prueba con el fin de obtener resultados confiables y destacables, por lo cual una sola muestra de aleación metálica no es representativa. Desafortunadamente todo lo antes mencionado dificulta el trabajo de investigación para un periodo muy corto de estancia. Desde mi perspectiva futuros estudios variando propiedades cualitativas y cuantitativas deben ser probados con la finalidad de obtener aleaciones óptimas y seguir con el camino hacia el desarrollo tecnológico en el país.

Como comentario final, la manipulación de un experimento no es siempre lo más relevante en esta estancia veraniega, sino la ampliación de la perspectiva personal sobre el profundo mundo científico y tecnológico en México, muchos retos han de ser cumplidos para alcanzar estabilidad y representación a nivel mundial. Precisamente tales programas de la ciencia se usan para acercar a jóvenes inexpertos de licenciatura a la vida laboral a la que muy pronto entraremos y prepararlos para adoptar una actitud de superación personal y para el país, y sobre todo conocer si un área de la ciencia es totalmente de su interés o si bien, se prefiere tratar con una división alterna a ya trabajado.

VII. RECONOCIMIENTOS

Agradezco primeramente a mi institución de procedencia el Tecnológico Nacional de México en Celaya (ITC) por su apoyo, tanto como institución que promueve estancias de verano científicas y tecnológicas, como por su patrocinio económico.

Dentro de la institución al Dr. Guillermo González por su soporte mediante una carta de recomendación brindada con el fin de realizar mi estancia.

Es también para mí un honor haber sido recibido por el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) por brindarme la infraestructura y servicios adecuados para una estancia amena. Dentro del instituto agradezco inmensamente al Dr. José Luis Sánchez Llamazares y a todos sus alumnos de posgrado por su disposición y amabilidad.

REFERENCIAS

- [1] J. Dieckmann, K. Roth, and J. Brodrick, "Magnetic refrigeration," *ASHRAE J.*, 2007.
- [2] P. M. Haas, "Banning chlorofluorocarbons: Epistemic community efforts to protect stratospheric ozone," *Int. Organ.*, 1992.
- [3] J. L. Sánchez Llamazares, P. Ibarra-Gaytán, C. F. Sánchez-Valdés, P. Álvarez-Alonso, and R. Varga, "Enhanced magnetocaloric effect in rapidly solidified HoNi₂ melt-spun ribbons," *J. Alloys Compd.*, vol. 774, pp. 700–705, Feb. 2019.
- [4] R. A. y C. V. Serway, *Fundamentos de física*. 2012.
- [5] "Biography of PIERRE-ERNEST WEISS." [Online]. Available: <http://theor.jinr.ru/~kuzemsky/pwbio.html>. [Accessed: 12-Aug-2019].
- [6] A. Vázquez, R. Directores, P. Lazpita, and V. A. Chernenko, "Efecto magnetocalórico en aleaciones ferromagnéticas con memoria de forma monocristalinas de FeNiCoGa."
- [7] J. L. Sánchez Llamazares, P. Ibarra-Gaytán, C. F. Sánchez-Valdés, P. Álvarez-Alonso, and A. D. Martínez-Iniesta, "Synthesis and magnetocaloric characterization of rapidly solidified ErMn₂ melt-spun ribbons," *Intermetallics*, vol. 88, pp. 41–45, Sep. 2017.

Síntesis de nanocompositos de poliéster-uretanos reforzados con nanotubos de carbono funcionalizados

Teresa Verónica Ruíz Reyes

Universidad Autónoma de Aguascalientes
Aguascalientes, Ags. Centro de ciencias básicas
y exactas. Ingeniería Bioquímica.
Avenida Universidad 940, C.U., 20130
Aguascalientes, Ags
teresa.veronica.ruiz.reyes@gmail.com

Asesor: Antonio Martínez Richa

Universidad de Guanajuato
Guanajuato, Gto. Departamento de Química.
División de Ciencias Naturales y Exactas, Col
Noria Alta s/n México 36050
richa@ugto.mx

Resumen — En este trabajo se realizó un proceso de funcionalización de nanotubos de carbono mediante el tratamiento con ácido (mezcla de ácido nítrico y ácido sulfúrico). Se elaboró un poliuretano a partir de un diol biodegradable a base de ϵ -caprolactona (PCL-diol), dietilenglicol y hexametilén diisocianato. Esto con el fin de funcionalizar los nanotubos de carbono y mejorar la interacción con diferentes matrices, llevando a la formación de materiales con mejores propiedades mecánicas, mejor resistencia al calor y a un aumento la cristalinidad del material (una morfología más ordenada). El material se caracterizó por microscopía electrónica de barrido, espectroscopia de infrarrojo, ensayos mecánicos, difracción de rayos X.

Palabras clave — Nanotubos de carbono, poliuretanos, dioles biodegradables, nanocompuestos

Abstract — In this work, functionalization of carbon nanotubes was carried out using an acid treatment (a mixture of nitric and sulfuric acid). A polyurethane was made from a biodegradable diol based on ϵ -caprolactone (PCL-diol), diethylene glycol and hexamethylene diisocyanate. This in order to functionalize the carbon nanotubes and improve the interaction with different matrices, leading to the formation of materials with better mechanical properties, better resistance to heat and an increase in the crystallinity of the material (a more ordered morphology). Final material was characterized by scanning electron microscopy, infrared spectroscopy, mechanical tests and X-ray diffraction

Keywords — Carbon nanotubes, polyurethanes, biodegradable diols, nanocomposites

I. INTRODUCCIÓN

Los poliuretanos son polímeros que contienen grupos uretanos. Teniendo en cuenta que un uretano es un compuesto con un grupo OR y un grupo NHR unidos al mismo carbono de un grupo carbonilo. Uno de los poliuretanos más comunes se prepara con diisocianatos y dioles, siendo los únicos polímeros de condensación en los que no se pierde agua. Se utilizan los dioles ω -telechelic, los cuales se produjeron por biocatálisis. Utilizando dietilenglicol (DEG) como co-iniciador y Yarrowia Lypolitica lipasa como biocatalizador.

Los poliuretanos termoplásticos (PU) biodegradables son los materiales de elección para muchas aplicaciones biomédicas, debido a sus propiedades tales como fácil fabricación, flexibilidad, biocompatibilidad, bioestabilidad, degradabilidad y buena adhesión. El camino común para obtener los poliuretanos es realizar una reacción de condensación con un isocianato y un diol. Teniendo que a 50 °C los isocianatos reaccionan con el hidroxilo.

Los nanotubos de carbón (CNT) se habían utilizado para estas aplicaciones conduce a cambios estructurales que mejoran los materiales. En algunos casos, la adición de

nanotubos de carbono en una matriz polimérica produce un aumento en las propiedades tales como tenacidad, resistencia a la compresión, resistencia a la flexión y resistencia a la fatiga. La morfología observada de los nanocompuestos resultantes depende de los distintos grupos orgánicos utilizados para modificar nanorellenos, que pueden interactuar de manera diferente; significa que dependiendo de la naturaleza y número de grupos funcionales presentes en nanotubos de carbono pueden ser independientemente reforzados.

El objetivo del trabajo es obtener una comparación con respecto a las propiedades de los materiales reforzados con nanocompositos aplicados a poliuretanos y la matriz pura.

II. MARCO TEÓRICO

Un polímero es una molécula grande formada por la repetición de unidades químicas simples o monómeros, también suelen nombrarse con base al término de macromolécula; estos son producidos a partir de materias primas del petróleo y gas natural, con la excepción de algunos producidos por la modificación de sustancias vegetales tales como la celulosa y el hule natural.

Se tienen dos tipos de polímeros ya sean: (i) homopolimeros los cuales contienen una sola unidad estructural por lo cual tienen menores cantidades de irregularidades mientras que de igual manera se cuenta con (ii) los copolimeros los cuales contienen varias unidades estructurales. De igual manera se tiene que existen dos reacciones de polimerización para poder obtener las reacciones de polimerización ya sea por adición o por condensación.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. La funcionalización de los nanotubos de carbono se realiza por medio de un tratamiento con ácido:
 - a) Se pesan 100 mg de nanotubos de carbono. De igual manera se vierten 37.5 ml de ácido sulfúrico y 12.5 ml de ácido nítrico (ambos concentrados). La mezcla se coloca en un matraz redondo de 125 ml.
 - b) Se sónica la mezcla durante 15 minutos para proceder a calentar durante 3 horas a 60 °C teniendo que al término de la reacción se centrifuga a 6000 RPM durante 10 minutos para separar los nanotubos del ácido.
 - c) Se lavan los nanotubos con agua destilada para eliminar el exceso del ácido. Realizando el lavado 7 veces. Los nanotubos se secan en la estufa a 50°C
2. Síntesis de poliuretanos, reacción de polimerización:
 - a) Se pesan 2.5 gr de diol, añadiendo 0.51 gr de hexameten diisocianato, se diluyen en 20 ml de cloroformo.
 - b) Dejar en baño de aceite con constante agitación por 3 horas a 70°C
3. Polimerización in situ (preparación de nanocompuestos)

- a) Se agregan 0.5% de nanotubos a la reacción, dado que la mezcla total del poliuretano es 3 gr, se añaden 15 mg a la mezcla.
 - b) La mezcla de poliuretano se disuelve en 20 ml de cloroformo, sonicar por 30 minutos hasta la desaparición de los grumos.
 - c) Agitar y calentar a 80°C por 4 horas para completar la reacción.
4. Caracterizaciones realizadas
- a) Mediciones con espectroscopia infrarroja: Las mediciones con espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier del poliuretano y su nanocompuesto, en un espectrofotómetro Sectom Two Perkin Elmer.
 - b) Análisis termogravimétrico: (TGA; curvas TG/DTG) se obtuvieron en una termobalanza de TA instruments.
 - c) Difracción de rayos X de ángulo ancho: Se registraron en un Siemens D-500 WAXD difractómetro utilizando una fuente de 1.5406 Å
 - d) Propiedades de tensión: Se realizaron a una velocidad de 50 mm/min en una máquina United modelo SFM-10

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primero se realizó la funcionalización de los nanotubos de carbono. En la figura número 1 se pueden observar la morfología de nanotubos de carbón sin funcionalizar obtenidos por microscopía electrónica de barrido, los cuales se midieron con un software de imagen y resultaron en diámetros de 50-70 nm y de 1-2 micras de largo. En esta figura podemos constatar que la morfología es de nanotubos de pared múltiple. Dado que las dimensiones son menores a 100 nm podemos decir que se han obtenido materiales nanoestructurados.

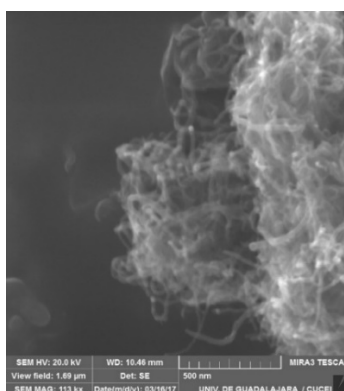


Fig. 1 Nanotubos de Carbono sin funcionalizar obtenidos por microscopía electrónica de barrido, observándose en conjunto los nanotubos entrecruzados.

En la figura 2 se muestran los espectros de infrarrojo del poliuretano y de su nanocompuesto, donde se revelan las bandas típicas de un poliuretano. La banda de los grupos hidroxilos se encuentra centrada en 3400 cm^{-1} , el doblete de la siguiente

banda es debido al estiramiento de los metilenos centrada en 2800 cm^{-1} . De igual manera en 2400 cm^{-1} se puede apreciar una pequeña banda debida al isocianato residual y la banda del carbonilo siendo la de mayor importancia para el análisis, en la cual se observa un desplazamiento a menores números de onda del poliuretano en comparación al nanocompuesto, debido a que el nanocompuesto genera mayores interacciones por puentes de hidrogeno, debido a la presencia del nanotubo de carbono. Una contribución espectral apreciable se encuentra centrada como un hombro en la banda del carbonilo, resuelta en 1680 cm^{-1} debido al ordenamiento de los grupos uretanos, lo cual indica el nanocompuesto tiene mejor ordenamiento.

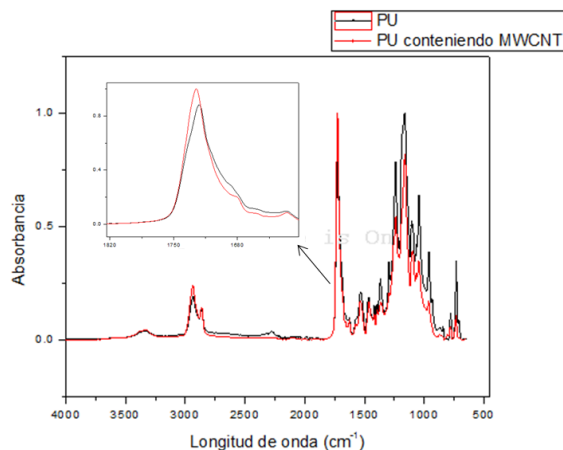


Fig. 2 Espectros de infrarrojo del poliuretano y su nanocomposito, observándose una morfología más ordenada en el nanocomposito.

En cuanto al estudio de Termogravimetría se observa en la figura 3 el desplazamiento hacia mayor temperatura del nanocompuesto, lo cual indica que requiere de mayores temperaturas para la pérdida de peso. Dado que térmicamente es mucho más estable al tener el nanocompuesto al incluir nanotubos de carbón en comparación con el poliuretano natural. Ya que el poliuretano pierde porcentaje en peso a menores temperaturas.

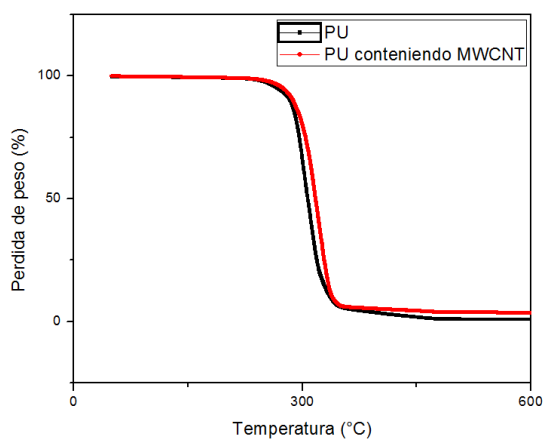


Fig. 3 Análisis termogravimetrico del Poliuretano y su nanocomposito, observando que el material compuesto es térmicamente más estable que el poliuretano.

En la figura 4 se presenta los difractogramas por dispersión de rayos X con los cuales se puede llevar a cabo el análisis de la cristalinidad. No se encontró ningún pico de cristalinidad en el poliuretano sin reforzar. De manera contraria el nanocompuesto presenta un pico de cristalinidad en 23° , lo cual indica que el nanocompuesto induce la formación de cristales, esto sugiere una mejor intercalación del nanotubo dentro de la matriz, induciendo cristalinidad como resultado del efecto sobre la matriz polimérica.

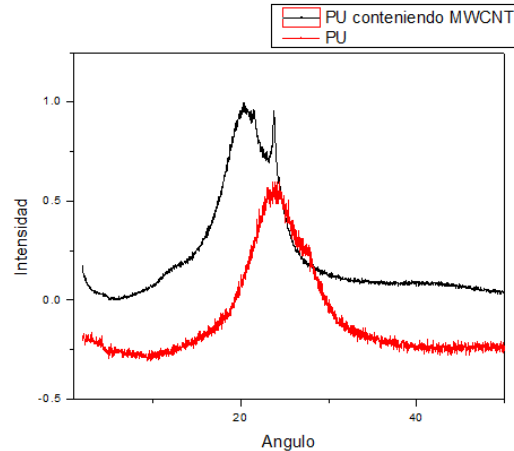


Fig. 4 Difractogramas de Rayos X del poliuretano y su nanocomposito. Observando que el material compuesto es más cristalino por la presencia de un pico en 23° .

En la figura 5 se muestran las curvas de tensión-deformación de los ensayos mecánicos realizados, en el cual se observa que el nanocompuesto presenta una pendiente (zona elástica lineal) más pronunciada en comparación con el poliuretano, de la misma forma la zona plástica también presenta mayor esfuerzo para la deformación del material, lo cual indica un mayor módulo de Young y un mayor esfuerzo para la deformación del nanocompuesto con respecto al poliuretano. El nanocompuesto presenta mejores propiedades mecánicas que el poliuretano sin reforzar.

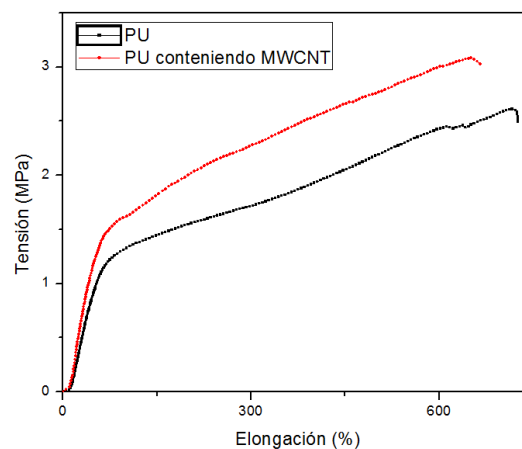


Fig. 5 Curvas de tensión-deformación del poliuretano y su nanocomposito. Observando que con base a la elongación el nanocompuesto es más eficiente que el poliuretano natural.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se encontró que al adicionar nanotubos de carbono a la matriz produce cambios importantes en la estructura del poliuretano. A través de la espectroscopia de infrarrojo podemos concluir que la morfología es más ordenada debido a que se encontró evidencia de que el nanocompuesto presenta mayores interacciones por puentes de hidrogeno y mayor ordenamiento del grupo uretano.

El análisis termogravimétrico indica que material compuesto es térmicamente más estable que el poliuretano. La caracterización por rayos X indica que el material compuesto es más cristalino con la presencia de un pico en 23°. El poliuretano reforzado contiene mejores propiedades mecánicas que poliuretano sin reforzar.

VI. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

La estudiante agradece a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano, así como a la Universidad de Guanajuato y a los doctores Antonio Martínez Richa y Antolín Cerón por el apoyo brindado.

REFERENCIAS GENERALES

- [1] J. Zhang, H. Zou, Q. Qing, Y. Yang, Q. Li, Z. Liu, X. Guo, and Z. Du, *J. Phys. Chem. B*, 107, (2003).
- [2] V. Georgakilas, K. Kordatos, M. Prato, D.M. Guldi, M. Holzinger, and A. Hirsch, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, (2002).
- [3] T. Ramanathan, F. Fisher, and R. Ruoff, and L.C. Brinson, *Chem. Mater.*, 17, (2005).
- [4] N.G. Sahoo, Y.C. Jung, H.H. So, and J.W. Cho, *J. Korean Phys. Soc.*, 51, (2007).
- [5] L.T.J. Korley, B.D. Pate, E.L. Thomas, and P.T. Hammond, *Polymer*, 47, (2006).
- [6] S.M. Liff, N. Kumar, and G.H. McKinley, *Nat. Mater.*, 6, (2007).
- [7] D.M. Crawford, R.G. Bass, and T.W. Haas, *Thermochim. Acta*, 323, (1998).
- [8] H.D. Kim, T.J. Lee, J.H. Huh, and D.J. Lee, *J. Appl. Polym. Sci.*, 73, (1999).
- [9] U. Khan, F.M. Blighe, and J.N. Coleman, *J. Phys. Chem. C*, 114, (2010).

Síntesis de nanopartículas para encapsular fármacos

Roberto Fernando Barbosa Gutiérrez

Instituto Tecnológico de Aguascalientes
Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica
Av. Adolfo López Mateos #1801 Ote. Fracc.
Bona Gens, C.P. 20256, Aguascalientes, Ags.
robertofernandobar@gmail.com

Asesor: René Darío Peralta Rodríguez

Centro de Investigación en Química Aplicada
Enrique Reyna H. No. 140, San José de los Cerritos,
25294 Saltillo, Coahuila
rene.peralta@ciqa.edu.mx

Resumen — En este proyecto se elaboró una ME tipo aceite en agua O/W compuesta por TPGS1000 como tensioactivo, proporción 80:20 agua: tensioactivo, y 3% aceite de clavo cargado con curcumina (7 mg/ml). Se incorporó una solución de quitosano con el fin de formar un recubrimiento sensible al pH. Los sistemas se caracterizaron mediante DLS. Posteriormente, se realizaron ensayos de liberación *in-vitro* a un valor de pH 6.5. Los valores de Dp de las microemulsiones fueron de 41 nm \pm 14.48 para la ME con quitosano y 15 nm \pm 0.3894 para la ME, valores dentro del intervalo óptimo para su aplicación biomédica. Mientras que los porcentajes máximos de liberación se encontraron alrededor de 60% para el sistema con quitosano y 70% para la ME sin el polímero, indicando un efecto de éste sobre la cinética de liberación de la curcumina.

Palabras clave — Microemulsión, curcumina, quitosano.

Abstract — In this project a normal O/W Microemulsion was prepared using TPGS1000 as surfactant in a proportion 80:20 water: surfactant, and 3% of clove bud oil loaded with curcumin (7mg/mL). Chitosan solution (1mg/mL) was incorporated to the formulation to form a pH sensible coating. The systems were characterized by DLS. Then, in-vitro release studies were performed under conditions of pH 6.5. Particle diameter values were 41 nm \pm 14.48 for the coated ME and 15 nm \pm 0.3894 for the uncoated ME, these values are feasible for biomedical application. The maximum curcumin release percentage of was around 60% for the coated system and 70% for the uncoated ME, these results showed an effect of chitosan on the kinetics of drug delivery.

Keywords — Microemulsion, curcumin, chitosan.

I. INTRODUCCIÓN

A. Microemulsiones como sistemas de liberación de fármacos

Las microemulsiones (ME) son sistemas coloidales que poseen características distintivas que las apartan de otros sistemas que se componen de manera similar. La definición que se maneja describe a las ME como soluciones isotrópicas, termodinámicamente estables conformadas por agua, aceite y uno o más compuestos de naturaleza anfífilica (2). Otras particularidades son el tamaño promedio de partícula que va de 10 a 100 nm, baja tensión superficial y su formación espontánea a diferencia de otros sistemas que requieren alta energía para su preparación. (3)

El desarrollo de microemulsiones ha ganado interés por su potencial aplicación como vehículo para el transporte de diversos fármacos y activos. Estos sistemas parecen ser una alternativa poderosa por su alta capacidad de solubilizarse en medios acuosos, transparencia, estabilidad termodinámica fácil preparación y velocidades altas de difusión comparadas con solventes carentes de tensioactivos. (4)

Se ha trabajado con diversos fármacos insolubles en agua incorporándolos a ME's para aumentar su biodisponibilidad e impulsar su efecto. Por ejemplo, la curcumina, este activo ha sido estudiado por ser un agente anticancerígeno, antimetástico, antiinflamatorio, antioxidante (1), en diferentes sistemas para liberación como nanopartículas, liposomas y microemulsiones.

B. Tensioactivo

Los tensioactivos son agentes químicos de naturaleza anfifílica, es decir, tienen en su estructura una parte hidrofílica y otra lipofílica. Por esta razón, la molécula tiende a permanecer en la frontera entre el solvente polar y la sustancia oleosa. La clasificación de los tensioactivos es de acuerdo con el tipo de disociación de su molécula en solución.

C. Fase oleosa

La mayoría de los autores coinciden en que la elección de la fase oleosa para la microemulsión depende principalmente del compuesto (activo, fármaco, etc.) que se desea solubilizar en este por su naturaleza lipofílica. El criterio es la solubilidad que tenga este compuesto en el aceite pues se desea incorporar la mayor cantidad posible del mismo en el sistema.

Para nuestro caso en la fase oleosa se ocupa el aceite esencial aislado a partir de clavo (*Eugenia caryophyllata*, *Syzygium aromaticum*) es usado y bien conocido por sus propiedades medicinales que incluyen efectos analgésicos y antisépticos. Estudios reportan actividades antifúngicas, anti carcinogénicas, anti alérgicas y anti mutagénicas. Mientras que su componente principal, el eugenol, destaca por sus propiedades antioxidantes e insecticidas.

D. Quitosano

El quitosano es un polímero natural derivado de la quitina, después de la celulosa, la quitina es el polisacárido más abundante en la naturaleza, encontrándose distribuida en la pared celular de hongos, en el integumento de los insectos y en el exoesqueleto de los crustáceos. Cuando el grado de desacetilación de la quitina excede el 50%, se vuelve soluble en un medio acuoso ácido, a lo que se le conoce como quitosano. El carácter catiónico del quitosano, así como la presencia de un grupo funcional reactivo y propiedades mucoadhesivas le da posibilidades para ser utilizado en tecnologías de liberación de fármacos. (5).

II. METODOLOGÍA

A. Cargar el fármaco al aceite.

El aceite que se usó fue aceite esencial de clavo y se preparó una solución que tuviera una concentración de curcumina de 7mg/ml.

B. Preparación de las microemulsiones (ME).

En un vial de 25 ml se preparó una ME de H₂O/TPGS1000 a una relación de 80:20 con 3% de aceite de clavo previamente cargado con el fármaco, posteriormente este vial se coloca en agitación magnética (1100 rpm) y a una temperatura constante de 25 °C.

C. Adición de quitosano a la microemulsión.

Se toma la mitad de la ME previamente realizada y se coloca en otro vial en agitación magnética para añadirle el quitosano en una relación 1:1 con la ME. El quitosano se encuentra en una solución de H₂O en una concentración de 1 mg/ml.

D. Determinación del diámetro de partícula.

Se tomaron varias muestras de la microemulsión para llevarlas al dispersor de luz para medir el diámetro de partícula y ver si estaban dentro de la zona que nos interesaba (10 – 50 nm).

E. Preparación de 500 ml de una solución buffer con pH de 6.5

Se elaboraron dos soluciones, para la primera solución se agregaron 13.8g de Na₂HPO₄*H₂O en un matraz aforado de 500 ml y para la segunda se añaden 26.8 g de Na₂HPO₄*7H₂O también en un matraz aforado de 500 ml. Ambas se ponen en agitación magnética a 1100 rpm durante 30 min.

En un matraz de 500 ml se agregan 303.1 ml de la primera solución y de la segunda se añaden 196.9 ml.

F. Prueba de liberación de las microemulsiones

a) Preparación de membranas de diálisis.

Se cortaron 6 tiras de 10 cm de membrana las cuales se pusieron a remojar durante un día en un vaso de precipitado con agitación magnética (500 rpm) en la solución buffer preparada.

A cada membrana se le añade 1 ml de ME, para este caso se hicieron tres membranas con ME con quitosano y tres membranas con ME sin quitosano y se cierra la membrana por los dos lados, asegurándonos de que no pueda tener algún tipo de fuga.

b) Preparación de viales.

En viales de 100 ml se colocan 30 ml de la solución buffer y se ponen las membranas tratando de que estas queden totalmente cubiertas por la solución. Se tapan los viales y se ponen en agitación magnética (700 rpm) y a una temperatura constante de 37 °C.

c) Liberación de la curcumina en las microemulsiones.

La prueba tiene un estimado de duración de aproximadamente 100 horas (dependiendo como se comporte la liberación de la curcumina en las ME's). Para monitorear la liberación de la curcumina en las ME's cada hora se realiza una prueba de espectroscopia de UV, sacando una pequeña muestra de cada vial (al final del muestreo

se regresa la solución tomada al vial) y se registra la absorbancia y el porcentaje de transmitancia, para después determinar la concentración de fármaco liberado.

III. RESULTADOS

A) Preparación de microemulsión

Tabla 1. Datos obtenidos para elaboración de 10 ml de ME con relación 80:20 O/W con 3% de aceite de clavo.

ME	Tensioactivo (TPGS 1000)	H2O	Aceite de clavo cargado con curcumina (7 mg/ml)	Total
%P	19.44%	77.56%	3%	100%

B) Adición de quitosano a la ME

Se tomaron 3 ml de la ME previamente preparada y se le agrega una solución de quitosano (1 mg/ml) en relación 1:1 en agitación. Como se muestra en la tabla 2

Tabla 2. Datos obtenidos para la adición del quitosano.

	Microemulsión	Quitosano	Total
% P	50%	50%	100 %

C) Determinación de diámetro de partícula.

Para la determinación del diámetro de partícula de las ME's con quitosano y sin quitosano. Se realizaron dos corridas de cada una en el dispersor de luz como se muestran en las tabla 3.

Tabla 3. Diámetro de partícula (en nm) de ME con y sin quitosano

	Z - Ave (nm)	Std Dev
ME con quitosano	45.96	14.487
Me sin quitosano	15.79	0.30895

D) Liberación de curcumina en las microemulsiones

Para cada prueba de liberación de la curcumina en las ME's (con y sin quitosano) se realizaron tres repeticiones y se reporta el promedio para cada una de las pruebas, como se muestra en las Figuras 1.1 y 1.2.

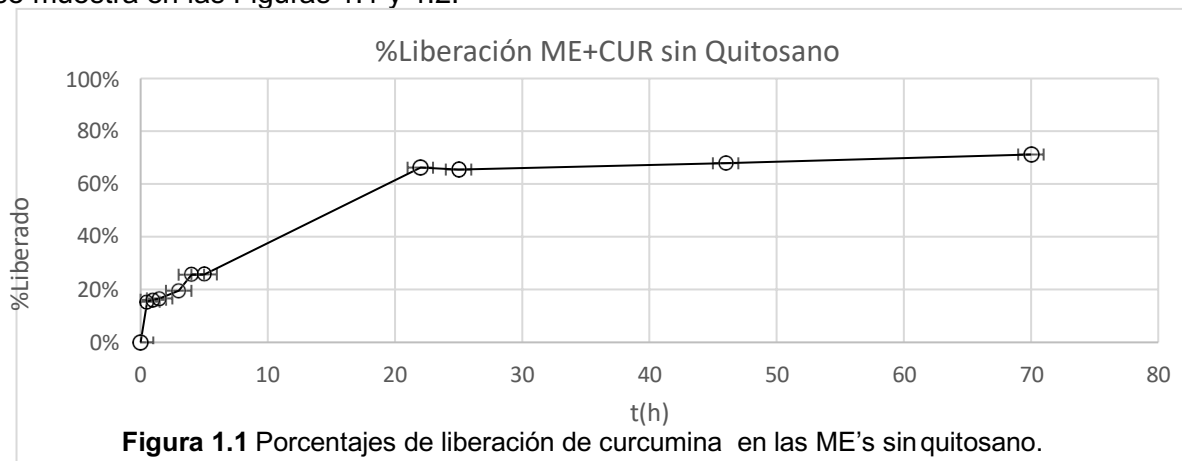


Figura 1.1 Porcentajes de liberación de curcumina en las ME's sin quitosano.

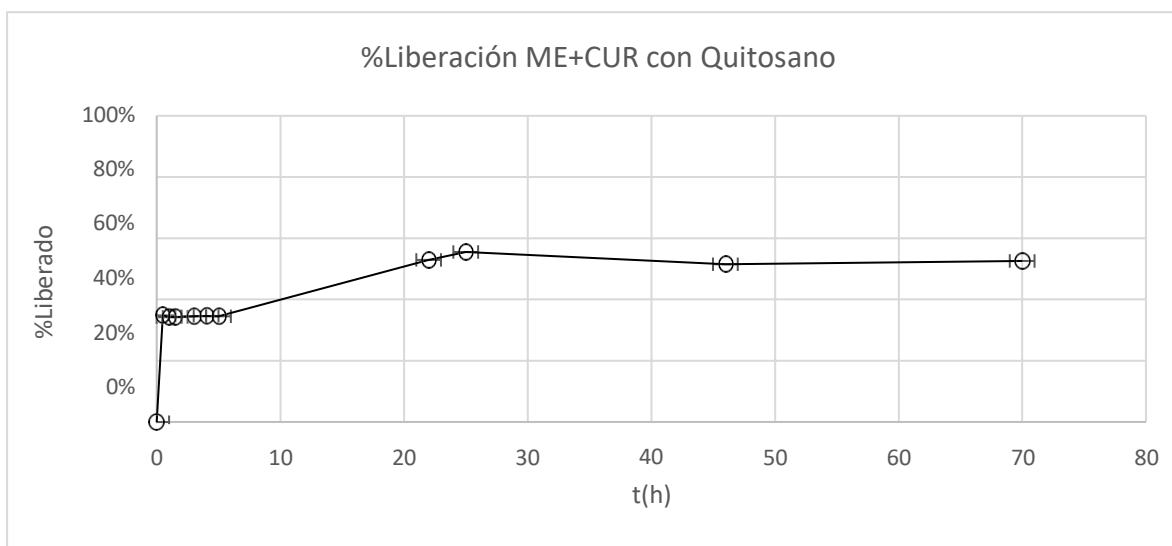


Figura 1.2 Porcentajes de liberación de curcumina en las ME's con quitosano.

IV. CONCLUSIONES

Como se puede apreciar al término de la prueba de liberación, se determina que la liberación de curcumina en la ME recubierta con el biopolímero (quitosano) después de 70 horas de estudio, libera menos del 60 % del activo. Con esto podemos inferir que este sistema es una vía factible para seguir haciendo estudios;

V. RECONOCIMIENTOS

Quiero externar mi agradecimiento en especial a los Drs. René Darío Peralta y Héctor Iván Meléndez por todo lo aprendido y todas las facilidades otorgadas durante el periodo de estancia en el verano dentro del Centro de Investigación en Química Aplicada. Al Instituto Tecnológico de Aguascalientes por el apoyo para realizar dicha estancia.

REFERENCIAS

- Bansal, S. S., Goel, M., Aqil, F., Vadhanam, M. V., & Gupta, R. C. (2011). *Advanced Drug Delivery Systems of Curcumin for Cancer Chemoprevention*. 4(August), 1158–1172. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0006>
- Danielsson, I., & Lindman, B. (1981). The definition of microemulsion. *Colloids and Surfaces*, 3(4), 391–392. [https://doi.org/10.1016/0166-6622\(81\)80064-9](https://doi.org/10.1016/0166-6622(81)80064-9)
- Flores, S. E., Rial-Hermida, M. I., Ramirez, J. C., Pazos, A., Concheiro, A., Alvarez- Lorenzo, C., & Peralta, R. D. (2016). Microemulsions for Colorectal Cancer Treatments. General Considerations and Formulation of Methotrexate. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 16(6), 498–508. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26349496>
- Jadhav, K., Shaikh, I., Ambade, K., & Kadam, V. (2006). Applications of Microemulsion Based Drug Delivery System. *Current Drug Delivery*, 3(3), 267–273. <https://doi.org/10.2174/15672010677731118>
- Kumari, B., & Kesavan, K. (2017). Effect of chitosan coating on microemulsion for effective dermal clotrimazole delivery. *Pharmaceutical Development and Technology*, 22(4), 617– 626. <https://doi.org/10.1080/10837450.2016.1230629>

Síntesis de tensioactivos gemini

Leonardo Daniel Ojeda Villa

Universidad Autónoma de Zacatecas
Campus UAZ Siglo XXI, Km 6 Carr. Zacatecas-
Guadalajara s/n, Ejido la escondida,
Zacatecas, Zac.

laineo23@gmail.com

Asesor: René Darío Peralta Rodríguez

Centro de Investigación en Química Aplicada
Enrique Reyna H. No. 140,
San José de los Cerritos, 25294
Saltillo, Coahuila.

rene.peralta@ciqua.edu.mx

Resumen — En este trabajo se presenta la síntesis de tensioactivo gemini a partir del aminoácido L-cisteína e isocianato de octilo. El progreso de las reacciones fue monitoreado mediante resonancia magnética nuclear de protón (H^1 RMN). Los espectros revelan la obtención de cistina en una primera reacción para formar las cabezas polares, y la obtención del tensioactivo gemini en la segunda reacción. Aún existe incertidumbre en la asignación de señales de la segunda reacción y es necesario un proceso de purificación del tensioactivo obtenido para eliminar subproductos e impurezas que interfieren en las señales.

Palabras clave — Tensioactivos gemini, L-cisteína, octil isocianato

Abstract. — This paper presents the synthesis of gemini surfactants from the amino acid L-cysteine and octyl isocyanate. The progress of the reactions was monitored by H^1 NMR. The spectra reveal the obtaining of cysteine in a first reaction to form the polar heads, and the obtaining of the gemini surfactant in the second reaction. There is still uncertainty in the assignment of signals from the second reaction, and a purification process is necessary to eliminate by-products and impurities.

Keywords — Gemini surfactant, L-cysteine, octyl isocyanate

I. INTRODUCCIÓN

Los tensioactivos son moléculas caracterizadas por una cabeza polar (grupo hidrófilo) unida a una larga cadena de hidrocarburos (grupo hidrófobo). La naturaleza anfifílica de los tensioactivos es la base de sus propiedades y características, como son: la capacidad de adsorción en las interfaces, la disminución de la tensión superficial del agua y el autoensamblaje espontáneo en sistemas acuosos [1].

A medida que aumenta la concentración de tensioactivo en una solución, disminuye la tensión superficial hasta alcanzar un valor crítico, llamado concentración micelar crítica (CMC), a partir de la cual, la tensión superficial se mantiene constante y se empiezan a formar agregados moleculares de tensioactivo o micelas en solución [2].

