

CIENCIAS AGROPECUARIAS



24° Verano de la Ciencia de la Región Centro

Comité Organizador
C.P. Raúl Sergio Farias Martínez
M.C. Jesús Roberto de Garza de Luna
M.A. Verónica Martínez Vela
Lic. Laura Elena González Rodríguez
Instituto Tecnológico Superior de Monclova

INSTITUCIONES PARTICIPANTES COORDINADORES INSTITUCIONALES

Universidad Autónoma de Aguascaliente	Marcelo de Jesús Pérez Ramos
	Yazmin Ramírez Rodríguez
Universidad Autónoma de Coahuila	Dora Elia Cárdenas Elizondo
	Alejandro Herrera Hernández
Instituto Tecnológico Superior de Monclova	Verónica Martínez Vela
	Laura Elena Gonzalez Rodriguez
Instituto Tecnológico de Abasolo	César Álvarez Mejía
Universidad Politécnica del Bicentenario,	Elizabeth Torres Vázquez
Instituto Tecnológico de Celaya	Rosa Ines Yerena Yerena
Instituto Tecnológico Superior de Irapuato	Akira Torreblanca Ponce
Instituto Tecnológico Superior de Purísima del	Carlos Alberto Sebastián Serra Martínez
Rincón	Luis Fernando Villanueva Jiménez
Escuela Nacional de Estudios Superiores UNAM,	Harumi Shimada Beltrán
Unidad León	
Instituto Tecnológico Superior del sur de	María Trinidad Pimentel Villegas
Guanajuato	
	Eduardo Arroyo Ortega
Instituto Tecnológico de Querétaro	Adriana del Pilar Aranda Servín
Arkansas State University Campus Querétaro	María Montserrat Juárez Aubry
	Nicolas Ramos Lara
Universidad Autónoma de Querétaro	Karina Villarauz Camargo
Universidad Politécnica de Querétaro	Jonny Paul Zavala De Paz
Universidad Autónoma de San Luis Potosí	Laura Elena Ochoa Leija
Centro Regional de Educación Normal Profra.	Juan Manuel Rodríguez Tello
Amina Madera Lauterio de Cedral	
Universidad Politécnica de San Luis Potosi	Martín Hernández Sustaita
Universidad del Centro de México	Alicia Villagómez Carvajal

CONTENIDO

1. Evaluación de propiedades funcionales de suplementos derivados de residuos agroindustriales del vino. Mónica Alejandra Gómez Rodríguez, Rosalía Reynoso Camacho5
2. Extracción de la fracción proteica y de quitina obtenida a partir de (*acheta domesticus*). María Fernanda Vázquez Bernal, Rosalía Reynoso Camacho12
3. Erradicación de hongo fitopatógeno de árbol de chirimoyo (*annona cherimola*) mediante el uso de bacterias. Paola Jazmín Valencia Chávez, María Rico Martínez19
4. Evaluación del contenido fenólico y estabilidad en el tiempo de un prototipo de bebida a base de jugo. Aguilar Medina Tessa Ximena25
5. Detección molecular *babesia caballi* y *theileria equi*, causantes de la piroplasmosis equina. Alejandra Carapia Pacheco, Juan Joel Mosqueda Gualito..... 32
6. Análisis de fertilizante orgánico versus químico. Paola Villa Tenorio, Jorge Avalos Carrillo40
7. Extracción de RNA de hongos fitopatógenos para una posterior evaluación de los mecanismos de acción. Juan Emmanuel Becerra Ramírez, Luis Ángel Xoca Orozco 43
8. Soberanía alimentaria: estudio sobre la percepción de los ciudadanos a los alimentos con nuevas tecnologías. Montserrat López Muro, Dra. Mónica Anzaldo Montoya53
9. Propiedades de golosinas gelificadas sustituidas con bagazo gastado de cervecera. Vanessa Mares Zapata , Laura Eugenia Pérez Cabrera59
10. Impacto del uso de nano aditivos sobre el crecimiento y valor nutricional de *salvia hispanica* L. Karina Michelle Gómez Elías, Dra. Karen Esquivel Escalante67
11. Extracción de rna de hongos fitopatógenos para una posterior evaluación de los mecanismos de acción. Leonardo Adrian Olivarez Jasso, Luis Ángel Xoca Orozco74
12. Evaluación de la estabilidad de compuestos fitoquímicos en la elaboración de suplementos a base de orujo de uva. Adriana Tronco Rodríguez, Rosalía Reynoso Camacho85
13. Identificación de patógenos nosocomiales en un hospital veterinario de grandes especies. Leslie Amairani Esparza Saucedo, Dr. Diego Josimar Hernández Silva92

14. Medición de parámetros de estrés oxidativo en hígado de ratas alimentadas con una dieta hipercalórica y suplementada con harina de grillo (*acheta domesticus*). Natalia Estrada Hernández, Rosalía Reynoso Camacho98
15. Efecto en la germinación de chíá (*salvia hispanica* L.) tratada con TiO_2 y Au-TiO_2 . Victor Eduardo Camacho Romero, Dra. Karen Esquivel Escalante106
16. Erradicación de hongo fitopatógeno de árbol de chirimoyo (*annona cherimola*) mediante el uso de bacterias. Moreno Oñate Verónica Alejandra, María Rico Martínez113
17. Desarrollo de una pasta alta en proteína a base de harina de trigo y garbanzo suplementada con “*acheta domesticus*”. Nicté García Carrillo, Rosalía Reynoso Camacho 120
18. Identificación de patógenos nosocomiales en un hospital veterinario de grandes especies. Abril Sánchez Ledesma, Dr. Diego Josimar Hernández Silva130
19. Biosíntesis de nanopartículas de cobre y plata utilizando extractos de *pseudomonas mediterranea* y *pantoea anthophila*. Jocelyn Covarrubias Garcia, Dra. Karen Esquivel Escalante.....137
20. Obtención de exudados producidos por hongos. Édgar Fabián Macías Gómez , Varinia López Ramírez143
21. Aprovechamiento de los desechos de la industria del vino, para la elaboración de suplementos. Aide Areli Cortés Rodríguez, Rosalía Reynoso Camacho150

EVALUACIÓN DE PROPIEDADES FUNCIONALES DE SUPLEMENTOS DERIVADOS DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES DEL VINO.

Mónica Alejandra Gómez Rodríguez

Universidad Autónoma de Coahuila
Carretera Torreón-Matamoros KM 7.5,
Torreón, Coah.
monica_gomez@audec.edu.mx

Rosalía Reynoso Camacho

Universidad Autónoma de Querétaro
Cerro de las Campanas S/N, Las Campanas, 76010
Santiago de Querétaro, Qro.
rrcamachomx@yahoo.com.mx

Resumen — En este trabajo se realizó el análisis de las propiedades funcionales de los suplementos alimenticios a base de residuos agroindustriales del vino, con el objetivo de obtener un suplemento que sea aceptado sensorialmente. En los trabajos anteriores, se desarrolló la formulación de los suplementos a partir de 3 variedades diferentes de orujo de uva, contemplando como variable la temperatura y el tiempo de exposición. Posteriormente, se realizaron las evaluaciones pertinentes del suplemento (índice de dispersabilidad, índice de solubilidad en agua, humectabilidad e índice de sedimentación). El suplemento del orujo de uva Cabernet mostró mejores resultados en ISA (232 %), humectabilidad (100%) y color. Por otro lado, la diferencia de dispersabilidad entre formulaciones es mínima (52.7%-53%).

Palabras clave — Propiedades tecnofuncionales, suplemento, orujo, subproducto.

Abstract — In this work, the analysis of the functional properties of food supplements based on agro-industrial residues of wine was carried out, with the aim of obtaining a supplement that is adequate to the taste and satisfaction of the consumer. In previous works, the formulation of the supplements was developed from 3 different types of grape pomace, contemplating as a variable the temperature and the time of exposure. Subsequently, the pertinent evaluations were carried out on the supplement (dispersibility index, water solubility index, wettability and sedimentation index). The Cabernet grape pomace supplement showed better results in ISA (232%), wettability (100%) and color. On the other hand, the difference in dispersibility between formulations is minimal (52.7%-53%).

Keywords — Technofunctional properties, supplement, pomace, by-product.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha presentado un incremento en el consumo de vino tanto a nivel nacional como internacional, debido en gran medida a la evidencia científica que correlaciona el consumo moderado del vino (1 o 2 copas al día) con la prevención de enfermedades crónico-degenerativas, lo cual ha generado que los consumidores vean el vino como una fuente de aporte de compuestos benéficos para la salud (Beres et al., 2017).

En la industria del vino se producen diferentes tipos de subproductos, y por tanto es importante conocer la composición de cada tipo de subproducto en cada fase de la vendimia y de la producción del vino para determinar sus posibles aplicaciones industriales. El principal subproducto de la vinificación es el orujo de uva, formado por semillas, hollejos y restos de pulpa que quedan después de las operaciones de prensado de la uva. En general, tiene un contenido en materia seca de entre un 30% y un 45%, siendo la fibra dietaria, hasta un 50% (Teixeira et al., 2014).

Debido a que la extracción durante la vinificación es incompleta, el orujo de uva remanente de dicho proceso presenta elevados contenidos de compuestos fenólicos, retiene alrededor del 20-30 % del total de compuestos en el hollejo y entre el 60-70 % en las semillas (Kammerer et al., 2004).

Existe un interés creciente por este subproducto debido a su contenido en fibra dietaria y polifenoles para la alimentación animal y potencial uso para el consumo humano en productos de panadería, bebidas y productos cárnicos (Beres et al., 2017). Además, estos compuestos presentes en el orujo presentan propiedades relacionadas a la promoción de la salud las cuales pueden ser expandidas desde el punto tecnológico. Dentro de estas propiedades se incluyen sus capacidades antioxidantes, antiinflamatorias, cardio protectoras, anticancerígenas y neuro protectoras (Fontana et al., 2013).

II. MATERIALES Y METODOS

A. MATERIALES

Se utilizó un suplemento alimenticio a base de orujo de uva de variedades provenientes de diferentes viñedos, como Cabernet (viñedo Márquez), Syrah (viñedo Azteca) y Tempranillo (viñedo Márquez).

B. MÉTODO

1) Índice de dispersabilidad

Para su medición se realizó la técnica propuesta por Jin (2013), se añadió 1 g de polvo en un vaso de precipitado de 50 mL con 10 mL de agua destilada y luego se mezcló vigorosamente con una espátula durante 15 s con el fin de hacer 25 movimientos completos a lo largo del diámetro del vaso de precipitado. Después de eso, las muestras reconstituidas se vertieron sobre el tamiz de 250 micras para separar las partículas dispersadas en la suspensión en base a la medida de la dispersión, y las muestras que se pasaron por el tamiz se recolectaron para su posterior secado a 105 °C durante toda la noche. Al día siguiente la materia seca se pesó y se calculó el índice de dispersabilidad utilizando la formula (1).

$$(1) \quad \text{Índice de dispersabilidad} = \frac{P_{ms} + (100 + P_m)}{P_m + \frac{100 - H}{100}}$$

Donde:

P_{ms} (% p/p): peso de la muestra seca después de tamizar

P_m : peso de la muestra

H (% p/p): es el contenido de humedad de la muestra

2) Índice de solubilidad en agua

Se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Anderson (1982), se pesó 1g de muestra y se adicionaron 20 mL de agua destilada, enseguida se agitó durante 30 min; posteriormente la suspensión se centrifugó a 3000 g por 15 min. El sobrenadante se decantó y secó a 100 °C durante un tiempo de 24 h. Para el cálculo del índice de solubilidad en agua (ISA) se utilizó la siguiente ecuación (2):

$$(2) \quad \text{Índice de solubilidad en agua} = \frac{\text{Peso del residuo de evaporación}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

3) Humectabilidad

Se empleó planteada por Fitzpatrick (2016), se pesó 2.5 g de cada formulación y se vació en seguida sobre 25 mL de agua destilada contenida en un vaso. Se cuantificó el tiempo al cual el polvo desaparece de la superficie, el cual se conoce como tiempo de humectación. La prueba se realizó a la misma temperatura para todas las muestras por 60 min, se eliminó el polvo con cuidado de la superficie del agua con una cuchara, se secó y pesó para cuantificar la cantidad de polvo que no se hundió. El porcentaje de humectabilidad se determinó empleando la siguiente ecuación (3):

$$(3) \quad \text{Humectabilidad} = \frac{\text{polvo hundido (g)}}{\text{polvo inicial (g)}} \times 100$$

4) Índice de sedimentación

Se determinó de acuerdo con la metodología propuesta por Matalanis y McClements (2013). Se pesó 2 gramos de muestra y se agregó en 25 mL de agua destilada, luego se dejó reposar en un cono Imhoff y se dejó reposar durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se registró el volumen de sedimento. El índice de sedimentación se reportó como la relación entre el nivel de sedimentación inicial (0%) y el volumen final de sedimentación.

5) Color

Las muestras en polvo se colocaron en cajas Petri en una capa uniforme y se registraron las lecturas correspondientes al espacio CIELAB a través de los parámetros de a^* , b^* , C^* , L^* y h , empleando un colorímetro marca Minolta 2002.

III. RESULTADOS y DISCUSIÓN

A. Análisis de las propiedades funcionales del suplemento

Los suplementos de acuerdo con la definición de la NOM-251-SSA1-2009 “Son productos a base de hierbas, extractos vegetales, alimentos tradicionales, deshidratados o concentrados de frutas, adicionados o no, de vitaminas o minerales, que se puedan presentar en forma farmacéutica y cuya finalidad de uso sea incrementar la ingesta dietética total, complementarla o suplir algún componente”.

Los suplementos se elaboran en forma de polvo que finalmente se rehidratan antes de su consumo, por lo que la capacidad de rehidratación del polvo debe ser su principal atributo, ya que el usuario industrial o el consumidor doméstico no desea tener problemas durante la rehidratación. La rehidratación del polvo a menudo se divide en una serie de subprocesos, por ejemplo, humectación, hundimiento, dispersión, hinchamiento, desintegración y solubilidad (Fitzpatrick et al., 2016). Tomando en cuenta esta problemática para el desarrollo del suplemento se analizó el índice de dispersabilidad, el índice de solubilidad en agua (ISA), la humectabilidad en agua y el índice de sedimentación, además de la determinación de color.

El índice de dispersabilidad es la capacidad del polvo para mojarse sin formar grumos en el agua, siendo el porcentaje de materia seca que se hace pasar a través de un tamiz después de que es mezclada por un tiempo corto con una espátula (Jin et al., 2013). El análisis del porcentaje de dispersabilidad no presentó una diferencia significativa entre las formulaciones de suplementos (Figura 1), lo que indica que presentaron una baja cantidad de grumos formados al momento de hidratarse.

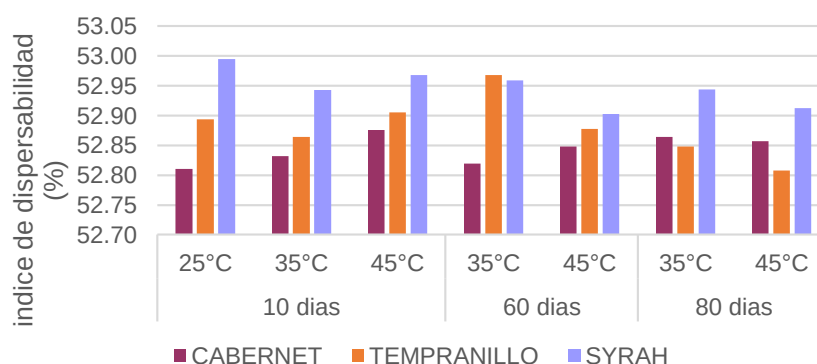


Figura 1. Comparación en porcentaje del índice de dispersabilidad de los suplementos. Formulaciones con tres repeticiones cada una.

El índice de solubilidad implica la solubilización o disolución de las partículas de polvo en el líquido para formar una solución. De las formulaciones analizadas (Figura 2) las que presentan una mayor solubilidad son aquellas que tienen como base el orujo de uva Cabernet y expuestas por 60 días, siendo las de 45° C quien presento el mayor porcentaje.

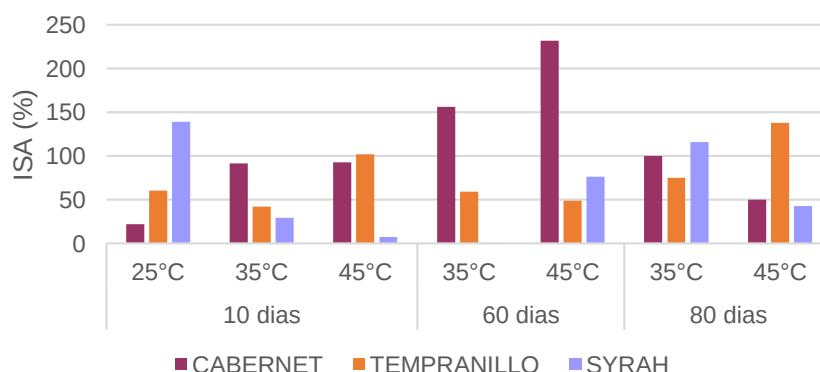


Figura 2. Comparación en porcentaje del índice de solubilidad de los suplementos. Formulaciones con tres repeticiones cada una.

La humectabilidad se refiere al polvo que entra en contacto con el líquido y rodea las partículas de polvo con líquido. En cuanto a la humectabilidad de las formulaciones se observó que las tres muestras de Cabernet a 45°C independientemente del tiempo fueron las que presentaron un mayor porcentaje de humectabilidad (Figura 3), esto indica que al entrar en contacto con el agua estas formulaciones se humedecen por completo.

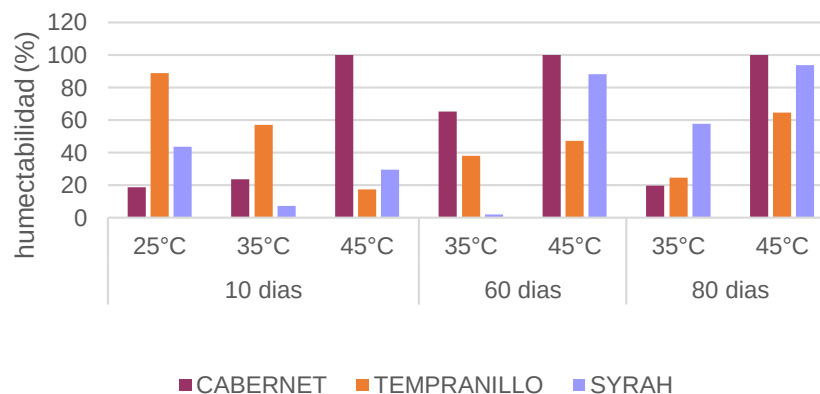


Figura 3. Comparación en porcentaje del índice de dispersabilidad de los suplementos. Formulaciones con tres repeticiones cada uno.

El índice de sedimentación se refiere al polvo que se sumerge debajo de la superficie del líquido. En este análisis las formulaciones que obtuvieron un mayor porcentaje de sedimentación fueron las de Tempranillo a 35°C a los 60 y 80 días, presentaron un 48% de sedimentación (Figura 4), lo que indica que un mayor porcentaje de la muestra permanece dispersa en el agua.

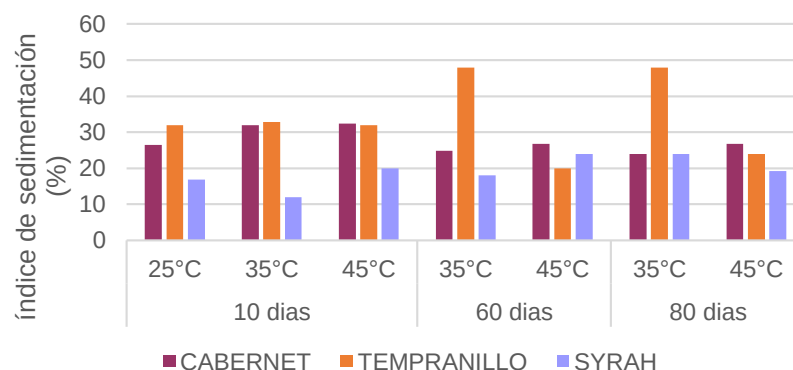


Figura 4. Comparación en porcentaje del índice de dispersabilidad de los suplementos. Formulaciones con tres repeticiones cada una

La determinación de color se consideraron tres coordenadas que representan la luminosidad del color (L), la posición entre rojo y verde (a*) y la posición entre amarillo y azul (b*) (Cuadro 1) (Cuadro 1). En base a esto se pudo observar que en el orujo de uva tipo Cabernet se encuentran los mayores parámetros de luminosidad y la variación entre ellos no es de gran significancia, a comparación de la luminosidad obtenida en los otros tipos de orujo.

Cuadro 1. Análisis de color de los suplementos

Tipo de orujo	Tiempo	Temperatura (°C)	Color L*	Color a*	Color b*	Delta E
CABERNET	10 días	25°C	54.98	3.47	4.74	13.25
		35°C	52.13	4.3	4.91	15.33
		45°C	56.76	2.64	5.27	11.69
	60 días	35°C	57.79	3.06	4.775	11.40
		45°C	56.57	2.84	5.04	11.97
	80 días	35°C	58.87	2.87	4.5	11.05
		45°C	57.33	2.765	5.44	11.18
TEMPRANILLO	10 días	25°C	50.9	4.6	4.82	16.40
		35°C	51.22	4.49	4.8	16.14
		45°C	51.5	3.85	5.35	15.58
	60 días	35°C	51.19	3.88	4.67	16.22
		45°C	47.52	4.88	5.73	18.89
	80 días	35°C	51.78	3.97	4.6	15.79
		45°C	46.9	4.79	5.74	19.44
SYRAH	10 días	25°C	48.05	6.17	5.56	18.61
		35°C	48.1	5.88	5.64	18.49
		45°C	46.76	4.56	5.77	19.54
	60 días	35°C	47.79	5.29	5.44	18.80
		45°C	47.39	4.96	5.84	18.96
	80 días	35°C	48.58	5.5	5.61	18.05
		45°C	47.27	5.87	6.42	18.91

L*= luminosidad; L=0 color negro; L=100 color blanco; a*=negativo verde, positivo rojo; b*= negativo azul, positivo amarillo. Formulación con tres repeticiones.

IV. CONCLUSIONES

El estudio de las propiedades funcionales de los suplementos mostro en la mayoría de los análisis que las formulaciones con orujo de uva Cabernet, presenta una mejor capacidad de hidratación, mostrándolo como una formulación adecuada que podría ser una opción adecuada para el agrado de los consumidores.

V. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Agradezco a mis padres Mario Gómez y Maricela Rodríguez por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida.

También quiero agradecer a mis familiares (hermanos, tíos y abuelo) por animarme y estar para mí en cada momento importante.

Por último, agradezco a la Dra. Rosalía Reynoso Camacho y a su grupo de tesis de Licenciatura, Maestría y Doctorado por la aceptación en el proyecto, la atención y el apoyo que me brindaron durante todo el periodo de este verano.

REFERENCIAS

- [1] Beres, C., Costa, G. N. S., Cabezudo, I., da Silva-James, N. K., Teles, A. S. C., Cruz, A. P. G., Mellinger-Silva, C., Tonon, R. V., Cabral, L. M. C., & Freitas, S. P. (2017). Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. In *Waste Management* (Vol. 68, pp. 581–594). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.017>
- [2] Fitzpatrick, J. J., van Lauwe, A., Coursol, M., O'Brien, A., Fitzpatrick, K. L., Ji, J., & Miao, S. (2016). Investigation of the rehydration behaviour of food powders by comparing the behaviour of twelve powders with different properties. *Powder Technology*, 297, 340–348. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2016.04.036>
- [3] Fontana, A. R., Antonioli, A., & Bottini, R. (2013). Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(38), 8987–9003. <https://doi.org/10.1021/jf402586f>
- [4] Jin, E. S., Beddow, S. A., Malloy, C. R., & Samuel, V. T. (2013). Hepatic glucose production pathways after three days of a high-fat diet. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 62(1), 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2012.07.012>
- [5] Kammerer, D., Claus, A., Carle, R., & Schieber, A. (2004). Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), 4360–4367. <https://doi.org/10.1021/jf049613b>
- [6] Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D. A., & Garcia-Viguera, C. (2014). Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(9), 15638–15678. <https://doi.org/10.3390/ijms150915638>

EXTRACCIÓN DE LA FRACCIÓN PROTEICA Y DE QUITINA OBTENIDA A PARTIR DE (*ACHETA DOMESTICUS*)

María Fernanda Vázquez Bernal

Universidad Autónoma de Coahuila
Facultad de Ciencias Biológicas
Carretera Torreón Matamoros Km. 7.5
C.P 27275 Torreón, Coah.
fernanda.vazquez@uadec.edu.mx

Rosalía Reynoso Camacho

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Cerro de las Campanas S/N
C.P 76010 Querétaro, Qro.
rrcamachomx@yahoo.com.mx

Resumen — Los insectos han demostrado ser una gran alternativa como fuente de alimento debido a su composición nutrimental y al poco impacto ambiental que genera su producción. En este estudio se evaluarán las condiciones óptimas del grillo *Acheta domesticus* para mejorar su eficiencia de extracción de proteínas y de quitina. Para ello se realiza un estudio con diferentes tratamientos postcosecha y diferentes pH para la extracción y precipitación de proteínas tomando en cuenta el factor del tiempo. Para la optimización de la extracción de quitina se empleó un diseño central compuesto para estudiar los efectos de las variables en el proceso de la desmineralización, y así determinar las condiciones óptimas.

Palabras clave — *Acheta domesticus*, extracción, proteína, quitina, diseño central compuesto.

Abstract — Insects have proven to be a great alternative as a food source due to their nutritional composition and the low environmental impact generated by their production. In this study, the optimal conditions of the *Acheta domesticus* cricket will be evaluated to improve its protein and chitin extraction efficiency. For this, a study is carried out with different post-harvest treatments and different pH for the extraction and precipitation of proteins, taking into account the time factor. For the optimization of the chitin extraction, a central composite design was used to study the effects of the variables in the demineralization process, and thus determine the optimal conditions.

Keywords — *Acheta domesticus*, extraction, protein, chitin, central composite design.

I. INTRODUCCIÓN

La ganadería es uno de los contribuyentes más significativos al efecto invernadero y al cambio climático. La crianza de ganado puede tener un gran impacto en nuestro medio ambiente debido a la ineficiencia de sus recursos. La ganadería es altamente contaminante ya que las fuentes de agua retienen materia orgánica, patógenos y residuos farmacológicos, suele expandir la producción a zonas no aptas para esta actividad, provocando deforestación, degradación, compactación y erosión del suelo [4]. Se estima que la agricultura es responsable del 14% de las emisiones de gases de efecto invernadero en todo el mundo. El ganado, que incluye animales criados por humanos, incluidos los que se mantienen como mascotas, representa el 55 % de esas emisiones, siendo los cerdos, el ganado vacuno y los corderos los principales.

Los insectos parecen una gran alternativa para alimentar a la población de una manera sostenible, además de brindar mayores beneficios nutrimentales [6]. El consumo de insectos no es algo nuevo, ya que se han consumido durante miles de años atrás en algunos países como, Tailandia, China, Laos, Japón y México. Con la introducción de las barras de proteínas de grillo y otros productos de proteínas de insectos a la dieta de los seres humanos, no solo podemos disminuir el estigma negativo de comerlos, sino que también brindamos diversos beneficios nutrimentales [1]. Sin embargo, al igual que

cualquier fuente de alimento que uno puede consumir, debe optimizarse para sus necesidades o preferencias específicas.