Los aminoácidos naturales se emplean en la síntesis de tensioactivos a partir de reacciones de condensación debido a su disponibilidad, biocompatibilidad y multifuncionalidad [3]. En este trabajo se empleará el aminoácido L-cisteína para formar las cabezas hidrófilas de los tensioactivos. La L-cisteína es un aminoácido no esencial que contiene un grupo tiol (-SH) en su cadena lateral. El grupo tiol suele participar en reacciones enzimáticas, actuando como nucleófilo, además, es susceptible a la oxidación para dar lugar a puentes disulfuros derivados de la cisteína, ejemplo de esto es la cistina, la cual es un dímero de dos cisteínas unidas mediante un puente disulfuro (figura 1).

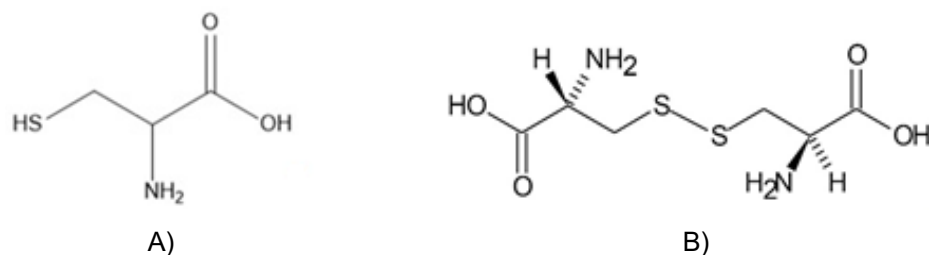


Figura 1. A) L-cisteína, B) cistina.

Por otro lado, la cadena hidrófoba de los tensioactivos se puede introducir a través del enlace acilo, éster, amida o alquilo, de acuerdo con el número de cadenas hidrófobas introducidas, pueden obtenerse tensioactivos monocatenarios, bicatenarios o diméricos (*gémunis*) [1]. Durante esta investigación se sintetizarán tensioactivos gémuni empleando octil isocianato para agregar dos cadenas hidrófobas a la cistina obtenida a partir del aminoácido L-cisteína.

El octil isocianato es una molécula conformada por una cadena de ocho carbonos unida a un grupo isocianato ($-N=C=O$), la alta reactividad de este grupo confiere una alta toxicidad a este tipo de moléculas.

Los tensioactivos gémuni están formados por dos cabezas hidrófilas y dos colas hidrófobas por molécula, unidas por un espaciador en o cerca de los grupos de cabeza como se muestra en la figura 2. Los tensioactivos gémuni muestran un mejor rendimiento en comparación con sus homólogos monoméricos, como una CMC más baja, una mayor eficiencia en la reducción de la tensión interfacial y superficial, así como una mayor capacidad de solubilización, esta última tiene relevancia farmacéutica ya que la solubilización micelar en agua de fármacos hidrófobos mejora la estabilidad frente a la degradación química y/o enzimática, mejorando así la biodisponibilidad del fármaco [1,3]. Es por esto que el objetivo de este trabajo es llevar a cabo la síntesis de un tensioactivo gémuni aniónico a partir del aminoácido L-cisteína y octil isocianato para aplicaciones biomédicas.

II. MARCO TEÓRICO

A. Clasificación de tensioactivos según su capacidad de disociación en el agua.

1) Tensioactivo Aniónico

Se disocian en un anión anfifílico (responsable de la actividad superficial) y un contraión catiónico, que suele ser un metal alcalino (sodio, potasio, etc.) o un amonio cuaternario.



Figura 2. Estructura de tensioactivo dimérico (gémuni) con espaciador en grupos de cabeza.

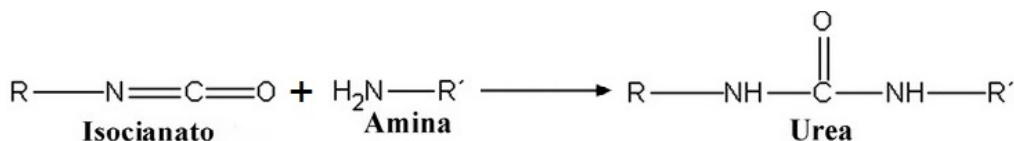


Figura 3. Reacción entre isocianato y grupo amina.

2) Tensioactivo Catiónico.

Se disocian dando lugar a un catión anfifílico y un contraión aniónico, que suele ser un halogenuro. La mayoría de tensioactivos catiónicos son compuestos nitrogenados tales como sales de amonio y sales de amonio cuaternario.

3) Tensioactivo No iónico.

Estos tensioactivos no se ionizan en solución acuosa ya que su grupo hidrofílico (alcohol, fenol, éter, éster o amida) no se puede disociar y por tanto, no se ven afectados por el pH de la solución.

4) Tensioactivo Anfotérico (o zwitteriónico).

Estos tensioactivos dan lugar tanto a disociaciones aniónicas como catiónicas en función del pH de la solución y pueden poseer las propiedades solubilizantes de los aniónicos y las desinfectantes de los catiónicos [2].

B. Adición de la cadena hidrófoba al precursor del tensioactivo gemini.

El grupo isocianato contiene un átomo de carbono que puede ser atacado por diferentes grupos nucleófilos provistos de hidrógenos lábiles, como es el caso del grupo amina para formar urea [3], figura 3, en este caso la reacción se efectuará entre el grupo isocianato del octil isocianato y los grupos amina de la cistina.

III. METODOLOGÍA

A. Síntesis de la cabeza polar del tensioactivo gemini

La síntesis de la cabeza polar del tensioactivo *gemini* (cistina) se llevará a cabo mediante la unión por un puente disulfuro de dos moléculas del aminoácido L-cisteína.

- En un matraz de 200 ml se colocarán, 10 mmol (1.21 g) del aminoácido L-cisteína (número CAS: 52-90-4; lote no. C7352; 98 % de pureza, Sigma Aldrich) en una solución de 81.33 mmol (3.252 g) de NaOH (CAS number: 1310-73-2, 98 % de pureza, lote: S5881, Sigma Aldrich) y agua (100 ml) obtenida en un purificador MilliQ, como se muestra en la tabla 1.
- Se dejará en agitación a temperatura ambiente durante 5 días para la posterior liofilización.
- La reacción será monitoreada por RMN ^1H y ^{13}C .

B. Adición de la cadena hidrófoba.

- Después, se añadirá gota a gota, una solución preparada a partir de la disolución de la cantidad estequiométrica (4.88 mmol) de octil isocianato en 2.44 mL de

acetona, tabla 2, bajo agitación durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente.

- b) La mezcla de reacción se dejará reposar durante una noche.
- c) La solución con los tensioactivos precipitados será centrifugada para separarlos del solvente y posteriormente liofilizada.
- d) La reacción será monitoreada por RMN ^1H y ^{13}C .

Tabla 1. Reactivos para síntesis de la cabeza polar.

Reactivo	Masa molar (g/mol)	mmoles	Gramos
L-cisteína	121.16	10	1.211
NaOH	39.997	81.33	3.252

Tabla 2. Reactivos para adición de cadena hidrófoba.

Reactivo	Masa molar (g/mol)	mmoles	Gramos
Octil isocianato	155.24	4.88	0.757

IV. RESULTADOS

Todas las muestras se caracterizaron mediante técnicas de ^1H RMN, utilizando agua deuterada (D_2O) como solvente a temperatura ambiente. Los espectros se obtuvieron en un equipo marca Bruker Avance III HD 400 N de 400 MHz utilizando una sonda multinuclear de 5 mm.

A. Reacción 1: síntesis de cistina.

En la figura 4 se muestra una superposición de los espectros generados para la L-cisteína (rojo) y la sal de sodio de cistina (azul).

En el caso de la L-cisteína las señales correspondientes a los protones de los grupos -SH, -NH₂ y -COOH no aparecen en el espectro determinado experimentalmente. La señal que se encuentra entre 4.0 y 3.8 ppm corresponde al protón cercano al grupo -NH₂, y las dos señales correspondientes a los protones próximos al sulfuro se encuentran alrededor de 3 ppm.

En el caso de la cistina, las señales muestran un desplazamiento marcado con respecto a la L-cisteína; además, los picos correspondientes a los protones próximos al puente disulfuro presentan mayor separación en comparación con sus homólogos pertenecientes a la L-cisteína, lo cual es resultado de que los ambientes químicos que rodean a ambos protones no son iguales (protones diastereotópicos, que no pueden interconvertirse por ninguna operación de simetría).

Se pueden observar, además, en el espectro correspondiente a la cistina, evidencias de señales que pueden ser atribuidas a impurezas o subproductos.

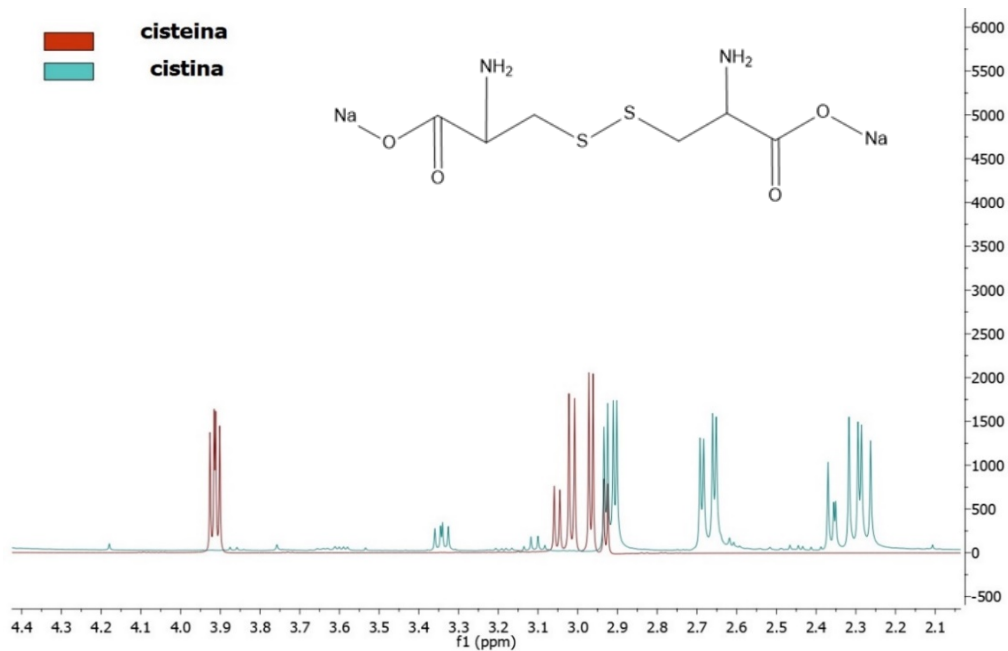


Figura 4. Espectro RMN ^1H de la cisteína y la cistina obtenida tras 5 días de reacción.

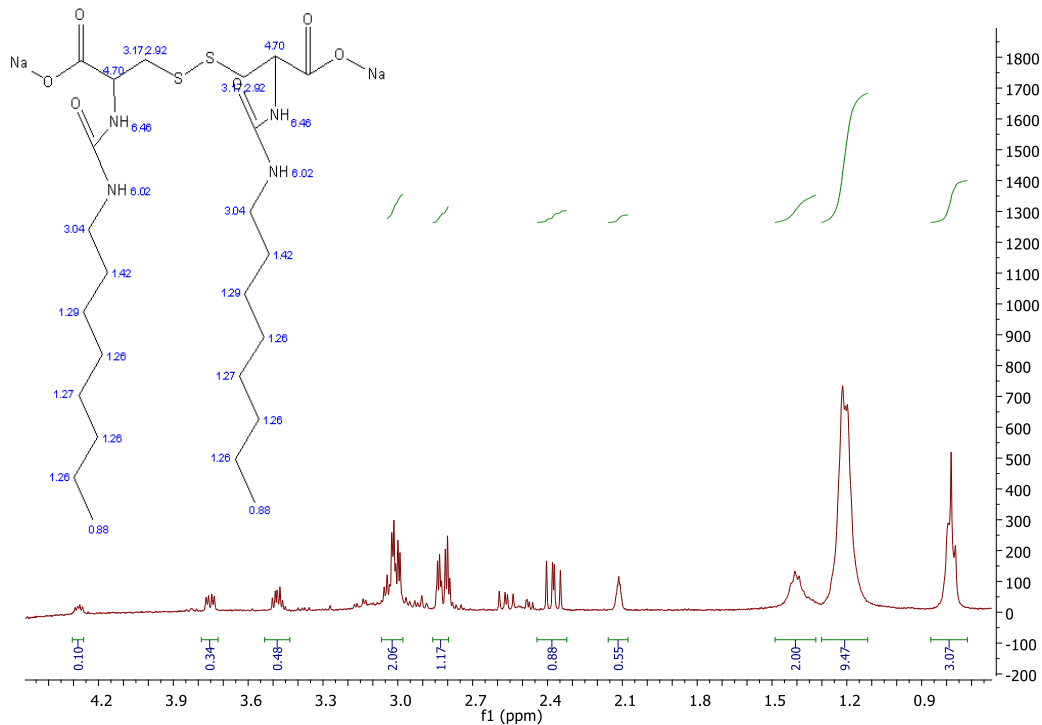


Figura 5. Espectro RMN ^1H del tensioactivo gemini obtenido a partir de octil isocianato y acetona.

B. Reacción 2: adición de cadenas hidrocarbonadas a la cistina.

La reacción 2 se llevó a cabo empleando como solvente acetona siguiendo la metodología reportada por Faustino *et al.*⁵

En la figura 5 se muestra el espectro ¹H RMN del tensioactivo gemini obtenido a partir de la reacción con octil isocianato. La señal que se encuentra alrededor de 0.8 ppm corresponde al grupo metilo de la cadena hidrocarbonada del octil isocianato y, la señal ubicada entre 1.26 y 1.29 pertenece a 10 de los protones contenidos en la cadena hidrocarbonada como se indica en la figura 5. Es posible que las señales cercanas a 2.4 y a 2.8 ppm pertenezcan a los protones próximos al puente disulfuro, así como la señal cercana a 3.0 concierne al protón primario próximo al grupo amino, aunque no es seguro debido a que no hay certeza en la asignación de las señales del espectro.

El valor de las integrales de cada una de estas señales augura un alto porcentaje de conversión de reactivos en productos, sin embargo, hay evidencia de subproductos o impurezas de la reacción, por lo que se realizarán purificaciones.

V. CONCLUSIONES

En este proyecto de investigación se realizó la síntesis de un tensioactivo gemini a partir del aminoácido L cisteína y octil isocianato, la síntesis consistió en dos reacciones. En el espectro de ¹H RMN de la primera reacción para la síntesis de cistina hay señales que pueden ser atribuidas a impurezas o subproductos por lo que es necesario continuar estudiando la metodología en aras de optimizar el proceso.

El espectro de ¹H RMN del tensioactivo gemini (reacción 2) posee señales que no han sido asignadas con certeza, por esto, posteriormente se debe generar un espectro de correlación con el cual sea posible corroborar la asignación de señales. Además, se debe purificar el tensioactivo obtenido antes de ser utilizado en la síntesis de microemulsiones para aplicaciones biomédicas.

VI. RECONOCIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento al Centro de Investigación en Química Aplicada, así como al Dr. René Peralta y a su equipo de trabajo por las facilidades y el apoyo otorgado para la realización de esta estancia de verano. Asimismo, agradezco el apoyo experimental de la M. C. Sandra Vaillant Sánchez. Al CONACYT, proyecto A1-S-46343, "Síntesis de microemulsiones utilizando surfactantes novedosos biocompatibles (gemini y bicéfalos) para la nanoencapsulación de fármacos anticancerígenos."

REFERENCIAS

- [1] L. Pinheiro and C. Faustino, "Amino Acid-Based Surfactants for Biomedical Applications. Application and Characterization of Surfactants", *Reza Najjar*, IntechOpen, Disponible en: <https://doi.org/10.5772/67977> [consultado en 2019].
- [2] J. Ospina, Diseño, síntesis y caracterización fisicoquímica de surfactantes derivados de γ -aminoácidos preparados a partir de (-)- verbenona [Thesis]. Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Ciencias, Departamento de Química. Bellaterra.

- [3] L. Perez, *et al*, "Gemini surfactants from natural amino acids", *Advances in Colloid and Interface Science* Vol. 205, pp 135-155, 2014.
- [4] C. Six, and F. Richter, "Isocyanates, Organic", *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, Disponible en: https://doi.org/10.1002/14356007.a14_611 [consultado en 2019]
- [5] M. Faustino, R. Calado and L. García, "Gemini Surfactant - Protein Interactions: Effect of pH, Temperature, and Surfactant Stereochemistry", *Biomacromolecules*, Vol. 77, pp 2508-2514, 2009.

Síntesis de α -aminonitrilos para la obtención de derivados del pirrol propuestos en tratamiento de tuberculosis

Elvia Estrella Cabrera Castro

Universidad Autónoma de Zacatecas
Unidad Académica de Ciencias Químicas
Campus UAZ Siglo XXI Carr. Zac.-Guad. Km.6
Ejido la Escondida C.P. 98160 Zacatecas, Zac.
e.e.c.c.xd@gmail.com

Asesor: Miguel Ángel Vázquez Guevara

Universidad de Guanajuato
Departamento de Química
División de Ciencias Naturales y Exactas Noria
Alta S/N; C.P. 36050; Guanajuato, Gto.
mvazquez@ugto.mx

Resumen — Se propone una ruta sintética para la formación de α -aminonitrilos que mediante reacciones de hidrólisis permiten la obtención de α -aminoácidos y sus derivados, que son reactivos importantes en la síntesis de moléculas propuestas como potenciales fármacos antituberculosos tomando como referencia el BM212; un fármaco que ha demostrado ser efectivo en el tratamiento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multiresistentes (MDR-TB) y extensamente multiresistentes (XDR-TB). El punto clave en este trabajo es la realización y optimización de la reacción de Strecker, utilizando una bencilamina, un benzaldehído y TMSCN en una reacción de tipo multicomponente efectuándose en condiciones de reacción de calentamiento convencional pero también con el uso de microondas para la obtención de aminonitrilos que son precursores de derivados de la 2-fenilglicina.

Palabras clave — α -aminoácidos, reacción de Strecker, *Mycobacterium tuberculosis*, resistencia a fármacos.

Abstract — A synthetic route is proposed for the formation of α -aminonitrile derivatives, after a hydrolysis reaction they allow the obtaining of α -aminoacids, which are important reagents in the synthesis of molecules proposed as potential anti tuberculosis drugs as BM212 as a reference; a drug which has been shown to be effective in the treatment of strains *Mycobacterium tuberculosis* multiresistant (MDR-TB) and extensively multiresistant (XDR-TB). The key point in this work is optimization of the Strecker reaction, using a benzylamine, a benzaldehyde and TMSCN in a multicomponent-type reaction carried out under conventional heating reaction conditions but also with the use of microwaves to obtain aminonitrile which are precursors of 2-phenyl glycine derivatives.

Keywords — α -amino acids, Strecker reaction, *Mycobacterium tuberculosis*.

I. INTRODUCCIÓN

Los α -aminoácidos se han convertido en valiosos intermedios en la síntesis química de moléculas que sirven como modelos adecuados en la investigación y el desarrollo farmacológico-biológico[1]. La síntesis de aminoácidos puede llevarse a cabo atendiendo a distintas vías, sin embargo es de gran interés la reacción de Strecker, por ser la primera reacción registrada para la formación de aminonitrilos y también la más directa para la formación de aminoácidos. Representa una reacción que ha sido ampliamente estudiada y modificada para aplicarse en el laboratorio y también a escala industrial, con la consecuente implementación de tecnología como el uso de microondas [2].

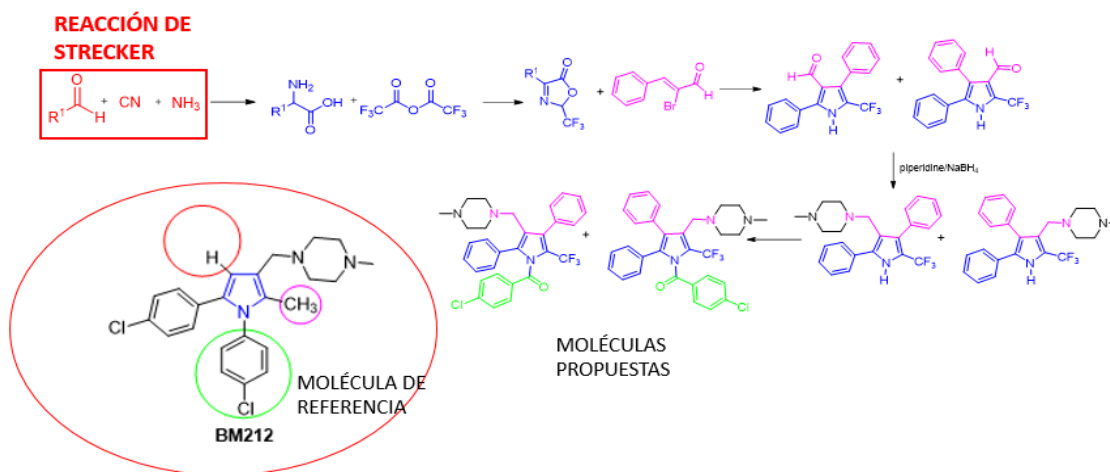


Figura 1. Ruta de síntesis para la obtención de moléculas similares a BM212

Ya se ha mencionado que los aminoácidos han sido utilizados como intermediarios para la obtención de diversos fármacos, si consideramos la síntesis del BM212, una molécula con propiedades anti-tuberculosas [3], encontraríamos a la reacción de Strecker como un intermediario en la formación del anillo pirrólico que luego de varias reacciones, permitiría la formación de una molécula con estructura similar a BM212 (Figura 1).

La tuberculosis es causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, a nivel mundial se estima que esta bacteria infecta al 23–32% de la población mundial [4], y en el 2016 se posicionó como la principal causa de muerte por agente infeccioso único, lo que resultó en 1.6 millones de muertes [5]. En México en el año 2016 se registraron 21,184 casos nuevos, la mayor concentración de afectados se encuentra en las grandes ciudades de estados como Baja California, Tamaulipas o Veracruz [6].

En el tratamiento convencional para tuberculosis se administran antibióticos de primera línea que incluyen al isoniazida, rifampicina, pirazimida y etambutol, sin embargo se estima que 480 000 personas en todo el mundo presentaron tuberculosis con algún grado de resistencia en el año 2014 [7]. La Tuberculosis multirresistente a fármacos (MDR-TB) se define como la TB que es resistente a medicamentos de primera línea y Tuberculosis altamente resistente a los fármacos (XDR-TB) definida por la OMS como una MDR-TB con una resistencia adicional a cualquier fluoroquinolona y a al menos uno de los tres fármacos inyectables de segunda línea usados en el tratamiento (capreomicina, kanamicina o amikacina) [8].

II. MARCO TEÓRICO

La reacción de Strecker (figura 2) se considera una reacción multicomponente debido a que se incorporan los tres componentes de reacción en un mismo paso de síntesis [8]. Para ello se requiere una amina, un aldehído o cetona (presentan grupo carbonilo), y un donador de grupo cianuro [9]. La reacción tradicionalmente es catalizada por un ácido, y en presencia de agua permite que se efectuó la hidrolisis del α -aminonitrilo a α -aminoácido.



Figura 2. Reacción general de la reacción Strecker tradicional

Durante la reacción se generan una imina como consecuencia del ataque nucleofílico de la amina al aldehído. Teniendo en cuenta que el agua puede actuar como una base, la presencia de agua en la reacción puede provocar que la reacción de formación de imina se invierta [10] y por lo tanto no se lleve a cabo la siguiente etapa que es la adición del **cianuro**.

Uno de los inconvenientes iniciales de esta reacción es el uso de derivados del cianuro altamente tóxicos. Para evitar parcialmente este inconveniente, se ha introducido el uso de cianuro de trimetilsililo. De esta manera, el solvente habitual usado (agua) puede cambiarse por solventes orgánicos típicos (tolueno, cloruro de metileno, acetonitrilo, etc.), mejorando la solubilidad de los reactivos orgánicos así como las condiciones de reacción [10].

III. MATERIALES Y MÉTODO

Se llevó a cabo una revisión bibliográfica acerca de la reacción de Strecker para encontrar metodologías que se pudieran aplicar a los reactivos y a condiciones que se pudieran reproducir en el laboratorio, luego se procedió a la parte experimental.

Se llevó a cabo la síntesis de Strecker utilizando como amina a la bencilamina, y como aldehído a diferentes benzaldehídos 4-sustituídos o 2,4-sustituídos. Como donador del grupo cianuro se utiliza el cianuro de trimetilsililo (TMSCN). Los materiales utilizados son reactivos comerciales, con un nivel de pureza superior al 98%. Las reacciones que se llevaron a cabo en calentamiento convencional y a reflujo fueron preparadas en matraces de dos bocas para poder monitorear la evolución de la reacción mediante cromatografía en capa fina. Las reacciones en microondas también fueron monitoreadas por cromatografía en capa fina al término del tiempo programado en el equipo.

Los productos obtenidos fueron purificados mediante cromatografía en columna utilizando sílica gel de tamaño grande, con sistemas hexano: acetato, dependiendo de la polaridad de los componentes del crudo de reacción. Por último para la caracterización de los productos obtenidos se empleó la técnica de resonancia magnética nuclear de protón.

IV. RESULTADOS

Se utilizaron 5 derivados de la bencilamina; 4-hidroxibenzaldehído, 4-nitrobenzaldehído, 2,4-dinitrobenzaldehído, 4-fluorobenzaldehído y 4-bromobenzaldehído, de los cuales se obtuvieron 2 compuestos que fueron caracterizados por resonancia magnética nuclear. Las condiciones de reacción se presentan en la tabla número 1.

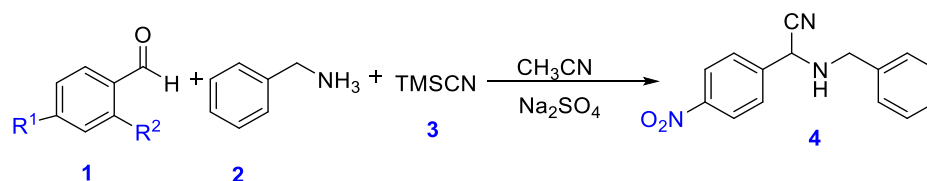
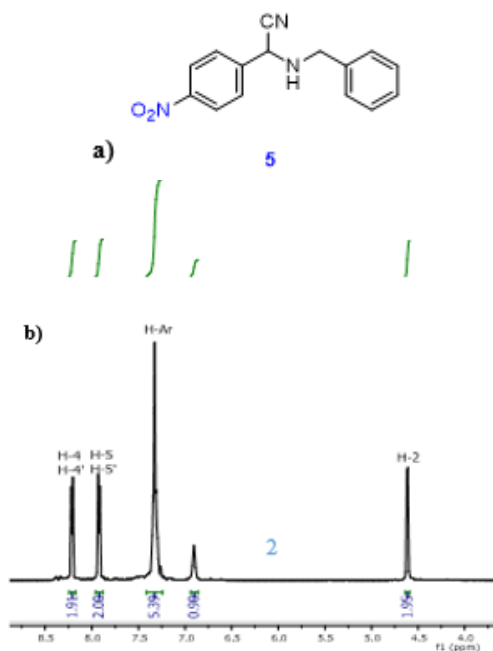
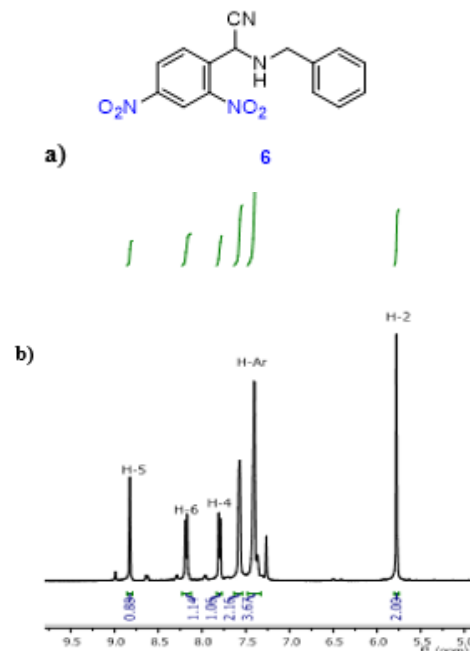


Figura 3. Reacción de Strecker llevada a cabo

Tabla 1. Condiciones de reacción que fueron favorables para la formación de un producto

Producto	R ₁	R ₂	Entrada	Eq 1 (derivado del benzaldehido)	Eq 2 (benzilamina)	Eq 3 (cianuro de trimerilsililo)	t	T °C	R (%)
1	NO ₂	H	2	1	1.1	1.2	30 min	90 (microondas)	24.29
1	NO ₂	H	4	1	1	1.2	30 min	140 (microondas)	16.75
1	NO ₂	H	5	1	1	1.2	1h 30 min	100 (microondas)	10.0
1	NO ₂	H	7	1	1	1.2	3h	82	40.0
2	NO ₂	NO ₂	1	1	1	1.2	4h	82	20.0
3	F	H	7	1	3	2.4	30 min	140	-
4	Br	H	5	1	3	2.4	30 min	140	-

Figura 4. a) producto 5, compuesto 2-(benzilamino)-2-(4-nitrofenil)acetonitrilo y b) su correspondiente RMN DE 1H (CDCL₃, 500 MHz)Figura 5. a) producto 6, compuesto 2-(benzilamino)-2-(2,4-dinitrofenil)acetonitrilo y b) su correspondiente RMN DE 1H (CDCL₃, 500 MHz)

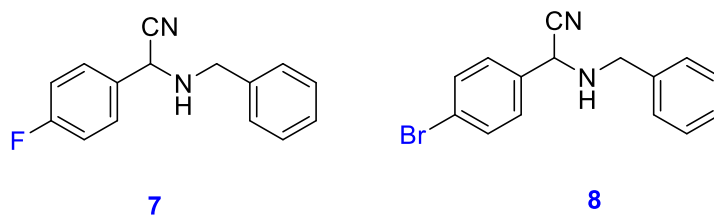


Figura 6. Productos obtenidos a partir del 4-fluorobenzaldehído (producto 7) y el 4-bromobenzaldehído (producto 7). Estos compuestos no fueron aislados ni caracterizados.

Solo se realizó una entrada con el compuesto 4-hidroxialdehído sin embargo no se observó transformación química utilizando etanol (EtOH) como disolvente. Luego se cambió por el 4-nitrobenzaldehído, donde se observó que los reactivos no tenían una disolución completa en el disolvente EtOH, por lo que se realizó una prueba en acetonitrilo (CH_3CN) para determinar si era un mejor disolvente.

Bajo las mismas condiciones de reacción se obtuvo el compuesto número 2, cambiando el 4-nitrobenzaldehído por el 2,4-nitrobenzaldehído. Sin embargo al intentar con benzaldehídos 4-halogenado, no se logró aislar algún producto, proceso verificado en Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Los equivalentes fueron cambiados y únicamente se obtuvieron los productos 7 y 8 en calentamiento por microondas.

V. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Observamos la transformación de producto siempre y cuando el disolvente fuera adecuado, en contraste con otros autores que obtenían productos con alto rendimiento en reacciones asistidas en microondas [2], en este caso con la presencia de al menos un reactivo en estado sólido, el uso de un disolvente con la capacidad de solubilizarlo facilitó el aumento del área de contacto entre los reactivos para que la reacción se llevara a cabo.

Otra característica del solvente utilizado es que es de tipo aprótico, ya que la presencia de protones en el medio podía favorecer la formación de agua y el desplazamiento del equilibrio hacia la retrosíntesis, evitando la formación de la imina que es el primer intermediario en esta ruta de reacción. Otro motivo por el que fue importante la ausencia de agua en la reacción es que el derivado α -aminonitrilo no correspondía al α -aminoácido de interés, por lo que detener la hidrólisis del α -aminonitrilo permitiría la eliminación del anillo bencílico perteneciente a la bencilamina que fue importante para la protección del grupo funcional pero que luego ya no resultaba útil.

Al utilizar distintos derivados del benzaldehído en las mismas condiciones de reacción obtuvimos resultados que nos dan una idea de la influencia de los sustituyentes en el grupo aromático, donde los grupos halógeno redujeron la formación del producto. A pesar de que la reacción es caracterizada por la obtención de altos rendimientos y además de que en el monitoreo por cromatografía en capa fina se observaba una transformación prácticamente total de los reactivos, los rendimientos no superaron el 50%.

VI. CONCLUSIONES

La importancia de buscar nuevos fármacos para condiciones patológicas de gran importancia para la salud mundial, como es la tuberculosis, permite que también se considere la utilización de nuevas vías de síntesis para ampliar la variedad de compuestos que se pueden obtener. Así pues, la optimización de la reacción de Strecker condujo a la obtención de dos productos que fueron aislados y caracterizados por resonancia magnética nuclear, aunque los rendimientos no superaron el 50% el hecho de que los reactivos de partida sean relativamente baratos, que se pueda efectuar por calentamiento a reflujo con un disolvente común, como es el acetonitrilo; o con el uso del microondas para acortar los tiempos de reacción; y la facilidad para la separación mediante la utilización de cromatografía en columna permite considerar a la reacción de Strecker viable para la síntesis de α -aminoácidos y α -aminonitrilos que son de interés en la síntesis de otros compuestos.

VII. RECONOCIMIENTO Y AGRADECIMIENTOS

Agradezco al doctor Miguel Ángel por la oportunidad de trabajar en este proyecto, a su equipo de trabajo por la paciencia y el apoyo; así como a la Universidad de Guanajuato por permitir la realización de esta estancia.

REFERENCIAS

- [1] B. Nammalwar, C. Fortenberry y R. A. Bunce, "Synthesis of α -aminonitriles under mild catalytic, metal-free conditions", *Tetrahedron Letters*, vol. 55, no. 1, pp 379-381. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2013.11.035>. [consultado en 2019].
- [2] D. D. Young, J. Torres-Kolbus, A. Deiters, "Microwave-assisted synthesis of unnatural amino acids", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 18, pp. 5478-5480. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.09.025> [consultado en 2019].
- [3] A. Campaniço, R. Moreira y F. Lopes, "Drug discovery in tuberculosis. New drug targets and antimycobacterial agents", *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol.56, no.1. pp 324-331. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.020> [consultado en 2019]
- [4] J. D. Simmons, C. M. Stein, C. Seshadri, M. Campo, G. Alter, S. Fortune, E. Schurr, R. S. Wallis, G. Churchyard, H. Mayanja-Kizza, W. H. Boom y T. R. Hawn, "Immunological mechanisms of human resistance to persistent Mycobacterium tuberculosis infection", *Nature Reviews Immunology*, vol. 18, pp. 575–589. Disponible en <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0025-3> [Consultado en 2019].
- [5] M. Möller, C. J. Kinnear, M. Orlova, E. E. Kroon, P. D. van Helden, E. Schurr y E. G. Hoal, "Genetic Resistance to Mycobacterium tuberculosis Infection and Disease", *Front. Immunol.*, vol. 9, no.1, pp 1-13. Disponible en <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02219> [consultado en 2019]
- [6] CENAPRECE. Programas Preventivos. Dirección de Micobacteriosis. Casos nuevos de tuberculosis todas formas. Estados Unidos Mexicanos 1990-2016. Fecha de consulta: 24 de mayo, 2017. Accesible en: <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/8CasosTbTodas16.pdf>
- [7] R. C. Harris, L. Grandjean, L. J. Martin, A. J. P. Miller, J. N. Nkang, V. Allen, M. S. Khan, K. Fielding y D. A. J. Moore, "The effect of early versus late treatment initiation after diagnosis on the outcomes of patients treated for multidrug-resistant tuberculosis: a systematic review", *BMC Infectious Diseases*, vol. 16, no. 196, pp. 1-14. Disponible en <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1524-0> [disponible en 2019].

- [8] V. La Rosa, a G. Poce, J. Ortiz Canseco, S. Buroni, M. R. Pasca, M. Biava, R. M. Raju, G. Porretta, S. Alfonso, C. Battilocchio, B. Javid, F. Sorrentino, T. R. Ioerger, J. C. Sacchettini, F. Manetti, M. Botta, A. De Logu, E. J. Rubin, y E. De Rossia. "MmpL3 Is the Cellular Target of the Antitubercular Pyrrole Derivative BM212", *AAC*, vol. 56, no. 1, pp. 324-331. Disponible en <https://doi.org/10.1128/AAC.05270-11> [consultado en 2019].
- [9] B. A. Bhanu Prasad, A. Bisai and V. K. Singh, "Trimethylsilyl cyanide addition to aldimines and its application in the synthesis of (S)-phenylglycine methyl ester", *Tetrahedron Letters*, vol. 45, pp9565-9567. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.11.015> [consultado 2019].
- [10] R. Martínez, D. J. Ramón* y M. Yus, "Catalyst-free multicomponent Strecker reaction in acetonitrile", *Tetrahedron Letters*, vol. 46, pp 8474-8477. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.11.015> [consultado en 2019]

Síntesis y caracterización de nanoestructuras de ZnFeO-C utilizando arco eléctrico inmerso en líquidos

María Guadalupe Olmos Andrade

Universidad Autónoma de Zacatecas
Unidad Académica de Física
Solidaridad, No s/n, Col. Hidráulica
CP 98068, Zacatecas, Zacatecas
lupitaolmos1997@gmail.com

Asesor: Bernabé Rebollo Plata

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Micro y Nanociencias
Carr. Irapuato-Silao Km. 12.5, Col. El Copal
C.P: 96821, Guanajuato, Irapuato
berebollo@itesi.edu.com

Resumen — Se presenta la síntesis de nanoestructuras de ZnFeO-C a través del método de arco eléctrico sumergido en líquido; ya que partículas a estas escalas son muy aplicables a distintos ámbitos (los cuales se mencionan más adelante); estas a su vez se esparcen en tres zonas del fluido, de las cuales se capturan muestras y se procede a observarlas a través de un microscopio para elegir la más apta en la contención de las partículas a escala nano (puesto que los tamaños no siempre son de la escala deseada), en este caso se obtuvo que la zona 3 presentó las características más favorables, posteriormente se continúa con la caracterización a través del método de espectroscopia raman.