El grillo *Acheta domesticus* es considerado uno de los insectos ganaderos más prometedores debido a sus atractivas características nutricionales y su menor índice de conversión alimenticia en comparación con otros animales [5].

A pesar de lo anterior, una tendencia es la extracción de fracciones de alto valor agregado, para ser usadas como suplemento o ingrediente de otros alimentos. En el grillo *Acheta domesticus*, se han identificado dos fracciones de interés con potencial de ser aisladas, la primera es la fracción proteica y la segunda, es la fracción de quitina, las cuales pueden ser usadas de manera aislada como suplemento alimenticio y generar un valor agregado a la producción de insectos. Sin embargo, se desconocen cuáles son los principales factores para mejorar la eficiencia de extracción de estas dos fracciones.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es encontrar los mejores parámetros para la obtención de una fracción rica en quitina evaluando el efecto del tratamiento postcosecha del grillo, pH y tiempo de extracción de proteína y optimizar la etapa de desmineralización mediante metodología de superficie de respuesta, evaluando parámetros como tiempo, temperatura y concentración de ácido.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

I. *Determinación del efecto de los tratamientos postcosecha sobre la eficiencia de extracción de proteínas*

I.1. *Preparación de las muestras*

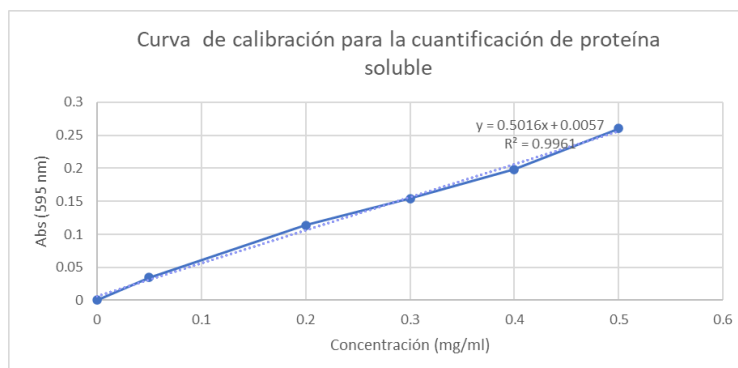
Para la determinación del efecto del tratamiento postcosecha del grillo en el rendimiento de la extracción de su fracción proteica, se prepararon las muestras de la siguiente manera: se pesó 0.2 g de muestra con tres tratamientos postcosecha, de los cuales el primero fue grillo hervido (95 °C, 10 min) y horneado (2h, 120 °C), el segundo horneado (2 h, 120 °C), el tercero fue deshidratado (38 °C, 12 h). Posteriormente, se adicionó 15 ml de agua destilada y se ajustó el pH a 1, 2, 4, 10 y 12 para que así por medio del punto isoeléctrico de los aminoácidos se determinara el pH óptimo para la extracción de las proteínas de cada uno de los tratamientos postcosecha del grillo, después las muestras se agitaron constantemente durante 1 hora, y se centrifugó a 10000 RPM durante 10 minutos y se recuperó tanto el sedimento insoluble y al sobrenadante soluble.

I.2. *Determinación de proteínas solubles*

Se elaboró una curva de calibración (Fig. 1) de albúmina sérica bovina, para la cuantificación de proteínas solubles extraídas de cada una de las muestras sometidas a los diferentes tratamientos utilizando el método Bradford, donde se prepararon en microtubos las muestras solubles con una dilución de 1000 uL de agua destilada y 100 uL de muestra y posteriormente en una placa microtituladora se le aplicó 10 uL de la muestra diluida y 200 uL del reactivo Bio-Rad a cada pocillo de la placa, esto se realizó con cada una de las de

las muestras por dos replicas y cuatro repeticiones de cada una, posteriormente fueron sometidas para realizar las mediciones de absorbancia a 595 nm.

Fig. 1. Curva de calibración de albumina sérica bovina, para la cuantificación de proteína



soluble.

II. *Mejoramiento en la extracción proteica*

II.1. *Extracción de la fracción proteica*

Para establecer las condiciones de extracción óptimas para la fracción de proteína soluble de grillo, se determinaron los efectos del pH y el tiempo de extracción con agitación sobre la eficiencia de extracción. Para conocer el pH óptimo para la extracción y precipitación de las proteínas de grillo, se midió la cantidad de proteínas solubles a diferentes pH (1-12) buscando el punto isoeléctrico para fijar el pH óptimo de la solubilización y posterior precipitación del aislado proteico. Para determinar el efecto del tiempo de extracción de la agitación, sobre la eficiencia de extracción de proteínas, se pesó 65 g de grillo y se diluyó en 1 litro de agua destilada la muestra fue sometida con agitación a diferentes tiempos de extracción (30 minutos, 1 hora, 1 hora y 30 minutos, 2 horas, 2 horas y 30 minutos, y 3 horas) determinando las condiciones más adecuadas de extracción.

III. *Optimización de la extracción de quitina*

III.1. *Condiciones de extracción en etapa de desmineralización*

Para la optimización de la extracción de quitina de *Acheta domesticus*, se realizó un diseño central compuesto (DCC) (Tabla. 1) para evaluar el efecto de las variables seleccionadas (Tabla. 2): concentración del ácido, tiempo y temperatura para determinar un mayor efecto en la etapa de desmineralización.

Para realizar la desmineralización, se utilizó 0.5 g de grillo deshidratado y desproteinizado (como se menciona en la metodología anterior) en tubos falcón de 50ml, a las muestras se adicionó el ácido a la concentración y tiempo indicado para cada tratamiento especificado en la Tabla 3. Se llevaron a peso contante papeles filtro para posteriormente utilizarlos para filtrar al vacío cada una de las muestras, las cuales fueron enjuagadas con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro.

Al finalizar la extracción en la etapa de desmineralización del grillo deshidratado se determinó la eficiencia de extracción de los tratamientos.

Temperatura	Tiempo	Concentración
x1	x2	x3
-1.000000	-1.000000	-1.000000
1.000000	-1.000000	-1.000000
-1.000000	1.000000	-1.000000
1.000000	1.000000	-1.000000
-1.000000	-1.000000	1.000000
1.000000	-1.000000	1.000000
-1.000000	1.000000	1.000000
1.000000	1.000000	1.000000
0.000000	0.000000	0.000000
0.000000	0.000000	0.000000
0.000000	0.000000	0.000000
0.000000	0.000000	0.000000
-1.681793	0.000000	0.000000
1.681793	0.000000	0.000000
0.000000	-1.681793	0.000000
0.000000	1.681793	0.000000
0.000000	0.000000	-1.681793
0.000000	0.000000	1.681793
0.000000	0.000000	0.000000
0.000000	0.000000	0.000000

Tabla 1. Diseño central compuesto para el proceso de desmineralización de la quitina de grillo.

	Temperatura	Tiempo	Concentración
	x1	x2	x3
1	34.1	1.8	0.25
2	70.1	1.8	0.25
3	34.1	5.17	0.25
4	70.1	5.17	0.25
5	34.1	1.8	0.85
6	70.1	1.8	0.85
7	34.1	5.17	0.85
8	70.1	5.17	0.85
9	52.5	3.5	0.55
10	52.5	3.5	0.55
11	52.5	3.5	0.55
12	52.5	3.5	0.55
13	25.0	3.5	0.55
14	80.0	3.5	0.55
15	52.5	1.0	0.55
16	52.5	6.0	0.55
17	52.5	3.5	0.1
18	52.5	3.5	1.0
19	52.5	3.5	0.55
20	52.5	3.5	0.55

Tabla 3. Tratamiento para cada muestra.

IV. RESULTADOS

Variable	Nivel bajo (-1)	Nivel alto (+1)	Punto axial		Punto Central (0)
			Bajo (-1.68)	Alto (1.68)	
X1 Temperatura	34.1	70.1	25	80	52.5
X2 Tiempo	1.83	5.17	1	6	3.5
X3 Concentración	0.25	0.85	0.1	1	0.55

Tabla 2. Variables y niveles del diseño experimental.

IV.1. Extracción de la fracción proteica del grillo

La extracción de la fracción proteica a diferentes pH y con diferentes pretratamientos se observa en la Figura 2. Donde se destaca un mayor rendimiento al utilizar grillo deshidratado y un pH básico, sobresaliendo así el pH de 10 y un pequeño incremento a pH de 12, por lo cual se seleccionó el pH de 10 para la solubilización de proteínas.

Respecto a los estudios realizados entre el factor del tiempo en extracción de proteínas de *Acheta domesticus* (Fig. 3), se observó que una hora en agitación es tiempo suficiente para la extracción óptima de proteína soluble.

También se observa que a un pH de 4 se disminuye notoriamente la capacidad de extracción, debido a que las proteínas se encuentran en su punto isoeléctrico, lo que quiere decir que tienen una carga de 0 lo que ocasiona que las proteínas se precipiten, por lo que, se seleccionó este pH para la precipitación de proteínas.

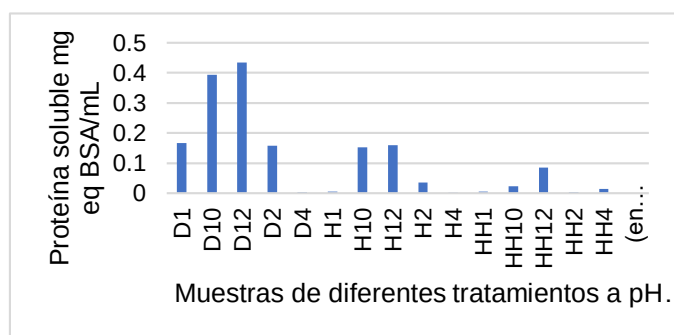


Fig. 2 Extracción de proteína de grillo a diferentes pH y diferentes pretratamientos postcosecha.

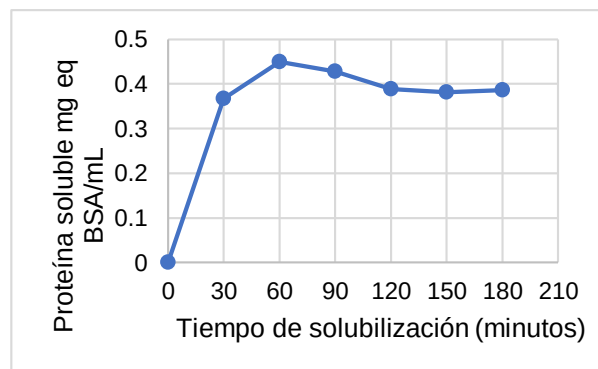


Fig. 3 Desproteinización de grillo a pH 10 a diferentes tiempos.

IV.2. Optimización de la desmineralización

Los resultados del diseño experimental en la etapa de desmineralizado de los carbohidratos insolubles se representaron mediante el método de superficie de respuestas en las figuras 4, Y 5. Se logra observar que las variables que más influyen son el tiempo y la temperatura, sin embargo, la concentración del ácido presentó muy poca relevancia, obteniendo que el tratamiento 3 es menos idóneo y resultando mas conveniente el tratamiento 14.

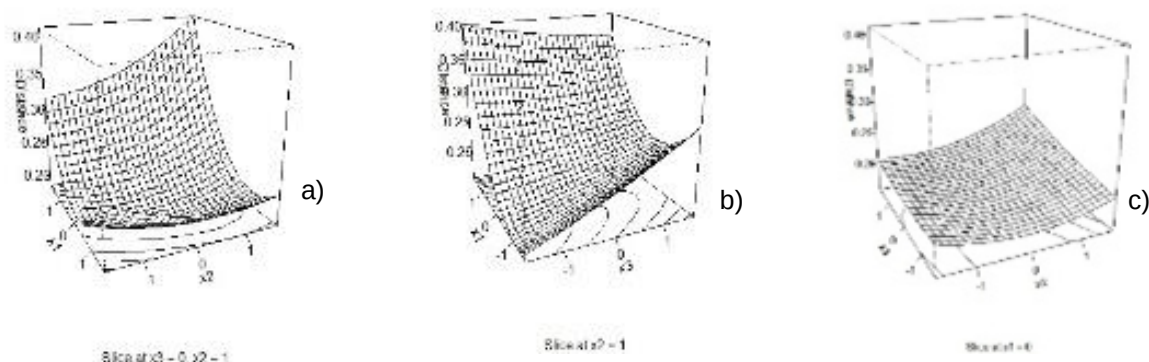


Fig. 4 Superficies de respuestas a) Concentración – Temperatura, b) Tiempo – Temperatura, c) Tiempo - Concentración

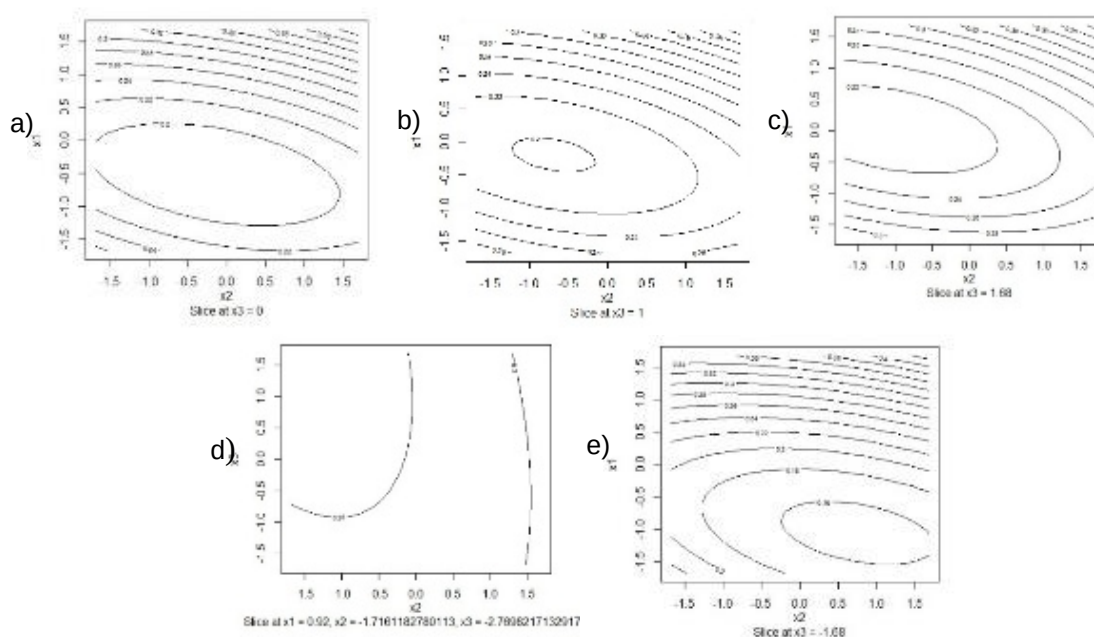


Figura 5. Líneas de contorno de la superficie de: a) Tiempo – Temperatura (Concentración 0), b) Tiempo – Temperatura (Concentración 1), c) Tiempo – Temperatura (Concentración 1.68), d) Tiempo – Concentración, e) Tiempo – Temperatura (Concentración -1.68).

V. CONCLUSIONES

Con este estudio el grillo deshidratado demostró ser el mejor tratamiento postcosecha con el cual se obtuvo un mejor rendimiento de la extracción de proteína, y que el pH óptimo para la extracción de proteínas solubles es a un pH de 10, mientras que el punto isoeléctrico, para la precipitación de proteínas se conseguía a un pH de 4. Además, se optimizó el proceso de desproteínización al reducir el tiempo con agitación constante a 1 hora. Se logró tener buenos resultados en la etapa de desmineralización al utilizar ácido acético, lo cual es mas beneficioso al ser un ácido orgánico y tener menos impacto ambiental.

VI. AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Querétaro por las facilidades y el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano.

VII. REFERENCIAS

- [1] Awobusuyi, TD, Pillay, K. y Siwela, M. (2020). Aceptación del consumidor de galletas complementadas con una harina de sorgo e insectos. *Nutrientes*, 12 (4), 895.
- [2] Brogan, E. N., Park, Y. L., Matak, K. E., & Jaczynski, J. (2021). Characterization of protein in cricket (*Acheta domesticus*), locust (*Locusta migratoria*), and silk worm pupae (*Bombyx mori*) insect powders. *LWT*, 152, 112314.
- [3] López, O., Lamela, L., Montejo, I. L. y Sánchez, T. (2015). Influencia de la suplementación con concentrado en la producción de leche de vacas Holstein x Cebú en silvopastoreo. *Pastos y Forrajes*, 38(1), 46-54. <https://www.redalyc.org/pdf/2691/269138824005.pdf>
- [4] Moscoso M., J. E., Franco F., F., San Martín H., F., Olazábal L., J., Chino V., L. B., & Pinares-Patiño, C. (2017). Producción de Metano en Vacunos al Pastoreo Suplementados con Ensilado, Concentrado y Taninos en el Altiplano Peruano en Época Seca. *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 28(4), 822–833. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i4.13887>
- [5] Palop Gómez, A., Rodríguez Lázaro, D., Santos Buelga, J. Á., Conchello Moreno, M. P., Daschner, Á., González Fandos, E., & Cámara Hurtado, M. (2018). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) en relación a los riesgos microbiológicos y alergénicos asociados al consumo de insectos (No. ART-2018-116100)
- [6] Van Huis, A., Van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G. y Vantomme, P. (2013). Insectos comestibles: perspectivas futuras para la seguridad alimentaria y de piensos (núm. 171). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

ERRADICACIÓN DE HONGO FITOPATÓGENO DE ÁRBOL DE CHIRIMOYO (*ANNONA CHERIMOLA*) MEDIANTE EL USO DE BACTERIAS

Paola Jazmín Valencia Chávez

Instituto Tecnológico Superior de Purísima del Rincón
Blvd. Del Valle 2301, Guardarrayas, 36425, Gto
rs18110611@purisima.tecnm.mx

María Rico Martínez

Instituto Tecnológico Superior de Abasolo
Cuitzeo de 401 Cuitzeo de los Naranjos 36976, Los
Naranjos, Abasolo, Gto
maria.rm@abasolo.tecnm.mx

Resumen —. El objetivo de esta investigación fue demostrar el antagonismo que presenta *Bacillus subtilis* frente a hongos fitopatógenos que afectan a los árboles de chirimoyo in vivo, para esto se tomaron muestras de tierra, hojas y fruto de los árboles seleccionados que presentaban síntomas de antracnosis generada por hongos, posteriormente se trataron con caldo nutritivo inoculado con *bacillus spp* y se diluyó en agua al 4.5%. La aplicación de *B. subtilis* fue realizada en forma de riego (Tratamiento 1- T1) y asperjado (T2) por triplicado, cada árbol corresponde a un individuo. Posteriormente se hizo toma de muestras, fueron analizadas en el laboratorio, donde se observó limitación del crecimiento óptimo de los hongos en las que tenían el tratamiento, concluyendo que es una alternativa viable.

Palabras clave — *Bacillus subtilis*, hongos fitopatógenos, chirimoyo, microorganismos.

Abstract — The objective of this research was to demonstrate the antagonism that *Bacillus subtilis* presents against phytopathogenic fungi that enhance custard apple trees in vivo, for this soil, leaf and fruit sample were taken from selected trees that present symptoms of anthracnose produced by fungi. They were treated with nutrient broth inoculated with *Bacillus subtilis* and diluted in 4.5% water. The application of *B. subtilis* was carried out in the form of irrigation (Treatment 1- T1) and sprinkled (T2) in triplicate, each tree corresponding to an individual. Subsequently, samples were analyzed in the laboratory, where the limitation of the optimal growth of the fungi in those that had the treatment was reduced, concluding that it is a viable alternative.

Keywords — *Bacillus subtilis*, phytopathogenic fungi, chirimoya, microorganisms

I. INTRODUCCIÓN

La utilización de microorganismos en el control biológico de patógenos es una alternativa eficiente y ecológica, bacterias del género *Bacillus* presentan potencial debido a su capacidad para ejercer actividad antagónica mediante competencia, producción de antibióticos y producción de enzimas líticas[1]. Los microorganismos antagonistas tienen la capacidad de ejercer un efecto de control sobre diversos patógenos y se han empleado para controlar enfermedades en frutos y hortalizas. *Bacillus subtilis* presentan un alto grado de tolerancia a factores ambientales y ha sido utilizado como biocontrol de muchos hongos fitopatógenos [2]. Teniendo por objetivo implementar bacterias *Bacillus subtilis* como un factor antagónico frente a un hongo fitopatógeno que afecta a árboles de chirimoyo (*Annona cherimola*) ubicados en la sierra de Pénjamo, buscando contrarrestar el problema agrícola que esto conlleva, es decir, pérdida de cultivos y daños ecológicos que afectan el ecosistema de la sierra y la economía de la población.

II. MARCO TEÓRICO

Entre las características del género *Bacillus* destaca su crecimiento aerobio o en ocasiones anaerobio facultativo, Gram positivas, morfología bacilar, movilidad flagelar, y tamaño variable (0.5 a 10 μm), su crecimiento óptimo ocurre a pH neutro, presentando un amplio intervalo de temperaturas de crecimiento, aunque la mayoría de las especies son mesófilas (temperatura entre 30 y 45 °C), su diversidad metabólica asociada a la promoción del crecimiento vegetal y control de patógenos; además destaca su capacidad de producir endosporas (ovales o cilíndricas) como mecanismo de resistencia a diversos tipos de estrés [3]. La producción de enzimas involucradas en la degradación de la pared celular de agentes fitopatógenos es uno de los mecanismos de control biológico más reportados, especialmente contra patógenos de origen fúngico, estas enzimas son responsables de la degradación de los principales polisacáridos que conforma la pared celular de hongos, mediante la hidrólisis de sus enlaces glucosídicos [3]. Una de las principales plagas fungosas en anona es la enfermedad antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en donde los frutos presentan pequeñas manchas hundidas, necróticas, irregulares, de color marrón oscuro. Un fruto con avanzado estado de antracnosis presenta fisuras que penetran la pulpa, afectando por tanto la calidad de esta. También se pueden observar puntos negros formando círculos concéntricos en las lesiones. Cuando el ataque de un insecto antecede la entrada de antracnosis, generalmente el fruto queda momificado en el árbol [4].

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Previamente se obtuvo un cultivo de bacterias *Bacillus subtilis* proveniente de un cultivo de maíz, el cual fue llevado al laboratorio en donde se hizo una identificación molecular del microorganismo. Para iniciar la presente investigación, se hicieron siembras de *Bacillus subtilis* en agar nutritivo, posteriormente se realizó la preparación de reactivos para tinción Gram (cristal violeta, safranina, Lugol y alcohol-acetona) con la finalidad de evitar contaminación y resultados erróneos. Las colonias obtenidas de la inoculación en agar fueron analizadas microscópica y macroscópicamente, de tal forma que se observó su aspecto, consistencia, color, elevación, bordes y su forma de bacillus. Para llevar un control, cada caja fue rotulada según el día de inoculación y lugar de la toma de muestra.

Identificación de la enfermedad en los árboles de chirimoyo

Los árboles seleccionados de chirimoyo para ser sometidos al tratamiento con *Bacillus subtilis*, fueron analizados a través de observación de los síntomas presentes en las hojas, tallos y frutos, haciendo una investigación bibliográfica de las similitudes de los daños generados por el hongo fitopatógeno se determinó la infección por hongo *Colletotrichum*.

Preparación del tratamiento a aplicar en arboles de chirimoyo infectados

La preparación del medio se hizo en frascos con 300 ml de caldo nutritivo, posteriormente se esterilizaron en autoclave a 121°C a 15 psi por 15 minutos, se dejaron enfriar hasta llegar a temperatura ambiente. Una vez con temperatura ambiente, utilizando la campana de flujo laminar y en condiciones estériles, se hizo la inoculación de un solo frasco utilizando un cultivo de *Bacillus subtilis* aislado previamente, tomando una colonia con la ayuda de un asa se inocula el caldo nutritivo, prosiguiendo a dejar el frasco en incubación a 35°C durante

72 horas. Para realizar un conteo de la concentración bacteriana en cámara de Neubauer, se hicieron diluciones de 1/10, 1/100 y 1/1000, tomando 1 ml de la solución madre, llevándolo a 9 ml de agua estéril, tomando 1 ml de esa solución y llevándolo a nuevamente a 9 ml de agua estéril y por último se repitió lo mismo para la última dilución, obteniendo la concentración de la dilución 1/10. Posteriormente y repitiendo el procedimiento se hizo inoculación de los frascos restantes, 10 de ellos se pusieron en incubadora y 27 se dejaron a temperatura ambiente, pudiendo observar mayor crecimiento de *Bacillus* en los frascos incubados. La fórmula aplicada para el conteo de concentración en la cámara de Neubauer fue:

$$\frac{\#UFC}{\# Cuadros} \times \frac{Cuadros}{L \cdot A \cdot P} \times \frac{1000mm^3}{cm^3} \times \frac{cm^3}{ml} \times FD \quad (1)$$

Aplicación del tratamiento y ensayos de muestras tomadas de los arboles

Se seleccionaron 7 árboles con separación de 2 a 3 metros mínimo, en la aplicación del tratamiento y conociendo la concentración bacteriana en los frascos inoculados de 3.14×10^8 UFC/ml, se tomaron 900ml y se diluyó a un volumen final de 20L, esta dilución fue aplicada de la siguiente manera: tres arboles de los seleccionados fueron escarbados cerca de la raíz y se aplicaron los 20L de la dilución, se taparon con tierra y nuevamente se agregó la mezcla. Otros tres arboles de los seleccionados fueron asperjados con rociadores, aplicando solo en las hojas y ramas la mezcla preparada de igual forma. Y finalmente un último árbol mezcló las 2 formas del tratamiento, con la finalidad de observar un mejor resultado. De estos árboles se tomaron muestras antes y después de aplicar el tratamiento con *Bacillus subtilis*, las muestras fueron de tierra cerca de las raíces, fruto y hojas con sintomatología las cuales fueron llevadas al laboratorio, haciendo una separación al colocar las que no contenían ningún tratamiento en refrigeración y las que habían sido tomadas después del tratamiento se dejaron a temperatura ambiente. Para los ensayos con las muestras de tierra se tomó 1 g con 9 ml de agua destilada, se mezcló hasta homogenizar y se hicieron diluciones hasta 10^{-5} , utilizando tubos Eppendorf con 900 μ m de agua estéril y tomando 100 μ m de la muestra madre, con estas diluciones se hizo inoculación en cajas Petri con agar nutritivo (AN) y agar papa dextrosa (PDA) para obtener un crecimiento de bacterias y hongos presentes en las muestras. Para el control se hizo rotulación de acuerdo con los árboles estudiados, si contenían *B. subtilis* y el medio en el que se sembraron. Cada árbol fue identificado como: A₁, A₂, A₃, A₄, A₅, A₆, de los cuales se obtuvieron muestras de: suelo, hoja, agua y fruto. Las hojas y el fruto fueron esterilizadas superficialmente con cloro al 3% durante 5 minutos, posteriormente se enjuagaban con agua estéril y se machacaba en un tubo Eppendorf con 900 μ m de agua estéril, esto para que rompiera el tejido vegetal y las bacterias u hongos que se encontraran en su interior pudieran salir, estas se llevaron hasta 10^{-3} y se procedió a inocular en medio AN y PDA por medio de vaciado y posterior extendiéndolo por un asa en L e incubando todo a 35°C.