Palabras clave — Nanopartículas, arco de descarga, espectroscopia raman.

Abstract — The synthesis of nanostructures of ZnFeO-C is presented through the electric arc method submerged in liquid; since particles at these scales are very specific to different variables (which are mentioned below); these, in turn, are spread in three areas of the fluid, from which samples are captured and proceed to observe them through a microscope to choose the most suitable for containing nano-scale particles (since sizes are not always of the desired scale), in this case it will be obtained that zone 3 presented the most favorable characteristics, then the characterization will continue through the raman spectroscopy method.

Keywords — Nanoparticles, discharge-arc, raman spectroscopy.

I. INTRODUCCIÓN

Los nanomateriales han atraído una gran atención debido a su potencial de aplicaciones en distintos campos tales como nanoelectrónica y dispositivos optoelectrónicos, por mencionar algunos [1]. La síntesis y las propiedades de materiales inorgánicos a nanoescala han atraído un gran interés. En particular, los nanocristales semiconductores han sido objeto de estudio debido a sus propiedades físicas únicas como un resultado de la modificación de estados electrónicos por el efecto de confinamiento [2].

Las nanoestructuras hechas de ZnO han atraído la atención por sus aplicaciones en distintos dispositivos [3]. Por otro lado, una atención considerable ha sido dedicada al ferromagnetismo a alta temperatura observado en metales de transición con óxido. Particularmente, el ZnO ha sido identificado como un material semiconductor anfitrión prometedor, exhibiendo ferromagnetismo cuando es dopado con metales de transición, tales como Fe, Co, Ni [4]. Además, el dopaje con elementos no metálicos tales como C, S y N ha sido utilizado para mejorar las propiedades morfológicas y vibracionales [5]. Algunas

de las técnicas con las cuales se han sintetizado este tipo de nanoestructuras son las siguientes: combustión a bajas temperaturas [6], cavitación-asistida solvotérmica [7], tratamiento térmico [8], entre otras.

Algunas de las razones por las que se debe experimentar en la síntesis de nanoestructuras utilizando el método de arco eléctrico: a) Las nanoestructuras tienen un orden nanométrico y sus propiedades mecánicas, térmicas, eléctricas y magnéticas son únicas e interesantes por lo que es indispensable su síntesis para futuros experimentos, b) El método de arco eléctrico es tal vez el método más sencillo y económico para la obtención de nanoestructuras, c) Este método permite la utilización de catalizadores de metales de transición como Co o Ni soportados sobre sólidos para la síntesis de nanoestructuras [9].

En este trabajo se reporta la síntesis de nanoestructuras de $ZnFeO - C$ en donde se utiliza el método de arco-eléctrico inmerso en líquidos, en particular agua destilada, buscando los parámetros de optimización, teniendo un intervalo en la corriente (50-300A) para un voltaje constante (27V). Para conocer las propiedades ópticas y estructurales de tales nanoestructuras, se utilizan algunas técnicas como el microscopio óptico y la espectroscopia Raman.

II. MARCO TEÓRICO

La nanotecnología abarca la producción y aplicación de materiales a escalas que van desde los átomos o moléculas individuales, hasta materiales con dimensiones de 100 nanómetros en sistemas físicos, químicos y biológicos. Además de la integración de estructuras con dimensiones nanométricas resultantes en sistemas de mayor dimensión.

El arco **eléctrico** es una descarga eléctrica continua que genera luz y calor intensos, es formado entre dos electrodos con la sección transversal paralela inmersos en un líquido, particularmente agua destilada. Por los electrodos de grafito, se hace pasar una corriente intensa la cual evapora los átomos de carbono formando un plasma alrededor de los electrodos. En un arco abierto, a presión normal, el electrodo positivo alcanza una temperatura de 3000 grados centígrados [10-11].

A. Técnicas de caracterización

1). Microscopia óptica

El estudio bajo un microscopio óptico es una fuente muy importante de información para la caracterización y estudio de muestras de estructuras sintetizadas. Un microscopio es un sistema óptico complejo que permite la observación de un objeto a ciertos aumentos, dependiendo de los objetivos que se utilicen en cada caso. Asimismo, un microscopio puede adoptar varias configuraciones que permiten la observación de diferentes tipos de muestra: por transmisión, por reflexión, iluminado en claro o en campo oscuro, etc. Y con complementos específicos observar irregularidades o cambios laterales que no serían percibidos si no bajo ciertas condiciones de observación: contraste de fases, contraste interferencial, microscopía con luz ultravioleta, de fluorescencia, etc.

2). Espectroscopia Raman

El efecto Raman se produce cuando la luz incide sobre una molécula e interactúa con la nube de electrones de los átomos de esa molécula. El fotón incidente excita uno de los electrones a un estado virtual. La molécula se excita desde el estado basal a un estado de energía virtual, y se relaja a un estado vibracional excitado, lo que genera la dispersión de Raman Stokes. Si la molécula ya se encontraba en un estado elevado de energía vibracional, la dispersión Raman se llama entonces dispersión Raman anti-Stokes [12].

Esta técnica tiene grandes ventajas ya que la muestra no sufre daño alguno, no es necesario prepararla para su análisis, es sensible a pequeños cambios en la estructura del material, puede analizar la muestra en soluciones acuosas, es aplicable a casi cualquier material (con pequeñas excepciones como algunos metales, ya que estos solo reflejan la luz) [12,13].

III. METODOS Y MATERIALES

La técnica utilizada en la síntesis de nanoestructuras de $ZnFeO - C$ es la denominada arco eléctrico, este proceso se realiza inmerso en líquido, particularmente en este proyecto se utilizó agua destilada. Este proceso es relativamente simple, comparado con otros métodos.

En esta técnica se utilizan dos electrodos, los cuales son barras cilíndricas comerciales de grafito de alta pureza, una de 7 mm de diámetro y la otra de 20 mm, las dos barras con una longitud 6 cm. Siendo la preparación la siguiente: A la barra de 7 mm se le hace una perforación de 3 cm utilizando un taladro. Se prepara en distintas condiciones la mezcla que consiste de distintos porcentajes de los elementos involucrados en el experimento, de acuerdo al proyecto, una vez obtenida, se procede a rellenar cuidadosamente la perforación realizada en la barra. La técnica utiliza un contenedor rectangular de vidrio pyrex, donde se encuentran los porta electrodos, donde se colocan los electrodos preparados previamente, estos son alineados frontalmente uno del otro, separados por una distancia 1 mm aproximadamente. Un porta electrodo es fijo y el otro deslizable, lo que permite mantener esa distancia conforme se realiza el experimento. A continuación, se vierte un litro de agua destilada en el contenedor de tal forma que los electrodos queden sumergidos a una distancia de la superficie del agua de 3 cm.

Eligiendo el valor de los parámetros, 50-300 A para la corriente y 27 V para el voltaje. En este proyecto se elige 250 A, por cuestión de tiempo, para la experimentación. Se crea un plasma durante el proceso y para preservar el plasma, una perilla es utilizada para desplazar la barra deslizable, y por lo tanto conservar la distancia entre ambas barras. El experimento tiene una duración de 45 s, aproximadamente. En la Figura 1 se puede muestra un esquema del proceso utilizado en esta técnica.

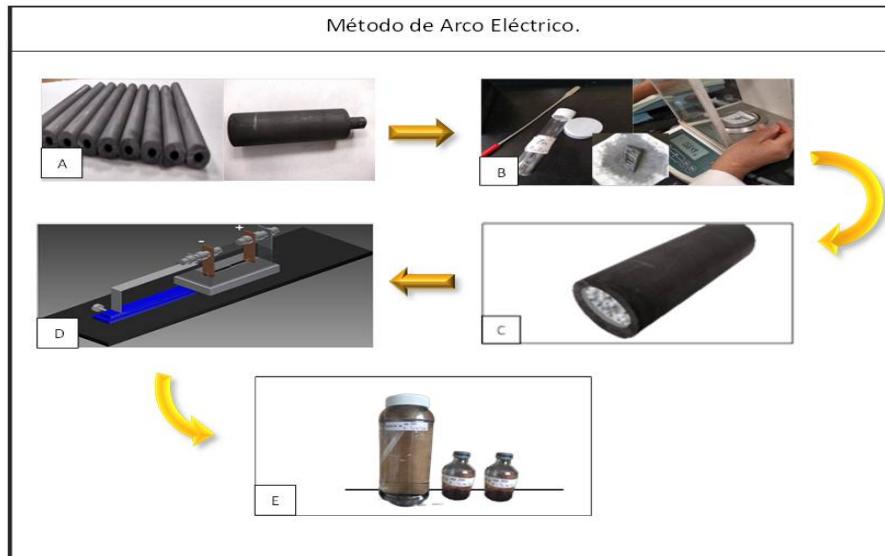


Figura 1. Esquema del proceso de arco eléctrico: A. Preparación de los electrodos; B. Elaboración del compuesto utilizado dentro del electrodo móvil; C. Electrodo móvil apto para ser utilizado; D. Instalación de los electrodos en los porta electrodos del sistema utilizado, listo para generar el proceso; E. recolección de las muestras de las tres distintas zonas.

Una vez concluido el experimento, se deja un tiempo para el enfriamiento. De acuerdo a la experiencia adquirida con esta técnica, las micro y nanopartículas se hallan en tres zonas básicamente: en el fondo del contenedor (zona 1), flotando en la zona intermedia del contenedor (zona 2) y flotando en la superficie (zona 3).

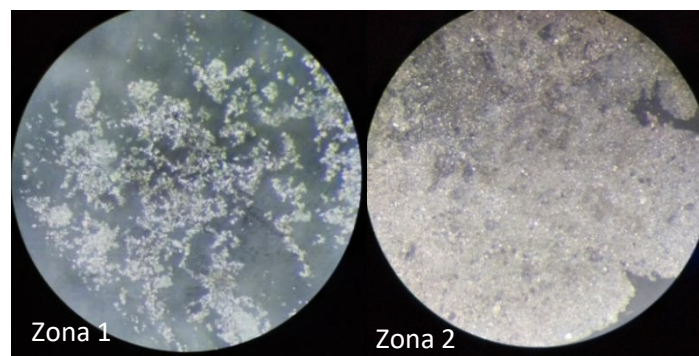


Figura 2. Imágenes de las zonas 1 y 2 tomadas por el microscopio óptico ZEISS SteREO Discovery.V12.

Después de recolectar las partículas metálicas de cada una de las zonas estas son colocadas en contenedores, así como también se toman unas pequeñas muestras para analizarse en el microscopio óptico, como se muestra en la Figura 2.

Con lo expuesto anteriormente, se muestra que la técnica utilizada es bastante sencilla, dando resultados en un tiempo muy corto, siendo un punto a considerar para la parte científica y tecnológica.

IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Una vez recolectadas las muestras se realiza un análisis utilizando un microscopio óptico (ZEISS SteREO Discovery.V12), en la figura 3 se muestran las fotografías de muestras de $ZnFeO - C$ tomadas de la zona 3, tomándose este para el análisis por motivos observables de tamaño, ya que esta zona presentó las partículas con menores dimensiones.

Si bien el microscopio no tiene la potencia necesaria para un mejor análisis, nos permite observar ciertas características típicas de la técnica utilizada y algunas diferencias entre los tamaños de los resultados obtenidos en las distintas zonas, lo cual nos permite la elección de la muestra adecuada para análisis subsecuentes.

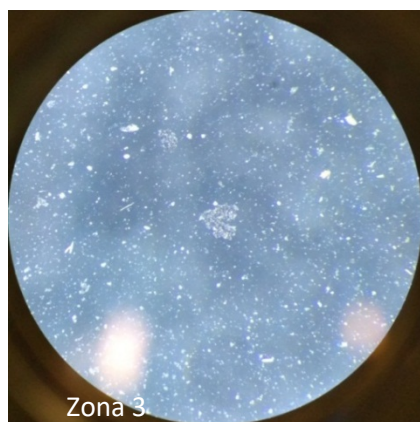


Figura 3. Imagen de la zona 3 tomada por el microscopio óptico ZEISS SteREO Discovery.V12

En la figura 4 se muestra el espectro Raman de una muestra tomada de la zona 3. Haciendo un ajuste utilizando un software comercial podemos identificar distintos picos: en 436 cm^{-1} , que es claramente un modo $E_2^{(2)}$ típico del ZnO [14], en 1763 cm^{-1} posiblemente sea $C = O$ [15], los picos situados en $1268, 1388, 1667\text{ cm}^{-1}$ no fueron identificados por lo que se requiere hacer un análisis más profundo.

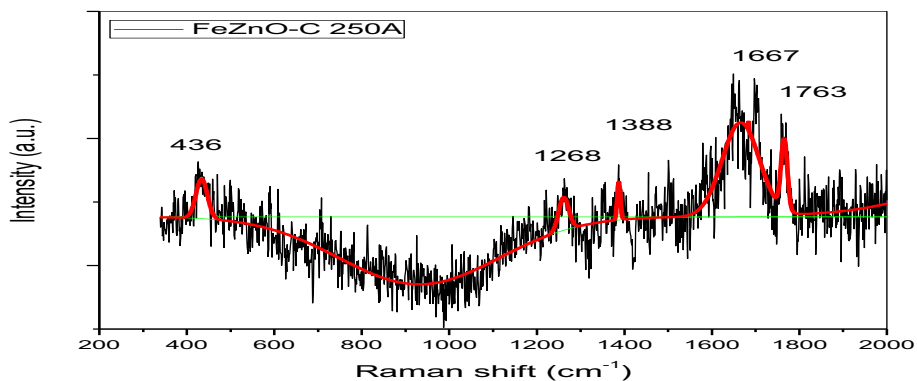


Figura 4. Espectro raman de la zona 3 de $ZnFeO-C$.

V. CONCLUSIONES

Se ha mostrado en este trabajo que la técnica de arco eléctrico inmerso en agua destilada es una técnica muy útil y sencilla que utilizando materiales comerciales nos permite la síntesis de nanoestructuras de distintos materiales, en particular de $ZnFeO - C$. Se conocen algunas propiedades superficiales y estructurales de estas nanoestructuras, utilizando microscopía óptica y espectroscopia Raman.

VI. RECONOCIMIENTOS

Manifiesto mi agradecimiento al Instituto Tecnológico Superior de Irapuato (ITESI) y a CONACyT por el apoyo brindado para la realización de la estadía de verano, gracias a la cual adquirí nuevas visiones, habilidades y conocimientos, los cuales sé que me serán útiles en mi desarrollo académico y profesional.

REFERENCIAS

- [1] A. Khan. J. Pak Mater Soc. 1(2010)5.
- [2] B. Hadzic, N. Romcevic, M. Romcevic, I. Kuryliszyn-Kudelska, W. Dobrowolski, J. Trajic, D. Timotijevic, U. Narkiewicz, D. Sibera. J. Alloys And Compounds 540(2012)49-56.
- [3] N. Romcevic, R. Kostic, M. Romcevic, B. Hadzic, I. Kuryliszyn-Kudelska, W. Dobrowolski, U. Narkiewicz, D. Sibera. Acta
- [4] M.D. Coey, M. Venkatesan, C.B. Fitzgerald. Nat. Mater. 4(2005)173.
- [5] R. Taziwa, L. Ntozakhe, E. Meyer. J. Of Nanoscience & Nanotechnology Research. 1(2017)1-3.
- [6] A. Bardhan, C.K. Ghosh, M.K. Mitra, G.C. Das A, S. Mukherjee A, K.K. Chattopadhyay; Low Temperature Synthesis Of Zinc Ferrite Nanoparticles, Solid State Sciences 12 (2010) 839–844
- [7] Sireenart Surinwong, Apinpus Rujiwatra; Ultrasonic Cavitation Assisted Solvothermal Synthesis Of Superparamagnetic Zinc Ferrite Nanoparticles; Particuology 11 (2013) 588– 593
- [8] Mahmoud Goodarz Naseri, Elias B. Saion A, Mansor Hashima,C, Abdul Halim Shaari A, Hossein Abasstabar Ahangard; Synthesis And Characterization Of Zinc Ferrite Nanoparticles By A Treatment Method; Solid State Communications 151 (2011) 1031–1035
- [9] N.D. Núñez Vanegas. Tesis: Síntesis De Nanotubos De Carbono Por El Método De Arco De Descarga. Universidad De Córdoba, 2009.
- [10] Y. Hernández, G. Holguín, M. Baquero, F. Gómez-Baquero. Revista Colombiana De Física, 36(2004)296.
- [11] B. Rebollo-Plata, M.P. Sampedro, G. Gallardo-Gómez, N. Ortega-Miranda, C.F. Bravo-Barrera, G. Daniel-Pérez, B. Zenteno-Mateo, D. Hernández-Cruz, S. Jiménez-Sandoval. Revista Mexicana De Física. 60(2014)227-232. [4] Claudia E. Gutierrez Wing; Las Nanopartículas: Pequeñas Estructuras Con Gran Potencial ¿Por Qué El Interés En Estos Materiales? ¿Qué Aplicación Tienen?; El Inin Hoy.
- [12] Guillermo Pérez (Biólogo Colegiado N° 003257); Espectrometría Raman; Espectrometria.Com
- [13] Renishaw Apply Innovation; Por Qué Utilizamos La Espectroscopía Raman.
- [14] N. Romcevi, R. Kostic, B. Romcevic, I. Kuryliszyn-Kudelska, W.D. Dobrowolski, U. Narkiewics, D. Sibera. Journal Of Alloys And Compounds 507(2010)386-390.
- [15] A. Raj, K. Raju, H.T. Varghese, C.M. Granadeiro, H.I.S. Nogueira, C.Y. Panicker. J. Braz. Chem. Soc. 3(2009)549-559.

Síntesis y caracterización de puntos cuánticos de In/As mediante la técnica MBE

Jesús Hernández Medina

Universidad Autónoma de Zacatecas
Unidad académica de Física
Paseo de la Bufa, Solidaridad, Col. Hidráulica,
CP: 98068 Zacatecas, Zac.
jesus.hernandez@fisica.uaz.edu.mx

Asesor: Dr. Víctor Hugo Méndez García

Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Coordinación para la Innovación y Aplicación
de la Ciencia y la Tecnología
Av. Sierra Leona #550, Col. Lomas 2a. Sección,
C.P.: 7821, San Luis Potosí, S.L.P.
vyktormen@gmail.com

Resumen — En el presente reporte se da a conocer un análisis de caracterización de puntos cuánticos de InAs crecidos sobre películas delgadas de GaAs de diferentes espesores, sobre una capa tensora de un ternario para así modificar sus parámetros de nucleación y crecimiento. Se da a conocer la metodología de crecimiento de las heteroestructuras de multipozos cuánticos así como su caracterización in-situ por medio de RHEED, el cual permite observar la calidad cristalina y las transiciones 2D-3D en el crecimiento de los QDs en cada uno de las capas. Finalmente, se hace una comparativa de la relación que se logra establecer entre tales espesores y el tiempo de relajación de los puntos cuánticos. Estas muestras de películas delgadas dan pie al desarrollo de celdas solares más eficientes

Palabras clave — Puntos cuánticos, MBE, InAs.

Abstract — In this report, an analysis of the characterization of quantum dots of InAs grown on thin films of GaAs of different thicknesses, on a tensor layer of a ternary to modify its nucleation and growth parameters is disclosed. The methodology for the growth of quantum multipole heterostructures as well as their in-situ characterization by means of RHEED, which allows to observe the crystalline quality and 2D-3D transitions in the growth of the QDs in each of the two layers. Finally, a comparison is made of the efficiency obtained by measuring the photovoltaic response of the cells. These samples of thin films give rise to the development of more efficient solar cells.

Keywords — Quantum Dots, MBE, InAs.

I. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es hoy uno de los hitos de la ciencia y ha representado un cambio radical en la vida de la humanidad desde los aspectos cotidianos hasta una revolución completa en la industria. Asimismo, uno de los logros más prometedores que ha alcanzado la nanotecnología es el desarrollo de puntos cuánticos (QD)[1]. Los QD son partículas semiconductoras con pocos nanómetros de tamaño, con propiedades ópticas y electrónicas que difieren de las partículas más grandes. Por ejemplo, los QD de semiconductores dan lugar al desarrollo de células solares más eficientes, dispositivos optoelectrónicos y también computación cuántica.

II. MARCO TEÓRICO

El término Molecular Beam Epitaxy (MBE), describe el crecimiento epitaxial de láminas delgadas de semiconductores compuestos mediante la reacción de haces moleculares térmicos de los elementos constituyentes con la superficie de un sustrato cristalino,

mantenido a temperatura adecuada y en condiciones de ultravacío (10^{-10} torr). Consiste en la evaporación de fuentes sólidas e manera que se producen haces moleculares y se dirigen sobre un sustrato caliente sobre el cual se deposita el material. Los haces moleculares inciden sobre un sustrato y diversas reacciones químicas ocasionan la deposición de monocapas sucesivas.

Los QD pueden autoensamblarse con la técnica de MBE[2], en el modo de crecimiento Stranski-Krastanov[3]. El proceso de autoensamblaje del sistema InAs / GaAs se produce ya que la constante de la red de GaAs es un 7% más pequeña que la red de InAs. Por lo tanto, en las etapas iniciales del crecimiento, el InAs adopta la red de GaAs constante, pero se genera tensión elástica (ϵ) en la película depositada. ϵ se acumula a medida que aumenta el espesor de InAs. Entonces, el grosor alcanza un punto (llamado grosor crítico, H_c) en el que la estructura se colapsa y, en lugar de formar una superficie plana en 2D, se ensamblan nano-islas en 3D que finalmente forman los QD[4]. Dado que los QD están nucleados debido a la tensión de la película en la que crece, se puede suponer que al modificarla, el autoensamblado también cambiaría[5].

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el crecimiento de Puntos Cuánticos de InAs sobre el sustrato de GaAs se hizo uso de un MBE Riber-32, equipado con RHEED. Colocando el sustrato en un molyblock pegado con indio de alta pureza[6].

A. Preparación de Sustratos

Todos los sustratos deben prepararse antes del crecimiento.

- Primeramente se limpia el excedente de Indio de; Molyblock que será utilizado, (esto porque queda un poco de Indio una vez que se ha usado).
- Se coloca el Molyblock con sobre una estufa que elevará la temperatura y hará más fácil el proceso de quitado del Indio usado.
- Agregamos nuevo indio y se extiende por la superficie en el centro del Molyblock, por lo general, ya viene especificado el lugar donde se deposita el Indio.
- Colocamos el Sustrato arriba del Indio caliente y lo acomodamos de forma que quede uniforme para que este se adhiera de la misma manera.
- Una vez adherido el sustrato es colocado en el carrito transportador, que será colocado dentro de la cámara de inducción para ser usado en el proceso.

B. Proceso de Degasado

El proceso de degasado se lleva a cabo elevando la temperatura «standby» de las celdas en el MBE con el fin de vaporizar elementos residuales de algún otro proceso de crecimiento.

Para cuantificar estos valores se debe estudiar las curvas correspondientes, donde se vincula la disminución del caudal generado por unidad de superficie en función del tiempo

en que son expuestos al vacío. Con todos estos datos se puede establecer algunos conceptos generales relacionados con este efecto.

- Primeramente se expone la celda a una temperatura mayor a la del crecimiento, esto puede ser unos 30° arriba de la temperatura normal del sustrato.
- Después al llegar a la temperatura deseada la celda empieza a vaporizar impurezas.

C. Crecimiento

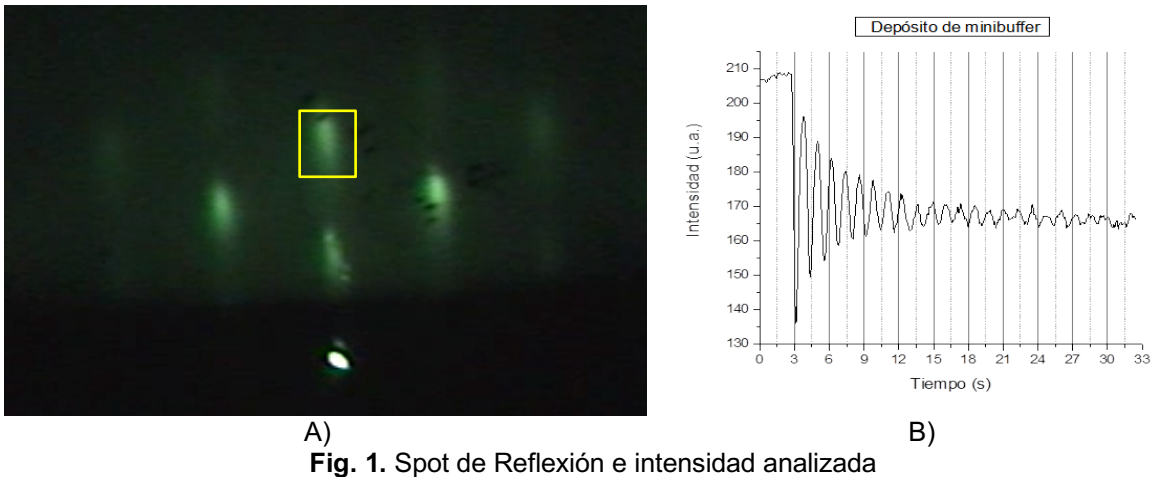
El equipo de MBE que tenemos consta de tres cámaras (introducción, degasado y crecimiento); tenemos la bomba criogénica y tres reguladores (que se encargaran de medir el vacío interno y de controlar la bomba iónica); y una Bomba Turbomolecular.

- Primeramente debemos colocarnos el equipo correcto de laboratorio (guantes, bata, cofia, cubrecalzado); una vez listo, nuestro proceso de crecimiento comienza en la cámara de introducción.
- Se revisan los medidores para ver el seguimiento de la presión.
- Para mantener el vacío (10^{-10} torr) deben estar abiertas las bombas, en éste caso se revisa la temperatura en la bomba criogénica que tiene que estar alrededor de 17°k.
- El ducto del aire se purga primero con aire a presión y luego abrimos el tanque de nitrógeno para que quede previamente purgado el ducto del aire con gas nitrógeno.
- Se debe tener una temperatura ideal de entre 0°c y -5°c.
- Monitoreamos los sensores para ver el vacío, así mismo se debe monitorear el peso del tanque de nitrógeno.
- En la cámara de introducción es donde comienza el proceso de vacío, mediante la utilización de bombas.
- Una vez realizadas todas las medidas de seguridad correspondientes la muestra es colocada en el carrito transportador para ser dirigido hacia la cámara de degasado.
- Después del degasado, se transporta el sustrato a la cámara de Transferencia .
- Se inician las condiciones de crecimiento tomando en cuenta los principales parámetros (Temperatura y presión).
- Después de haber obtenido los parámetros de crecimiento requeridos, se pasa la muestra a la cámara de crecimiento, en la que se procede a crecer en términos de nm de la capa Buffer de GaAs con una temperatura de manipulador de 558°C, seguido de una capa de AlGaAs donde se crecieron los Puntos Cuánticos de InAs.
- Parámetros de crecimiento (Temperatura y Presión)[7]:

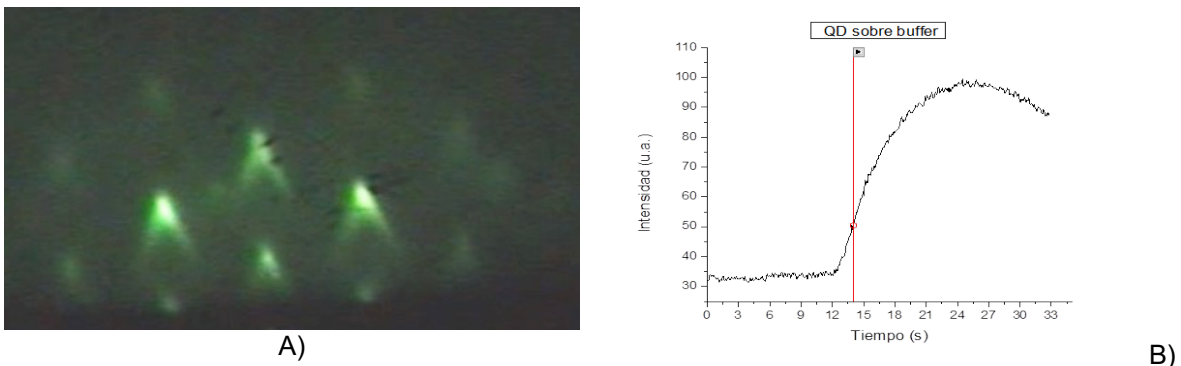
$T_{As}=280$	$P_{As}=2.6E-6$
$T_{Ga}=913$	$P_{Ga}=2.1E-7$
$T_{In-Bk}=690$	$P_{In}=2.3E-7$

IV. RESULTADOS

Con el fin de conocer tanto las velocidades de crecimiento como espesor de cada capa, se recurrió a hacer una revisión de las oscilaciones de intensidad que se producían en el spot especular. Todo esto se realizó con la ayuda de un software en el que se analizaban uno a uno los vídeos de RHEED, seleccionando un área del spot donde se aprecie con claridad el cambio de intensidad con respecto al tiempo. Los datos obtenidos se exportaron hacia un graficador que nos mostraba la cantidad de oscilaciones generadas mientras el obturador se encontraba abierto. Cada oscilación representa el crecimiento de una monocapa [8]



A lo largo del crecimiento se estuvieron monitoreando los patrones de RHEED que se producían en las múltiples etapas. Concluyendo el crecimiento de manera satisfactoria con la formación del patrón de difracción conocido como chevrones, patrón característico que se genera tras la formación de Puntos Cuánticos



Variando los grosores de la capa penúltima de GaAs en 0, 2, 4, 8, 13 y 18 monocapas, se obtuvo la siguiente relación

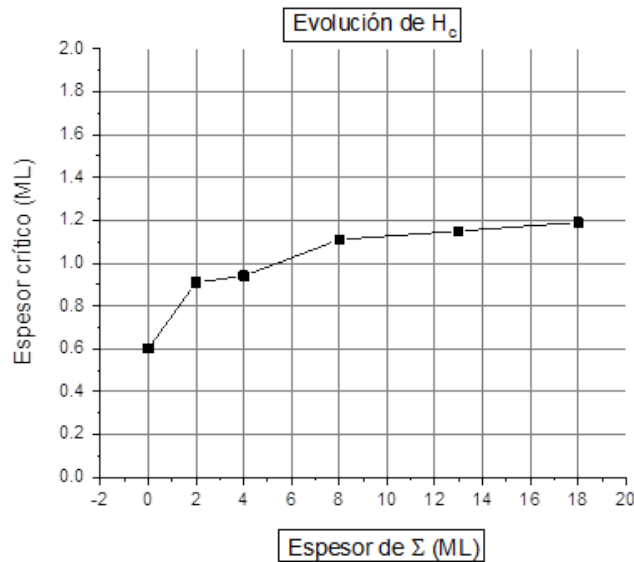


Fig. 3. Relación entre el grosor de la monocapa de GaAs y la nucleación de los QDs

V. CONCLUSIONES

Se crecieron correctamente los puntos cuánticos sobre una superficie plana de GaAs la cual, al variar sus espesores, efectivamente tuvo repercusiones directas en la nucleación de los QDs. Puesto que la gráfica sugiere una tendencia al aumento de espesor crítico en función de las monocapas depositadas

VI. RECONOCIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Institución en la que tuvo cede mi investigación, al comité organizador del “Verano de la Ciencia 2019” por haberme permitido formar parte del evento, al CIACyT y sus instalaciones, donde desempeñé la parte experimental.

Finalmente, extendiendo mi agradecimiento personal al Dr. Victor Hugo Mendez García y a su equipo de trabajo completo por las facilidades y el apoyo, disposición y seguimiento otorgado para la realización de la estancia de verano.

REFERENCIAS

- [1] B. A. Joyce, P.C. Kelires, A.G. Naumovets, Proceedings of the NATO ARW on Quantum Dots: Fundamentals, Applications and Frontiers, Crete, Greece 20. (2003, 24 julio).

- [2] D. Bimberg, M. Grundmann, N.N. Ledentsov, Quantum Dot Heterostructures (Wiley, Chichester, 1998).
- [3] P. Michler, Single Quantum Dots (Springer, Berlin, 2003)
- [4] H. Lee, R. Lowe-Webb, W. Yang, P.C. Sercel Determination of the shape of self-organized InAs/GaAs quantum dots by reflection high energy electron diffraction. (1997, 12 diciembre).
- [5] P. Pampili, P.J. Parbrook. Materials Science in Semiconductor Processing. (2016, 3 agosto).
- [6] K.L. Wang, Novel Devices by Si-Based Molecular Beam Epitaxy, Solid State Technol, 28:137 (1985)
- [7] A.Y. Cho, J.R. Arthur, Progress Solid-State Chemistry 10:157, (1975)
- [8] L.C. Cai, H. Chen, C.L. Bao, Q. Huan, J.M. Zhou. RHEED characterization of InAs/GaAs grown by MBE. (1998, 20 septiembre)

Síntesis y caracterización de recubrimientos de ZnS químicamente depositados

Diana Laura García Antonio

Instituto Tecnológico de Querétaro
Av. Tecnológico s/n esq. Gral. Mariano Escobedo
Col. Centro Histórico C.P. 76000,
Querétaro, Querétaro
yanalauragarcia@outlook.com

Asesora: Mónica Balvanera Ortuño López

Instituto Tecnológico de Querétaro
Av. Tecnológico s/n esq. Gral. Mariano Escobedo
Col. Centro Histórico C.P. 76000,
Querétaro, Querétaro
mbortuno@mail.itq.edu.mx

Resumen — Se presenta la síntesis química por medio de la técnica de depósito por baño químico (CBD por sus siglas en inglés) para la obtención de películas de Sulfuro de Zinc (ZnS), usando una solución constituida por iones S^{-2} y Zn^{+2} a partir de Tiourea y Sulfato de Zinc, citrato de sodio como agente complejante e hidróxido de potasio como fuente de iones hidroxilo y un buffer de pH. La nucleación y el crecimiento se controló sobre un sustrato de vidrio, ejecutando múltiples ensayos con variaciones en los parámetros que afectan la deposición para encontrar las condiciones idóneas para la obtención. Se empleó un espectrofotómetro uv-vis para la caracterización óptica de las muestras.

Palabras clave — Baño químico, sulfuro de zinc, películas, propiedades ópticas.

Abstract — The chemical synthesis is presented by means of the chemical bath deposition (CBD) technique to obtain Zinc Sulfide (ZnS) films, using a solution consisting of S^{-2} and Zn^{+2} ions from Tiourea and Zinc Sulfate, sodium citrate as complexing agent and potassium hydroxide as a source of hydroxyl ions and a pH buffer. Nucleation and growth was controlled on a glass substrate, executing multiple tests with variations in the parameters that affect the deposition to find the ideal conditions for obtaining. A uv-vis spectrophotometer was used for the optical characterization of the samples.

Keywords — Chemical bath, zinc sulphide, films, optical properties.

I. INTRODUCCIÓN

La síntesis por baño químico es una técnica ampliamente utilizada para el crecimiento de películas de materiales semiconductores debido a su simplicidad ya que utiliza material accesible como un recipiente para contener la solución química, el sustrato en el que se requiere hacer el depósito y un controlador de temperatura. De la misma forma se debe tener un control de los parámetros principales como agitación, tiempo, temperatura y pH que en general no es tan sencillo, ocasionando complicaciones en los depósitos de las películas.

La importancia del baño químico radica en gran parte a su uso aabrumadoramente exitoso en el depósito de películas de CdS (y materiales similares) para aplicaciones en celdas fotovoltaicas; sin embargo, el uso de este compuesto desde el punto de vista ambiental no es conveniente debido a su alta toxicidad [1]. Por esta razón algunos centros de investigación e universidades se han dado a la tarea de hallar materiales que sustituyan al CdS sin deteriorar la eficiencia que proporciona el mencionado compuesto.

Estudios reportan el uso de ZnS es uno de los compuestos que ha demostrado tener propiedades ópticas y estructurales similares al CdS, convirtiéndolo en un potencial candidato a remplazarlo además que presenta una menor toxicidad y su síntesis se efectúa de forma similar [1-2].