IV. RESULTADOS

En la **Figura 1** se realizó la prueba de tinción de Gram para la identificación de *Bacillus subtilis*, observando una coloración violeta, indicando que lo observado microscópicamente tiene presencia de bacilos Gram positivos y confirmando que el cultivo cuenta con las características morfológicas del *Bacillus subtilis*.

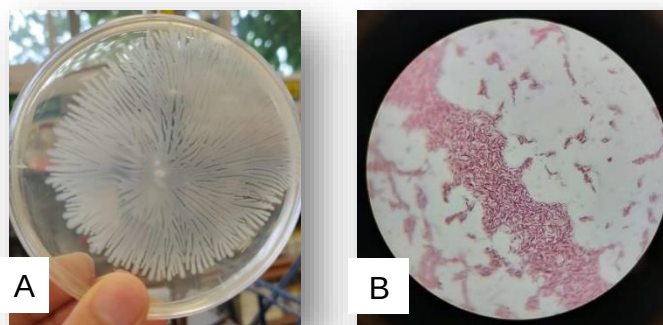


Fig. 1. A) Cultivo de *Bacillus subtilis* analizado B) Prueba de tinción de Gram para identificar presencia de *B. subtilis*.

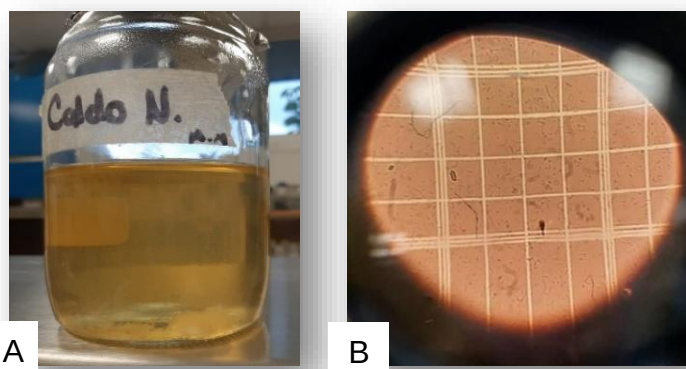


Fig. 2 A) Caldo inoculado con cultivo de *Bacillus subtilis*, observándose un precipitado propio de la bacteria. B) Cámara de Neubauer al microscopio, observándose los microorganismos para su conteo y cuantificación con la ecuación 1, obteniendo como resultado -3.14×10^{-8} UFC/ml.

En la siembra en medio AN y PDA de las muestras de agua que fueron tomadas de la sierra, presentaron optimo crecimiento de diversos microorganismos como lo fue la presencia de bacterias de la familia *Bacillus spp*, las cuales fueron identificadas a través de formas bacilares y siendo Gram positivas lo cual evita la hipótesis de que podría alterar el tratamiento empleado. En la **figura 3** se puede observar un crecimiento del hongo fitopatológico más óptimo cuando no hay aplicación del tratamiento con *Bacillus subtilis* y cuando si lo hay, confirmando la actividad antifúngica de estas bacterias que limitan el crecimiento del hongo.

El tratamiento tiene un mejor funcionamiento al aplicarse en ciclos, tratándose al tercer día de la primera aplicación, posteriormente al día 7 de la segunda aplicación. Los resultados en las hojas y frutos fueron similares, observando una mayor esporulación en las cajas con muestras que no fueron tratadas con *Bacillus spp*.

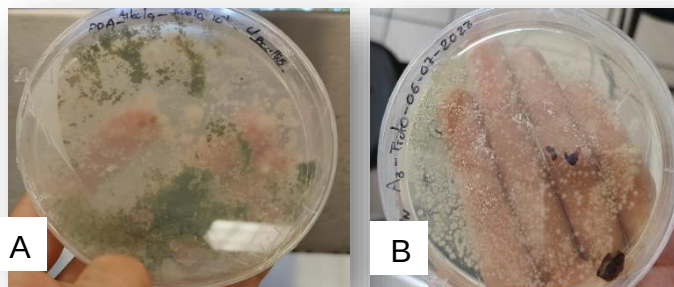


Fig. 3 A) Crecimiento de hongos en muestra de suelo sin tratamiento de *Bacillus subtilis*.

B) menor crecimiento en muestra con tratamiento

A través de la observación de los síntomas y con diversas consultas bibliográficas, se encontró presencia de la enfermedad antracnosis en los árboles de chirimoyo, la cual genera puntos de necrosis (manchas negras o marrones) y contorno de clorosis (contorno amarillento) como pudo observarse en la figura 5a y 5b, estos síntomas se presentan por la infección del hongo fitopatógeno que daña los cultivos e impide la maduración del fruto. No obstante, en la segunda toma de muestras se observó una disminución de los síntomas en los árboles de chirimoyo, notándose una decoloración en las manchas vistas la primera vez como se observa en la figura 5c.

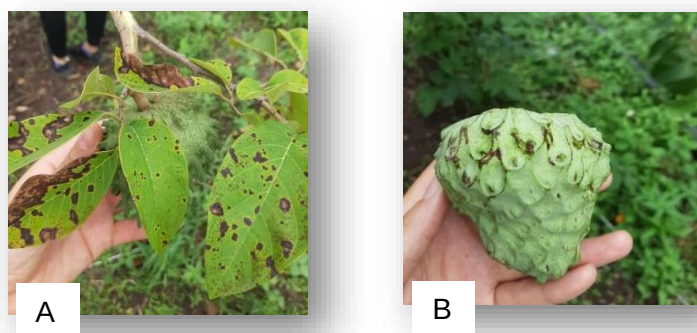


Fig. 2. A) Hojas de chirimoyo con síntomas de antracnosis. B) fruto de chirimoyo con síntomas de antracnosis

V. DISCUSIÓN (O ANÁLISIS DE RESULTADOS)

En el presente estudio se hicieron aplicaciones de un tratamiento de *Bacillus spp* por su actividad antifúngica en arboles de chirimoyo de la Sierra de Pénjamo, Guanajuato, presentando un antagonismo con hongos fitopatógenos que provocan la putrefacción de los frutos. Las muestras tomadas posteriormente de la aplicación del tratamiento fueron sometidas a pruebas in vitro que mostraron una limitación del crecimiento óptimo de los diversos hongos crecientes en comparación con las muestras tomadas sin tratamiento, siendo esto confirmado en un artículo publicados en la revista Mycobiology [5], en el cual se demostró la actividad antagónica entre hongos fitopatógenos y *Bacillus subtilis*, mostrando inhibición del crecimiento de diversos patógenos así como cambios en su morfología como daño, ruptura, distorsiones y morfología anormal en comparación al

control, sugiriendo que los antibióticos bacterianos producidos por la cepa de *Bacillus subtilis* podrían ser responsables de la inhibición del crecimiento del patógeno, de total forma que apoyan la hipótesis de presentan antagonismo frente al hongo fitopatógeno, sirviendo como un limitante del crecimiento óptimo de los hongos por la acción coordinada de enzimas hidrolíticas y lipopeptidos antifúngicos. [5] En este sentido, el tratamiento de *Bacillus subtilis* podría representar una alternativa de biocontrol contra hongos que dañan los árboles de chirimoyo, siendo necesario realizar más pruebas en campo e in vitro para confirmar que los resultados son repetibles y confiables.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El objetivo de esta investigación pudo cumplirse satisfactoriamente al lograr observar el antagonismo que provoca *Bacillus subtilis* frente a hongos fitopatógenos a través de pruebas realizadas en el laboratorio, siendo de gran importancia aumentar el interés en biofungicidas para el control de hongos que dañan los ecosistemas de climas tropicales, al ser una alternativa que en comparación con los productos químicos tiene muchas más ventajas y ayuda a la preservación de la biodiversidad, apoyando la hipótesis de lograr un control con *Bacillus subtilis*. No obstante, es necesario que se realicen más estudios para reforzar los resultados obtenidos, haciendo pruebas in vitro con plantas de chirimoyo de control e infectadas para tener un manejo de las variables que puedan interferir, también es importante realizar más aplicaciones del tratamiento en los árboles infectados y ver mejoría en los frutos cuando estos ya estén en una etapa de maduración ya que este estudio fue realizado cuando los frutos estaban verdes y el hongo no ha provocado su putrefacción.

VII. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Expreso mi agradecimiento a las personas encargadas de organizar el 24° verano de la ciencia que hacen posible estas oportunidades, al Instituto Tecnológico Superior de Abasolo por abrir las puertas de sus instalaciones y permitir mi estancia en el verano, un especial agradecimiento a la maestra María Rico Martínez por darme la oportunidad de colaboración en su maravilloso trabajo de investigación y por el apoyo y conocimiento brindado a cada momento de mi estancia, y a los compañeros con quienes estuve colaborando e investigando este proyecto.

BIBLIOGRAFIA

- [1] M. Úbeda, «Aislamiento e identificación de *Bacillus subtilis* y evaluación del antagonismo in vitro frente a hongos fitopatógenos,» *Revista científica Nexo*, vol. 30, nº 02, pp. 96-110, Noviembre 2017.
- [2] A. B. Pérez, *Antagonismo de Bacillus subtilis sobre hongos fitopatógenos y su efecto en capsicum spp.*, Conkal, Yucatán: Tecnológico Nacional de México, 2019.
- [3] M. Villarreal, E. Villa y L. Cira, «EL género Bacillus como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola,» *Revista mexicana de fitopatología*, vol. 36, nº 1, 2018.
- [4] J. J. C. Retona, *Cultivo de la anona (Annona cherimola, Mill)*, San José: MAG, 2007.
- [5] A. Abdelmoteleb, «Antifungal Activity of Autochthonous *Bacillus subtilis* Isolated from *Prosopis juliflora* against Phytopathogenic Fungi,» *Mycrobiology*, vol. 45, pp. 385-391, 2017.

EVALUACIÓN DEL CONTENIDO FENÓLICO Y ESTABILIDAD EN EL TIEMPO DE UN PROTOTIPO DE BEBIDA A BASE DE JUGO

Aguilar Medina Tessa Ximena

Instituto Tecnológico Superior de Purísima del Rincón

BLVD. del Valle 2301, Guardarrayas, 36425 Gto.

tessamedina15@gmail.com

Resumen — *Saccharum Officinarum* es un cultivo con gran versatilidad, por ello se llevó a el desarrollo de bebida refrescante, nutritiva, 100% natural, y que brinde efectos funcionales. Se realizaron pruebas fisicoquímicas, caracterización cualitativa de compuestos fenólicos y determinación de carga microbiana. Los resultados fisicoquímicos muestran un contenido de humedad (81%), sólidos disueltos (24° Bx), pH (5.05 a 4.9) y acidez (0.10 a 0.081 mg/100 mL ácido cítrico), el análisis cualitativo demostró la presencia de fenoles totales, antocianinas, flavonoides, cumarinas, quinonas. La presencia de compuestos fenólicos demuestra su valor nutricional, así mismo la calidad del jugo de caña de azúcar depende directamente de la materia prima, del tratamiento y manipulación antes, durante y después de su entrada al molino de extracción, lo que repercute directamente en sus propiedades fisicoquímicas y microbiológicas.

Palabras clave — Jugo de caña, Bebida funcionales, Vida útil de alimentos.

Abstract — *Saccharum Officinarum* is a crop with great versatility, which is why it led to the development of a refreshing, nutritious, 100% natural drink that provides functional effects. Physicochemical tests, qualitative characterization of phenolic compounds and determination of microbial load were carried out. The physicochemical results show a moisture content (81%), dissolved solids (24° Bx), pH (5.05 to 4.9) and acidity (0.10 to 0.081 mg/100 mL citric acid), the qualitative analysis showed the presence of total phenols, anthocyanidins, flavonoids, coumarins, quinones. The presence of phenolic compounds demonstrates its nutritional value, likewise the quality of sugar cane juice depends directly on the raw material, treatment and handling before, during and after entering the extraction, which directly affects its physicochemical and microbiological properties.

Keywords — Cane juice, functional beverage, Shelf life of foods.

I. INTRODUCCIÓN

El consumo de productos naturales que se caractericen por ser sanos, nutritivos y que de forma paralela ayuden a la reducción de enfermedades crónico-degenerativas, es aquí donde aparecen las llamadas Bebidas Funcionales que ofrecen un beneficio a la salud del consumidor. Los alimentos funcionales son aquellos destinados a ser consumidos como parte de la dieta normal y que contienen componentes biológicamente activos que ofrecen el potencial de mejorar la salud o reducir el riesgo de enfermedades; (R. Kaavya, 2018)

De aquí surge la necesidad de la empresa CeroMaya S.A.P.I de C.V. de buscar una alternativa para ampliar sus productos y mejor la calidad de los mismo, con la finalidad de posicionarse y ser competitivos dentro del mercado de las bebidas funcionales, por ello ha implementado la extracción 4.0 y desarrollado una bebida a base de jugo de caña de azúcar obtenido a través del Molino Exprimidor de Agave de Alta Eficiencia.

La empresa Cero Maya S.A.P.I. de C.V especializada en el diseño y construcción de maquinaria industrial para la transformación y conservación de productos alimenticios, ha desarrollado una bebida a base de jugo de caña de azúcar, sin embargo, la empresa no cuenta con el equipo, reactivos y personal capacitado en procesos e inocuidad alimentaria, esto marcó un inicio para la vinculación con el TecNM Campus Purísima del Rincón.

II. MARCO TEÓRICO (OPCIONAL)

El jugo de caña de azúcar es una importante bebida natural para la salud en los países subtropicales y tropicales. India es el segundo mayor productor de caña de azúcar después de Brasil. El tallo de la caña de azúcar consta de una corteza exterior de células de paredes gruesas que encierran tejido parenquimatoso más blando y haces vasculares; la corteza y los haces vasculares constituyen la porción fibrosa; y el parénquima constituye la médula (R. Kaavya, 2018)

Las células del parénquima contienen un jugo rico en azúcar y se rompen con facilidad; el líquido de alta pureza de estas células aparece por primera vez cuando se tritura inicialmente el tallo de la caña. La gran cantidad de jugo se puede encontrar en los haces vasculares relativamente resistentes que transportan nutrientes entre las raíces y las hojas de la planta; sin embargo, este jugo es diluido y de baja pureza y composición variable (Blackburn, 1984)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Físicoquímico

1) pH y grados brix

Las mediciones de pH del jugo se llevaron a cabo en diferentes tiempos, por triplicado, con un electrodo marca HANNA.

El Brix es una medida de la cantidad de sólidos disueltos que hay en un líquido. Un grado Brix es un gramo de sacarosa en 100 gramos de solución.

Las mediciones de grados Brix se llevaron a cabo por triplicado con un refractómetro

2) Acidez titulable

Se llevó a cabo una disolución de la muestra de jugo de caña en donde se consideró tener una razón 1:10, las diluciones se modificaban dependiendo de la disponibilidad del jugo y posterior se añadieron 5 gotas de fenolftaleína; esta muestra se llevó a titulación con NaOH 0.1 N hasta alcanzar un viraje color amarillo o rosa, los mililitros de NaOH fueron registrados para el posterior análisis mediante la siguiente fórmula:

(1)

$$\text{Acidez } g\% = \frac{V \times N \times mEq}{m} \times 100$$

En dónde:

V= mL de NaOH gastados.

N= normalidad de la solución NaOH

m= cantidad de muestra pesada

mEq= miliequivalente (correspondiente al ácido cítrico 0.064 g)

B. *Microbiológico*

1) *Mohos y levadura*

La preparación de las muestras para su posterior análisis microbiológico fue necesaria esterilización; se utilizó el criterio de preparar disoluciones del jugo a 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} y un concentrado, disoluciones preparadas de esta manera contemplando el posterior conteo en placa.

Se determinan el número de mohos y levaduras viables presentes en productos destinados al consumo humano por medio de la cuenta en placa, en donde el medio de cultivo necesario para el procedimiento fue agar papa- dextrosa. Se colocaron por duplicado en cajas Petri 1 ml de la muestra líquida y sus respectivas disoluciones, posterior se vertieron de 15 a 20 ml de agar papa dextrosa acidificado manteniéndolo a 45°C tomando en cuenta que en el momento que es vertido el medio de cultivo no se deben exceder 20 minutos, se mezcló cuidadosamente haciendo movimientos de ocho sobre una superficie lisa, se dejó que el medio solidificara en una superficie horizontal fría, se invirtieron las cajas y fueron colocadas en incubadora a 25°C, para el posterior análisis de resultados fue necesario el conteo en placa después de 3 y 5 días de incubación, seleccionando aquellas placas que contuvieran entre 10 y 150 colonias.

2) *Coliformes totales*

Se inoculan 5 tubos previamente preparados con 6 ml de caldo lauril sulfato con triple de su concentración, se le colocan 6 ml del jugo de caña de azúcar, incubándolos a 37°C durante 24-48 horas, se siembran con asa bacteriológica los tubos positivos en donde se encuentre presencia de gas, en caldo lactosa verde brillante bilis 2% y en caldo EC, cada tubo de caldo contiene 10 ml, los tubos inoculados en caldo lactosa verde brillante se incuban a 37°C por 24-48 horas, a diferencia de los que contienen EC se inoculan a 45°C por 24-48 horas, se realiza la lectura de los tubos positivos en tablas teniendo el NMP de coliformes totales en 100 ml de muestra, si hay tubos con presencia de gas (positivos) en caldo EC, se realiza la inoculación por estriado en placa de Agar EMB para la búsqueda de *Escherichia coli* y en Agar Salmonella Shigella, todos los tubos a utilizar contienen campanas Durham para observar la presencia de gas.

3) Mesófilos

La preparación de las muestras para su posterior análisis microbiológico fue necesaria esterilización; se utilizó el criterio de preparar disoluciones del jugo a 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} y un concentrado, disoluciones preparadas de esta manera contemplando el posterior conteo en placa.

Se determinó el número de mohos y levaduras viables presentes en productos destinados al consumo humano por medio de la cuenta en placa, en donde el medio de cultivo necesario para el procedimiento fue método estándar. Se colocaron por duplicado en cajas Petri 1 ml de la muestra líquida y sus respectivas disoluciones, posterior se vertieron de 15 a 20 ml de agar método estándar manteniéndolo a 45°C tomando en cuenta que en el momento que es vertido el medio de cultivo no se deben exceder 20 minutos, se mezcló cuidadosamente haciendo movimientos de ocho sobre una superficie lisa, se dejó que el medio solidificara en una superficie horizontal fría, se invirtieron las cajas y fueron colocadas en incubadora a 37°C, para el posterior análisis de resultados fue necesario el conteo en placa después de 24-48 días de incubación, seleccionando aquellas placas que contuvieran entre 10 y 150 colonias.

C. Análisis cualitativo de compuestos fitoquímicos

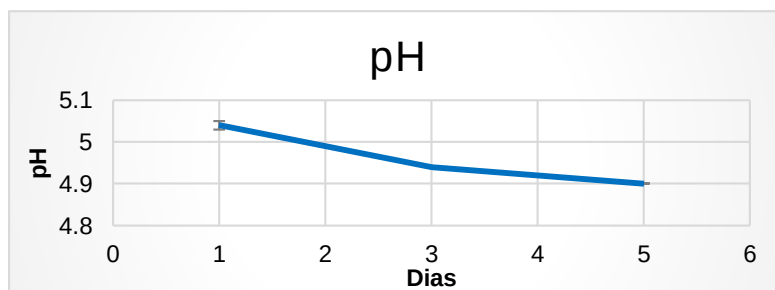
Para la identificación de compuestos fitoquímicos presentes en el jugo se determinaron por medio de la estimación del color; para llevar a cabo este análisis fue necesario hacer disoluciones de las muestras del jugo a 12°Bx.

IV. RESULTADOS

A. Físicoquímico

1) pH y grados brix

Tabla 1. Datos obtenidos de pH



Las mediciones de grados Brix se llevaron a cabo por triplicado con un refractómetro

Tabla 2. Datos obtenidos de grados Brix

	1	Promedio	des.est	3	Promedio	des.est	5	Promedio	des.est
Muestra 1	23	23.5	0.5	23.9	23.966667	0.05773503	24	24	0
Muestra 2	23.5			24			24		
Muestra 3	24			24			24		

2) *Acidez titulable*

Se realizaron diferentes disoluciones de la muestra de jugo de caña para así tener un triplicado, en concentración 10:90 v/v jugo de caña y agua.

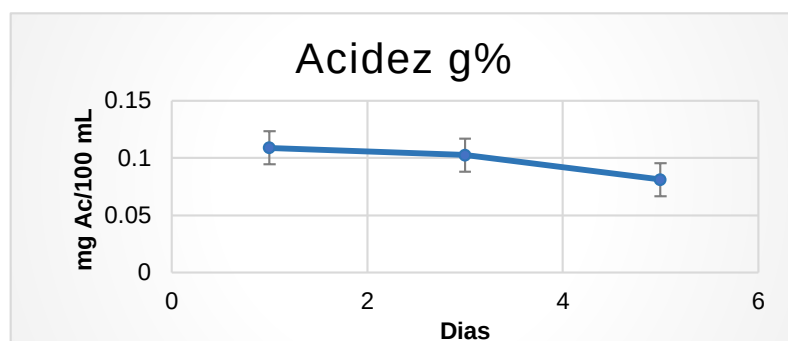


Fig. 1. Porcentaje de acidez

B. *Microbiológico*

Tabla 3. Resultados obtenidos de hongos y levaduras y mesófilos

	<i>Hongos y levaduras UFC/ml</i>	<i>Mesófilos UFC/ml</i>
1	6500	1120
3	12 700	1300
5	14000	Incontable

Tabla 4. Resultados de coliformes totales

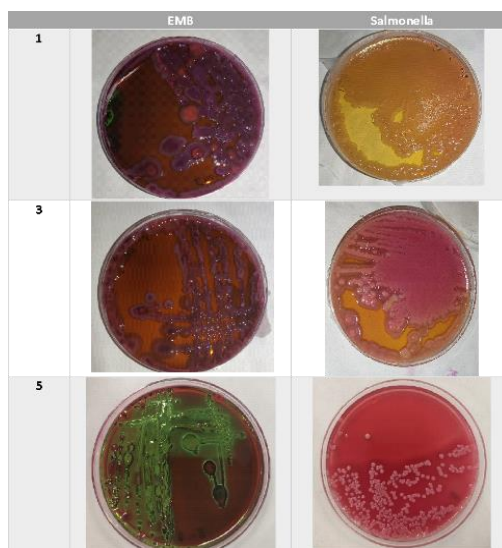
C. *Análisis cualitativo de compuestos fitoquímicos*

Tabla 5. Análisis fitoquímico

Análisis fitoquímico	
Pruebas	Resultados
Alcaloides	Negativo
Flavonoides	Positivo
Antocianinas	Positivo
Quinonas	Positivo
Cumarinas	Positivo
Antocianidinas	Positivo
Fenoles totales	Positivo

V. DISCUSIÓN (O ANÁLISIS DE RESULTADOS)

Las propiedades funcionales del jugo de caña están conformadas con una serie de compuestos que tienen y que dan lugar al color característico de la caña esto por la presencia de clorofila y compuestos fenólicos encargados de darles la actividad antioxidante y biológica. Se presenta como alternativa el consumo de jugo de caña para aumentar la ingesta de polifenoles o de compuestos antioxidantes, esas propiedades están relacionadas con la capacidad de eliminación de radicales libres, eliminar la peroxidación de algunos lípidos y con efectos profiláctico para algunas resistencias de infecciones virales o bacterianas que permite de cierta manera experimental considerar como un alimento funcional.

Dada a la cantidad de carbohidratos que tiene el jugo es el sustrato perfecto para desarrollar el metabolismo propio del crecimiento de bacterias, la reducción de los azúcares provocaran la disminución de pH lo que ocasionara una mayor producción de bacterias en un tiempo determinado, ya que contarán con un ambiente óptimo para su producción, esto nos permite detectar como indicador que las buenas prácticas sanitarias, se deben tomar en cuenta para obtener un producto inocuo, ya que al parecer la materia prima no se está tratando con los parámetros adecuados.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La calidad del jugo de caña de azúcar depende directamente de la materia prima, del tratamiento y manipulación antes, durante y después de su entrada al molino de extracción, lo que repercute directamente en sus propiedades fisicoquímicas y microbiológicas.

Se detecta la presencia de compuestos fenólicos a los cuales se le puede atribuir propiedades antioxidantes, sin embargo, tienden ser susceptibles a ser oxidados impidiendo la catálisis de reacción antioxidantes.

Utilizar jugo de caña fresco para la caracterización fisicoquímica del jugo de caña para que los resultados sean los idóneos al momento de realizar los análisis correspondientes.

Para facilitar el desarrollo e implementación de las Buenas Prácticas de Manufactura se recomienda la realización de taller en el cual se refuerce la importancia de la sanidad de los alimentos.

VII. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Este proyecto es posible gracias al financiamiento de la convocatoria Mentefactura, sub-modalidad Ciencia Productiva 2022 del estado de Guanajuato.

Asimismo, agradecemos el apoyo permanente del TecNM Campus Purísima del Rincón y la empresa CeroMaya S.A.P.I. de C.V. al proporcionar el Molino Exprimidor de Agave de Alta Eficiencia para la obtención del jugo de caña.

REFERENCIAS

- [1] Blackburn, F. (984). *Sugarcane, tropical agriculture series*. London: Longman Inc.
- [2] R. Kaavya, R. P. (17 de mayo de 2018). *SpringerLink*. Obtenido de <https://link.springer.com/article/10.1007/s12355-018-0622-2>
- [3] Selvamuthukumar, M., & Pathak, Y. V. (2020). Flavor development for functional foods and nutraceuticals. En M. Selvamuthukumar, & Y. V. Pathak, *Flavor development for functional foods and nutraceuticals* (págs. 23- 25). U.S: Taylor & Francis Group, LLC.

DETECCIÓN MOLECULAR *BABESIA CABALLI* Y *THEILERIA EQUI*, CAUSANTES DE LA PIROPLASMOSIS EQUINA

Alejandra Carapia Pacheco

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Av. De las Ciencias S/N
C.P. 76230, Querétaro, Qro.
acarapia26@alumnos.uaq.mx

Juan Joel Mosqueda Gualito

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Av. De las Ciencias S/N
C.P. 76230, Querétaro, Qro.
joel.mosqueda@uaq.mx

Resumen — En este proyecto se analizaron muestras de sangre de équidos expuestos a garrapatas. Para la detección molecular de los agentes etiológicos de la piroplasmosis equina que son *Babesia caballi* y *Theileria equi*. Se extrajo el DNA utilizando un kit comercial y se utilizó un protocolo de nPCR. Se logró estandarizar la nPCR para las dos especies pues se obtuvieron amplicones en las muestras de los controles positivos para *B. caballi* y *T. equi* pero no se observó amplificación en las muestras de caballos usadas como controles negativos. Estos resultados permitirán implementar estas pruebas moleculares en futuras investigaciones.

Palabras clave — Piroplasmosis equina, nPCR, Extracción de DNA, *Babesia caballi*, *Theileria equi*.