Es por ello que en el trabajo se presenta la síntesis del compuesto ZnS para ser depositado mediante la técnica de CBD, partiendo del análisis de las diversas soluciones utilizadas, manipulando los parámetros como temperatura, tiempo y pH para obtener la fórmula adecuada que permita conseguir películas homogéneas para su posterior caracterización.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

La deposición química por CBD consta principalmente de dos etapas:

a) Preparación de la solución que parte de compuestos que contienen azufre y zinc empleándose Tiourea y Sulfato de Zinc respectivamente; el agente acomplejante utilizado es citrato de sodio e hidróxido de potasio como fuente de iones hidroxilo. Soluciones diluidas de cada uno de los componentes fueron vertidas continuamente en un vaso de precipitado de 100 ml, con las concentraciones que se reportan en la Tabla 1. En esta tabla también se muestran las diferencias en composición de cada una de las fórmulas estudiadas, y los pH de cada reactor.

b) Para el depósito de las películas de ZnS se emplea el método de inmersión en donde sustratos de vidrio se sumergirán en la solución química que permanecerá dentro de un baño maría, favoreciendo a la nucleación y crecimiento de las películas. Los parámetros de síntesis se variaron para encontrar condiciones óptimas para obtener homogeneidad y adherencia.

Tabla 1. Variables de reacción estudiadas

Compuesto químico	Concentración	Serie de reacciones						
		Q2	Q3	A	B	C	D	E
Sulfato de Zinc (ZnSO ₄)	0.1 M	10 ml	10 ml	10ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Tiourea (CH ₄ N ₂ S)	0.1 M	15 ml	15 ml	15 ml	15 ml	15 ml	15 ml	15 ml
Citrato de Sodio (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇)	0.5 M	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10ml
Hidróxido de Potasio (KOH)	0.5 M	2ml	2.5 ml	3 ml	3.3 ml	2.8 ml	2.5 ml	2ml
Buffer de borato pH 10		10ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Temperatura °C		90	90	70	70	70	70	70
Tiempo de depósito (min)		60,120 y 180		30, 90 y 150			60,120 y 180	

El diseño experimental se basa en el estudio de la influencia que tienen las variables pH, temperatura y tiempo de depósito, como se puede observar al analizar la Tabla 1. Se ha reportado condiciones óptimas para el crecimiento de las películas de ZnS, de pH en un

intervalo de 10-11, de temperatura de 70-90°C y tiempos de depósito de 70-120 minutos. [2-3]

A partir de las formulaciones propuestas de la Tabla 1 fueron obtenidos recubrimientos de muy buena calidad macroscópica. Se descartaron todas aquellas muestras producidas a partir de condiciones experimentales que derivaron en muestras de pobre calidad. Después del depósito los sustratos con la película fueron enjuagados con agua y haciéndoles pasar un trozo de algodón; posteriormente secados y almacenados para su posterior caracterización óptica. [4]

Para las mediciones de pH se empleó un analizador multiparamétrico CONSORT C3010 y para la caracterización óptica el espectrofotómetro UV-Vis Hach DR600.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con cada una de las formulaciones estudiadas se obtuvieron baños químicos transparentes en las etapas iniciales de la reacción, lo que es indicativo del control de la precipitación del ZnS a través de la composición del baño, siendo adecuadas las proporciones del agente acomplejante, la fuente de iones metálicos, el pH y la fuente de iones sulfuro. El pH que del baño se reporta en la Tabla 2, junto con las características macroscópicas de los recubrimientos.

En todos los casos las películas de sulfuro de zinc resultaron de una excelente calidad macroscópica, es decir homogéneas, transparentes y fuertemente adheridas a su sustrato, como se muestra en la Fig.1.



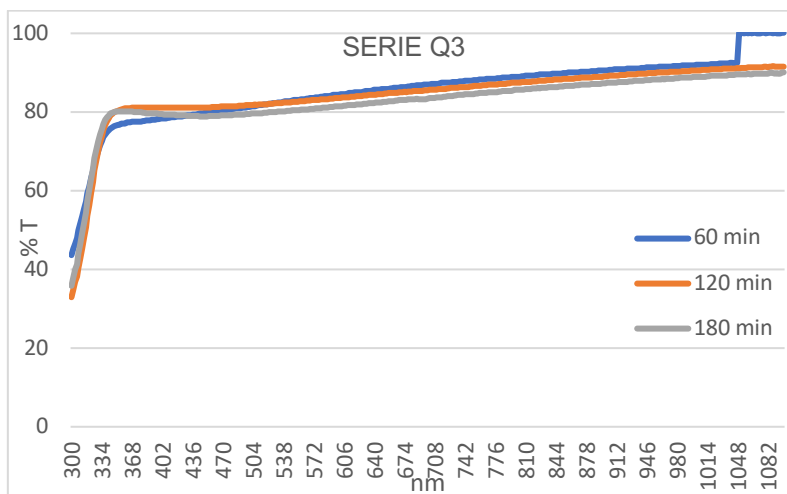
Fig.1. a) Serie Q3, b) Comparación entre las series Q3 y Q2

Para la evaluación de las propiedades se realizó una caracterización óptica básica de las diversas películas obtenidas (véase en Tabla 2) utilizando un espectrofotómetro uv-vis, con lo que fue verificada la identidad de los materiales sintetizados. Se tomó como base datos reportados en artículos y se compararon con los datos experimentales obtenidos. [4-5]

Tabla 2. Serie de películas obtenidas por variaciones en parámetros que fueron caracterizadas ópticamente.

Serie	pH	Características macroscópicas de los recubrimientos
Q3	11.3	Películas transparentes homogéneas, fuertemente adheridas a su sustrato y de tonalidad ahumada
Q2	9.89	Películas transparentes homogéneas, fuertemente adheridas a su sustrato.
A1	11.7	
B1	11.8	
C1	11.68	
D1	10.44	
E1	10	

En la gráfica de la Fig.2 se observa el borde característico de la transmisión de los recubrimientos de sulfuro de zinc de la serie Q3 en diferentes tiempos de depósito, ubicado en los 346 nm. Tales espectros demuestran que las películas son altamente transparentes en toda la región visible del espectro electromagnético, y opacas para la región ultravioleta estudiadas con un porcentaje de transmisión superior al 80% por encima de los 346 nm, y menores de 30% por debajo. Las diferencias sutiles entre los espectros se atribuyen a los diferentes espesores de la serie.

**Fig. 2.** Espectro de transmisión de la serie Q3

En la figura 3 se observa que la influencia de la temperatura y pH en el índice de crecimiento de las películas. De manera convencional se acepta que la temperatura incide directamente en el espesor lo cual puede comprobarse en la gráfica de depósitos de igual tiempo, así mismo el pH influye en lo anterior considerándose como el óptimo entre 10-11. El índice de crecimientos a temperaturas inferiores se compensa en pH de 10 como se deduce al analizar la gráfica de la figura 3. Esto deja ver el potencial de estas formulaciones

al conseguir recubrimientos de buena calidad en condiciones de menores requerimientos energéticos debidos a menores temperaturas de crecimiento y sin agitación.

En la figura 4 se analiza la influencia de variaciones mínimas del pH en el borde de trasmisión, observando diferencias considerables cercanas a los 20 nm en el borde, cuando el pH varía solo entre 11.7 y 11.8. Los resultados anteriores dejan ver un potencial de estas formulaciones en la sintonización de las propiedades ópticas de estos materiales.

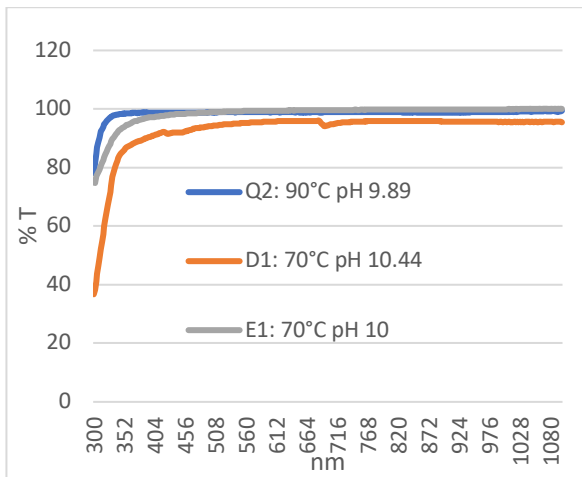


Fig.3. Espectros de transmisión de las películas de ZnS depositadas en 180 min

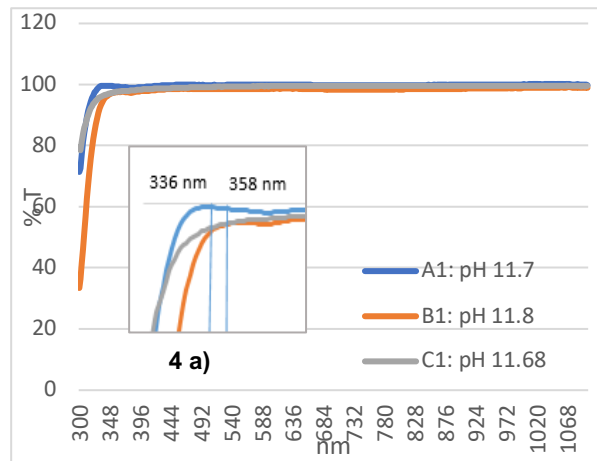


Fig.4. Espectros de transmisión de las películas de ZnS crecidas a 70° en 120 min

IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Se logró diseñar 7 formulaciones para el crecimiento de películas de ZnS de buena calidad, homogéneas, transparentes y fuertemente adheridas al sustrato.
- Se demostró que la temperatura y tiempo de depósito influyen de manera directa en la calidad y el índice de crecimiento, en crecimientos de 70 y 90° C y tiempos de 30 a 180 minutos. Se comprueba que el pH óptimo se encuentra en el intervalo de 10 a 11.
- Se demuestra que los recubrimientos son altamente transparentes por encima 350 nm, y muy opacos por debajo. Por lo que podrían usarse como filtros de radiación ultravioleta.
- Se recomiendan estudios más profundos de las propiedades ópticas que incluyan la caracterización estructural, con el fin de comprobar la potencialidad de estos materiales como componentes de propiedades sintonizables en dispositivos ópticos u optoelectrónicos.

V. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

En la realización y ejecución del proyecto se agradece al Instituto Tecnológico de Querétaro por el apoyo y las facilidades proporcionadas para el uso de las instalaciones del laboratorio de materiales.

REFERENCIAS

- [1] Hodes, G. (10 de Agosto de 2002). *Chemical Solution Deposition Of Semiconductor Films*. Boca Raton: CRC Press.
- [2] Cruz Lemus, S. D., Correa Hoyos, J. M., Chamorro Coral, W., Becerra Arciniegas, R. A., Suarez, H. A., Rodríguez Bejarano, O., & Gordillo Guzmán, G. (29 de Abril de 2013). Síntesis de películas delgadas de ZnS por CBD para uso como buffer en celdas solares basadas en Cu₂SnZnS₄. Bogotá, Colombia.
- [3] Zhou, L., Tang, N., Wu, S., Hu, X., & Xue, Y. (2011). Influence of Deposition Time on ZnS Thin Films Performance with Chemical Bath Deposition. *Physics Procedia*, 354-359.
- [4] Wei, A., Liu, J., Zhuang, M., & Zhao, Y. (2013). Preparation and characterization of ZnS thin films prepared by chemical bath deposition. *Materials Science in Semiconductor Processing*, 1478-1484.
- [5] Galicia, L. R. (2014). *Tesis de Doctorado del Posgrado en Ingeniería Química de la Universidad de Guanajuato*, (Julio 2014), p. 76

Síntesis y caracterización estructural de benzoazolilpirrolidonas

Etna Abigail López García

Universidad de Guanajuato
Noria Alta S/N, Noria Alta,
36050 Guanajuato, Gto.
ea.lopezgarcia@ugto.mx

Asesor: Rubén Antonio Romo Mancillas

Universidad Autónoma de Querétaro
Cerro de las Campanas S/N, Centro Universitario,
76010 Santiago de Querétaro, Qro.
ruben.romo@uaq.mx

Resumen — La epilepsia es una enfermedad cerebral crónica que afecta a personas de todo el mundo y a cualquier edad, es caracterizada por crisis epilépticas que se deben a descargas eléctricas excesivas de grupos de neuronas que pueden producirse en diferentes partes del cerebro. Una de las formas de tratar la epilepsia es por medio de fármacos, sin embargo existe un porcentaje considerable de pacientes que resultan ser resistentes para dicho tratamiento, es por esto que nace la necesidad de sintetizar nuevos fármacos capaces de hacer frente a dicho problema. Las lactamas son una de las moléculas funcionales fundamentales en química orgánica, sirven como farmacóforos en antibióticos, antipsicóticos, candidatos a fármacos y productos intermedios, considerando un potencial uso como anticonvulsivos.

Palabras clave — Anticonvulsivos, benzoazolilpirrolidonas, síntesis.

Abstract — Epilepsy is a chronic brain disease that affects people around the world and at any age, it is characterized by epileptic seizures that are due to excessive electrical discharges of groups of neurons that can occur in different parts of the brain. One of the ways to treat epilepsy is through drugs, however there is a considerable percentage of patients who turn out to be resistant for such treatment, which is why the need to synthesize new drugs capable of coping with this problem is born. Lactams are one of the fundamental functional molecules in organic chemistry, they serve as pharmacophores in antibiotics, antipsychotics, drug candidates and intermediates, considering a potential use as anticonvulsants.

Keywords — Anticonvulsants, benzoazolilpyrrolidones, synthesis

I. INTRODUCCIÓN

La epilepsia es un trastorno cerebral crónico que afecta a personas de todo el mundo y en cualquier edad. Desde la antigüedad ha estado rodeada de temores, desconocimiento, discriminación y estigmatización social. Esta estigmatización persiste hoy en muchos países y puede influir en la calidad de vida de los pacientes y sus familias. Este trastorno es caracterizado por la aparición de crisis convulsivas recurrentes que se deben a descargas eléctricas excesivas generadas por las neuronas cerebrales que pueden producirse en diferentes partes del cerebro. Las crisis epilépticas pueden ir desde breves episodios de ausencia o de contracciones musculares hasta crisis prolongadas y graves. La frecuencia de aparición de los episodios epilépticos varían desde menos de uno al año hasta varios al día, destacando que la intensidad de estos puede ser variable.

Cuando una persona es diagnosticada con epilepsia, de primera elección se le administra un tratamiento farmacológico, el cual debe de ser seleccionado principalmente tomando en consideración el tipo de epilepsia, la edad y el tiempo de

desarrollo del trastorno, esto con la finalidad de favorecer la calidad de vida del paciente. Existen más de 20 fármacos anticonvulsivos (FAE's) aprobados por la FDA para ser administrados en pacientes. Aunado a esto, el 70 % de las personas con epilepsia responden de manera efectiva al tratamiento y el porcentaje restante desarrolla epilepsia de difícil control o menor conocida como epilepsia refractaria, la cual se caracteriza por no responder al control de crisis epilépticas con los fármacos que existen en el mercado, es por ello que se tiene la necesidad de ampliar la gama de moléculas con actividad anticonvulsiva con la finalidad de contribuir en reducir el número de pacientes farmacorresistentes.

Entre los diferentes FAE's con los que se cuenta en los diferentes establecimientos de sector salud en los distintos países, existe un fármaco muy prometedor dado a que presenta características farmacológicas cercanas a las ideales y los pacientes que son tratados con este medicamento desarrollan efectos secundarios menores, este fármaco es el levetiracetam (LEV), el cual ha sido muy estudiado debido a que presenta un mecanismo de acción novedoso, dado que interactúa con la proteína de vesículas sinápticas 2A (SV2A). Por lo tanto, el estudiar moléculas que sean estructuralmente similares a LEV, contribuirán en la elucidación del mecanismo de acción de este fármaco, así como en los posibles candidatos que puedan llegar a fungir como FAE's dirigidos hacia los pacientes con epilepsia refractaria.

II. MARCO TEÓRICO

La epilepsia es trastorno cerebral crónico que afecta a personas de todo el mundo y a cualquier edad.

Las crisis epilépticas se deben a descargas eléctricas excesivas generadas por las neuronas cerebrales que pueden producirse en diferentes partes del cerebro, pueden ir desde breves episodios de ausencia o de contracciones musculares hasta crisis prolongadas y graves. La frecuencia de aparición de los episodios epilépticos varían desde menos de uno al año hasta varios al día, destacando que la intensidad de estos puede ser variable. La sintomatología que se presenta puede ser temporal como pérdida del conocimiento o la conciencia, y alteraciones del movimiento, de los sentidos (incluyendo visión, audición y gusto), estado de ánimo u otras funciones cognitivas.

Los pacientes con crisis convulsivas tienden a padecer problemas físicos a consecuencia de los episodios que desarrollan como son fracturas y hematomas derivados de y mayores tasas de trastornos psicosociales, por ejemplo ansiedad y depresión. Del mismo modo, el riesgo de muerte prematura en las personas epilépticas es hasta tres veces mayor que en la población general, dado que pueden presentar caídas, ahogamientos, quemaduras y desarrollar crisis prolongadas. (1), (OMS,2019)

El tratamiento de la epilepsia dependerá de la clasificación adecuada del tipo de crisis y el síndrome epiléptico, luego la elección de un fármaco antiepiléptico (DEA) que sea más apropiado para el tipo de crisis y el síndrome epiléptico.

El levetiracetam (LEV) es uno de los DEA más nuevos, comercializado en todo el mundo solo desde el año 2000. Inicialmente se aprobó en los EE. UU. Solo como terapia

complementaria para las convulsiones de inicio parcial. Sin embargo, los ensayos más recientes obtuvieron su aprobación como terapia complementaria para las convulsiones tónico-clónicas generalizadas primarias y las crisis mioclónicas de la epilepsia mioclónica juvenil, y un reciente ensayo comparativo de monoterapia obtuvo la aprobación para su uso como monoterapia inicial en la Unión Europea, aunque no en los EE. UU. . Además, la reciente aprobación y comercialización de una preparación intravenosa se ha sumado a la versatilidad de este DEA. (4), (Abou-Khalil B, 2008) SV2A, una proteína vesicular sináptica, se ha identificado recientemente como un objetivo de unión para levetiracetam. (5),(Kaminski RM, Matagne A, Leclercq K, Gillard M, Michel P, Kenda B, et al, 2007). A lo largo de los años se han realizado diferentes estudios que han permitido identificar las partes estructurales importantes en la molécula de LEV para llevar a cabo interacción con la proteína SV2A, así como los diferentes aminoácidos que participan en la interacción ligando-proteína (Shi et al., 2011; Mercier et al., 2014; Correa-Basurto et al., 2015; Lee et al., 2015). Así mismo, Kurokawua en el 2017, realizó una recopilación de varios estudios en los cuales se observan las partes del anillo de pirrolidona del LEV donde se sugieren realizar cambios bioisostéricos (Figura 1) y de esta manera conservar la interacción con la proteína SV2A y posiblemente un efecto anticonvulsivo.

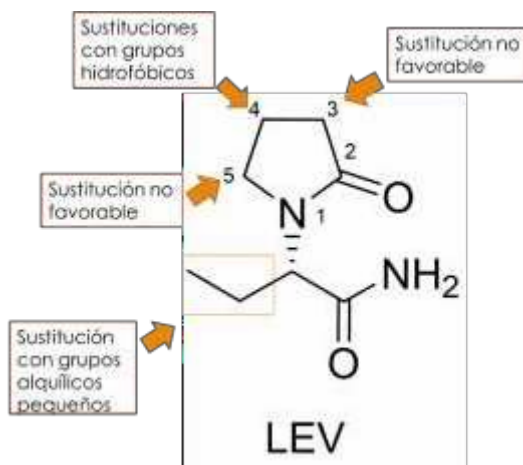


Figura 1. Estructura del levetiracetam (LEV). Se sugiere que se pueden realizar modificaciones estructurales en las posiciones 1 y 4 por grupos alquílicos principalmente, y que en posiciones 3 y 4 no se sugiere realizar sustituciones. Imagen modificada de Kurokawua *et al.*, 2017.

Así mismo se ha visto la importancia del anillo de lactama para llevar a cabo interacciones con la proteína SV2A, a sabiendas de que estas moléculas son de importancia relevante en la química orgánica dado que son los farmacóforos de moléculas con actividades biológicas como antibiótica, antipsicóticos, entre otras (Kicheol y Hyeok Hong, 2015). Por lo tanto, el sintetizar moléculas relacionadas con la estructura de LEV contribuirá a ampliar la gama de candidatos para posteriormente evaluar su actividad biológica en distintos modelos animales.

Una de las formas de tratar la epilepsia es por medio de fármacos sin embargo existe un porcentaje considerable de pacientes que resultan ser refractarios para dicho tratamiento, es por esto que nace la necesidad de sintetizar nuevos fármacos capaces de hacer frente a dicho problema.

Las lactamas son una de las moléculas funcionales fundamentales en química orgánica, sirven como farmacóforos en antibióticos, antipsicóticos, candidatos a fármacos y productos intermedios. En la síntesis de receptores de dopamina. Además, pueden ser utilizados como los monómeros de polímeros sintéticos versátiles, tales como derivados de poli (1-2 vinilpirrolidinona). (2) (Kicheol y Hyeok Hong, 2015).

Las lactamas son importantes subestructuras en productos naturales y Compuestos biológicamente activos, una eficiente estrategia para acceder rápidamente a la diversidad estructural como a sustitución del nitrógeno de la lactama final se puede variar con diferentes nucleófilos de la amina. (3) (Rankic, Stiff, Ende y Humphrey, 2017)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Se formó un 5-amino isoquinolina a partir de una reducción de 5- nitro isoquinolina.

Se utilizaron 500 mg de 5- nitro isoquinolina con 15 ml de metanol, 5 equivalentes de Formiato de amonio como donador de protones y 10% de Paladio/carbono con respecto al compuesto nitrado utilizado como catalizador.

En un matraz Erlenmeyer de 50 ml se colocaron 500 mg de 5- nitro isoquinolina y 15 ml de Metanol en agitación, se agregó el 10% del compuesto nitrogenado de Paladio/carbono y se agregaron los 5 sustituyentes en dos adiciones.

El compuesto obtenido se filtró para eliminar el Paladio/Carbono y posteriormente se concentró en un rota evaporador para eliminar exceso de Metanol, posteriormente se realizó una dilución en Acetato de Etilo con lo que la formación de cristales de Formiato de Amonio fue evidente por lo que la muestra se decantó rescatando solo el líquido resultante para ser separada con lavados de una solución carbonatada con un Ph de 8 en un embudo de separación.

Se extrajeron tanto la fase orgánica como la fase acuosa y se realizó una cromatografía de capa fina tanto de las dos fases como de los cristales de formiato previamente separados para confirmar la presencia de la 5-Amino isoquinolina, comprobando que efectivamente el compuesto estaba presente en la fase orgánica. La fase orgánica fue concentrada en un rota evaporador y se dejó secar.

Posteriormente se montó una reacción con la 5-Amino isoquinolina y furanona para formar una lactama se utilizaron 200 mg de 5 -Amino isoquinolina, 1.3 sustituyentes de furanona,

1.5 de DBU y se utilizaron 2 ml de anhídrido dicloroacético, la reacción se montó en agitación durante dos, horas posteriormente se agregaron 3.5 sustituyentes de anhídrido trifloro acético y de dejó reaccionar durante toda la noche.

El compuesto resultante se trató con una solución sobresaturada de cloruro de sodio y hielo, se filtró y se separó en un embudo de separación y acetato de etilo, en donde se extrajeron tanto la fase orgánica como la fase acuosa, se tomaron muestras y se observaron bajo luz UV.

Se concentró la fase orgánica por medio de un rotaevaporador, posteriormente se diluyó en etanol caliente y se mantuvo en agitación por varios minutos, después se adicione

sulfato de sodio anhidro para extraer cualquier remanente de agua y se filtró para luego ser concentrada de nuevo hasta sequedad.

IV. RESULTADOS

Se realizaron distintas pruebas en placas de sílice que fueron observadas a distintas longitudes de luz demostrando la presencia de 5-amino isoquinolina, así mismo, se obtuvo el espectro de masas de la primera fase de la formación de la 5-amino isoquinolina.

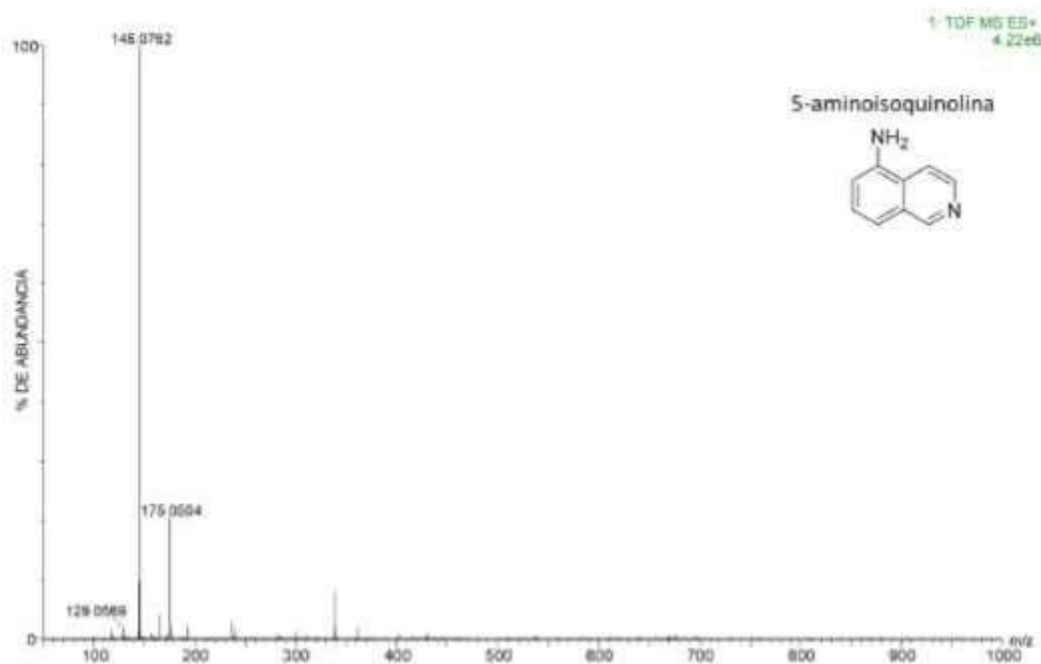


Figura 2: Espectro de masas de la formación de la 5-amino isoquinolina.

En la segunda fase en donde se forma la lactama, se realizaron muestreos de cromatografía en capa fina, observadas a distintas longitudes de luz, en donde se comparan tanto los productos iniciales como el producto final demostrando la presencia de la lactama. Se realizó una metodología inicial para la síntesis de una lactama, con el fin de comprobar su efectividad anticonvulsiva, durante la primera fase se obtuvo 5-Amino isoquinolina, la cual es la primera parte para la creación de la lactama, obteniendo un espectro de masas acorde con lo esperado. Sin embargo durante la segunda fase no se pudo comprobar la formación de la lactama por medio de un espectro de masas debido a que el tiempo no fue suficiente.

V. CONCLUSIÓN

Los fármacos anticonvulsivos han jugado un papel muy importante en el tratamiento de la epilepsia, sin embargo aún existe la necesidad de obtener nuevos fármacos para tratar dicho síndrome.

Aún existe un camino muy largo por recorrer sin embargo nuevas propuestas para dar solución surgen y por esto es necesario seguir explorando nuevas técnicas y posibilidades

en la rama de la farmacia.

VI. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Quisiera expresar mis agradecimientos a la Universidad Autónoma de Querétaro, al laboratorio de diseño asistido por computadora y síntesis de fármacos dirigido por el Doctor Rubén Romo Mancillas, en especial a la estudiante de doctorado Amelia Fabiola Chávez, por su dedicación, compromiso, paciencia y compromiso, mostrado durante la estancia en el verano de investigación región centro para con los estudiantes. Una mención especial a la universidad de Guanajuato por el apoyo obtenido y al Doctor Adolfo López Torres y a la universidad de Papaloapan por el apoyo en la obtención del espectro de masas.

REFERENCIAS

- 1) OMS, Epilepsia, disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>, consultado julio 2019.
- 2) K. Kim and S. Hyeok Hong, Iridium-Catalyzed Single-Step N-Substituted Lactam Synthesis from Lactones and Amines, Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Seoul National University, Seoul 151-747, Korea, The journal of Organic Chemistry, March 23, 2015.
- 3) D. Rankic, C. Stiff, C. Ende, and J. Humphrey, Protocol for the Direct Conversion of Lactones to Lactams Mediated by 1,5,7-Triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ene: Synthesis of Pyridopyrazine-1,6-diones, Pfizer Worldwide Research and Development, Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340, United States, The journal of Organic Chemistry, October 19, 2017.
- 4) Abou-Khalil B, Levetiracetam en el tratamiento de la epilepsia. Neuropsychiatr Dis Treat. 2008.
- 5) Kaminski RM, Matagne A, Leclercq K, Gillard M, Michel P, Kenda B, et al. La proteína SV2A es un objetivo anticonvulsivo de amplio espectro: correlación funcional entre la unión a proteínas y la protección contra ataques en modelos de epilepsia parcial y generalizada. Neurofarmacología. 2008.
- 6) Amelia Fabiola Chávez Elías, (2018), Síntesis y actividad antiepiléptica de pirrolidonas 1,4-disustituidas (tesis de posgrado), Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.

Síntesis y caracterización estructural de benzoazolilpirrolidonas con actividad anticonvulsiva

Ivonne Acosta Buitrón

Universidad Autónoma de Querétaro
Cerro de las Campanas S/N, Centro Universitario,
Santiago de Querétaro, Qro.
ivonneacosta_b@hotmail.com

Asesor: Rubén Antonio Romo Mancillas

Universidad Autónoma de Querétaro
Cerro de las Campanas S/N, Centro Universitario,
Santiago de Querétaro, Qro.
ruben.romo@uaq.mx

Resumen —En este trabajo se describe la síntesis del 4(7)-amino-1H-benzimidazol por medio de síntesis clásica, empleando reacciones de reducción catalítica y de ciclación, partiendo de la 2,6-dinitroanilina. El objetivo es estandarizar la ruta de reacción para la obtención del benzimidazol propuesto, empleando como fuente de hidrógeno, formiato de amonio; paladio sobre carbono como catalizador y metanol como solvente para la reducción catalítica; y ácido fórmico con ácido sulfúrico en cantidades catalíticas para la ciclación del anillo; conservando para ambas reacciones condiciones inertes.

Palabras clave — epilepsia, síntesis, anticonvulsivantes.

Abstract — In this work, the synthesis of 4(7)-amino-1H-benzimidazole is described by classical synthesis, using catalytic reduction and cyclization reactions, starting from the 2,6-dinitroaniline. The objective is to standardize the reaction route to obtain the proposed benzimidazole, using ammonium formate as hydrogen source and palladium on carbon as catalyzer and methanol as solvent for catalytic reduction; and formic acid with sulfuric acid in catalytic amounts for ring cyclization, preserving inert conditions.

Keywords — epilepsy, synthesis, anticonvulsants.

I. INTRODUCCIÓN

La epilepsia es un trastorno neurológico crónico que afecta alrededor de 50 millones de personas a nivel mundial. Es caracterizado por la aparición de crisis epilépticas recurrentes y crónicas que pueden ser convulsivas o no convulsivas (ausencias), durante una crisis se puede perder el control de esfínteres, desarrollarse alteraciones sensitivas y/o psíquicas e incluso síncope^{1,2}. Las crisis epilépticas se dividen en tres grupos: generalizadas, parciales y desconocidas. Se habla de crisis generalizadas cuando las despolarizaciones descontroladas se extienden por toda la corteza cerebral. En cambio, cuando esas descargas se localizan en una zona específica de la corteza cerebral se denominan crisis parciales, por otro lado, cuando no se tienen elementos suficientes para clasificar una crisis epiléptica se conoce como crisis desconocida.³

La transmisión de impulsos nerviosos está modulada por señales excitatorias e inhibitorias, se deduce que las despolarizaciones descontroladas son resultado de una perturbación neuronal por aumento de su estimulación o por disminución de su inhibición.⁴ Algunas estructuras que participan en la neurotransmisión son: canales dependientes de voltaje: Na⁺, K⁺ y Ca²⁺; otros receptores como los dependientes de ligando: GABA_A, AMPA, NMDA y kainato, así como la proteína de vesículas sinápticas SV2A, entre otros.^{5,6} Este tipo de estructuras se han convertido en dianas terapéuticas para el desarrollo fármacos

antiepilépticos, dado que se estima que aproximadamente el 70% de las personas con epilepsia podrían vivir sin convulsiones si se diagnosticaran y trataran adecuadamente.¹

Entre las principales cuestiones que motiva el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la epilepsia es la gran cantidad de efectos adversos que producen los disponibles en la actualidad y el alto porcentaje de pacientes con epilepsia refractaria.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

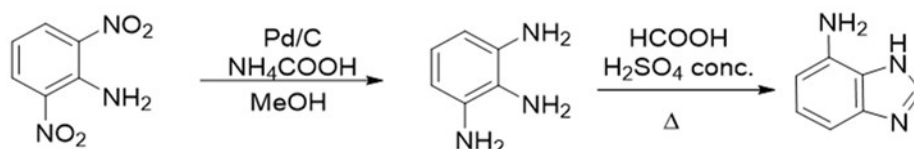


Figura 1. Ruta de reacción propuesta para la síntesis del 7-amino-1H-bencimidazol.

Las reacciones implicadas para la síntesis del 4(7)-amino-1H-bencimidazol, fueron reducción catalítica y ciclación, siguiendo el esquema ilustrado en la figura 1. El monitoreo de las reacciones se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina (CCF.), en placas de silica-gel soportadas en aluminio, empleando una lámpara UV para el revelado de los productos. La purificación del 4(7)-amino-1H-bencimidazol se llevó a cabo mediante cristalización. Para la caracterización química se empleó el método de espectrometría de masas usando como fuente de ionización ESI (+).

En general, el procedimiento para la reacción de reducción fue adicionar en un matraz se 0.5 g de 2,6-dinitroanilina y disolverla en 15 mL de metanol. Se agregó aproximadamente el 10% de Pd/C como catalizador, se mantuvo con atmósfera de nitrógeno durante 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 0.5 g de NH₄COOH, se colocó atmósfera inerte y se mantuvo en agitación a 250 rpm durante 3 horas. Transcurrido el tiempo de reacción, se adicionaron 0.6 g más de NH₄COOH y se dejó en agitación con atmósfera de nitrógeno durante 18 horas. Una vez obtenido el producto de reacción se prosiguió con la formación del anillo de bencimidazol, empleando 0.3 mL de HCOOH y 3 gotas de H₂SO₄ concentrado, dejando durante 18 horas con agitación y atmósfera de nitrógeno.

III. RESULTADOS

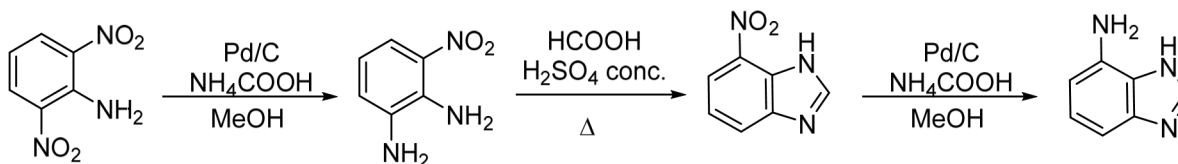


Fig.2 Esquema de la ruta de reacción para la obtención de 7-amino-1H-bencimidazol.

En la primera etapa se llevó a cabo la reducción catalítica de la 2,6-dinitroanilina empleando Pd/C, NH₄COOH y MeOH como solvente, siguiendo las especificaciones descritas en el apartado de metodología y adicionando un exceso de NH₄COOH (0.34 g),

agitando durante 2 horas. Una vez concluida la reacción, el producto se filtró por gravedad para apartarlo del Pd/C, realizando lavados con metanol y se destiló a presión reducida. La reacción fue monitoreada con CCF (Fig. 3)

En un segundo paso de reacción, se prosiguió con la ciclación del anillo de imidazol empleando las condiciones descritas en metodología, purificando el compuesto empleando lavados con solución saturada de Na_2CO_3 hasta pH 7, y luego se extrajo la fase acuosa usando AcOEt. La fase orgánica fue tratada con carbón activado en agitación durante 2 horas, posteriormente se filtró por gravedad y se secó con Na_2SO_4 anhidro. El compuesto se destiló a presión reducida y se cristalizó con etanol y agua (Fig. 4). El compuesto se analizó por espectrometría de masas, obteniendo que aún un grupo nitro estaba presente en la estructura (Fig. 5), por lo cual se realizó de nueva cuenta reducción catalítica empleando 0.3 g de NH_4COOH , Pd/C (10%), 15 mL de MeOH, en agitación y condiciones inertes durante 2.5 h, el compuesto se monitoreó con CCF (Fig.6).



Fig. 3 Cromatograma del monitoreo de la reducción del 2,6-dinitroanilina. Sistema de elución: AcOEt:Hex (7:3). Muestras: control 2,3-dinitroanilina (carril 1) y producto de reducción catalítica (1,2,3-triaminobenceno) (carril 2).



Fig 4. Cristalización del 4(7)-amino-1H-benzimidazol. Fase móvil: AcOEt:Hex (7:3). Muestras: 1,2,3-triaminobenceno (carril 1), 4(7)-amino-1H-benzimidazol en AcOEt (carril 2), 4(7)-amino-1H-benzimidazol cristalizado (carril 3).