Abstract — In this project, blood samples from equids exposed to ticks were analyzed. For the molecular detection of the etiological agents of equine piroplasmosis which are *Babesia caballi* and *Theileria equi*. DNA was extracted using a commercial kit and an nPCR protocol was used. Standardized nPCR was achieved for the two species as amplicons were obtained in the positive control samples for *B. caballi* and *T. equi* but no amplification was observed in the horse samples used as negative controls. These results will allow the implementation of these molecular tests in future research.

Keywords — Equine piroplasmosis, nPCR, DNA extraction, *Babesia caballi*, *Theileria equi*.

I. INTRODUCCIÓN

La piroplasmosis equina es una enfermedad transmitida por garrapatas ixódidas que afecta a los équidos dentro de los cuales se incluyen los asnos, mulas, cebras y caballos. Los agentes etiológicos de esta enfermedad son *Theileria equi* y *Babesia caballi* dos hemoparásitos intracelulares del Phylum Apicomplexa (Rothschild, 2013). Los signos clínicos desarrollados por estos dos protozoarios son muy similares entre los que se encuentran la fiebre, pérdida del apetito, anorexia, taquicardia, esplenomegalia, anemia hemolítica e ictericia. Los animales infectados que se logran recuperar de la infección aguda permanecen persistentemente infectados convirtiéndose en reservorios de la enfermedad (Scoles & Ueti, 2015). Debido a que los porcentajes de parasitemia son tan bajos en estos animales es difícil realizar un diagnóstico por métodos tradicionales como lo es la identificación por microscopia con frotis teñidos con tinción de Giemsa. Sin embargo, son útiles otras técnicas con mayor sensibilidad como la ELISA (Cantú-Martínez et al., 2012) o métodos moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2022).

El objetivo de este trabajo fue obtener muestras de équidos expuestos a garrapatas y estandarizar la reacción en cadena de la polimerasa anidada (nPCR) para la detección molecular de *Babesia caballi* y *Theileria equi*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Extracción de DNA de sangre con DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN)

Materiales

- Viales estériles de 2 ml
- Viales estériles de 1,5 ml
- Columnas DNeasy Mini Spin
- Micropipetas: 20, 100, 200 y 1.000 µl
- Puntas estériles para pipetas de 20, 100, 200 y 1.000 µl
- Gradilla para viales de 1,5 ml
- Guantes de látex o de nitrilo
- Cronómetro
- Frascos de descarte
- Tubos colectores
- Papel absorbente

Reactivos

- Buffer ATL (buffer de lisis)
- Proteinasa K (15 mg/ml)
- Buffer AL (solución amortiguadora con sal caotrópica)
- Etanol 100 %
- Buffer AW1 (buffer de lavado)
- Buffer AW2 (buffer de lavado)
- Buffer AE (buffer de elución)

Se realizaron extracciones de DNA de tres muestras distintas de sangre con EDTA que estaban congeladas desde el 2018.

Protocolo para la extracción de DNA con Dneasy Blood & Tissue kit (QIAGEN) para muestras de sangre.

1. Se colocaron 20µl de proteinasa K en el fondo de un tubo de 1.5 ml.
2. Se agregaron 100µl de muestra de sangre anticogulada.
3. Se ajustó volumen con PBS (estéril) a 220µl (100µl de PBS).
4. Se añadieron 200µl de buffer AL y se mezcló en vortex hasta homogenizar.
5. Se incubaron 10 min. a 56°C.
6. Se agregaron 200µl de etanol °B y se mezcló en vortex.
7. Se cargó la muestra en una columna y se ensambló a un tubo colector.
8. Se centrifugaron a 8000rpm durante 1 min.

9. Con cuidado se descartó el líquido del tubo colector y se ensambló la columna.
10. Se añadieron 500µl de buffer Aw1.
11. Se centrifugaron a 8000rpm durante 1 min.
12. Se descartó el líquido del tubo colector y se ensambló la columna
13. Se añadieron 500µl de buffer Aw2.
14. Se centrifugaron 3 min. a 13,000 rpm.
15. Se descartó el líquido y el tubo.
16. Se colocó la columna en un tubo de 1.5ml.
17. Se agregaron 200µl de buffer AE
18. Se incubó 5 min. a temperatura ambiente.
19. Se centrifugaron a 8000rpm durante 1 min.
20. Se almacenaron a -20°C.

Posteriormente se comprobó la integridad del DNA por electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución buffer de corrida TAE. Se realizó a un voltaje constante de 80 volt/cm durante 40 min, se utilizó como indicador de peso molecular 1Kb. Para su visualización se realizó en el ChemiDoc de BioRad.

B. PCR anidada

- Equipo
 - Termociclador
 - Vortex
 - Micropipetas de 2, 20, 100 y 200 µl
 - Microcentrífuga
 - Fotodocumentador
- Material
 - Guantes desechables de látex, vinil o nitrilo
 - Tubos para PCR
 - Puntas para micropipetas
 - Hielo
 - Gradilla
- Reactivos
 - Muestra de ADN que contenga la región que se desea amplificar
 - Buffer o solución amortiguadora
 - Cloruro de Magnesio (MgCl₂)
 - Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs)
 - *Taq* polimerasa
 - Agua destilada o desionizada estéril

La PCR anidada para *B. caballi* se basó en el protocolo descrito por Schwint *et al.* (2008) del gen *rap 1*. Los iniciadores fueron los siguientes:

Rap 1 iniciadores externos:

Forward: BcRap1-exF 5'-GATTACTTGTCGGCTGTGTCT-3';

Reverse: BcRap1-nestR 5'-CGCAAGTTCTCAATGTCAG-3

Los cuales amplifican un fragmento del nucleótido 165 al 778.

Rap1 iniciadores internos:

Forward: BcRap1-intF 5'-GCTAAGTACCAACCGCTGA -3';

Reverse: BcRap1-nestR 5'-CGCAAGTTCTCAATGTCAG-3

Estos amplifican un fragmento de 222 pb. (Schwint, 2008, como fue citado en Salinas, 2017).

Para la reacción externa se preparó un pul con un volumen de 96µl, utilizando 50µl de 1x MyTaq Mix, 8µl de primer BcRap1-exF, 8µl de primer BcRap1-nestR y 30µl H₂O °B (agua grado biología molecular). Posteriormente se alicuotaron en 7 tubos de 200µl, a cada tubo se le agregó 12µl del mix preparado, después a cinco tubos se les agregó .5µl de DNA de distintas muestras, a un tubo se le agregó .5µl de H₂O °B (control negativo) y a un tubo no se le agregó muestra.

El protocolo de termociclado fue el siguiente:

95°C por 3 min

30 ciclos:

95°C por 20 seg

60°C por 20 seg

72°C por 10 seg

72°C por 5 min

10°C final

Para la reacción interna (anidada) se preparó un pul de 96µl, utilizando 50µl de 1x MyTaq Mix, 8µl de primer BcRap1-intF, 8µl de primer BcRap1-nestR y 30µl H₂O °B. Posteriormente se alicuotaron en 7 tubos de 200µl, a cada tubo se le agregó 12µl del mix preparado, después a cinco tubos se le adicionó .5µl de DNA procedentes de la reacción externa, a un tubo se le adicionó .5µl del control negativo procedente de la reacción externa y al último tubo se le agregó .5µl del mix procedente de la reacción externa que no tenía ninguna muestra.

El protocolo de termociclado fue el siguiente:

95°C por 3 min

25 ciclos:

95°C por 20 seg

60°C por 20 seg

72°C por 10 seg

72°C por 5 min

10°C final

La resolución de los fragmentos de la nPCR se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución buffer de corrida TAE. Se realizó a un voltaje constante de 50 volt/cm durante 50 minutos, se utilizó como indicador de peso molecular 1Kb. Para la visualización de los fragmentos se realizó en el ChemiDoc de BioRad.

C. Muestreo en campo

Equipo

- Centrífuga
- Pipetas de 1000µl
- Material
- Puntas para pipeta estériles
- Tubos Vacutainer con EDTA y con activador de coagulación
- Agujas para tubos Vacutainer
- Camisas para tubos Vacutainer
- Tubos Eppendorf
- Torundas de algodón con alcohol

Se realizó un muestreo en el municipio de Jalpan de Serra en el estado de Querétaro para la obtención de sangre completa, suero y garrapatas de caballos que estuvieran en libre pastoreo o en contacto directo con el vector de *B. caballi*.

Dichas muestras se obtuvieron a través de punción en la vena yugular.



Fig. 1. Toma de muestra sanguínea por punción de vena yugular en equino

III. RESULTADOS

A. Extracción de DNA de sangre con Dneasy Blood & Tissue kit (QIAGEN)

La extracción de DNA se realizó en tres muestras de sangre con EDTA que fueron tomadas en 2018. Dichas muestras estaban etiquetadas de la siguiente manera: Muestra 1- *T. equi*. Muestra 2- *B. caballi*. Muestra 3- 273754. Se respetó este orden para las muestras.

Las muestras que estaban etiquetadas con *T. equi* y *B. caballi* es porque cuando las tomaron hicieron frotis y es lo que observaron, pero no realizaron ninguna prueba molecular para confirmar.

Integridad de DNA del día 07-07-2022



Fig. 2. Carril 1 Marcador de peso molecular, carril 2 Muestra 1-1, carril 3 Muestra 2-1, carril 4 Muestra 3-1.

Las muestras se etiquetaron de esta manera para referirnos al 1 como el primer día de extracción y 2 como el segundo día.

Por la poca fragmentación de las muestras 2 y 3, se decidió repetir la comprobación de la integridad y estos fueron los resultados:

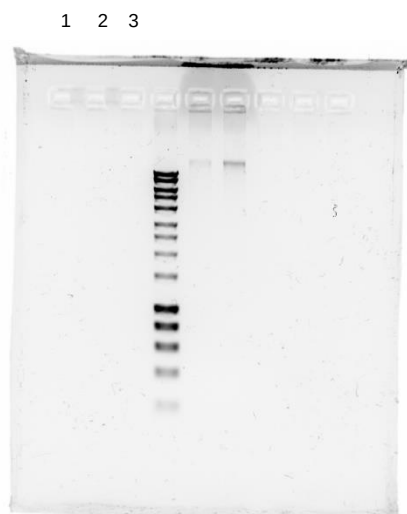


Fig. 3. Carril 1 Marcador de peso molecular, carril 2 Muestra 2-2, carril 3 Muestra 3-2.

Con esta comprobación de integridad se decidió hacer la nPCR, dando estos resultados:

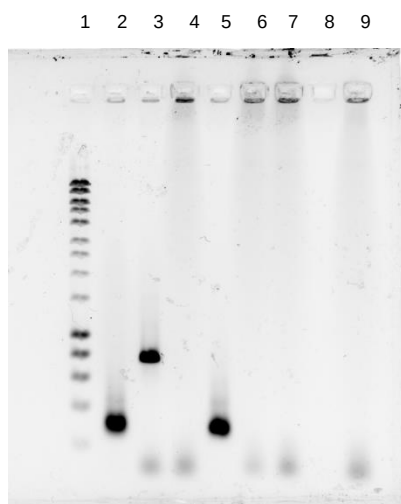


Fig. 4. Carril 1 Marcador de peso molecular, carril 2 Muestra 2-1, carril 3 Muestra 1-1, carril 4 Muestra 3-1, carril 5 Muestra 2-2, carril 6 Muestra 3-2, carril 7 Muestra sin DNA, carril 8 vacío, carril 9 Muestra con H₂O °B.

De las tres muestras que se manejaron la Muestra 1-1 fue positiva a la presencia de DNA de *T. equi*, la muestra 2-1 y 2-2 (es la misma muestra, solo diferente día de extracción de DNA) fueron positivas al DNA de *B. caballi*, la muestra 3-1 y 3-2 (misma muestra, diferente día de extracción de DNA) fue negativa. Los controles negativos no presentaron contaminación.

Estos resultados nos permitieron obtener nuevos controles positivos para estos agentes etiológicos y poder utilizarlos en siguientes investigaciones de dicha enfermedad.

IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Dado que este trabajo fue realizado con muestras del año 2018, no tenemos datos completos de los animales muestreados, ni los lugares donde fueron tomadas las muestras, por lo que no sabemos con exactitud que género y especie de garrapata fueron los transmisores de dichas enfermedades.

Esta es una gran área de oportunidad ya que se deben considerar estudios sobre la transmisión de la enfermedad por los distintos géneros y especies de garrapatas que hay presentes en el país, además de conocer su prevalencia.

V. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Agradezco por esta gran oportunidad al Dr. Juan Mosqueda por recibirme en esta breve estancia en el Laboratorio de Inmunología y Vacunas. Al Dr. Diego Hernández por el apoyo brindado en el laboratorio. A los tesisistas Carlos Rivera y Mayra Becerra por asesorarme y acompañarme en esta estancia.

REFERENCIAS

- [1] Camacho-Nuez, M., Hernández-Silva, D. J., Castañeda-Ortiz, E. J., Paredes-Martínez, M. E., Rocha-Martínez, M. K., Alvarez-Sánchez, M. E., Mercado-Curiel, R. F., Aguilar-Tipacamu, G., & Mosqueda, J. (2017). Hap2, a novel gene in *Babesia bigemina* is expressed in tick stages, and specific antibodies block zygote formation. *Parasites & Vectors*, 10(1), 568. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2510-0>
- [2] Cantú-Martínez, M. A., Segura-Correa, J. C., Silva-Páez, M. L., Avalos-Ramírez, R., & Wagner, G. G. (2012).
- [3] Prevalence of Antibodies to *Theileria equi* and *Babesia caballi* in Horses From Northeastern Mexico. *Journal of Parasitology*, 98(4), 869–870. <https://doi.org/10.1645/GE-3064.1>
- [4] Cooperación Técnica MAPA/OPS/PANAFTOSA. (2017). *Manual veterinario de toma y envío de muestras: Manual técnico* (1º). PANAFOTSA-OPS/OMS.
- Cultivos y Productos de Ganadería, FAOSTAT. (2020). <https://www.fao.org/faostat/es/#data/OCL/visualize>
- [5] Perera Carmen Laura & Acevedo Ana María. 09/12/2017. Nuevas tendencias en el diagnóstico de enfermedades virales en los animales. *Revista de Salud Animal*. Vol. 40.
- [6] Márquez-Valdelamar, L. M, A. Serrato-Díaz y R. Cerritos-Flores. 2013. Secuenciación de fragmentos de ADN. En: A. Cornejo-Romero, A. Serrato-Díaz, B. Rendón-Aguilar y M. G. Rocha-Munive (eds.). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*.
- [7] Salinas Estrella Elizabeth. 2017. *Estudio prospectivo inmunomolecular de la presencia de Babesia caballi y Theileria equi en México*. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México]. Repositorio Institucional- Universidad Nacional Autónoma de México.