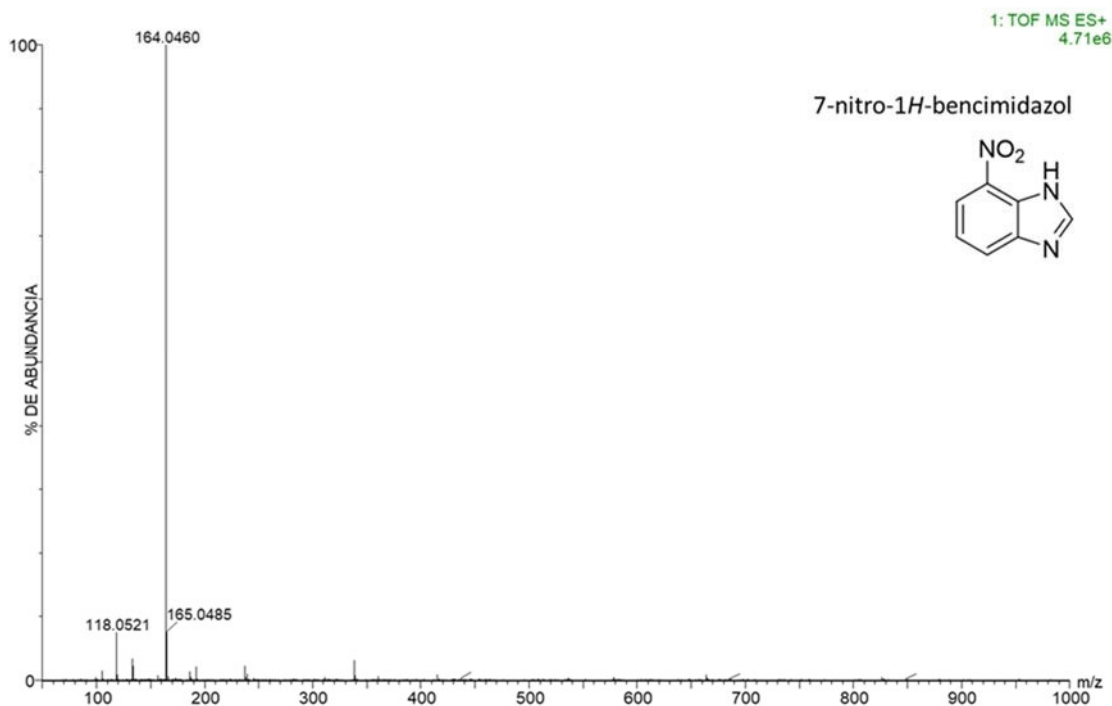


Fig. 5 Espectro de masas de la molécula 4(7)-nitro-1H-benzimidazol. Se observa el ion cuasimolecular con un valor de 164.0460 correspondiente a $[M+H]^+$ con un porcentaje de abundancia del 100 %. El valor de la masa exacta de la molécula es de 163.0382 m/z .

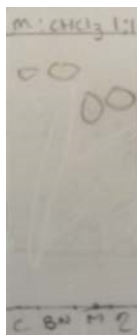


Fig 6. Cromatograma de la obtención del 4(7)-amino-1H-benzimidazol. Fase móvil: MeOH:CHCl₃ (1:1). Muestras: 7-nitro-1H-benzimidazol (carril 1 y 2), 7-amino-1H-benzimidazol (carril 3 y 4).

IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de masas demostraron que la molécula final contiene 2 oxígenos, por lo cual concluimos que posiblemente solo se redujo un grupo nitro del 2,3-dinitroanilina, obteniendo así al 2-amino-3-nitroanilina y posteriormente de su ciclación al 4(7)-nitro-1H-benzimidazol; o, que efectivamente se haya obtenido en primera instancia al 1,2,3-triaminobenceno y luego su ciclación para obtener el 7-amino-1H-benzimidazol, pero que en algún punto de su purificación el grupo amino libre se haya oxidado a nitro debido a su

exposición con la luz o al aire; sin embargo, se propone que sea más factible que no se haya logrado la reducción de ambos grupos nitro debido a que el impedimento estérico presente en la 2,4-dinitroanilina haya imposibilitado la reducción total de ésta al 1,2,3-triaminobenceno. El hecho de monitorear las reacciones y el proceso de purificación por cromatografía en capa fina nos ayudó a contemplar algunos de los componentes de las muestras y a tomar decisiones respecto a su síntesis y purificación.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se realizó la reducción del 2,6-dinitroanilina por medio de una hidrogenación catalítica con Pd/C y NH₄COOH, y la ciclación de la 1,2,3-triaminobenceno con ayuda del ácido fórmico y ácido sulfúrico, esperando formar el 4(7)-amino-1H-benzimidazol. El rendimiento de la reacción por este método fue de 40%. En trabajos futuros, deseamos someter la molécula a distintas reacciones y obtener un compuesto en suficiente cantidad para evaluaciones biológicas posteriores, esperando obtener actividad biológica que reduzca significativamente las crisis convulsivas.

VI. AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro por el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano.

A la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec y al Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencia y Nanotecnología (LINAN-Tuxtepec), así como al Dr. Adolfo López Torres, por su contribución para la adquisición del espectro de masas.

A mis padres, por su apoyo incondicional.

REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. Epilepsia. 2019. Recuperado de: www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy.
2. Hernandez Ramos, J. Fármacos de última generación para el tratamiento de la epilepsia: síntesis, farmacología y comercialización. Universidad Complutense de Madrid. 2017.
3. Ropper A-A, Samuels M. Adams y Victor: Principios de neurología. 9ª ed. México D.F.: Mc Graw-Hill; 2011.
4. Cabo-de la Vega C, Villanueva-Hernández P, Prieto Martín M. Neuroquímica de la epilepsia, neurotransmisión inhibitoria y modelos experimentales: nuevas perspectivas. Rev Neurol. 2006;42(3):159-168.
5. Sociedad Española de Neurología. Guía oficial de práctica clínica en epilepsia [Internet]. Madrid: Luzán 5; 2012 [citado 26 May 2017]. Disponible en <http://www.epilepsiasen.net/wpcontent/uploads/GUIA%20OFICIAL%20SEN%20EPILEPSIA.pdf>
6. Guyton A-G, Hall J-E. Tratado de fisiología médica. 13ª ed. Elsevier; 2016

Síntesis y evaluación de fotocatalizadores con base en perovskitas

Auria Sarai Porras Zapien

Universidad de Guanajuato
División de Ciencias Naturales y Exactas,
Noria Alta S/N; C.P. 36050; Guanajuato, Gto.
as.porraszapien@ugto.mx

Asesor: Vladimir Alonso Escobar Barrios

Instituto Potosino de Investigación Científica
y Tecnológica, A.C
Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas
4 sección, CP. 78216; San Luis Potosí S.L.P
vladimir.escobar@ipicyt.edu.mx

Resumen — En la estancia de verano se trabajó la degradación de fenol a partir de un fotocatalizador tipo perovskita con base en titanato de bario (BaTiO_3), sintetizado mediante el método de coprecipitación, asimismo se realizó la valoración de la degradación con un fotocatalizador comercial oxiclورو de bismuto (BiOCl). Las reacciones se llevaron a cabo en una solución con concentración alta de fenol, dentro de un reactor irradiado con luz UV y agitación constante. A la par se realizaron depósitos entre los dos fotocatalizadores evaluados a diferentes proporciones. La caracterización de los materiales se realizó mediante la difracción de rayos X (DRX) y microscopía electrónica de barrido (SEM), en tanto que para medir el porcentaje de degradación se utilizaron los métodos espectroscopia infrarroja (FTIR) y espectroscopia UV-Vis.

Palabras clave — Fotocatálisis, degradación del fenol, titanato de bario, oxiclورو de bismuto.

Abstract — During the summer stay, phenol degradation was carried out using a perovskite-type barium titanate (BaTiO_3) photocatalyst, which was synthesized by coprecipitation method. In addition, degradation of phenol was evaluated using a commercial bismuth oxychloride (BiOCl) photocatalyst. The reactions were carried out with high concentration of phenol solution, inside a reactor irradiated with UV light under constant agitation. At same time, some the two photocatalysts were deposited with different proportions. The X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopy (SEM) as well as infrared spectroscopy (FTIR) and UV-Vis spectroscopy were used to characterize the material and measure the percentage of degradation.

Keywords — Photocatalysis, degradation of phenol, Barium titanate, bismuth oxychloride.

I. INTRODUCCIÓN

La creciente preocupación por el tratamiento inadecuado e insuficiente de las aguas residuales ha fomentado la investigación y el desarrollo de nuevos métodos para la remediación de estos efluentes. Uno de los principales contaminantes que persiste aun después del tratamiento por métodos convencionales es el fenol, ya que presenta una naturaleza recalcitrante, la cual proviene de la presencia del anillo bencénico dentro de su estructura que posee la capacidad de estabilizarse, lo que hace difícil su degradación [1].

El fenol está presente en el medio ambiente mediante procesos naturales y por fuentes antropogénicas, ya que es una de las materias primas más utilizadas en la industria para la producción de productos químicos como resinas fenólicas, bisfenol A y caprolactama, entre otros productos [2]. El fenol tiene grandes efectos dañinos a la salud por su alta toxicidad, además de tener la particularidad de ser un compuesto bioacumulable, por lo que se puede

acumular en los tejidos del cuerpo y ser transportado por medio de estos antes de ser excretado a través de la vía metabólica del cuerpo, debido a su persistencia [3].

Estudios previos han demostrado la degradación de la molécula del fenol a través de Procesos de oxidación avanzada (PAO's) con el método de fotocatalisis heterogénea, consiste en la destrucción de los contaminantes mediante el uso de radiación solar o ultravioleta y catalizadores, con el objeto de formar radicales hidroxilos, los cuales posteriormente tendrán un efecto oxidante sobre los contaminantes químicos.

En este proceso, la oxidación tiene lugar directamente en la superficie de la partícula que se utiliza como catalizador con base en materiales semiconductores. En investigaciones previas se demostró la degradación del fenol por medio del Dióxido de Titanio (TiO_2) [4,5]. Sin embargo, debido a la energía de su banda prohibida (E_g) de 3.2 eV sólo puede activarse bajo irradiación UV, limitando su uso con luz solar, reduciendo la viabilidad en la implementación a gran escala para el tratamiento de aguas residuales. En otras investigaciones se realizó el arreglo nano particulado del TiO_2 con plata (Ag) y (MgO) con el fin de disminuir la banda prohibida, activando el catalizador sin necesidad de luz UV [1]. Otros casos han presentado la degradación de fenol por medio del Oxidocloruro de Bismuto (BiOCl). Los fotocatalizadores base oxihaluro de bismuto exhiben interacción de los átomos de halógeno mediante fuerzas de Van der Waals, dicha estructura promueve una alta eficiencia en la separación de los pares electrón-hueco fotogenerados y reduce la recombinación de dichos pares e^-/h^+ . A diferencia del TiO_2 , es un material capaz de activarse con irradiación de luz visible debido a su menor E_g (diferencia de energías entre el mínimo de la banda de conducción E_c y el máximo de la banda de valencia E_v en un semiconductor) de 2.7-2.8 eV [6].

Además, en la actualidad se ha promovido el estudio de estructuras tipo perovskita debido a sus aplicaciones como materiales semiconductores y como superconductores con diversas propiedades férricas. La fórmula general para la perovskita es ABX_3 , siendo "A" y "B" dos cationes de tamaños diferentes ("A" > "B"), mientras que X es un anión principalmente oxígeno que se une a ambos cationes. [7]. Considerando investigaciones previas dentro del grupo se presenta la síntesis del BaTiO_3 (titanato de bario), con sus respectivos arreglos de compositos y depósitos con BiOCl a 3 diferentes concentraciones con el objetivo de identificar el porcentaje adecuado de BiOCl para la degradación del fenol.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Síntesis del BaTiO_3

Para la obtención del titanato de bario, mediante el método de coprecipitación, se generó una solución en cantidades estequiométricas de acuerdo a la reacción $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{TiO}_2 \rightarrow \text{BaTiO}_3 + 2\text{HCl} + \text{H}_2\text{O}$ con cloruro de bario dihidratado comercial ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ACS FERMONT) y dióxido de titanio comercial (TiO_2 , DEGUSSA), y una solución a 0.5 M de urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, FERMONT) como agente quelante. Para ello, se disolvió la urea en 50ml de agua desionizada, y se mantuvo con agitación y temperatura moderada (menor al punto de ebullición del agua), posteriormente se le agregó $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ hasta disolver, y por último se agregó TiO_2 previamente activado en un mortero por 15 min con 10ml de agua

desionizada. La reacción se agitó durante las primeras 5 horas, después (durante 17 horas) se mantuvo la temperatura del agua entre 70-80 °C, concluido el tiempo se retiró de la parrilla y se dejó precipitar por 40 min, una vez precipitado se colocó en una estufa (THERMO SCIENTIFIC, PRECISION) a 110 °C por 6h, después se llevó a calcinación en una mufla a 900°C, por medio de una rampa de calentamiento de 100 °C por hora y un tiempo de estadía de 3h. Una vez obtenido el material se realizó la caracterización del material por medio de difracción de rayos X (DRX) RIGAKU, DIFFRACTOMETER SMARTLAB.

B. Modificación del catalizador BaTiO₃ por depósito

Se trataron 3 muestras del material por 30 min con un equipo ultrasónico ULTRASONIC TEST SIVE, CLEANER HAVER USE para reducir el tamaño de partícula del BaTiO₃, disuelto en alcohol isopropílico. Enseguida se agregó BiOCl para realizar las modificaciones en relación masa del 25%, 50% y 75%. Después se secó en una estufa a 95 °C, una vez seco se calcinó a 300 °C por 3h. Se realizó la caracterización del material.

C. Evaluación de actividad catalítica

1) Realización de la curva de calibración

Se realizó una solución madre de 50ml con una concentración de 100 ppm con Fenol de JALMEK 99%, se tomaron puntos de 3, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 ppm, los cuales se analizaron por los métodos de espectroscopia UV-Vis en un espectrómetro JENWAY 6715, para generar la curva de calibración entre 200 y 500 nm con intervalos de 0.5 nm.

2) Evaluación de Fotólisis y la absorción de los catalizadores

Para evaluar la capacidad de degradación del fenol por medio de fotólisis, es decir; sin el catalizador y solo irradiando con luz UV a 365 nm, se analizó una solución acuosa con una concentración de fenol de 50 ppm, dejándola agitar durante 1h a temperatura ambiente. El experimento duró 6h tomando muestra cada 1h, después se analizaron las muestras por medio de espectroscopia UV-Vis y mediante espectroscopia infrarroja (FTIR) (THERMO SCIENTIFIC, NICOLET IS 10, SMART ITR).

Para la evaluación de la absorbancia de los catalizadores BaTiO₃ y BiOCl se prepararon dos soluciones de concentración de fenol de 50 ppm, a cada una se le añadió fotocatalizador al 1% en un vaso de precipitado cubiertos con aluminio para evitar el paso de la luz, con agitación durante 6h, tomando muestras en intervalos cada 1h. Las muestras obtenidas fueron y posteriormente llevadas a analizar por medio de espectroscopia UV-Vis.

D. Fotocatálisis

Se estudiaron soluciones de fenol (50 ppm) con BaTiO₃, BiOCl y cada uno de los compositos al 1 %, para evaluar su *fotodegradación*. Las soluciones se mantuvieron en obscuridad por una hora dando oportunidad para el proceso de adsorción-desorción, después se irradió con luz UV con una longitud de onda de 365 nm por 5h, tomando muestra cada hora. Se evaluaron los resultados de las muestras por medio de UV-Vis y FTIR.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A) Caracterización del material

Se utilizó el método difracción de rayos X (DRX) para la caracterización de los fotocatalizadores, de esta forma se comprobó la cristalinidad del material. En las pruebas realizadas, para el caso del BaTiO_3 sintetizado y el BiOCl comercial, en la figura 1 se muestran los difractogramas de ambos materiales, donde se comprueba que para el caso de la perovskita se obtuvo sin trazas de precursores o formación de fases secundarias.

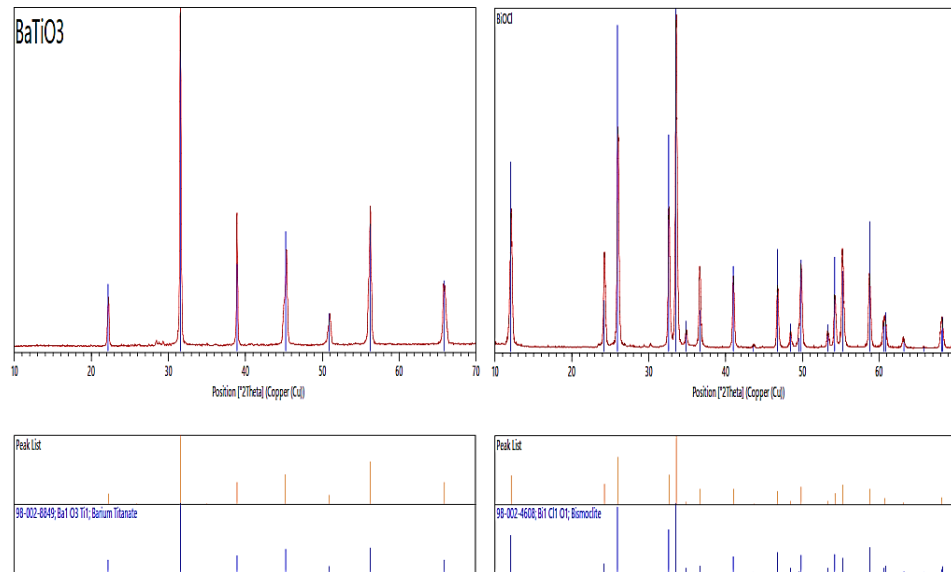


Figura 1. Difractogramas del BaTiO_3 y BiOCl

En la figura 2 se presentan las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM), del titanato de bario y del oxiclورو de bismuto.

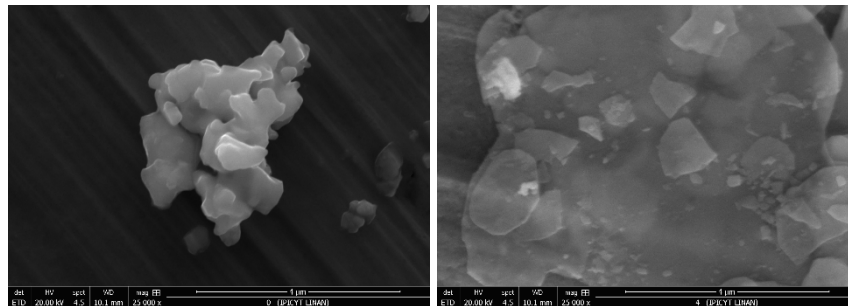


Figura 2: A la izquierda imagen de SEM del titanato de bario y a la derecha el oxiclورو de bismuto.

Para el titanato de bario se observa la formación de partículas alargadas y de diferentes tamaños, así como crecimiento en forma de placas, por su parte el BiOCl tiene una formación característica de “rosa del desierto”.

Para el caso del compuesto con 25% de BaTiO_3 y 75% de BiOCl , como se muestra en la figura 3 se obtienen depósitos del titanato de bario y por el tratamiento térmico el oxiclورو

de bismuto forma obleas. Estos materiales quedan por verificar y corroborar los datos obtenidos en las diferentes pruebas.

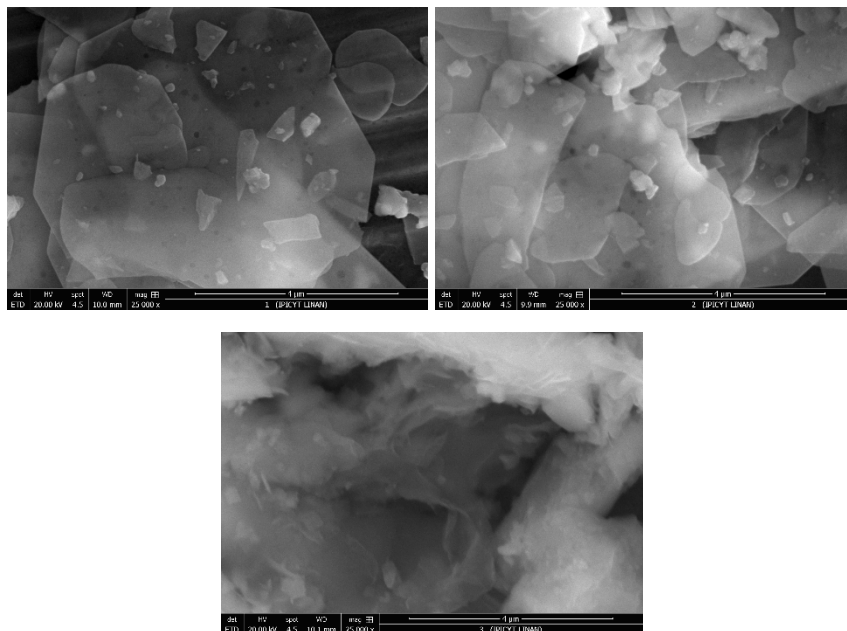


Figura 3: Imágenes de SEM de los depósitos obtenidos de BaTiO_3 en BiOCl , superior derecha 25% de BaTiO_3 , superior izquierda 50% e inferior 75% del titanato de bario.

B) Absorción, fotólisis y fotocatalisis

En los resultados de fotólisis, se pudo observar que el fenol presenta un cambio mínimo en su concentración, pero este cambio no es relevante, es decir que la irradiación UV no tiene la capacidad de degradar al fenol por sí sola.

Por otra parte, en el caso de la absorción del fenol en la superficie de los catalizadores BaTiO_3 y BiOCl . Se observa un comportamiento similar de absorción-desorción, es decir; el catalizador comienza a absorber el fenol hasta llegar a un punto máximo (alrededor de 1h), después comienza un proceso de desorción, así entra en un ciclo, pero presentando la mayor absorción-desorción en el primer ciclo.

Posteriormente se realizaron las evaluaciones con los catalizadores, obteniéndose una degradación del 33.4% con BiOCl y 24.76% con BaTiO_3 , en la figura 4 se puede observar la degradación en función del tiempo, comprobando que existe una reacción de oxidación-reducción en la solución de fenol por la acción de los fotocatalizadores. Los cuales dan la formación del radical hidroxilo cuando se irradian con luz UV, éste absorbe un fotón con mayor o igual energía que la banda prohibida, la cual permite el desplazamiento de un electrón de la banda de valencia a la de conducción, generando pares electrones-hueco reaccionando con las especies absorbidas formando los radicales hidroxilos, el cual inicia un ataque electrofílico al fenol conduciendo a la hidroxilación del anillo bencénico

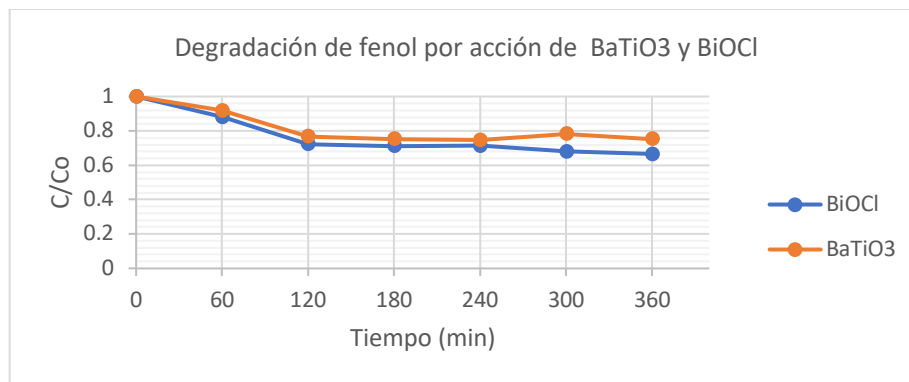


Figura 4. Degradación del fenol por fotólisis, BiOCl y BaTiO₃

Se midió la temperatura de las reacciones, teniendo en el tiempo 0 una temperatura de 27.6 °C, presentando un incremento gradual con lo que se obtuvo en la hora 6 una temperatura máxima de 33.2 °C; cabe mencionar que las temperaturas entre cada muestra fueron diferentes lo que está relacionado con las reacciones que se producen en su superficie, así como a los procesos de recombinación radiactiva y equilibrio térmico de las mismas reacciones.

Los datos obtenidos permiten llegar a conclusiones parciales sin embargo quedan pruebas y valores por corroborar.

IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

A partir del trabajo de investigación que llevé a cabo en la estancia de verano se demostró que es posible degradar el fenol con fotocatalizadores BaTiO₃ y BiOCl, siendo el mayor porcentaje de degradación obtenido a las 2 horas, ya que en las horas subsecuentes la velocidad de degradación se ve disminuida, esto último se ve relacionado con el incremento de la temperatura en la reacción ya que presentó un incremento de 1 °C por hora. Por otro lado, se lograron obtener los depósitos con las técnicas de mezclado y calcinación. Sin embargo, su evaluación queda pendiente para trabajo futuro.

Por lo que se propone una continuación a esta investigación donde se evalúen variables como el pH de la solución, ya que esto va relacionado con la capacidad de oxidación del radical OH[•], además de inyectar aire a la reacción, puesto que el oxígeno es un aceptor de electrones con lo cual podría acelerar la reacción favoreciendo la formación de los productos intermedios, además de un control de la temperatura de la reacción.

V. RECONOCIMIENTOS

Se agradece al programa 21° Verano de la Ciencia de la Región Centro por la oportunidad de participación, al Instituto Potosino de Investigación Científica (IPICYT), al doctorante Eric Enrique Sánchez Díaz a por la ayuda y recomendaciones sobre el trabajo, al Dr. Vladimir Escobar por la oportunidad de participar en su grupo, así como a la Universidad de Guanajuato por el apoyo económico durante la estadía.

REFERENCIAS

- [1] T. Scott, H. Zhao, W. Deng, X. Feng, Y. Li. "Photocatalytic degradation of phenol in water under simulated sunlight by an ultrathin MgO coated Ag/TiO₂ nanocomposite", Vol. 216, pp 1-8.
- [2] Health and Safety Guide, No. 88, 1994. Disponible en <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39958/9241510889-eng.pdf;jsessionid=A56D4D1498806052AFAD17C0EB864915?sequence=1> [consultado en 2019]
- [3] "Fenol". Disponible en: <http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/018903/Links/Guia14.pdf> [consultado en 2019]
- [4] I.D. de León Abarte, "Efecto de la L-Lisina en las Propiedades Físicoquímicas y Fotocatalíticas del Bi₂O₃ Sintetizado Vía Precipitación Asistida con Ultrasonido" [PhD Tesis]. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de ingeniería Civil, Nuevo León, México, 2014.
- [5] L. F. Garcés Giraldo, E. A. Mejía Franco, J. J. Santamaría Arango, "La fotocatalisis como alternativa para el tratamiento de aguas residuales", Disponible en :<http://lasallista.edu.co/fxcuul/media/pdf/Revista/Vol1n1/083-92%20La%20fotocat%C3%A1lisis%20como%20alternativa%20para%20el%20tratamiento.pdf> [consultado en 2019]
- [6] D. V. Sánchez Rodríguez "Evaluación de Oxicloruros de Bismuto como Fotocatalizadores en la Degradación de Rodamina B y Fenol" [Ph Tesis]. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. San Luis Potosí, S.L.P., México, 2015.
- [7] C. J. Rhodes, "Perovskites and their potential use in solar energy applications" Disponible en: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.3184/003685014X14098307810589> [consultado en 2019]
- [8] C.E. Diaz-Urbe, W. Vallejo, Y. Reales, P. Correa. "Degradación de fenol por proceso Haber-Weiss fotoinducido por luz visible con tetracarboxifenilporfirina de cobre (II) anclada al dióxido de titanio" Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/prosp/v13n2/v13n2a06.pdf> [consultado en 2019]

Solución numérica del sistema de ecuaciones diferenciales péndulo resorte en R

Kort Gerardo Rodríguez Beck
 Universidad Autónoma de Coahuila
 Facultad de Ciencias Físico Matemáticas
 Unidad Campo Redondo – Edificio A
 C.P. 25020, Saltillo Coahuila, Coah.
kort.beck@uadec.edu.mx

Asesor: Alberto Hernández Almada
 Universidad Autónoma de Querétaro
 Facultad de Ingeniería - Campus Aeropuerto
 Carr. a Chichimequillas s/n
 C.P. 76140, Querétaro, Qro.
ahalmada@uaq.mx

Resumen — En este documento se discute la simulación del sistema péndulo – resorte (*PR*) modelado a través de la mecánica lagrangiana con el fin de obtener las ecuaciones de movimiento para situaciones idealizadas y no idealizadas para posteriormente resolverlas numéricamente utilizando el paquete deSolve del software R.

Palabras clave — Mecánica clásica, simulación, péndulo, resorte, R.

Abstract — In this document the simulation of the idealize and non-idealize pendulum – spring (*PR*) system its discussed. Lagrangian mechanics were used in order to model the system and the equations of motion were solved numerically using deSolve library on R software.

Keywords — Classical mechanics, simulation, pendulum, spring, R

I. INTRODUCCIÓN

El sistema PR es una modificación del sistema péndulo simple en el que se sustituye la varilla rígida que une la masa oscilante con el eje de giro o pivote, por un resorte libre de expandirse y comprimirse que obedezca la ley de Hooke [1]. Esta modificación añade un grado de libertad al sistema lo que generalmente resulta en ecuaciones de movimiento más complejas.

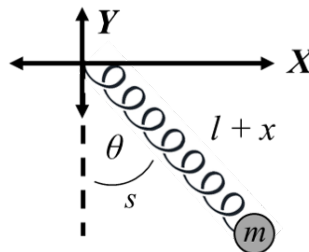


Fig. 1. Sistema PR.

El modelo consta de una esfera sólida de masa m unida a un resorte de constante elástica k , la longitud natural del resorte es l y x es el desplazamiento (*expansión*) del resorte, por lo que en algún tiempo t la longitud total del resorte es $l + x$. El resorte forma un ángulo θ con la vertical. Es importante remarcar que θ y x cambian con el tiempo, es decir son funciones del tiempo, esto es: $\theta = \theta(t)$, $x = x(t)$.

El sistema PR idealizado consta únicamente de lo anteriormente mencionado, es decir no se está considerando la interacción con ningún otro medio ni el desgaste del resorte, por lo tanto no pierde energía y teóricamente el movimiento del péndulo sería perpetuo, esto es imposible ya que se violaría la segunda ley de la termodinámica.

El sistema no idealizado será modelado agregando un factor de frenado debido a la pérdida de energía ocasionada por la fricción entre el aire y el péndulo, este factor de frenado será directamente proporcional al producto entre un coeficiente de fricción μ y la velocidad del péndulo.

II. MARCO TEÓRICO

A. Mecánica lagrangiana (ML)

Modelar un sistema dinámico en ocasiones puede ser demasiado complicado, especialmente si se utiliza como herramienta principal la segunda ley de Newton, es decir utilizando mecánica Newtoniana. Una dificultad que puede surgir al utilizar la segunda ley de Newton en sistemas complejos o con restricciones de movimiento es que esta ley no incorpora explícitamente ninguna de estas posibles restricciones, por lo que deben incluirse ecuaciones adicionales que deben resolverse simultáneamente con las ecuaciones de movimiento obtenidas. Otra opción es hacer uso de la mecánica lagrangiana, la cual es una hermosa teoría que se basa en el análisis de un conjunto de coordenadas generalizadas $\{q_i\}$ y de la energía cinética y potencial del sistema. La ML es el comienzo de un estudio mucho más profundo y formal de sistemas dinámicos, traza un bello camino hacia la mecánica Hamiltoniana, la cual nos permite extraer una increíble cantidad de información sobre cualquier sistema dinámico más allá de solo resolver las ecuaciones de movimiento. Esto es algo sumamente importante ya que da la pauta para poder simplificar los modelos de sistemas complejos en un régimen molecular, atómico y subatómico.

En la ML se definen un conjunto de ecuaciones conocidas como ecuaciones de Euler – Lagrange o simplemente de Lagrange, las ecuaciones son las siguientes:

$$\mathcal{L} = K - U \quad (1)$$

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{\partial \mathcal{L}}{\partial \dot{q}_i} \right) - \frac{\partial \mathcal{L}}{\partial q_i} = 0 \quad (2)$$

donde $\{q_i\}$ es el conjunto de coordenadas generalizadas del sistema y L es el lagrangiano del sistema, definido como la diferencia entre la energía cinética K y la potencial U .

La ecuación 2 considera las posibles fuerzas de restricción del sistema y refleja algunas características de este como la conservación del momento en alguna coordenada generalizada. Por lo general las coordenadas generalizadas solo dependen del tiempo.

B. deSolve

R [2] es un lenguaje y entorno para computo científico, estadístico y gráficos. Es un proyecto GNU, es decir de software libre. R proporciona una amplia variedad de técnicas estadísticas y técnicas gráficas, es altamente extensible.

El paquete deSolve [3] es uno de los tantos paquetes oficiales con los que cuenta R, es utilizado para resolver problemas de valor inicial (*y condiciones de frontera*) de:

- Ecuaciones diferenciales ordinarias lineales y no lineales
- Ecuaciones diferenciales algebraicas
- Ecuaciones diferenciales retrasadas
- Ecuaciones diferenciales parciales

III. METODOLOGÍA

El primer paso fue obtener las ecuaciones de movimiento usando la ecuación 2. Posteriormente se resolvieron las ecuaciones numéricamente a través de un código escrito en R. Una vez obtenidos los datos, estos se graficaron utilizando Python debido a que Python ofrece paquetes (*módulos*) que permiten generar gráficas de alta calidad. Se analizó la evolución del sistema para dos diferentes conjuntos de condiciones iniciales, es decir las ecuaciones de movimiento fueron resueltas dos veces. Todas bajo los mismos parámetros.

A. Ecuaciones de movimiento

Observando la figura 1 es claro que el sistema de referencia está colocado en el pivote del péndulo, de este modo las ecuaciones se simplifican, el sistema es más sencillo de modelar.

La energía potencial del sistema está dada por la suma de la energía potencial gravitacional de la masa m y la energía potencial elástica acumulada en el resorte (*suponemos que el resorte tiene una masa despreciable*), esto es:

$$U = -mg(l+x)\cos(\theta) + \frac{1}{2}kx^2 \quad (3)$$

La energía cinética de una coordenada q_i se define clásicamente como:

$$K_{q_i} = \frac{1}{2}m\dot{q}_i^2 \quad (4)$$

donde \dot{q} denota derivada temporal.

La energía cinética total está dada por:

$$K = \frac{m}{2}(\dot{x}^2 + (l+x)^2\dot{\theta}^2) \quad (5)$$

Finalmente, el lagrangiano del sistema es:

$$\mathcal{L} = \frac{m}{2}(\dot{x}^2 + (l+x)^2\dot{\theta}^2) + mg(l+x)\cos(\theta) - \frac{1}{2}kx^2 \quad (6)$$

Ahora, utilizando la ecuación 2 respecto a cada coordenada se obtienen las ecuaciones de movimiento, esto es:

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{\partial \mathcal{L}}{\partial \dot{\theta}} \right) - \frac{\partial \mathcal{L}}{\partial \theta} = 0 \quad (7)$$

$$\ddot{\theta} = \frac{-2\dot{x}\dot{\theta} - g\text{Sin}(\theta)}{l+x} - \mu\dot{\theta} \quad (8)$$

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{\partial \mathcal{L}}{\partial \dot{x}} \right) - \frac{\partial \mathcal{L}}{\partial x} = 0 \quad (9)$$

$$\ddot{x} = (l+x)\dot{\theta}^2 + g\text{Cos}(\theta) - \frac{kx}{m} - \mu\dot{x} \quad (10)$$

A las ecuaciones 8 y 10 se les agregó el factor $-\mu\dot{\theta}$ y $-\mu\dot{x}$ respectivamente; este es el factor de frenado ya mencionado.

B. Solución numérica

Las ecuaciones 8 y 10 deben ser resueltas simultáneamente, pues una depende de la otra, para poder resolverlas este sistema de dos ecuaciones diferenciales de segundo orden se convirtió en un sistema de cuatro ecuaciones diferenciales de primer orden. Para hacer lo anterior se introducen las nuevas variables:

- Velocidad angular: $\omega(t) = \dot{\theta}$
- Velocidad de compresión y expansión: $V_x(t) = \dot{x}$

Por lo que el sistema de ecuaciones diferenciales a resolver es:

$$\omega = \dot{\theta} \quad (11)$$

$$\dot{\omega} = \frac{-2\dot{x}\dot{\theta} - g\text{Sin}(\theta)}{l+x} - \mu\dot{\theta} \quad (12)$$

$$V_x = \dot{x} \quad (13)$$

$$\dot{V}_x = (l+x)\dot{\theta}^2 + g\text{Cos}(\theta) - \frac{kx}{m} - \mu\dot{x} \quad (14)$$

Para resolver este sistema se utilizó la librería deSolve en R, en específico la rutina de integración ode con un tamaño de paso de $h = 0.0001$.

C. Parámetros y condiciones iniciales

Los parámetros y conjuntos de condiciones iniciales C1, C2 utilizados fueron:

Tabla 1. CI 1.		Tabla 2. CI 2.		Tabla 3. Parámetros.	
$\theta(0)$	1.0472 rad	$\theta(0)$	1.5708 rad	l	2 m
$\dot{\theta}(0)$	0 rad/s	$\dot{\theta}(0)$	0 rad/s	k	5 N/m
$x(0)$	3 m	$x(0)$	4 m	m	2 kg
$\dot{x}(0)$	0 m/s	$\dot{x}(0)$	0 m/s	g	9.81 m/s ²
μ	0.4 kg/s	μ	0 kg/s		

D. Trayectoria

Para obtener la trayectoria que sigue la masa m en el plano XY , se evaluó el vector siguiente, el cual representa la posición de la masa m (ver figura 2).

$$\vec{r} = (X, -Y) = [l + x](\sin(\theta), -\cos(\theta)) \quad (15)$$

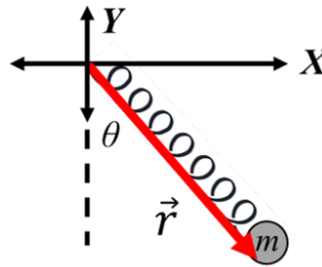


Fig. 2. \vec{r} como vector de posición.

IV. RESULTADOS

A continuación se presentan las gráficas obtenidas:

A. Conjunto 1

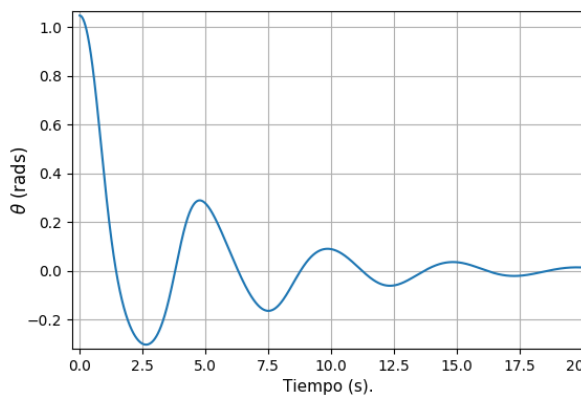


Fig. 3. Posición angular.

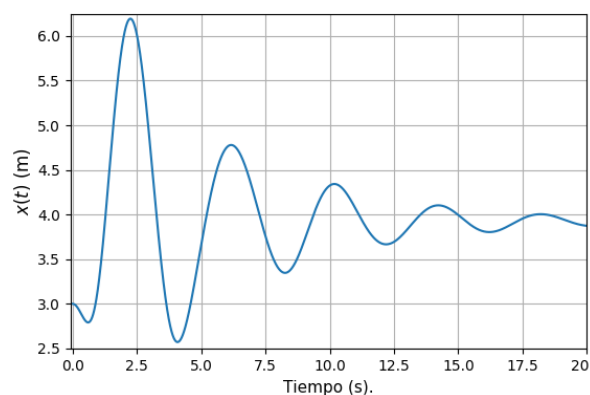


Fig. 4. Compresión/Expansión del resorte.

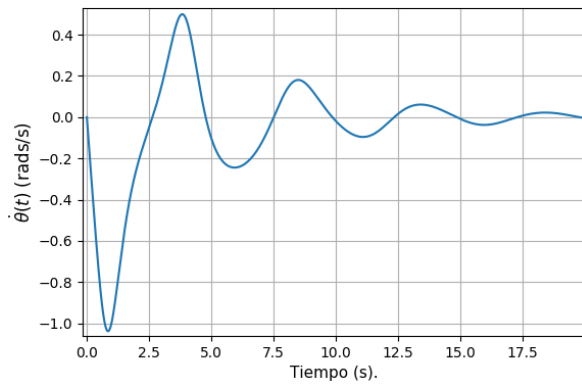


Fig. 4. Velocidad angular.

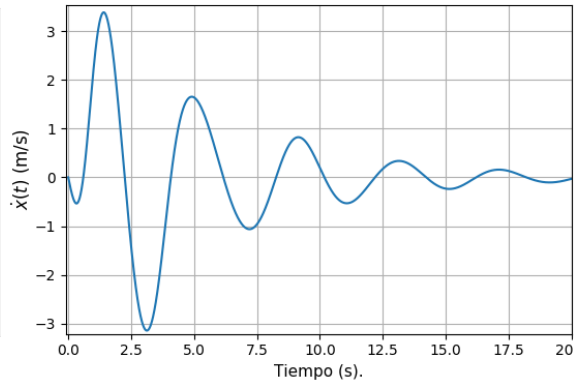


Fig. 5. Velocidad de expansión del resorte.

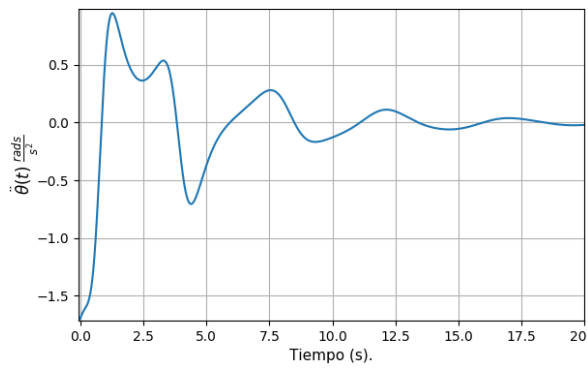


Fig. 6. Aceleración angular.

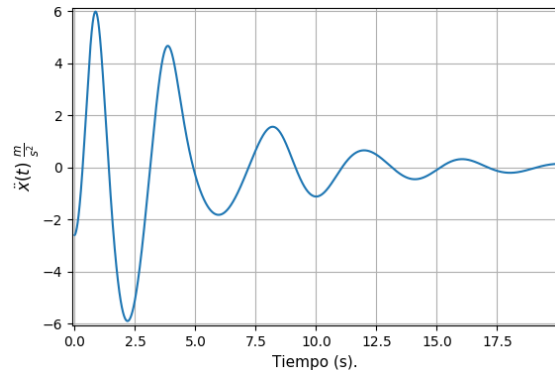


Fig. 7. Aceleración de expansión del resorte.

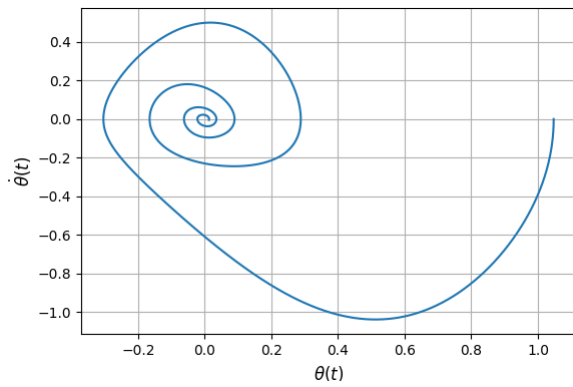


Fig. 8. Espacio fase de θ .

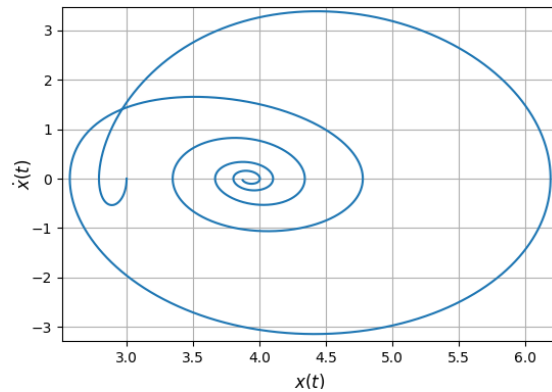


Fig. 9. Espacio fase de x .

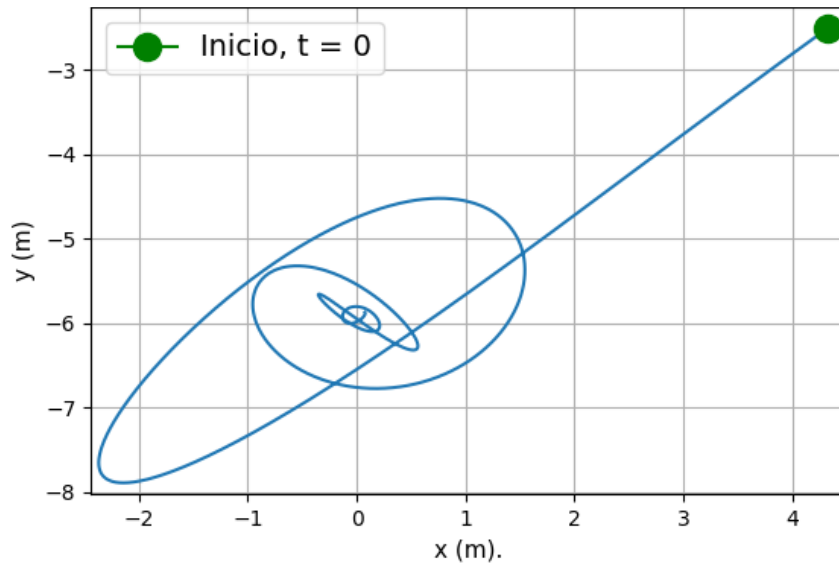


Fig. 10. Trayectoria en el plano.

B. Conjunto 2

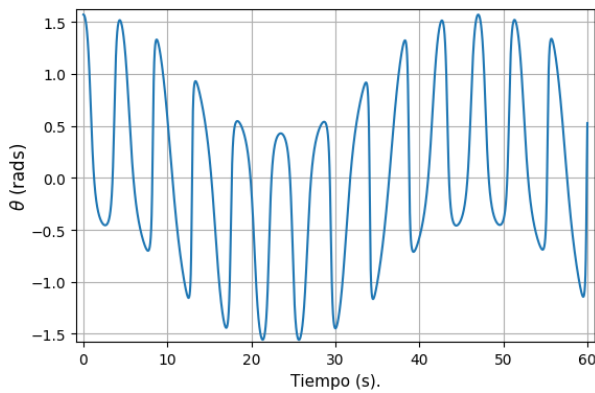


Fig. 11. Posición angular.

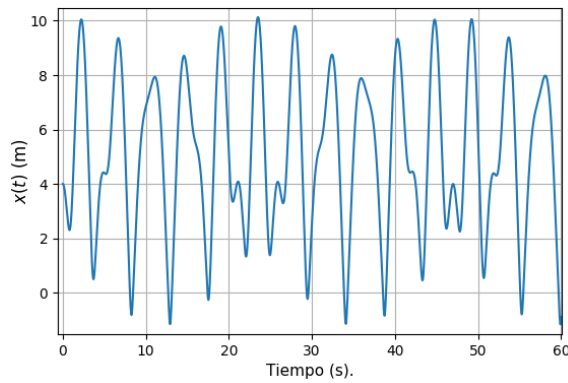


Fig. 12. Compresión/Expansión del resorte

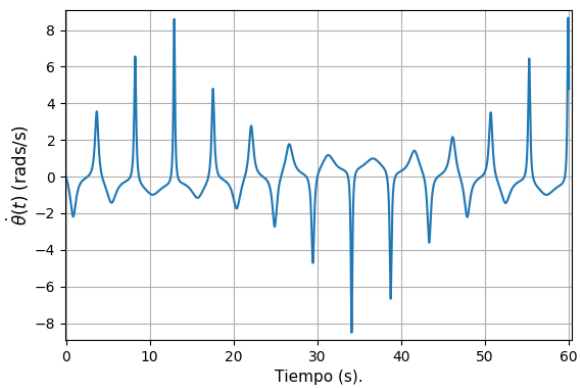


Fig. 13. Velocidad angular.

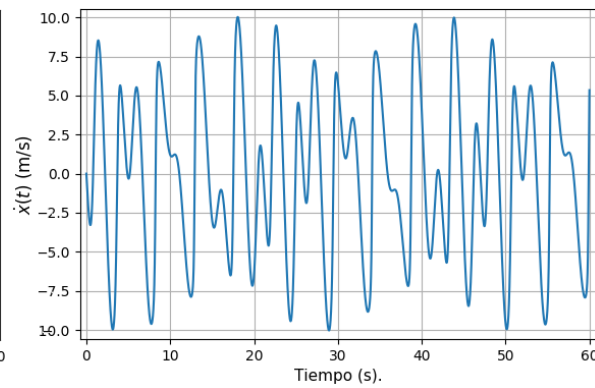


Fig. 14. Velocidad de expansión del resorte

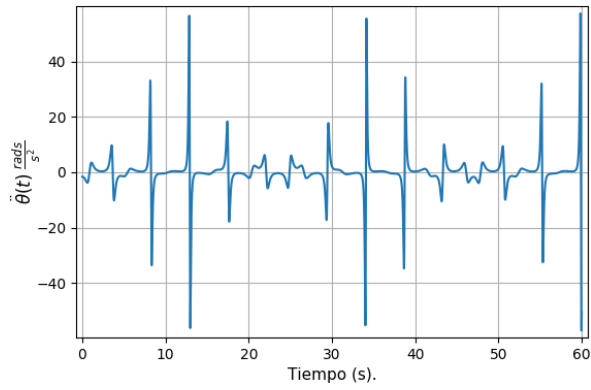


Fig. 15. Aceleración angular.

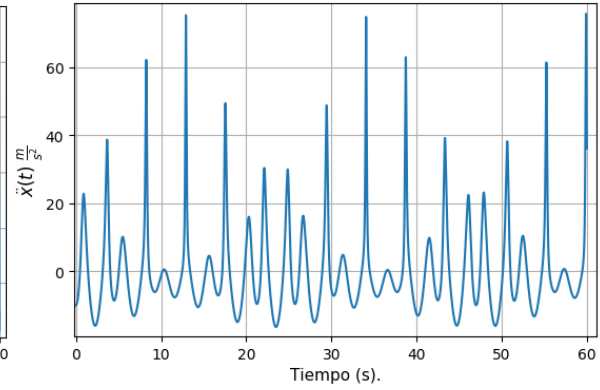


Fig. 16. Aceleración de expansión del resorte

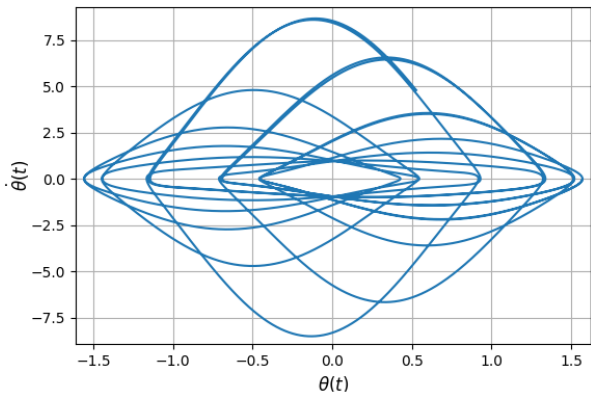


Fig. 17. Espacio fase de θ .

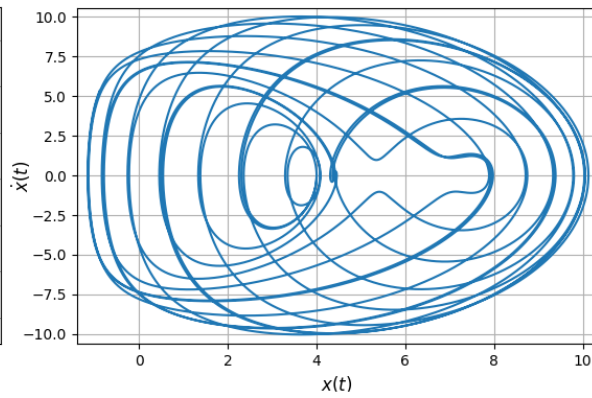


Fig. 18. Espacio fase de x .

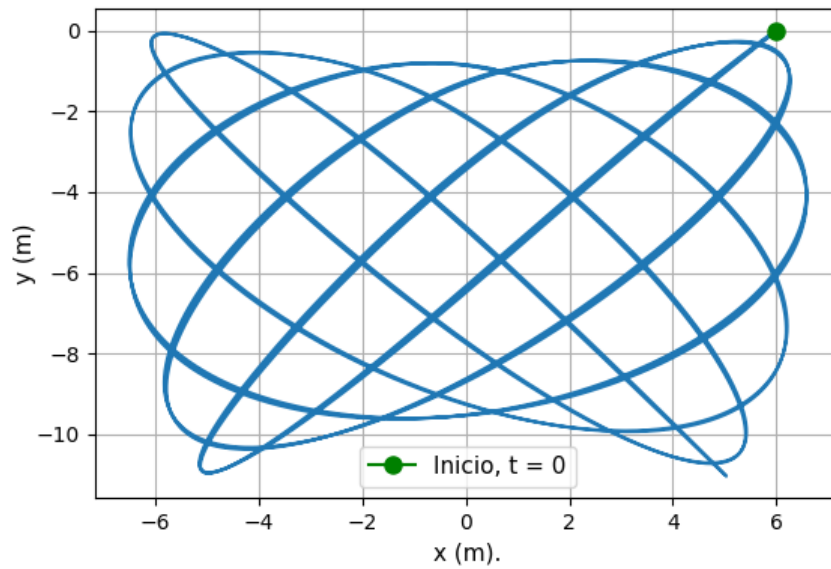


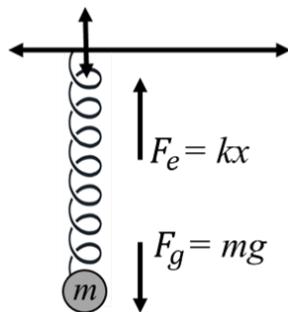
Fig. 19. Trayectoria en el plano.

V. DISCUSIÓN

A. Conjunto 1

Este conjunto de condiciones iniciales fue el único no idealizado, es decir con un valor de μ diferente de 0, como era de esperar, el comportamiento del sistema es muy diferente al de los otros dos casos. Se puede apreciar que al péndulo le tomó aproximadamente 20 segundos para frenarse por completo. Observando los diagramas fase (*fig. 7, fig. 8*) es claro que el péndulo tiende a un estado de equilibrio, en este caso es estado $\theta = 0$ y $x = 3.8$ aproximadamente.

Analizando el estado mencionado utilizando la segunda ley de Newton se tiene que:



$$\begin{aligned}
 F_e &= F_g \quad (16) \\
 kx &= mg \\
 x &= mg / k \\
 x &= (2 \text{ kg})(9.81 \text{ m/s}^2) / (5 \text{ N/m}) \\
 x &= 3.924 \text{ m}
 \end{aligned}$$

Fig. 20. Estado de equilibrio

La deformación que sufre el resorte debido a la masa en el estado de equilibrio debe ser de $x = 3.9 \text{ m}$, como lo indica la ecuación 16, esto es consistente con los resultados obtenidos mediante la simulación utilizando el formalismo lagrangiano.

Si consideramos que el único punto de equilibrio permitido es el representado en la figura veinte, para un sistema PR con parámetros indicados en la tabla tres, no importa cual sea el conjunto de condiciones iniciales, cuando el sistema llegue al estado de equilibrio, la deformación que sufre el resorte será de $x = 3.9 \text{ m}$.

B. Conjunto 2

Una característica especial del sistema PR idealizado son sus trayectorias, la figura 19 es una hermosa curva paramétrica que forma parte de la familia de las curvas de Lissajous [4], la forma del vector \vec{r} de inmediato nos revela esto ya que al ser θ una función explícita del tiempo digamos equivalente a alguna frecuencia ω por un tiempo t , el vector es una combinación lineal de osciladores armónicos simples, uno en cada dimensión.

Los espacios fase (*figuras 17 y 18*) también reflejan cierta periodicidad, es decir no tienen puntos en los que converja la curva, lo cual coincide con el modelo que predice que el péndulo no se detendrá

VI. CONCLUSIONES

En el sistema bajo las CI2, algunas de las variables dinámicas (figuras 13, 14, 15 y 16) tuvieron una evolución brusca en el tiempo, es decir los valores cambian muy rápido y aun así en un intervalo de 60 segundos, no parece que las gráficas hayan perdido su periodicidad ni simetría. Por ejemplo, en la figura 15, el valor de la aceleración angular cambia de 0 a poco más de 50 en un intervalo demasiado pequeño.

Lo comentado anteriormente y lo comentado en las secciones **V.A** y **V.B.**, refleja claramente la precisión de la rutina de integración ode del paquete deSolve. Como ya se mencionó, el tamaño de paso utilizado fue de $h = 0.0001$, esto quiere decir que para las CI2 la rutina calculó 3,000,000 de datos dando solución al sistema de ecuaciones diferenciales 600,000 para el tiempo y 600,000 mas para cada variable dinámica; cabe resaltar el tiempo de computo es de tan solo un par de segundos.

Las ecuaciones 8 y 10 forman un sistema de ecuaciones diferenciales de segundo orden no lineales, en otras palabras, son prácticamente imposibles de resolver, pero gracias a la eficiencia de rutinas de integración como ode, podemos obtener la solución con increíble precisión.

VII. RECONOCIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a los organizadores del Verano en la Ciencia Región Centro 2019 así como a todos los colaboradores del proyecto en cada universidad, por seguir impulsando el quehacer científico en el país, especialmente el de jóvenes universitarios como yo.

REFERENCIAS

- [1] R. J. Atkin & N. Fox: *An Introduction to the Theory of Elasticity*, Ed. Dover, 1980.
- [2] About R, <https://www.r-project.org/about.html> [consultado en 2019]
- [3] Package 'deSolve', Solvers for Initial Value Problems of Differential Equations ('ODE', 'DAE', 'DDE'), 2019.
- [4] H. Goldstein, C. Poole, J. Safko, *Classical Mechanics*, 3era Ed., Addison Wesley, 2001.

Statistics of Hotspots in Radio Galaxies

Pedro Abel de la Rosa Valdés

Universidad Autónoma de Zacatecas
Calzada Solidaridad esq. Paseo La Bufa s/n
C.P. 98060, Zacatecas, Zac., Mexico
pedrodelarosa993@gmail.com

Advisor: Heinz Andernach

Universidad de Guanajuato
Departamento de Astronomía, DCNE
C.P. 36023, Guanajuato, Gto., Mexico
heinz@astro.ugto.mx

Resumen — Con base en imágenes del rastreo del cielo en radio FIRST a 1.4 GHz, se compilaron las posiciones de unos 5200 *hotspots* en ~2870 radiogalaxias y cuásares, cuyos tamaños lineales y radioluminidades fueron derivados de los *redshifts* de los huéspedes. Para una submuestra de ~2100 radiofuentes con un *hotspot* en cada uno de sus lóbulos, se estudió su geometría en términos de asimetría y grado de torsión. Se comprobó la (débil) tendencia conocida que el lóbulo (aquí *hotspot*) más brillante se ubica más cerca del huésped que el *hotspot* menos brillante. La mediana del ángulo de torsión entre los dos brazos de las radiofuentes es de 4.8° con una diferencia significativa en la distribución entre las 627 fuentes con huéspedes cuásares y las 1501 galaxias. **Palabras clave** — Rastros en radio, radiogalaxias, hotspots.

Abstract — Based on images from the FIRST survey of the radio sky at 1.4 GHz, the positions of ~5200 hotspots in ~2870 radio galaxies and quasars were compiled, and linear sizes and radio luminosities were derived from the hosts redshifts. For a subsample of ~2100 radio sources with exactly one hotspot in each of the two opposite lobes, their geometry in terms of asymmetry and bending was studied. The known (weak) tendency for the brighter lobe (here hotspot) to lie closer to the host than the fainter one, is confirmed. The median bending angle between the two arms of radio sources is 4.8° with a significant difference in the distribution between the 627 quasar hosts and the 1501 galaxies. **Keywords** — radio surveys, radio galaxies, hotspots.

I. INTRODUCTION

Radio galaxies (RGs, including quasar hosts unless otherwise noted) show an excess of radio continuum emission over normal galaxies, and their radio structure consists of a radio nucleus (if present) at the core of the host galaxy from where two jets in opposite directions carry relativistic particles usually far beyond the outskirts of the optical galaxy to form outer radio lobes of varied shapes. Many of these feature "hotspots", a term originally coined by Gull & Northover (1973) for the most compact emission regions in the lobes of Cygnus A. Hotspots are likely the places where the relativistic particles transported from the galaxy nucleus are reaccelerated, since for most RGs the synchrotron radiation lifetime of these particles is shorter than their travel time from the nucleus to the outer lobes.

While radio hotspots are ubiquitous in edge-brightened (or FR II type, Fanaroff & Riley 1974) radio galaxies, of those ~100 hotspots in the literature studied outside the radio window, only two-thirds were detected in X-rays, about one-third in the infrared (IR) and only ~16% in the optical (see e.g. Hardcastle et al. 2004, Werner et al. 2012). Valdés Ochoa (2019) has shown that the average radio-to-IR spectral slope of hotspots individually IR-undetected can be inferred from stacking many hundreds of mid-IR images drawn from the WISE mission (Cutri et al. 2013) and centered on radio-detected hotspots.

Hotspots have also been used to characterize the symmetry of FR II RGs and to infer the hotspot advance speed, with sometimes contradicting results, partly because of too small

samples available at the time. Here we aim to expand the number of catalogued hotspots. We used standard cosmology with $H_0=70 \text{ km s}^{-1} \text{ Mpc}^{-1}$, $\Omega_m = 0.3$ and $\Omega_\Lambda = 0.7$ to derive linear sizes and luminosities.

II. MATERIALS AND METHODS

For the construction of this new sample of hotspots we used a compilation of extended RGs maintained by one of us (see e.g. Andernach 2018), and which includes for each object the position and brightness of its optical or IR host, the measured or photometric redshift, and the largest angular size (LAS) and largest linear size (LLS) of its radio emission. In a summer research project in 2016 (see Valdés Ochoa 2019 for the final result) radio images from the "Faint Images of the Radio Sky" (FIRST, Helfand et al. 2015) survey at 1.4 GHz and 5.4" angular resolution were extracted and used to construct a list of ~2680 hotspots in ~1530 RGs. Since 2016, many more FR II-type radio galaxies were compiled by H.A. such that in a 2018 summer internship, D.E. Monjardin Ward established a further list of ~1150 hotspots in 605 radio galaxies. This list was revised by us in the present work, discarding ~5% of the originally chosen hotspots and adding another ~5% that had been missed. Since 2018, a further ~750 radio galaxies were compiled that appeared to have hotspots, and their FIRST cutouts were used here to construct a further list of ~1440 hotspots in 737 RGs.

To aid in recognizing the radio source structure we also used the lower-resolution radio surveys NVSS (Condon et al. 1998), and TGSS-ADR1 (Intema et al. 2017), and occasionally consulted images from the ongoing "VLA Sky Survey" at 2-4 GHz with 2.5" angular resolution (VLASS, Lacy et al. 2019) to assess the reality of a hotspot, but taking the data from FIRST only. Images of the same source were displayed with ObitView (<http://www.cv.nrao.edu/~bcotton/Obit.html>) in order to register the exact host positions with its "Gaussfit" option, as well as with ds9 (<http://ds9.si.edu>) and Aladin (Bonnarel et al. 2000), which made it easier to distinguish the hotspots from more diffuse emission.

Here we combine the above-mentioned three samples to obtain a list of over 5200 hotspots in 2869 RGs for a statistical analysis of hotspot parameters and the degree of symmetry of classical double radio sources. These RGs span a wide range of redshifts with median $z=0.53$ with quartiles at 0.35 and 0.73, and 373 RGs lie at redshifts above 1. The median LAS is 1.65', with quartiles at 1.1' and 2.5'. Their LLS ranges from 50 kpc to almost 5 Mpc, with a median of 580 kpc and quartiles at 400 and 820 kpc. Spectroscopic redshifts are available for ~50% of the sample and for most others reliable photometric ones were culled from references like DiPompeo et al. (2015), Bilicki et al. (2016), and others.

The hotspot positions from ObitView were then cross-matched with the FIRST source catalog using the VizieR catalog browser (Ochsenbein et al. 2000) choosing either the closest source within 12", or the farthest one from the host as the hotspot. Less than one percent of the hotspots had no counterpart in the FIRST catalog, either for having a peak brightness of $< 1 \text{ mJy/beam}$ or being located close to the FIRST survey boundary, and were discarded, leaving 5236 hotspots in 2869 RGs. For each FIRST source its integrated flux (from the FIRST catalogue) was combined with the redshift of the host to find the hotspots 1.4-GHz radio luminosity, $\log P_{1.4}$, and their deconvolved major axes were used to derive

linear hotspot sizes, LS_{hs} . Angular and linear lengths and position angles, PA_{arm} , of the vectors from host to hotspot (called the "arm" of a radio galaxy) were computed, as well as the acute angle, PA_{dif} , between the hotspot major radio axis (PA_{hs}) and PA_{arm} .

III. RESULTS AND ANALYSIS

Of the 2869 RGs with any hotspot, we found 21% to have one hotspot, 75% with two, 3.6% with three, and 0.3% with four hotspots. Note that these numbers are biased, as they are based on a selection of RGs which showed at least one hotspot at first sight on a FIRST image. Experience showed (Valdés Ochoa 2019) that about 20–25% of all non-FR I sources do not have any hotspot. We further found that 178 (3.4 %) of our hotspots were labelled with a sidelobe probability $p(S) > 7\%$ in the FIRST catalog. Since 2.9 % of all 946,432 FIRST sources have a $p(S) > 7\%$, we anticipate that ~800 further such sources will turn out to be hotspots rather than artefacts.

The linear size distribution of 5236 hotspots has a median of 34 kpc and is shown in figure 1. The long tail of larger sizes is likely due to hotspots embedded in the diffuse emission of the surrounding lobe. The decimal log of the 1.4-GHz luminosity (in W/Hz) of these hotspots has a median of 25.26 and its distribution is shown in figure 2.

Figure 3 shows the distribution of the misalignment angle between the host-to-hotspot direction and the orientation of the hotspot major radio axis. While the majority of hotspots appear to be aligned with the "arm" in which they reside (51% within 20° vs. 9.6% beyond 70°), a plot of the hotspot linear sizes vs. the misalignment angle shows that the aligned hotspots are on average larger, suggesting that part of this trend is due to hotspots embedded in diffuse lobe emission, and that those hotspots close to perpendicular to the arm axis may be bow shocks at the working surface between jet and intergalactic medium.

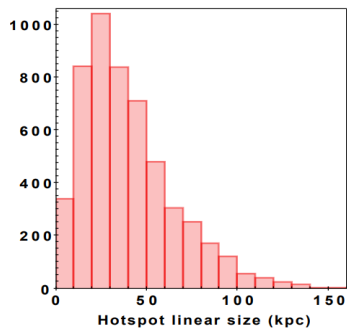


Fig. 1. Hotspot linear size distribution.

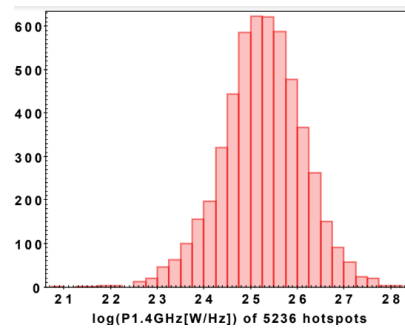


Fig. 2. Distribution of 1.4-GHz luminosity for 5236 hotspots

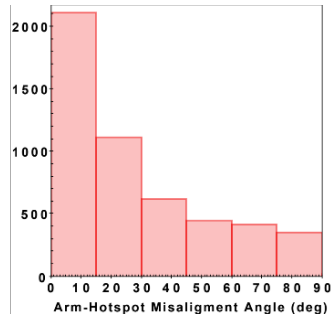


Fig. 3. Distribution of misalignment angle between hotspot and arm orientation.

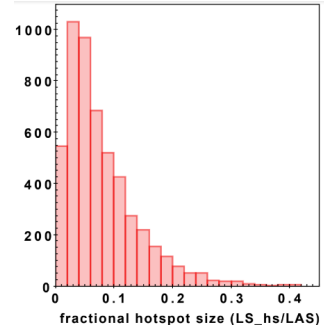


Fig. 4. Distribution of fractional hotspot sizes for 5192 hotspots.

Figure 4 displays the distribution of the "fractional hotspot size", the ratio $FHS = LS_{hs}/LAS$, with a median of 0.062 for those 5192 hotspots with non-zero major-axis values in the FIRST catalogue. For 919 hotspots with hosts at $z < 0.3$ the median FHS decreases to 0.05. This is five times larger than the FHS found by Hardcastle et al. (1998) since their value of ~ 0.01 was based on observations of up to 10 times higher angular resolution than FIRST. Indeed, those 83 sources with $LAS > 3'$ (> 33 FIRST beams) have $FHS_{med} = 0.028$.

For a subsample of 2128 RGs with one hotspot on each side, we assumed these to be the "ends" of the sources. To check this assumption we calculated the ratio, SSL, of the sum of the two hotspot separations from the host divided by the LAS of the RG. The 31 RGs with $SSL < 0.5$ are mostly of the "restarted" (or double-double), X-shaped or precessing type, and very few of these may be wide-angle tailed (WAT) sources with their radio knots misidentified as hotspots. Another 11 RGs with $SSL > 1.2$ show radio emission beyond their hotspots. Excluding these few sources will not alter the following results.

We calculated the "armlength ratio" (ALR) as the distance from the host object to the stronger hotspot divided by the distance to the fainter hotspot, as well as the "flux ratio" (FLR) between the integrated flux density (as listed in the FIRST catalog) of the hotspot more distant from the host to that of the closer one, as well as the acute angle between the two position angles from the host to each of the two hotspots, the "misalignment" or bending angle, BA, of the radio galaxy or quasar.

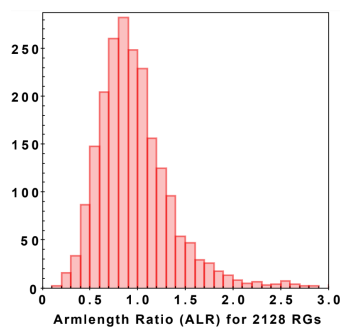


Fig. 5. Distribution of armlength ratio

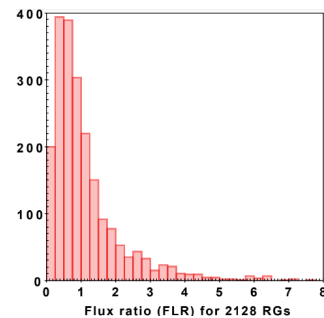


Fig. 6. Distribution of flux ratio

Figures 5 and 6 show the distributions of ALR and FLR, except for a few outliers with $ALR > 3$ and $FLR > 8$. Their medians are 0.91 and 0.815, respectively. Both figures confirm the known trend that the stronger lobe (here hotspot) tends to lie closer to the host.

The 2128 RGs have a median BA of 4.8° , with little difference between the 1501 galaxies (4.6°) and 627 quasars (5.1°), but distributed differently at 99.4% confidence.

IV. CONCLUSIONS AND FUTURE WORK

We composed an unprecedented sample of over 5200 hotspots in 2869 radio galaxies and quasars covering a large range of redshifts, radio luminosities and projected linear radio sizes. Based on source sizes from the FIRST catalog, the median size of hotspots is 34 kpc, compared to 20 kpc for the 65 hotspots in Hardcastle et al. (2004), which was based on observations of much higher angular resolution.

For a sample of 2128 radio sources with one hotspot per side, we confirm the known fact that on average the brighter lobe (here hotspot) is closer to the host than the fainter one. The median projected bending angle between the two arms of radio sources is $\sim 5^\circ$, but their distribution is much broader for the 627 quasars than for the 1501 galaxy hosts.

Longair & Riley (1979) and Banhatti (1980) have proposed to use what they call the "separation quotient", Q , and "fractional separation difference", X , in order to estimate the advance speed of the hotspots. While we do not confirm the finding of Best et al. (1995) that the X distribution of quasars has a minimum near zero, we do find that X values of quasars have a broader distribution than that of galaxies at 100.00% confidence, which is consistent with the expectation that quasar jets make a smaller angle with our line of sight.

Our new hotspot sample will be ideal to be matched with modern optical, IR, and X-ray surveys, in order to either find their SEDs or discard some of them for being superposed on the radio galaxies. For the vast majority of hotspots undetected in these non-radio bands, a stacking analysis could shed light on their average SED. The ongoing VLASS survey will allow to determine the positions of hotspots in many times the current number of radio galaxies, moreover at two times better angular resolution than FIRST, allowing to better separate real hotspots from mere brightness peaks in the diffuse lobes, which certainly constitute a (small) fraction of the hotspots used in the present work.

V. ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Isabel Valdés Ochoa and Douglas Monjardin Ward for assembling $\sim 60\%$ of the hotspot sample used here. A significant number of RGs in our sample was found by volunteers of Radio Galaxy Zoo (<http://rgzauthors.galaxyzoo.org>). We are grateful to the VLASS team at NRAO for a timely delivery of Quick Look images, and to F.J. Peralta for a python script to extract VLASS cutouts. W. Cotton (NRAO) provided a revised script to download NVSS images. H. A. benefited from Univ. Guanajuato grant CIIC 218/2019.

REFERENCES

- H. Andernach, "Large Imaging Radio Surveys: What one can find by just looking at them", presented on "A Celebration of Jasper (Jas) Wall at 75", UBC Vancouver, Canada, Dec. 2018, http://www.astro.ubc.ca/JAS/Andernach_Jas75.pdf
- D. Banhatti, "Expansion speeds in extended extragalactic double radio sources from angular structure", *Astron. Astrophys.*, Vol. 82, 112-114, 1980
- P. N. Best, D. M. Bailer, M. S. Longair, J. M. Riley, "Radio Source Asymmetries and unified schemes", *Mon. Not. Roy. Astron. Soc.* 275, 1171-1184, 1995
- M. Bilicki, J. A. Peacock, T. H. Jarrett, et al., "WISE-Supercosmos photometric redshift catalog: 20 million galaxies over 3π sr", *Astrophys. J. Suppl.*, Vol. 225, 5, 2016
- F. Bonnarel, P. Fernique, P., O. Bienaymé, et al. "The ALADIN interactive sky atlas", *Astron. Astrophys. Suppl.*, 143, 33-40, 2000, <http://aladin.u-strasbg.fr/aladin.gml>
- J. J. Condon, W. D. Cotton, E. W. Greisen, Q. F. Yin, R. A. Perley, G. B. Taylor, J. J. Broderick, "The NRAO VLA Sky Survey", *Astron. J.*, 115, 1693-1716, 1998
- R. Cutri, E. Wright, T. Conrow, et al., "Executive Summary of the AllWISE Data Products: Explanatory Supplement to the AllWISE Data Release Products", 2013, <http://wise2.ipac.caltech.edu/docs/release/allwise/expsup/index.html>
- M. A. DiPompeo, J. Bovy, A. D. Myers, D. Lang, "Quasar probabilities and redshifts from WISE mid-IR through GALEX UV photometry", *Mon. Not. Roy. astron. Soc.*, Vol. 452, 3124-3138, 2015.
- B. L. Fanaroff, and J. M. Riley, "The morphology of extragalactic radio sources of high and low luminosity", *Mon. Not. Roy. astron. Soc.*, Vol. 167, 31P-36P, 1974.
- S. F. Gull, K. J. E. Northover, "Bubble Model of Extragalactic Radio Sources", *Nature*, 244, 80-83, 1973.
- M. J. Hardcastle, P. Alexander, G. G. Pooley, and J. M. Riley, "FR II radio galaxies with $z < 0.3$ - I. Properties of jets, cores and hotspots", *Mon. Not. Roy. astron. Soc.*, Vol. 296, 445-462, 1998.
- M. J. Hardcastle, D. E. Harris, D. M. Worrall, and M. Birkinshaw, "The Origins of X-Ray Emission from the Hot Spots of FR II Radio Sources", *Astrophys. J.*, Vol. 612, 729, 2004.
- D. J. Helfand, R. L. White, R. H. Becker, "The Last of FIRST: The Final Catalog and Source Identifications", *Astrophys. J.*, 801, 26, 2015.
- H. T. Intema, P. Jagannathan, K. P. Mooley, "The GMRT 150 MHz All-sky Radio Survey First Alternative Data Release TGSS ADR1", *Astron. Astroph.*, Vol. 598, A78, 2017.
- M. Lacy, S. A. Baum, C. J. Chandler, et al., "The Jansky Very Large Array Sky Survey (VLASS). Science case, survey design and initial results", submitted July 2019, arXiv:1907.01981.
- M. S. Longair, and J. M. Riley, "Statistical evidence on the dynamical evolution of extended radio sources", *Mon. Not. Roy. Astron. Soc.*, Vol. 188, 625-635, 1979.
- F. Ochsenbein, P. Bauer, and J. Marcout, "The VizieR database of astronomical catalogues", *Astron. Astrophys. Suppl.*, Vol. 143, 23-32, 2000, <http://vizier.u-strasbg.fr>
- I. Valdés Ochoa, "Construcción de la primera gran muestra de hotspots en radiogalaxias: estudio estadístico de sus espectros radio-infrarrojo y de la asimetría de sus radiogalaxias", Tes. Lic., Univ. Veracruzana, Xalapa, August 2019.
- M. W. Werner, D. W. Murphy, J. H. Livingston, et al., "Spitzer Observations of Hotspots in Radio Lobes", *Astrophys. J.*, Vol. 759, 86, 2012.

Subgrupos finitos del grupo especial de rotaciones en tres dimensiones

Alejandra de la O Delgado

Universidad Autónoma de Zacatecas
Unidad Académica de Física
Calzada Solidaridad esq. Paseo La Bufa s/n
C.P. 98060 Zacatecas, Zac., México
exrraordinaria456@gmail.com

Asesor: Ricardo Francisco Vila Freyer

Centro de Investigación en Matemáticas, A.C.,
Jalisco S/N, Col. Valenciana CP: 36023
Guanajuato, Gto, México,
Apartado Postal 402, CP 36000
vila@cimat.mx

Resumen — En este trabajo se aborda como la clasificación de los subgrupos finitos del grupo especial de rotaciones en tres dimensiones tiene una repercusión en poder determinar el grupo de simetrías de los cristales y las moléculas. Para ello se debe entender la definición abstracta de grupo y algunas de sus propiedades. A las clasificaciones resultantes, se les asociará una representación geométrica donde la simetría de cada una, estará definida por las restricciones que se obtienen después de revisar las definiciones de subgrupos, entenderemos la acción de un elemento del grupo en un conjunto, así mismo la importancia de las orbitas y puntos fijos, por último se discutirá si esa simetría de la representación se puede encontrar en los cristales.

Palabras clave — Punto arreglado, orbitas, acción de grupo.

Abstract — This paper addresses how the classification of finite subgroups of the special group of three-dimensional rotations has an impact on being able to determine the group of symmetries of crystals and molecules. We are gonna establish, the abstract definition of group and some of their properties. The classifications will be associated with a geometric representation where the symmetry of each one will be defined by the restrictions obtained after reviewing the definitions of subgroups, we are going to understand the action of an element of the group in a set, as well the importance of the orbits and fixed points, finally we are gonna check if that symmetry of the representation can be found in the crystals.

Keywords — pointwise fixed, orbits, group action.

I. INTRODUCCIÓN

Teoría de grupos influye en casi toda la matemática y en otras disciplinas, ya sean científicas o artísticas.

En las ciencias exactas, las aplicaciones van desde la geometría algebraica, teoría de números y topología algebraica; en física su aplicación está en el estudio de simetrías de las estructuras moleculares; en la última es donde estará el enfoque de este trabajo de investigación.

Para poder entender la clasificación de los subgrupos finitos de $SO(3)$ se necesitan los conceptos básicos de teoría de grupos, por lo cual el principal material de apoyo fue: Group theory and physics, Shlomo Sternberg.

A partir de los conceptos básicos, se estudió la clasificación de los subgrupos finitos de $SO(3)$ y como se determina el grupo de simetría de los cristales y moléculas.

II. MARCO TEÓRICO

El origen de la teoría de grupos está en el intento de los matemáticos por resolver ecuaciones algebraicas de grados arbitrarios por medio de radicales, es decir, dando fórmulas a aplicar para sacar las raíces de la ecuación. Primero los árabes en la edad media y después los algebristas italianos en el siglo XVI sólo llegaron a obtener expresiones radicales para órdenes 2, 3 y 4. [1]

La teoría de grupos tiene pues su origen en el trabajo de E. Galois [2] sobre solubilidad por radicales de la ecuación $a_n x^n + a_{n-1} x^{n-1} + \dots + a_1 x^1 + a_0 = 0$. Sin embargo, algunos de los resultados de la teoría de grupos habían aparecido con anterioridad en trabajos de otros matemáticos, entre los que se encuentra Cauchy [3]. Por lo anterior, es pertinente señalar que el término grupo es acuñado y usado sistemáticamente por Galois en su trabajo: "Memoir on the Conditions for Solvability of Equations by Radicals"[4], página 101. Dado que el trabajo de Galois citado versa sobre las raíces de polinomios, el concepto de grupo usado por Galois se restringe a lo que hoy llamamos el grupo de permutaciones de n elementos. La formulación axiomática de la teoría de grupos como se conoce actualmente, se inicia con el trabajo de H. Weber: "Die allgemeinen Grundlagen der Galois'schen Gleichungstheorie". Math. Ann. 43 (1893), 521-549, página 522.

III. METODOLOGÍA

Definimos el concepto de grupo:

Un grupo es una pareja $(G, *)$, con G siendo un conjunto no vacío, $*$ una función de $G \times G \rightarrow G$ (llamada multiplicación) ó operación binaria y denotada por $*(x,y) = x*y$, la cual satisface:

➤ $x * (y*z) = (x*y) * z$ Asociativa.

➤ Existe $e \in G$ tal que

$e*x = x*e = x$ Neutro.

➤ Dado $p \in G$, existe p^{-1}

$pp^{-1} = p^{-1}p = e$ Inverso.

Para entender la clasificación de los subgrupos finitos de $SO(3)$ tendremos que entender cómo puede actuar el grupo en un elemento de un espacio vectorial o un conjunto no vacío. Se manejarán los grupos con número finito de elementos.

Cuando el elemento $a \in G$ actúa sobre el conjunto M , llevando a $m \in M$ de la forma am , decimos que es la órbita del punto m , debido a la acción de G en M y es denotado como $G^\circ m$.

$$G^\circ m = \{am \mid a \in G\}$$

Cuando el elemento $a \in G$ actúa sobre el conjunto M , tal que, deja $am = m$ invariante, decimos que es el grupo isotrópico de m y es denotado como G_m .

$$G_m = \{am = m \mid a \in G\}$$

Se puede saber el número de puntos fijos en un conjunto, dada la acción de G en dicho conjunto. La identidad deja invariante a cualquier elemento del conjunto, por lo que se va a remover y Y será el subconjunto que no incluye a la identidad, tal que:

$$\#Y = \sum_{a \neq e} \#FP(a) \quad (1)$$

En el lado derecho de la expresión P es subconjunto de M que consiste de los $m \in M$ que son afectados por la izquierda por algún elemento $a \neq e$ que está en G , es decir $FP(a) = \{am=m \mid a \in G\}$, la expresión anterior (1), puede escribirse como:

$$\#Y = \sum_{m \in P} (\#G_m - 1) \quad (2)$$

Restando el 1 en la expresión (2), removemos el elemento identidad.

Podemos descomponer a P en orbitas dada la acción de G :

$$P = P_1 \cup P_2 \cup \dots \cup P_r \quad (3)$$

En cada orbita el valor de $\#G_m$ es constante, y el número de elementos en cada orbita es dado por $\frac{\#G}{\#G_m}$, entonces, la expresión (2) usando el número de elementos de (3) queda:

$$\#Y = \sum_{\text{orbits}} \frac{\#G}{\#G_m} (\#G_m - 1) \quad (4)$$

Es igualando (1) y (4) obtenemos:

$$\sum_{a \neq e} \#FP(a) = \sum_{\text{orbits}} \frac{\#G}{\#G_m} (\#G_m - 1) \quad (5)$$

Sea G un subgrupo finito de $SO(3)$. Cada $a \neq e$ en G , deja una línea de vectores con puntos fijos, y por lo tanto en la esfera unitaria, deja dos puntos fijos, haciendo que la expresión (5) se simplifique a:

$$\#Y = 2 (\#G - 1) \quad (6)$$

dónde:

$$n = \#G$$

$$r = \#(\text{orbitas de } G \text{ en } P)$$

$$n_i = \#G_m, \text{ donde } m\text{-ésima orbita}$$

Entonces, igualando el lado derecho de (5) con (6) nos queda:

$$2(n-1) = \sum_{i=1}^r \frac{n}{n_i} (n_i - 1) \quad (7)$$

Dividiendo a (7) por n :

$$2 - \frac{2}{n} = r - \sum_{i=1}^r \frac{1}{n_i} \quad (8)$$

En la expresión (8) se imponen restricciones, sobre r , n y n_i , que son:

$$n_i \geq 2, \quad r > 1 \text{ y } n_i \leq n$$

Considerando estas restricciones en (8), se tiene:

Para $r=2$

$$\frac{2}{n} = \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}$$

donde $n_i \leq n$.

Debido a esta restricción n debe ser de la forma:

$$n = n_1 = n_2$$

Su representación es el grupo cíclico de orden n , en la notación de Schoenflies es C_n

Ahora el valor es $r=3$

$$1 + \frac{2}{n} = \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} + \frac{1}{n_3}$$

Por las restricciones $n_1 \leq n_2 \leq n_3$ se debe tener $n_1 = 2$; si $n_2 = 3$ entonces

$\frac{1}{n_3} = \frac{1}{6} + \frac{2}{n} = \left[1 + \left(\frac{12}{n}\right)\right]/6$ de tal manera que $n_3 < 6$, las posibles combinaciones son para:

$$(2,2,k) \quad n = 2k, \quad k \geq 2 \quad (i)$$

$$(2,3,3) \quad n = 12 \quad (ii)$$

$$(2,3,4) \quad n = 24 \quad (iii)$$

$$(2,3,5) \quad n = 60 \quad (iv)$$

Cada una de las combinaciones anteriores, representan un grupo.

En el caso $(2,2,k)$ el grupo de isotropía G_q es de orden 2, que consiste de la identidad y una rotación de 180° . El subgrupo C_k rota los polos de cada orbita entre ellos, y actúa transitivamente en cada orbita por lo que $\#C_k = k = \#M_1 = \#M_2$. Todos los puntos de M_1 están en el plano y son rotados en ángulos $\frac{2\pi}{k}$. Y forman los vértices de un k -polígono regular. Cuando k es par hay dos familias de ejes, los que pasan por los vértices y los que bisecan los lados; para k impar, es una familia de ejes, y dos familias de polos.

La notación para el grupo diedral es D_k .

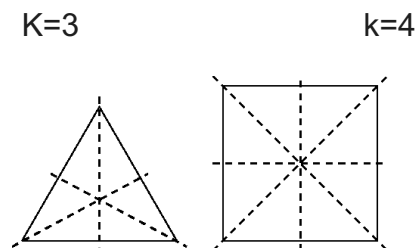


Fig.1. Representación del grupo diedral D_3 **Fig. 2.** Representación del grupo diedral D_4

$(2,3,3)$ $n=12$, M_1 representa las aristas, M_2 las caras, M_3 los vértices, $\#M_1 = 6$ y $\#M_2 = \#M_3 = 4$. Se encuentran 6 polos que corresponden a 3 ejes de 180° de rotación.

El grupo de rotaciones preserva el tetraedro regular, se observa que las líneas que unen los puntos medios de los bordes no adyacentes forman "diad axes". En cambio los puntos de intersección de los ejes con la esfera forman una órbita; las líneas que se conectan de un vértice al punto medio de la cara opuesta, forman "triad axes". Así mismo los vértices forman una órbita. El grupo de rotaciones de un tetraedro regular, es del tipo $(2,3,3)$, la notación Schoenflies para este grupo es T.

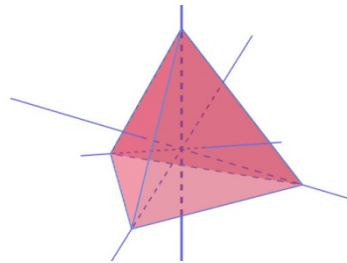


Fig. 3. Representación del grupo T

$(2,3,4)$ $n=24$ donde, $\#M_1 = 12$, $\#M_2 = 8$, $\#M_3 = 6$, el grupo de rotaciones del cubo tiene un conjunto de polos, analizando la órbita M_3 observamos que los segmentos que unen dos puntos adyacentes, tienen la misma medida, y forma los vértices de un octaedro regular. Debido a que el grupo del octaedro regular y del cubo, es el mismo. La notación Schoenflies para este grupo es O.

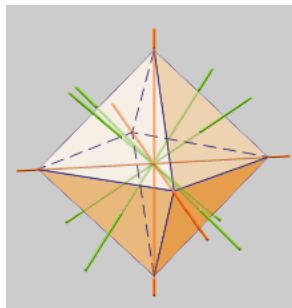


Fig. 4. Representación del grupo O.

$(2,3,5)$ $n=60$ donde, $\#M_1 = 30$, $\#M_2 = 20$, $\#M_3 = 12$. Los polos de M_3 están en los vértices de un icosaedro regular, el grupo de rotación para el icosaedro tiene notación Schoenflies, y es I.

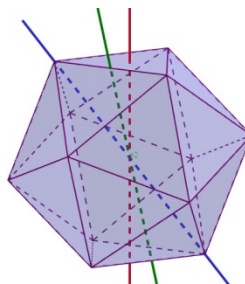


Fig. 5. Representación del grupo I.

IV. RESULTADOS

Por las restricciones notamos que no hay grupo de rotación para orden 5 o mayor que 6 en el grupo de simetría de los cristales que hasta el momento se conocen, en la primera clasificación donde son cíclicos, los valores están restringidos a $k=1,2,3,4,6$, y para (n_1, n_2, n_3) sus valores se restringieron a $n=1,2,3,4,6$ y el último grupo I no ocurre en el grupo de simetrías, de ningún cristal.

Las simetrías rotacionales de los cristales solo se dan para los ángulos de la forma:

$$\theta = \frac{2\pi}{k} \text{ para } k=1,2,3,4 \text{ ó } 5$$

Lo que nos lleva a la teoría atómica; es una teoría científica sobre la naturaleza de la materia que sostiene que está compuesta de unidades discretas llamadas átomos.

V. CONCLUSIONES

La existencia de subunidades discretas implica la ley de los índices racionales por Hauy, así mismo implican que no existan otros ángulos de rotación, la existencia de dichas subunidades discretas es una deducción muy importante para la cristalografía.

Debido a la restricción del ángulo de rotación, se obtuvieron las clasificaciones, que en notación Schoenflies, son:

$$C_1, C_2, C_3, C_4, C_6, D_2, D_3, D_4, D_6, T, O.$$

VI. RECONOCIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento al comité organizador del 21° Verano de la Ciencia de la Región Centro, por abrir la convocatoria que me permitió hacer la estancia de verano, así mismo a la Universidad Autónoma de Zacatecas por el apoyo económico, al CIMAT por la prestación de instalaciones y materiales que me brindaron una mejor experiencia, por ultimo al doctor Ricardo F. Vila Freyer por la creación de un proyecto que sin duda me brindo conocimiento y ayudo a mi formación académica.

REFERENCIAS

- [1] Jiménez Ruiz Carlos, física fundamental, <http://www.fisicafundamental.net/simetrias/grupos.html>
- [2] R. Bourgne and J.-P Azra. *Ecrits et Mémoires Mathématiques d'Évariste Galois*. Gauthier-Villars, Paris, France, 1962
- [3] H. Wussing. *The Genesis of the Abstract Group Concept*. The MIT Press Cambridge, Massachusetts, London England, first edition, 1984.

- [4] H. M. Edwards. Galois Theory. Springer-Verlag, New York USA, corrected third printing edition, 1998.
- [5] S. Stenberg. Group Theory and Physics, Cambridge University Press, 1994.

Taxonomía y biodiversidad de Aranea en Valparaíso, Zacatecas, México

Lidia Ávila Robles

Universidad Autónoma de Zacatecas
Unidad Académica de Ciencias Biológicas
Av. Preparatoria s/n, Col. Agronómica,
C.P. 98066. Zacatecas, Zacatecas.
litia.avila@mail.com

Asesora: Elizabeth A. Martínez Salazar

Universidad Autónoma de Zacatecas
Unidad Académica de Ciencias Biológicas
Lab. Colecc. Biológicas y Sistemática Molecular
Av. Preparatoria s/n, Col. Agronómica
C.P. 98066. Zacatecas, Zacatecas.
eamsuaz@gmail.com

Resumen --- Las arañas han explotado con éxito casi todos los entornos terrestres, hábitats de agua dulce e intermareal, y muestran una variedad de estilos de vida. En el estado de Zacatecas se han encontrado 7 familias correspondientes a 4 géneros y 3 especies, por lo que su conocimiento es escaso. El objetivo del trabajo fue determinar la diversidad taxonómica de Araneae en Valparaíso, Valparaíso, Zacatecas, como parte de un proyecto de biodiversidad de invertebrados del estado de Zacatecas, que se conduce en el Lab. de Colecciones Biológicas y Sistemática Molecular. El material biológico proporcionado por los habitantes de la localidad, se identificó morfológicamente un total de 12 géneros, el 49% son adultos y el 51% juveniles. El género *Physocyclus* fue el más abundante en comparación con el género *Trachelas*. Se sugiere realizar más estudios del grupo en la localidad en Zacatecas.

Palabras clave --- Araneae, Taxonomía, Biodiversidad, Zacatecas.

Abstract --- Spiders have successfully exploited almost all terrestrial environments, freshwater and intertidal habitats, and show a variety of lifestyles. In the state of Zacatecas, 7 families corresponding to 4 genera and 3 species have been found, so their knowledge is scarce. The objective of the work was to determine the taxonomic diversity of Araneae in Valparaíso, Valparaíso, Zacatecas, as part of the invertebrate biodiversity project of the State of Zacatecas, which is conducted in the Laboratory of Biological and Molecular Systematic Collections. The biological material provided by the inhabitants of the locality, a total of 12 genera was identified morphologically, 49% are adults and 51% are juveniles. The genus *Physocyclus* was the most abundant compared to the genus *Trachelas*. It is suggested to conduct further studies of the group in the locality in Zacatecas.

Keywords --- Araneae, Taxonomy, Biodiversity, Zacatecas

I. INTRODUCCIÓN

El orden Araneae es el más amplio de arácnidos, salvo quizá para el grupo que comprende o incluye ácaros y garrapatas, las arañas constituyen el orden más diverso de arácnidos [1]. Se reconoce cerca de 48,334 especies de arañas mundialmente, las cuales se agrupan dentro de 117 familias y 4,130 géneros [2]. Este grupo supera a todos los demás en número y variedad de especies, en la complejidad de los patrones de comportamiento y en el rango de hábitats ocupados [3]. Han explotado con éxito casi todos los entornos terrestres, y también muchos hábitats de agua dulce e intermareal, y muestran una sorprendente variedad de estilos de vida [4].

El cuerpo de una araña se divide en dos regiones principales (figura 1): el prosoma y el opistosoma, conectados por un pedicelo estrecho. En el prosoma se encuentran los cuatro pares de patas, un par de quelíceros, los pedipalpos, los ojos, y las partes bucales. La placa

dorsal del prosoma es llamado caparazón [5], y la placa ventral es llamada esternón. En los machos adultos, algunos segmentos del palpo se modifican en un órgano copulador secundario [6]. Cada pata tiene siete segmentos: una coxa, un trocánter, un fémur, una patela, una tibia, metatarso y un tarso con dos o tres garras. La boca está formada por cuatro partes: los maxilares, el rostrum, y el labio. La mayoría de las arañas tienen ocho ojos simples, mientras que algunas tienen seis, cuatro, dos o ninguno [6]. En el opistosoma se encuentran las hileras, los pulmones en libro, el espiráculo traqueal y el pliegue epigástrico.

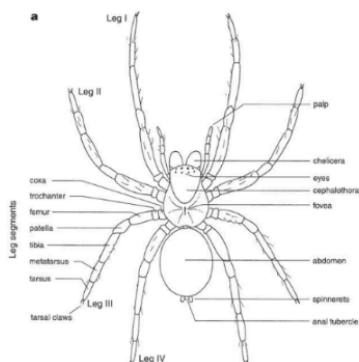


Figura 1. Morfología externa

(Tomada y editada de Jocqué y Dippenaar-Schoeman, 2005).

En México se han identificado 62 familias, 413 géneros y 2,506 especies de arañas [7]. En Zacatecas se han reportado 7 familias correspondientes con 4 géneros y 3 especies [8].

Como parte de un proyecto de biodiversidad de invertebrados del estado de Zacatecas, que se conduce en el Lab. de Colecciones Biológicas y Sistemática Molecular, se deriva este trabajo, que tiene como propósito determinar la diversidad taxonómica de Araneae sinantrópica de la localidad de Valparaíso, Valparaíso, Zacatecas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

El material biológico fue proporcionado por los habitantes de la localidad de Valparaíso, municipio de Valparaíso, Zacatecas (Figura 2). Los especímenes se almacenaron en frascos con OH 80%, con su correspondiente etiqueta y estos se donaron al Laboratorio de Colecciones Biológicas y Sistemática Molecular de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

El material biológico se identificó con base en la comparación de los caracteres morfológicos (estructuras del cuerpo y estructuras reproductivas) con claves taxonómicas y literatura especializada [2-8]. La morfología de los individuos se observó en un microscopio estereoscópico marca LABOMED; y se tomaron fotografías de la parte ventral y dorsal del cuerpo con una cámara fotográfica digital Nikon coolpix 1830. Se presenta un listado biótico de los organismos identificados. Se calculó la abundancia proporcional para cada género, aplicando la fórmula (1).

$$P_i = \frac{n_i}{N} \quad (1)$$

donde:

n_i = número de individuos de la especie i

N = número total de individuos para todas las especies de la comunidad



Figura 2. Área de estudio. Zona urbana del municipio de Valparaíso, Zacatecas (Tomada y editada de INEGI, 2010; Google Earth, 2019).

III. RESULTADOS

Se identificaron taxonómicamente 37 organismos (14 ♀, 4 ♂, y 19 juveniles) hasta nivel genérico; el 51% fueron juveniles, el 38 % fueron hembras adultas y 11% fueron machos adultos (ver listado biótico).

Algunas de las arañas juveniles no se logró identificar taxonómicamente, debido a que no presentan las características diagnosticas desarrolladas (como el epiginio). Las familias con más representatividad fueron Lycosidae y Pholcidae, mientras que las familias Thomisidae y Corinnidae fue menor (Figura 3).

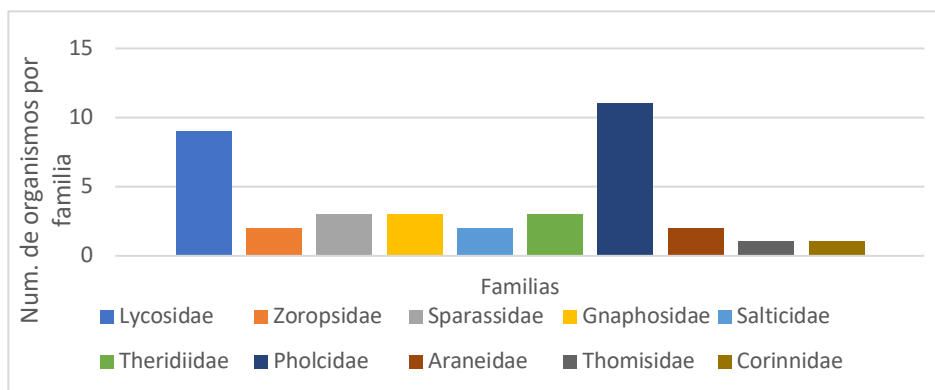


Figura 3. Distribución del material biológico identificado por familia.

El género con una mayor abundancia proporcional fue *Physocyclus*, seguido de *Olios*, en contraste con *Trachelas*, *Schizocosa*, *Gladicosa*, *Latrodectus*, *Synema* y *Zorocrates* que fueron de menor abundancia proporcional fueron (Tabla 1).

Tabla 1. Abundancia proporcional de Araneae, Valparaíso, Valparaíso, Zacatecas.

Género	Pi
<i>Neoscona</i>	0.054
<i>Trachelas</i>	0.027
<i>Gnaphosa</i>	0.054
<i>Schizocosa</i>	0.027
<i>Gladicosa</i>	0.027
<i>Physocyclus</i>	0.243
<i>Mexigonus</i>	0.054
<i>Olios</i>	0.081
<i>Steatoda</i>	0.054
<i>Latrodectus</i>	0.027
<i>Synema</i>	0.027
<i>Zorocrates</i>	0.027

A. Listado biótico

A continuación se presenta la lista de familias y géneros identificados en este estudio. Se identificaron 10 familias y 12 géneros diferentes. Seguimiento de la identificación taxonómica a nivel genérico se muestra el número de organismos. Los organismos con estadio juvenil que no pudieron ser identificados, de presentan seguido del nivel jerárquico de familia. ♂ (Macho), ♀ (Hembra) y J (Juvenil).

Infraorden Araneomorphae

Araneidae Clerck, 1775

Neoscona Simon, 1864 (2 ♀)

Corinnidae Karsch, 1880

Trachelas L. Koch 1866 (1 ♀)

Gnaphosidae Pocock, 1898 (1 J)

Gnaphosa Latreille, 1804 (2 ♀)

Lycosidae Sundevall, 1833 (7 J)

Gladicosa Brady, 1987 (1 ♀)

Schizocosa Chamberlin, 1904 (1 ♂)

Pholcidae C.L. Koch, 1850 (2 J)

Physocyclus Simon, 1893 (4 ♀; 2 ♂; 3 J)

Salticidae Blackwall, 1841

Mexigonus Edwards, 2003 (2 ♀)

Sparassidae Bertkau, 1872

Olios Walckenaer, 1837 (3 J)

Theridiidae Sundevall, 1833

Latrodectus Walckenaer, 1805 (1 ♀)

Steatoda Sundevall, 1833 (1 ♀; 1 J)

Thomisidae Sundevall, 1833

Synema Simon, 1864 (1 J)

Zoropsidae Bertkau, 1882 (1 J)

Zorocrates Simon, 1888 (1 ♂)



Figura 4. Diversidad taxonómica de Araneae en Valparaíso, Zac; 3-4. Género *Physocyclus*. 3) vista ventral. 4) vista dorsal; fig. 5-6. Familia Lycosidae. 5) vista ventral. 6) vista dorsal; fig. 7-8. Género *Olios*. 7) vista ventral. 8) vista dorsal; fig. 9-10. Género *Neoscona*. 9) vista ventral. 10) vista dorsal.

IV. DISCUSIÓN

De las familias Gnaphosidae, Theridiidae, Araneidae, Lycosidae y Salticidae se han reportado previamente en el estado de Zacatecas, en contraste con Zoropsidae, Sparassidae, Pholcidae, Thomisidae y Corinnidae, esta últimas constituyen nuevos registros. La diferencia entre la cantidad de organismos adultos y juveniles puede deberse a la época del año (octubre-enero) y el lugar donde se colectaron (dentro de la vivienda o en el jardín). La diferencia entre la cantidad de hembras y machos puede deberse al comportamiento, ya que algunas hembras se alimentan del macho después de reproducirse, lo que su presencia podría ser menos frecuente, esto debe corroborarse a través de un monitoreo biológico.

V. CONCLUSIÓN

El estudiar el grupo Araneae tiene gran importancia en el sector salud, aun cuando un número reducido de especies representan peligro para los humanos, el conocimiento de su distribución y su presencia en zonas urbanas es escasamente estudiado, a pesar de que pueden causar daños en la salud humana. Así mismo, arañas son agentes biológicos de control de plagas en las cosechas, por lo que su presencia es óptima como una alternativa natural al uso de los insecticidas químicos.

Debido a la escasa información de este grupo de arácnidos en Zacatecas, es muy importante conocer y cuantificar su diversidad en el estado para contribuir al conocimiento nacional de este orden de invertebrado terrestre asociado a zonas urbanas.

VI. AGRADECIMIENTOS

Se expresa un agradecimiento a la Universidad Autónoma de Zacatecas, al laboratorio de Colecciones Biológicas y Sistemática Molecular, así como al Consejo Zacatecano de Ciencia, Tecnología e Innovación por las facilidades y el apoyo otorgado A LAR, para la realización de la estancia como parte del 21º Verano de la Ciencia de la Región Centro (2019). Este trabajo forma parte del proyecto UAZ- UAZ-2016-37096, responsable EAMS.

REFERENCIAS

- [1] Barnes R. D. 1969. Quelicerados: orden Araneae. *In* Zoología de Invertebrados. Editorial Interamericana, México. p. 426-438.
- [2] World Spider Catalog (2019). World Spider Catalog. Version 20.5. Natural History Museum Bern, online at <http://wsc.nmbe.ch>, [última consulta 04 jul 2019].
- [3] Robinson W.H. 2005. Urban Insects and Arachnids, a Handbook of Urban Entomology. Cambridge University Press. USA. 405-420 p.
- [4] Brusca R. C. y J. G. Brusca. 2003. Invertebrates. 2ª ed. Sinauer Associates, Massachussets, 936 p.
- [5] Foelix R. F. 2011. Biology of Spiders. Oxford University press, USA. 432 p.
- [6] Jocqué R. y A. S. Dippenaar-Schoeman, 2007. Spider families of the world. Royal Museum for Central Africa, Leuvensesteenweg. 336 p.
- [7] Corcuera P. y M. L. Jiménez. 2008. Las arañas de México. *Ciencia*, enero-marzo: 58-63.
- [8] Portal de datos abiertos UNAM. 2019. Universidad Autónoma de México, México; <http://datosabiertos.unam.mx/> [última consulta 25 jun 2019]
- [8] Ubick D., P. Paquin, P.E. Cushing y V. Roth. 2005. Spiders of North America: an identification manual. American Arachnological Society. 377 p.
- [9] INEGI. 2010. Marco Geoestadístico Municipal; www.cuentame.inegi.org.mx [última consulta 17 jun 2019].

Taxonomía y biodiversidad odonata en Genaro Codina, Zacatecas

Dai Yael Esparza Rosales

Universidad Autónoma de Zacatecas
Unidad Académica de Ciencias Biológicas.
Av. Preparatoria, Col. Hidráulica, 98068
Zacatecas, Zac.
dai_110@hotmail.es

Asesora: Dra. Elizabeth Aurelia Martínez Salazar

Universidad Autónoma de Zacatecas
Unidad Académica de Ciencia Biológicas
Lab. de Colecciones Biológicas y Sistemática Molecular,
Av. Preparatoria, Col. Hidráulica, 98068
Zacatecas, Zac.
eamsuaz@gmail.com

Resumen — Hay pocos trabajos sobre la diversidad taxonómica de Odonata (libélulas o caballitos del diablo) en el estado de Zacatecas. Esto como parte de un proyecto de biodiversidad de invertebrados del estado de Zacatecas del Lab. de Colecciones Biológicas y Sistemática Molecular, se deriva este trabajo cuyo objetivo fue explorar y determinar la diversidad taxonómica de Odonata en la localidad de Corralillo, Genaro Codina, Zacatecas. Se identificó un grupo de 16 individuos que corresponden con 6 géneros. El género *Enallagma* es el más prevalente y abundante. Se sugiere realizar un monitoreo de la diversidad de Odonatos en esta localidad para incrementar el conocimiento de su biodiversidad regional y Nacional.

Palabras clave — Libélulas, caballitos del diablo, Diversidad alfa, Insecta.

Abstract — There are few works about the taxonomic diversity of Odonata (dragonflies or damselflies) in the state of Zacatecas. This as part of a project of biodiversity of invertebrates of the state of Zacatecas of Laboratorio de Colecciones Biológicas y Sistemática Molecular, this work is derived, whose objective was to explore and determine the taxonomic diversity of Odonata in the community of Corralillo, Genaro Codina, Zacatecas. A group of 16 individuals corresponding to 6 genera was identified. The genus *Enallagma* is the most prevalent and abundant. It is suggested to monitor the diversity of Odonatos in this locality to increase knowledge of their regional and National biodiversity.

Keywords — Dragonflies, Damselflies, Alfa diversity, Insecta.

I. INTRODUCCIÓN

El orden Odonata se divide en dos subórdenes, el primer llamado zygoptera, mejor conocido como caballitos del diablo y anisoptera, conocidos como libélulas. Estos pueden ser diferenciados fácilmente ya que el tamaño es mucho menor en los primeros que en los demás; de la misma manera los zygopteros poseen cuatro alas con tamaños similares y los anisopteros tienen el par de alas posteriores más anchas que las delanteras, cuando se encuentran en reposo las alas se juntan y se posicionan sobre el abdomen o se extienden a los costados, respectivamente; y por último los ojos de los caballitos del diablo están separados transversalmente pero en las libélulas están en contacto por lo menos en un punto [1, 2]. Las familias que presentan una mayor dispersión mundial se encuentran cada una en un suborden, la familia Coenagrionidae y Libellulidae perteneciente a Zygoptera y Anisoptera respectivamente (Figura 1 y 2).



Figura 1. Miembro del género *Argia* (Coenagrionidae).



Figura 2. Miembro del género *Libellula* (Libellulidae).

Para México existen 355 especies registradas del orden Odonata, equivalente al 6.1% de la diversidad de a nivel mundial, además se estima que 49 de estas especies son endémicas para el territorio nacional y cabe recalcar que no hay ninguna especie nombrada en la Nom-059-Semarnat-2010 [3]

El primer registro de una especie para el estado de Zacatecas fue *Rhionaeschna dugesi* el cual se realizó por Paulson y González-Soriano (1994). Escoto-Moreno (2015) consideró a Zacatecas como terra incognita odonatologica debido al único registro que se tenía para el estado, en su trabajo reportó 28 especies e incluyó el primer de *Rhionaeschna dugesi* (Tabla 1) [4].

Tabla 1. Diversidad de Odonata registrada para el estado de Zacatecas.

Suborden	Familia	Género	Cantidad
<i>Zygoptera</i>	<i>Lestidae</i>	<i>Archilestes</i>	1
	<i>Calopterygidae</i>	<i>Hetaerina</i>	1
	<i>Coenagrionidae</i>	<i>Apanisagrion</i>	1
		<i>Argia</i>	10
		<i>Enallagma</i>	1
		<i>Hesperagrion</i>	1
		<i>Ischnura</i>	2
		<i>Telebasis</i>	1
<i>Anisoptera</i>	<i>Aeshnidae</i>	<i>Rhionaeschna</i>	1
	<i>Gomphidae</i>	<i>Erpetogomphus</i>	1
	<i>Libellulidae</i>	<i>Dythemis</i>	1
		<i>Libellula</i>	3
		<i>Orthemis</i>	1
		<i>Pantala</i>	1
		<i>Pseudoleon</i>	1
<i>Sympetrum</i>	2		

Como parte de un estudio de biodiversidad de invertebrados que se conduce en el Laboratorio de Colecciones Biológicas y Sistemática Molecular de la UAZ se deriva este trabajo, que tiene como finalidad explorar la diversidad taxonómica de Odonata.

II. MATERIAL Y MÉTODO

Se procesó un total de 16 individuos (libélulas o caballitos) procedente de la localidad de Corralillo, municipio Genaro Codina al sudeste del estado (Figura 2), y recuperados en el mes de Septiembre del 2018. Este municipio es conocido por un gran cuerpo de agua que atraviesa la ciudad y que por ende tiene consigo una gran cantidad de especies. Personal de la comunidad proporcionó el material biológico para su estudio. Los ejemplares fueron colocados en frascos con alcohol al 70% y se proporcionó al Lab. de Colecciones Biológicas y Sistemática Molecular en la Universidad Autónoma de Zacatecas para su estudio.

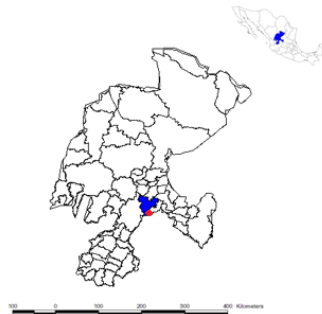


Figura 3. Ubicación del municipio de Genaro Codina (azul) y la comunidad de Corralillo (rojo), Zacatecas.

A. Identificación taxonómica

La identificación se realizó comparando las características morfológicas externas que son diagnósticas y bajo un microscopio estereoscópico Luxeo 4Z, y su comparación morfológica con claves dicotómicas [2,3]. Se tomaron fotografías de cuerpo completo con ayuda de una cámara modelo Coolpixl830 y marca Nikon de los taxa.

B. Abundancia proporcional

Se obtuvo la abundancia proporcional (π_i) a nivel genérico, baso en la formula $\pi_i = n_i/N$, en donde n_i es el número de individuos por género y N es el total de individuos en la muestra analizada. Así mismo, se contabiliza el estadio de desarrollo del grupo de individuos analizados.

III. RESULTADOS

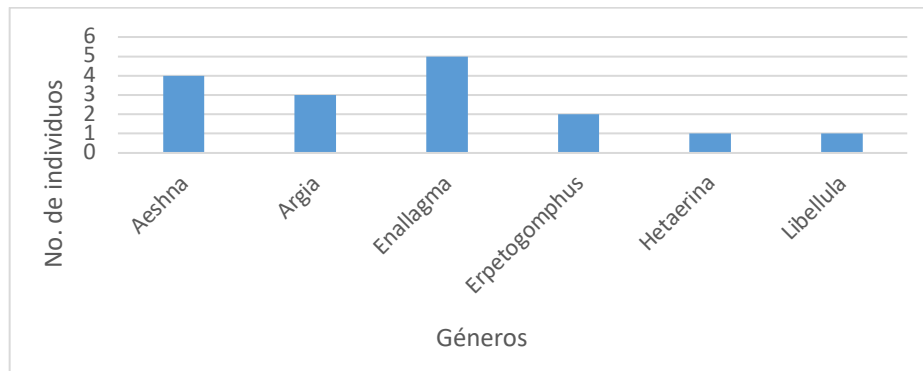
Se identificó taxonómicamente los 16 individuos que corresponden con dos subórdenes (Anisoptera y Zygoptera), con 3 (Aeshnidae, Gomphidae y Libellulidae) y dos familias representativas (Calopterygidae y Coenagrionidae) y 6 géneros.

El 68.8% corresponde con machos y 31.2% en hembras, de igual manera el 12.5% corresponde a organismos juveniles y el 87.5% a adultos. El género *Enallagma* es el taxón más representativo y abundante (Tabla 2 y 3).

Tabla 2. Conteo de hembras, machos e individuos pertenecientes a los subórdenes y familias de Odonata.

Suborden	Familia	Hembras	Machos	No. de individuos
Anisoptera	Aeshnidae	3	4	7
	Gomphidae			4
	Libellulidae			2
				1
Zygoptera	Calopterygidae	2	7	9
	Coenagrionidae			1
				8

Tabla 3. Determinación taxonómica a nivel genérico.



Aunque los géneros *Enallagma* y *Argia* pertenecen a la misma familia estos presentan diferencias morfológicas significativas. En particular el género *Argia* puede ser fácilmente reconocido observando el último segmento abdominal ya que por encima de los cercus se encuentran dos protuberancias como almohadillas, mientras que el género *Enallagma* los cercus presentan una separación dorsal y ventral, además los machos presentan una diferenciación notable en el extremo de sus genitales en donde las especies de *Argia* tienen un largo flagelo al contrario de *Enallagma* (Figura 4).



Figura 4. Miembro del género *Enallagma* (Coenagrionidae).

En relación a la abundancia proporcional se determinó que el género *Enallagma* es el más abundante en contraste con los géneros *Hetaerina* y *Libellula*, que tienen una menor abundancia proporcional (Tabla 3) (Figura 5).

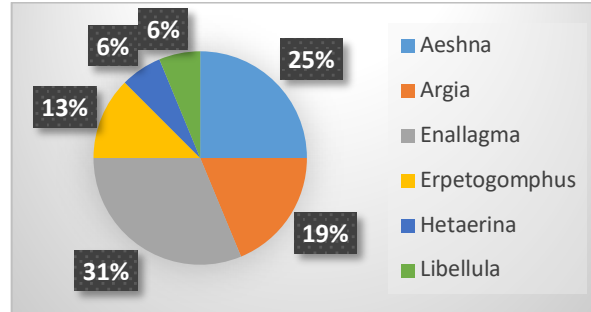


Figura 5. Porcentaje de la abundancia proporcional de los géneros de Odonata en Corralillo, Genaro Codina, Zacatecas.

Tabla 3. Abundancia proporcional de los géneros encontrados.

Familia	Genero	ni	pi
Libellulidae	<i>Aeshna</i>	4	0.25
Coenagrionidae	<i>Argia</i>	3	0.1875
Coenagrionidae	<i>Enallagma</i>	5	0.3125
Gomphidae	<i>Erpetogomphus</i>	2	0.125
Calopterygidae	<i>Hetaerina</i>	1	0.0625
Libellulidae	<i>Libellula</i>	1	0.0625

IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Este estudio tomo en cuenta el registro de odonatos para el estado con un total de 29 especies distribuidas en 16 géneros diferentes; actualizando este registro con los datos del estudio solo se agrega el género *Aeshna*, aunque el número de especies también pudo aumentar pero las identificaciones se realizaron hasta el nivel de género. La mayoría de la fauna de odonatos encontrados en el estado de Zacatecas pertenece a una amplia distribución en el país.

En cuestión de especies los individuos del genero *Argia* siguen teniendo una mayor representatividad considerando ambos estudios hechos en el estado, ya que en este estudio la mayor prevalencia fue del género de *Enallagma*.

V. CONCLUSIONES

En este estudio la diversidad que se encontró es bastante similar a la que está registrada por Escoto-Moreno (2015), esto puede ser debido a la proximidad geográfica de las localidades. Se incrementó el registro de un género para el estado. No se descarta la posibilidad que al realizar una mayor exploración, se incrementara el conocimiento de la riqueza biótica y confirmación de la identificación taxonómica a nivel específico. Se sugiere

realizar más estudios sobre el monitoreo de la diversidad de Odonatos en esta localidad para incrementar el conocimiento regional y Nacional.

VI. AGRADECIMIENTOS

Se expresa un agradecimiento a la Universidad Autónoma de Zacatecas, al laboratorio de Colecciones Biológicas y Sistemática Molecular, así como al Consejo Zacatecano de Ciencia, Tecnología e Innovación por las facilidades y el apoyo otorgado a DYER, para la realización de la estancia como parte del 21° Verano de la Ciencia de la Región Centro (2019). Este trabajo forma parte del proyecto UAZ- UAZ-2016-37096, responsable EAMS.

REFERENCIAS

- [1] R. Garrison, N. Ellenrieder., y J. Louton. *Damselfly Genera of the New World*. Johns Hopkins. EE. UU. 2010
- [2] R. Garrison, N. Ellenrieder., y J. Louton. *Dragonfly Genera of the New World*. Johns Hopkins. EE. UU. 2006.
- [3] E. Gonzales-Soriano, R. Novelo-Gutiérrez. *Biodiversidad de Odonata en México*. Revista Mexicana de Biodiversidad. México. 2014.
- [4] J. A. Escoto-Moreno R, Novelo-Gutiérrez., J. Sigala-Rodríguez., J. Escoto-Rocha., D. E. Carrillo-Lara., y D. Reynoso-Velasco. First records of Odonata from Zacatecas state, Mexico. *Odonatologica*. México.
- [5] V. J. Kalkman, V. Clausnitzer., K. B. Dijkstra., A. Orr., D. Paulson., y J. Tol. *Global Diversity of dragonflies (Odonata) in freshwater*. Freshwater animal diversity assessment. Leiden, Netherlands. 3 pp. 2007.

Tunelaje cuántico anómalo en materiales 2D

Amanda Contreras Hernández

Universidad Autónoma de Zacatecas
Unidad Académica de Física
Calzada Solidaridad e/c Paseo de la Bufa s/n
C.P.98060, Zacatecas, Zac.
amandaratm@gmail.com

Asesor: Isaac Rodríguez Vargas

Unidad Académica de Física, U.A.Z.
Calzada Solidaridad e/c Paseo de la Bufa S/N,
98060, Zacatecas, Zac.
isaac@fisica.uaz.edu.mx

Resumen — El tunelamiento cuántico ha traído consigo la oportunidad de analizar con mayor precisión materiales de tipo dos-dimensional, pues a pesar de ser un fenómeno conocido desde hace tiempo, con la llegada de materiales como el grafeno -materiales 2D- nos brindaron la oportunidad de mostrar experimentalmente las propiedades cuánticas involucradas, además de mostrar fenómenos que en ningún otro material podemos encontrar, tales como los tipos de tunelaje aquí analizados: cuántico convencional, Klein y antitunelaje Klein. Para este propósito se procura hacer comparaciones entre diferentes tipos de portadores de carga; electrones de Schrödinger, electrones de Dirac masivos y no masivos.

Palabras clave—tunelaje cuántico, tunelaje Klein, antitunelaje Klein.

Abstract — Quantum tunneling has brought with it the opportunity to analyze more precisely two-dimensional type materials, despite of being a phenomenon known for a long time, with the arrival of materials like graphene -2D materials- they gave us the opportunity to experimentally show the quantum properties involved. In addition, to show phenomena that we cannot find in other materials, such as the types of tunneling analyzed here: conventional tunneling, Klein and anti-Klein tunneling. Under this context, we try to make comparisons among different charge carrier types; Schrödinger electrons, massless and massive Dirac electrons.

Keywords — Conventional tunneling, Klein tunneling, anti-Klein tunneling.

I. INTRODUCCIÓN

El tunelamiento cuántico es ejemplo de un proceso no clásico que se manifiesta cuando partículas se mueven a través de barreras que serían imposibles de traspasar. Esta barrera podría ser un aislante o el vacío, para nuestro caso en particular, una región de alta energía potencial. En el mundo cuántico, las partículas pueden comportarse a menudo como ondas, y al encontrar una barrera, una onda cuántica no terminará abruptamente sino su amplitud disminuirá exponencialmente. Esta caída en la amplitud corresponde a una disminución en la probabilidad de encontrar una partícula dentro de la barrera. Si la barrera no es muy gruesa, existiría una probabilidad finita de que algunas de las partículas “tunelen” a través de ella [1], [3].

La posibilidad del tunelaje fue notado por F. Hund en 1927, mientras calculaba la energía del estado fundamental en un potencial de doble barrera. Las transiciones de “inversión” entre dos estados geométricos están prohibidas por la mecánica clásica, pero son posibles gracias al tunelaje cuántico.

L. Esaki y R. Tsu fueron los primeros en encontrar una manifestación experimental del tunelaje (1957) [2]. Usaron un potencial periódico unidimensional, esto con la llegada de los potenciales y superredes artificiales. Se esperaba una serie de bandas estrechas permitidas y prohibidas debido a la subdivisión de la zona de Brillouin. Mas en su trabajo encontraron que debido a ciertas cualidades cuánticas se presentaba una conductancia diferencial negativa o equivalentemente resistencia diferencial negativa.

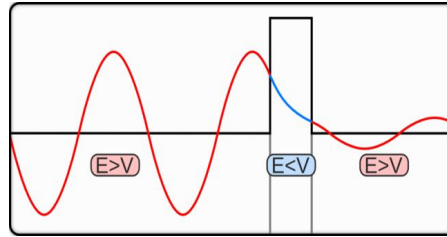


Figura 1. Onda atravesando una barrera.

Con la llegada de los materiales bidimensionales se abrió una gran oportunidad de aplicaciones. En este trabajo se hace un análisis en el grafeno, observando sus anomalías en el tunelaje (Novoselov 2006), cuando cambiamos un poco sus propiedades. Hablamos de la paradoja de Klein, de cómo lo mostramos con relativa simpleza en modelo de mono capa y bi capa de grafeno, poniendo énfasis en el uso de expresiones analíticas para su posterior análisis. Se encuentra que de acuerdo al arreglo que tengamos de grafeno -mono o bi capa- tendremos tunelamientos diferentes debido al comportamiento quiral, dando lugar al tunelamiento Klein (monocapa) o anti-tunelamiento Klein (bicapa)[5],[6].

Es de vital importancia analizar estos materiales y los fenómenos que en ellos ocurren dadas sus aplicaciones. Algunas de las más directas son el diodo Esaki (1970), y los láseres cuánticos de cascada (1994) [4]. La primera aprovecha el tunelamiento de tal manera que da lugar a una región de resistencia negativa, como se muestra en la parte “B” de la figura 2 [8],[9],[11]. En esta zona, un aumento de voltaje directo dará como resultado una disminución en la corriente directa, y viceversa. Es decir, el dispositivo exhibe Resistencia negativa en esta región. En cuanto al láser, los electrones fluyen por una “escalera” de barreras de potencial emitiendo secuencialmente fotones en los escalones. Los pasos consisten en pozos cuánticos acoplados en los que la inversión de la población entre estados excitados de la banda de conducción discreta se logra mediante el control del tunelaje [7], [10].

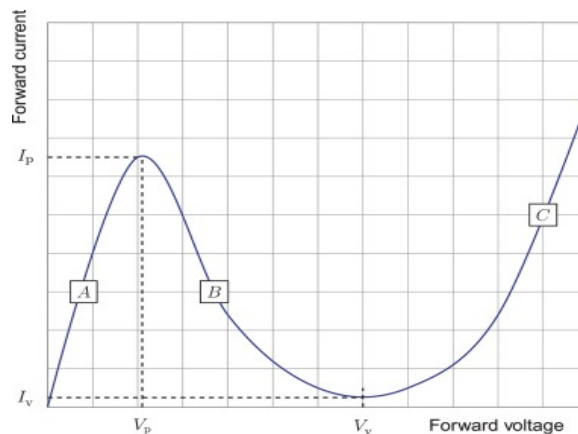


Figura 2. Resistencia diferencial negativa.

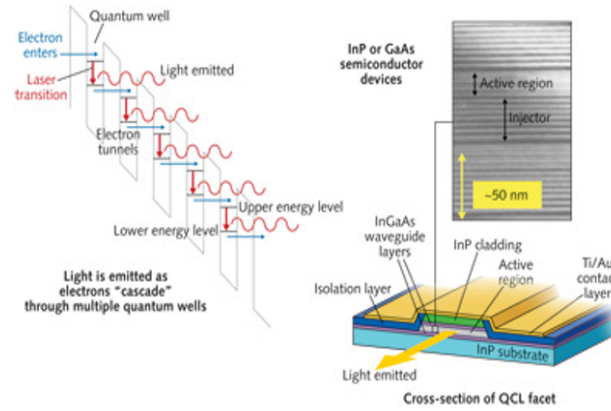


Figura 3. Láseres de cascada.

II. MARCO TEÓRICO

Teniendo en cuenta que los portadores son partículas cuántico-relativistas en materiales bidimensionales, emplearemos una descripción consecuente con este comportamiento usando hamiltonianos tipo Dirac para monocapa y bicapa de grafeno.

Partiendo entonces de la ecuación de autovalores $\hat{H}\psi = E\psi$ para ψ , donde

$$\hat{H} = \hbar v_F \boldsymbol{\sigma} \boldsymbol{\kappa} + V_0 I \quad (1)$$

siendo $\boldsymbol{\sigma}$: *matrices de Pauli*, $\boldsymbol{\kappa}$: *vector de onda* y I : *matriz identidad*.

Para monocapa de grafeno tenemos entonces:

$$\hat{H} = \hbar v_F \begin{pmatrix} 0 & q_x - iq_y \\ q_x + iq_y & 0 \end{pmatrix} + V_0 \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (2)$$

Y tendremos las soluciones siguientes:

$$\boldsymbol{\psi}_{\pm} = A_{\pm} \begin{pmatrix} 1 \\ v_{\pm} \end{pmatrix} e^{\pm iq_x x + iq_y y} \quad (3)$$

Con

$$v_{\pm} = \frac{\hbar v_F (\pm q_x + iq_y)}{E - V_0} \quad (4)$$

Para bicapa de grafeno:

$$\hat{H} = -\frac{\hbar^2}{2m} \begin{pmatrix} 0 & (q_x - iq_y)^2 \\ (q_x + iq_y)^2 & 0 \end{pmatrix} + V_0 \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (5)$$

$$\boldsymbol{\psi}_{\pm}^q = A_{\pm} \begin{pmatrix} 1 \\ v_{\pm}^q \end{pmatrix} e^{\pm iq_x x + iq_y y} \quad (6)$$

$$\boldsymbol{\psi}_{\pm}^{\beta} = A_{\pm} \begin{pmatrix} 1 \\ v_{\pm}^{\beta} \end{pmatrix} e^{\pm \beta q_x x + iq_y y} \quad (7)$$

III. METODOLOGÍA

Para mostrar los problemas de propagación presentes en grafeno (monocapa y bicapa), se hará uso del método de matriz de transferencia, que saca provecho a la conservación de momento transversal y de continuidad de la función de onda. Empleando el último argumento en el problema que nos atañe, tenemos que exigir que la función de onda en la región 1 sea igual a la función de onda en la región 2, y la continuidad en la región 2 y 3[Fig.4], matemáticamente:

$$[\psi_1]_{x=0} = [\psi_2]_{x=0} ; [\psi_2]_{x=d} = [\psi_3]_{x=d} \quad (8)$$

Con las funciones definidas como:

$$\psi_1 = A_1 e^{ik_x x} + B_1 e^{-ik_x x} \quad (9)$$

$$\psi_2 = A_2 e^{iq_x x} + B_2 e^{-iq_x x} \quad (10)$$

$$\psi_3 = A_3 e^{ik_x x} + B_3 e^{-ik_x x} \quad (11)$$

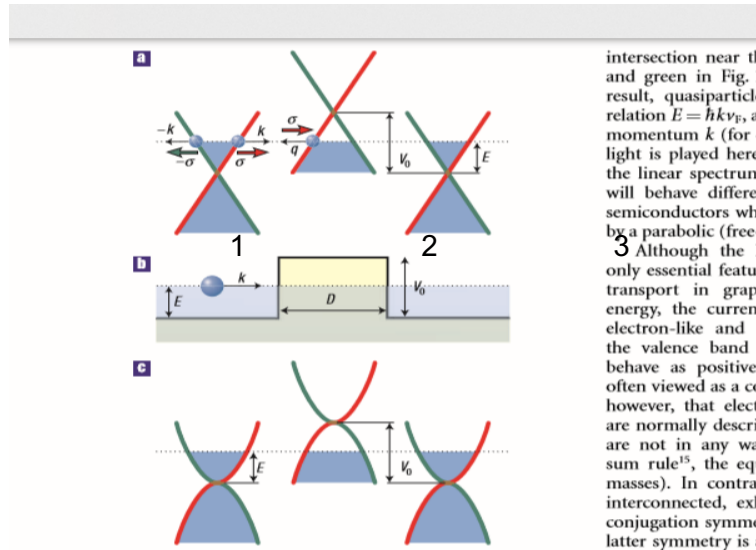


Figure 1 Tunneling through a potential barrier in graphene. a. Schematic

Figura 4.(a) Potencial en monocapa de grafeno.(b)Representación gráfica de un electrón atravesando una barrera.(c) Potencial en bicapa de grafeno.

Con estas condiciones y la conservación del momento transversal se puede relacionar los coeficientes de entrada $A_1 - B_1$ y salida $A_3 - B_3$ a través de la matriz de transferencia:

$$\begin{pmatrix} A_1 \\ B_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} M_{11} & M_{12} \\ M_{21} & M_{22} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} e^{ikd} & 0 \\ 0 & e^{-ikd} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A_3 \\ B_3 \end{pmatrix} \quad (12)$$

donde:

$$M = \begin{pmatrix} M_{11} & M_{12} \\ M_{21} & M_{22} \end{pmatrix} = D_1^{-1} \{ D_2 P_2 D_2^{-1} \} D_1 \quad (13)$$

$$D_1 = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ u_+ & u_- \end{pmatrix}; D_2 = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ v_+ & v_- \end{pmatrix}; P_2 = \begin{pmatrix} e^{-iq_x d} & 0 \\ 0 & e^{iq_x d} \end{pmatrix} \quad (14)$$

La probabilidad de transmisión se define en términos de los flujos de densidad de probabilidad de la onda incidente y la onda transmitida, como:

$$T = \frac{j_x^{out}}{j_x^{in}} \quad (15)$$

Que para nuestro caso al ser la región 1 equivalente a la región 3 viene dado en términos de la razón de los coeficientes de la onda transmitida y la incidente.

$$T = \left| \frac{A_3}{A_1} \right|^2 \quad (16)$$

Que en términos de la matriz de transferencia corresponde al elemento M_{11} .

$$T = \left| \frac{1}{M_{11}} \right|^2 \quad (17)$$

Para bicapa adicionalmente se exige continuidad en la derivada de la función de onda. Pudiéndose establecer conexión entre los coeficientes de entrada y salida por medio de la matriz de transferencia

$$\begin{pmatrix} A_1 \\ B_1 \\ C_1 \\ D_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} M_{11} & M_{12} & M_{13} & M_{14} \\ M_{21} & M_{22} & M_{23} & M_{24} \\ M_{31} & M_{32} & M_{33} & M_{34} \\ M_{41} & M_{42} & M_{43} & M_{44} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A_3 e^{ik_x x} \\ B_3 e^{-ik_x x} \\ C_3 e^{i\alpha_x x} \\ D_3 e^{-i\alpha_x x} \end{pmatrix} \quad (18)$$

$$M = \begin{pmatrix} M_{11} & M_{12} & M_{13} & M_{14} \\ M_{21} & M_{22} & M_{23} & M_{24} \\ M_{31} & M_{32} & M_{33} & M_{34} \\ M_{41} & M_{42} & M_{43} & M_{44} \end{pmatrix} = D_1^{-1} \{ D_2 P_2 D_2^{-1} \} D_1 \quad (19)$$

$$D_1 = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 \\ u_+^k & u_-^k & u_+^\alpha & u_-^\alpha \\ ik_x & -ik_x & \alpha_x & -\alpha_x \\ ik_x u_+^k & -ik_x u_-^k & \alpha_x u_+^\alpha & -\alpha_x u_-^\alpha \end{pmatrix} \quad (20)$$

$$D_2 = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 \\ v_+^q & v_-^q & v_+^\beta & v_-^\beta \\ iq_x & -iq_x & \beta_x & -\beta_x \\ iq_x u_+^q & -iq_x u_-^q & \beta_x u_+^\beta & -\beta_x u_-^\beta \end{pmatrix} \quad (21)$$

$$P_2 = \begin{pmatrix} e^{-iq_x d} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & e^{iq_x d} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & e^{-\beta_x d} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -e^{\beta_x d} \end{pmatrix} \quad (22)$$

de tal manera que la transmitancia está dada por:

$$T = \left| \frac{A_3 e^{ik_x x}}{A_1} \right|^2 = \left| \frac{M_{44}}{M_{11} M_{44} - M_{14} M_{41}} \right|^2 \quad (23)$$

III. RESULTADOS

Se presentan las expresiones analíticas, que nos dan mayor simpleza al momento de hacer un análisis enfocándonos en los comportamientos anómalos en la propagación de mono y bicapa. Se usará como referencia a los electrones de Schrödinger, para hacer más claras las diferencias en los comportamientos anómalos de los electrones en grafeno [12].

Para electrones de Schrödinger es bien conocida la expresión para el tunelaje, la cual viene dada por:

$$T = \frac{1}{1 + \frac{1}{4} \left(\frac{k}{q} - \frac{q}{k} \right)^2 \sin^2(qd)} \quad (24)$$

donde

$$k = \sqrt{\frac{2mE}{\hbar}}, q = \sqrt{\frac{2m(E-V_0)}{\hbar^2}} \quad (25)$$

(Vectores de onda fuera de la barrera y dentro de, respectivamente).

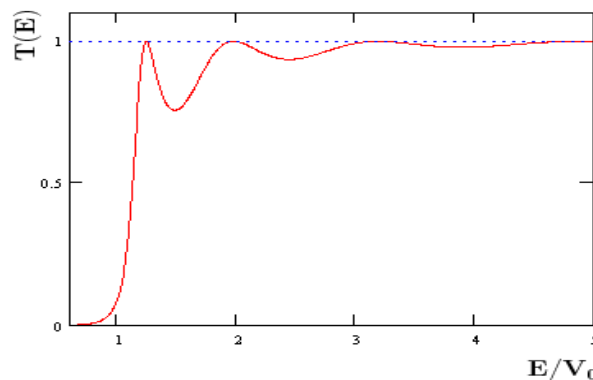


Figura 5. Tunelaje conocido para electrón de Schrödinger.

- Tunelamiento evanescente; En la zona donde $E < V_0$, observamos como clásicamente tendríamos $T=0$, pero aquí se muestra cómo va aumentando hasta comenzar a oscilar, en lugar de mantenerse en cero hasta llegar al punto donde $E=V_0$.
- Tunelamiento resonante; Para $E > V_0$ clásicamente T debe ser 1, sin embargo, se observa que existen máximos y mínimos a medida que la energía aumenta. Los máximos se presentan cuando $\sin(qd) = 0$; $qd = n\pi, n = 1, 2, \dots$. Esto es una manifestación puramente cuántica, conocida comúnmente como tunelaje resonante.
- Entonces, a medida que en la recta la razón entre E/V_0 se vuelve mayor, T tiende cada vez más a 1.

En el caso de monocapa de grafeno, desarrollando la matriz de transferencia analíticamente, se puede obtener la siguiente expresión para la transmitancia;

$$T = \frac{1}{1 + \left(\frac{k_y |k|}{q_x k_x} \frac{k_y (\pm |q|)}{k_x q_x} \right)^2 \sin^2(q_x d)} \quad (26)$$

donde

$$|k| = \sqrt{k_x^2 + k_y^2}; \quad |q| = \sqrt{q_x^2 + q_y^2}; \quad k_y = |k| \sin \Theta \quad (27)$$

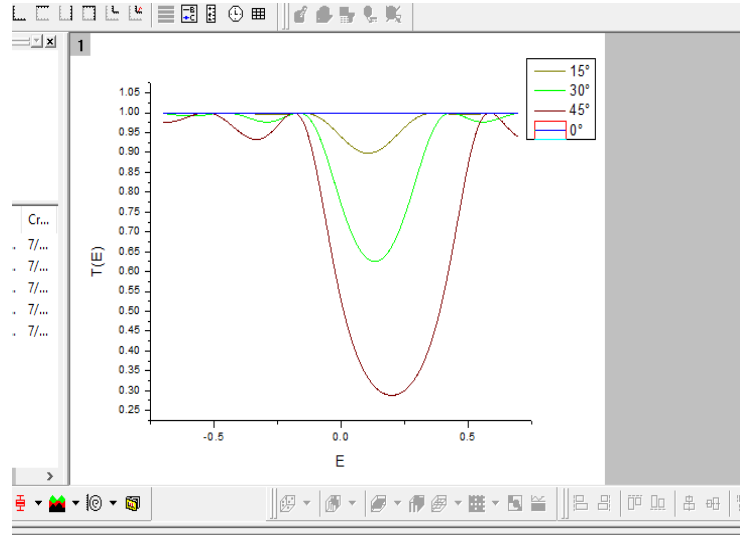


Figura 6. Gráfica obtenida con los parámetros: $V=0.01$ eV, $d=50a$, $t=2.7$ eV. ($a=0.142$ nm, la distancia carbono-carbono en grafeno).

- Al igual que en el caso de electrones de Schrödinger se puede presentar el tunelamiento evanescente y resonante, ya que la expresión también cuenta con una función seno.
- Lo que tenemos que resaltar aquí es cuando $k_y = 0$, dada su relación con el ángulo Θ . Es a lo que llamamos tunelaje Klein, cuando la transmisión es perfecta.

Para bicapa tenemos una expresión como sigue:

$$T = \frac{4i k_{tot} q_{tot}}{(q_{tot} + i k_{tot})^2 e^{-q_{tot} d} - (q_{tot} - i k_{tot})^2 e^{q_{tot} d}} \quad (28)$$

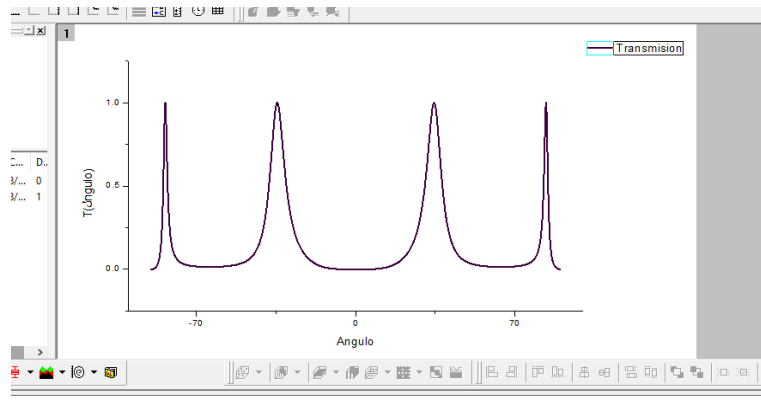


Figura 7. Lo parámetros son: $d=100$ nm, $V=50$ meV, $t=17$ meV

- Se muestran casos similares que en el tunelaje de Schrödinger y en monocapa, en tanto a tunelamiento resonante y evanescente, mas podemos ver que al contrario que en monocapa, a incidencia normal, es decir para ángulos igual a cero obtenemos reflexión perfecta, es decir, anti-tunelaje Klein.

Lo que hace posible estas situaciones tiene que ver con que manejamos electrones de Dirac, y encontramos características especiales como el pseudospín, que podemos ver en la expresión general de su Hamiltoniano: $\hat{H} = v_F(\nabla \cdot \mathbf{p})$, que la parte en paréntesis tiene una función similar a la que cumpliría el spín en electrones de Schrödinger, por tal lo llamamos "pseudospín". A partir de aquí tenemos una propiedad intrínseca llamada quiralidad, definida como: $\hat{C} = \frac{\nabla \cdot \mathbf{p}}{|\mathbf{p}|}$

En la imagen siguiente se representa la dirección del pseudospín con las flechas (rojas y azules), los colores nos indican si están en zona de electrones o donde hay huecos, rojo para electrones, azul para huecos. Para la parte de arriba tenemos el caso de monocapa, para el tunelaje Klein, es necesario que exista contraste quiral o empalme quiral entre electrones y huecos. En el caso de monocapa de grafeno la quiralidad para los electrones fuera de la barrera es +1, mientras que la quiralidad para los huecos de la barrera es -1, es decir, existe empalme quiral, por ende, los electrones se transmiten de manera perfecta. En el caso de bicapa de grafeno, no se cuenta con empalme quiral ya que el valor esperado de esta cantidad es el mismo dentro y fuera de la barrera.

Lo anterior también se puede entender en términos del pseudo-espín, ya que en monocapa el pseudo-espín se conserva a lo largo de la estructura, mientras que para el caso de bicapa se cuenta con pseudo-espín diferente fuera y dentro de la barrera [7].

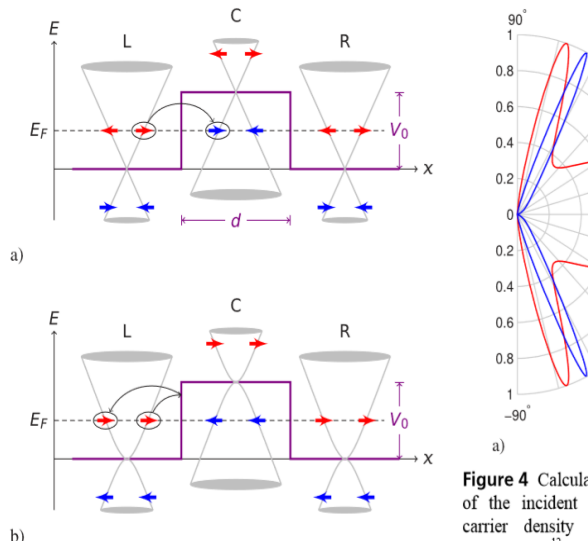


Figure 4 Calculat of the incident carrier density n .

Figura 8. Manera en que intactúa la quiralidad. Arriba: monocapa. Abajo: Bicapa.

IV. CONCLUSIONES

En resumen, se ha estudiado el fenómeno de tunelaje cuántico en materiales 2D, en particular monocapa y bicapa de grafeno. Se ha hecho un análisis más simple a partir de las expresiones analíticas, pues dejan ver con claridad las partes que se involucran en cada fenómeno que no podríamos explorar al usar de manera directa los métodos numéricos. Estos resultados nos dan la posibilidad de extenderse a otros materiales bidimensionales, como el siliceno, fosfeno y TMDs, por mencionar algunos. Además nos da una plataforma para el análisis de sistemas de barreras múltiples, de manera más simple.

V. RECONOCIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento al comité organizador del Verano de la Ciencia Regional 2019, por darme la oportunidad de formar parte de un proyecto de investigación como éste. Además de agradecer al Dr. Isaac Rodríguez Vargas por su asesoría y paciencia.

REFERENCIAS

- [1] Abyss.uoregon.edu. (2019). *Quantum Tunneling*. [online] http://abyss.uoregon.edu/~js/glossary/quantum_tunneling.html [Accessed 2 Aug. 2019].
- [2] Science.jrank.org. (2019). *Tunneling - History, Applications*. [online] <https://science.jrank.org/pages/7028/Tunneling.html> [Accessed 2 Aug. 2019].
- [3] AZoQuantum.com. (2019). *An Introduction to Quantum Tunneling*. [online] Available at: <https://www.azoquantum.com/Article.aspx?ArticleID=12> [Accessed 2 Aug. 2019].
- [4] Sites.google.com. (2019). *FENÓMENO DEL TUNELAJE - mecanicacuantica-efectotunel*. [online] Available at: <https://sites.google.com/site/mecanicacuanticaefectotunel/inicio/Efecto-Tunel> [Accessed 2 Aug. 2019].
- [5] Esaki, L. and Tsu, R. (1970). Superlattice and Negative Differential Conductivity in Semiconductors. *IBM Journal of Research and Development*, 14(1), pp.61-65.
- [6] Chang, L., Esaki, L. and Tsu, R. (1974). Resonant tunneling in semiconductor double barriers. *Applied Physics Letters*, 24(12), pp.593-595.
- [7] Katsnelson, M., Novoselov, K. and Geim, A. (2006). Chiral tunnelling and the Klein paradox in graphene. *Nature Physics*, 2(9), pp.620-625.
- [8] Faist, J., Capasso, F., Sivco, D., Sirtori, C., Hutchinson, A. and Cho, A. (1994). Quantum Cascade Laser. *Science*, 264(5158), pp.553-556.
- [9] Esaki, L. (1958). New Phenomenon in Narrow Germanium p-n Junctions. *Physical Review*, 109(2), pp.603-604.
- [10] Poole, C. and Darwazeh, I. (2016). Microwave semiconductor materials and diodes. *Microwave Active Circuit Analysis and Design*, pp.355-393.
- [11] Laser Focus World. (2019). QUANTUM-CASCADE LASERS: QCLs enable applications in IR spectroscopy. [online] Available at: <https://www.laserfocusworld.com/test-measurement/spectroscopy/article/16556856/quantumcascade-lasers-qcls-enable-applications-in-ir-spectroscopy> [Accessed 2 Aug. 2019].
- [12] Briones-Torres, J., Pernas-Salomón, R., Pérez-Álvarez, R. and Rodríguez-Vargas, I. (2016). Hybrid matrix method for stable numerical analysis of the propagation of Dirac electrons in gapless bilayer graphene superlattices. *Superlattices and Microstructures*, 93, pp.186-201.