ANÁLISIS DE FERTILIZANTE ORGÁNICO VERSUS QUÍMICO

Paola Villa Tenorio

Instituto Tecnológico del sur de
Guanajuato Av. Educación superior 2000
d19120291@alumnos.itsur.edu.mx

Jorge Avalos Carrillo

Instituto Tecnológico del sur de
Guanajuato Av. Educación superior 2000
j.avalos@itsur.edu.mx

Resumen

Para las ciencias agrarias son de gran utilidad los datos experimentales por mejorar el uso de los recursos hídricos y algunos otros. El objetivo de este trabajo es diseñar la comparación de un fertilizante orgánico versus un inorgánico o químico, en el cultivo de tomate o jitomate rojo se analizó el comportamiento del desarrollo y crecimiento de la planta para evaluar el rendimiento de estos fertilizantes. Los resultados fundamentales es que no existe diferencias significativas al 95% de confianza entre el tratamiento y el testigo, en las variables asociadas al desarrollo fisiológico o crecimiento de la planta y si existe diferencias significativas respecto a las variables de rendimiento.

Palabras clave: tomate, Orgánico, Químico, Experimento

Experimental studies are very useful in the agricultural sciences. The main objective of the study is to compare the use of organic fertilizer against chemical, in banana cultivation, to analyze the behavior of physiological development or plant growth and yield of banana. Normal, parametric and non-parametric tests were used. The fundamental results are that there is no significant difference at 95% confidence between the treatment and the control, in the associated variables the physiological development or growth of the plant and if there are significant differences with respect to the performance variables

Keywords tomatoe, Organic, Chemical, Experiment

I. INTRODUCCIÓN

Bajo la óptica de la sustentabilidad y la ecología se fundamenta el desarrollo del alimento para la subsistencia de la vida humana y no humana, garantizando la integridad de los ecosistemas respetando su importancia y necesidad de conservarlos hoy llamado “desarrollo sustentable”.

Este concepto se sustenta en dos dimensiones fundamentales, económica de la sustentabilidad, la cual trata de mantener el desarrollo económico y el bienestar del ser humano y social de la sustentabilidad, entendida esta como, los lazos indisolubles, la estabilidad social y cultural del hombre. Dentro de los factores de mayor agresividad al ecosistema se encuentran los fertilizantes donde el hombre está en la búsqueda de soluciones alternativas que garanticen una producción más limpia. “La introducción de fertilizantes de origen orgánico resulta de suma importancia en los momentos actuales en que se dan pasos para cambiar la llamada agricultura moderna, por la agricultura biológica o agroecológica. El uso de abonos orgánicos constituye una práctica común en la agricultura en varios países del mundo, debido fundamentalmente al papel crucial que estos cumplen en la nutrición de los cultivos agrícolas y su influencia en la actividad

fisiológica de las plantas el desarrollo de un marco referencial que usa la interdisciplinariedad para evaluar los sistemas socio ecológico. El uso de fertilizante orgánico, vista desde sus dos dimensiones, es más que una moda o una exigencia gubernamental, los seres humanos necesitan del cuidado del medio ambiente para poder subsistir ante un mundo globalizado, donde las superproducciones, basadas en químicos, no garantizan la sustancia y existencia, en última instancia, de la especie humana.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento tuvo las siguientes características:

- 1) Homogeneidad del suelo donde se realizó el experimento
- 2) Control de las variables: Altura de la planta, diámetro de la planta, número de hojas y número de hijos, en lo relacionado a desarrollo fisiológico o crecimiento de la planta y peso del racimo, número de mano, número de dedos y medida del tallo asociado al rendimiento.
- 3) Se realizaron dos mediciones una llamada “tratamiento” y la otra “testigo” consistente en la aplicación de Fertipotásico: 300 gr/plantas, Fertihumico: 2 litros disueltos en 200 litros de agua por hectárea y Muriato de Potasio: 200 gr/planta, Urea: 100gr/planta, respectivamente.
- 4) En ambas mediciones las plantas fueron seleccionadas al azar y existe homogeneidad de varianza en las mismas.
- 5) Todas las mediciones fueron realizadas por un personal capacitado, lo que disminuye el sesgo en la recogida de la información
- 6) Tiene variable causa o independiente (tratamiento orgánico) y la variable efecto o dependiente (testigo con químicos), en ambas hipótesis.

III. RESULTADOS

Primer momento: variables asociadas al desarrollo fisiológico de la planta o crecimiento. En este tipo de estudio las variables son cuantitativas o de razón, donde uno de los requisitos fundamentales para la comparación de medias, es cumplir que las variables que se están analizando: altura de la planta, diámetro de la planta, número de hojas, número de hijos, peso del racimo, número de manos, número de dedos y medida del tallo, siguen una distribución normal.

TIPO DE MEDICION					
		ESTADISTICO	gl	seguimiento	Diferencia pendiente
TRATAMIENTO	ALTURA DE LA PLANTA	0.085	140	0.014	
	DIAMETRO EN CENTIMETROS DE LA PLANTA	0.069	140	0.045	

TESTIGO	NUMERO DE HOJAS	0.148	140	0,002	
	NUMERO DE HIJOS PORPLANTA	0.442	140	0,004	
	ALTURA DE LA PLANTA	0.067	140	0.002	
	DIAMETRO EN CENTIMETROS DE LA PLANTA	0.093	140	0.005	
	NUMERO DE HOJAS	pendiente	140	pendiente	
	NUMERO DE HIJOS PORPLANTA	pendiente	140	pendiente	

IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este momento no se realiza el análisis, de forma análoga al anterior, por las características del estudio, es decir, solo es objeto de estudio, el resultado final de la producción la cual no se realiza por meses. El resultado en la tabla, se interpreta en dos pruebas, una, la asociada al test de crecimiento, donde todos los resultados coinciden con que existe homogeneidad de las varianzas, debido a que, todas las probabilidades asociadas al estadígrafo, son mayores que 0,05. La segunda prueba, es el correspondiente a la comparación de medias para muestras independientes y los resultados tienen la misma interpretación, es decir, existe diferencias significativas entre las variables coligadas al “tratamiento” y al “testigo”, pues todas las probabilidades asociadas al estadígrafo son menores que 0,05. Donde este tipo de fertilizante orgánico muestra rendimientos y calidad del producto, por encima de los fertilizantes químicos. La hipótesis 2, se cumple si se tienen en cuenta estos resultados, por lo que se puede afirmar con un nivel de 5% de significación que el rendimiento del tratamiento es mejor que el del testigo.

REFERENCIAS

Heizer, J., & Render, B. (s.f.). Principios de administración de operaciones (septima ed.). Mexico: Pearson.
 SALUD, S. D. (s.f.). <https://blogthinkbig.com/importancia-compartir-globalmente-investigacion-covid-19>.

EXTRACCIÓN DE RNA DE HONGOS FITOPATÓGENOS PARA UNA POSTERIOR EVALUACIÓN DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN

Juan Emmanuel Becerra Ramírez

Instituto Tecnológico de México en Celaya
Antonio García Cubas Pte. #600
Esq. Av. Tecnológico, Celaya, Guanajuato,
Gto.
19030290@itcelaya.edu.mx

Luis Ángel Xoca Orozco

Instituto Tecnológico Superior de Purísima
del Rincón
Blvd. Del Valle 2301, Guardarrayas
Cp. 36425, Guanajuato, Gto.
luis.xo@purisima.tecnm.mx

Resumen — En este trabajo se presenta la implementación de diferentes métodos de extracción de material genético de hongos fitopatógenos, con el fin de obtener ARN de calidad aceptable y de una concentración considerable. Se siguieron dos métodos de extracción: TRI-Reagent y método de CTAB modificado por Bekesviova et al (1999), resultando que el método de CTAB en comparación con el método de TRI-Reagent se obtuvo una extracción de ARN con mayor concentración. Si se requiere extraer material genético de hongos fitopatógenos en una concentración aceptable el método de CTAB modificado por Bekesviova et al (1999) es una opción óptima.

Palabras clave — Extracción, ARN, Electroforesis, calidad.

Abstract — This paper presents the implementation of different methods for extracting genetic material from phytopathogenic fungi, in order to obtain RNA of acceptable quality and of considerable concentration. Two extraction methods were followed: TRI-Reagent and the CTAB method modified by Bekesviova et al (1999), resulting in the CTAB method compared to the TRI-Reagent method, an RNA extraction with higher concentration was obtained. If it is required to extract genetic material from phytopathogenic fungi in an acceptable concentration, the CTAB method modified by Bekesviova et al (1999) is an optimal option.

Keywords — Extraction, ARN, Electrophoresis, quality.

I. INTRODUCCIÓN

Los hongos fitopatógenos son un problema nacional que causan problemas económicos, puesto que estos dañan a los cultivos provocando daños significativos y reduciendo la cantidad de producto para su posterior venta. El uso de fungicidas químicos es una de las mejores opciones eficaces para el control de estos microorganismos, pero teniendo como desventaja que estos fungicidas tienen un impacto ambiental considerable. El desarrollo de fungicidas que sean de origen natural ha sido uno de los objetivos de los investigadores nacionales en la actualidad.

El muérdago (*Psittacanthus calyculatus*) es una planta hemiparásita que crece y se desarrolla sobre varias especies de árboles frutales y forestales en el centro y sur de México [1]. Se ha determinado de manera experimental que la planta parásita del muérdago

mexicano (*P. calyculatus*) contiene grupos funcionales que han presentado actividades antimicrobianas [2]. Por lo que ha sido objeto de estudio para los investigadores del Tecnológico de Purísima del Rincón, puesto que no se encontró algún documento el cuál se haya reportado la actividad antifúngica de los extractos de *P. calyculatus*, por lo que se abrió una línea de investigación, en donde obtuvo el extracto. Se experimentaron con *Fusarium* spp y *Colletotrichum gloeosporioides* (aislados de un Viñedo el Lobo en Purísima del Rincón Gto) las muestras que se obtuvieron de estos hongos se cultivaron junto con los extractos teniendo las siguientes muestras: *Fusarium* spp control +, *Fusarium* spp 20 % acuoso, metanolico, *Fusarium* spp 10% acuoso, metanolico, *Colletotrichum gloeosporioides* control +, *Colletotrichum gloeosporioides* 20% acuoso, metanolico, *Colletotrichum gloeosporioides* 10% acuoso, metanolico (las muestras se inocularon en medios líquidos), encontrando que este extracto influyo en que el crecimiento fuera menor. Es importante tener un pretratamiento con la muestra, ya que la molécula del ARN es inestable por lo que tiene que estar en condiciones específicas para que este en buenas condiciones.

En la búsqueda de una explicación más concreta del porque es que este extracto puede inhibir el desarrollo de las dos especies de hongos fitopatógenos, se realizara la extracción de ARN, para la extracción de esta molécula. Se tienen diferentes métodos; algunos de ellos son: Método de TRI-Reagent, Método CTAB modificado por Bekesiova et al (1999), Método de Terbutanol por da Silva et al (2003). Al menos un método de extracción nos permitirá obtener material genético (ARN) de buena calidad, íntegro y de una concentración adecuada para poder utilizarlo evaluaciones futuras.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de la extracción del ARN se dividió en dos etapas:

a) Pretratamiento de la muestra

Materiales:

- Morteros estériles y a -20°C
- Pistilos estériles y enfriados a -20°C
- Tubos eppendorf estériles y enfriados a -20°C
- Tubos Falcón de 50ml estériles y enfriados a -20°C
- Hielo seco
- Espátulas estériles

Procedimiento:

Las muestras se sometieron a centrifugación a -4°C, posteriormente se retiró el sobrenadante, el precipitado se vertió en el mortero previamente esterilizado y enfriado con hielo seco, se molió, cuando la muestra se observe que se encuentra como un polvo fino se pasa a un tubo eppendorf y después se pasa a un tubo falcón estéril. Se resguardaron con el hielo seco en un congelador a -20°C.

b) Extracción de ARN

Método de TRI-Reagent :

Materiales:

- Morteros estériles y enfriados a -20°C
- Pistilos estériles y enfriados a -20°C
- Micropipetas
- Puntas para micropipeta estériles y enfriadas a -20°C
- Tubos eppendorf estériles y enfriados a -20°C
- Gradilla para tubos eppendorf enfriada a -20°C
- Tubos falcón de 50ml estériles y enfriados a -20°C

Reactivos:

- Reactivo Trizol
- Cloroformo
- Alcohol Isopropanol
- Agua Estéril

Procedimiento:

El material fúngico recolectado se molió hasta obtener un polvo fino con hielo seco, luego se agregaron 2 ml de reactivo TRIzol (Invitrogen, Mulgrave, VIC, Australia) y la muestra se molió más hasta que la suspensión se había descongelado. La muestra se dividió en dos volúmenes iguales y se transfirió a 2 ml tubos Eppendorf. Después de 5 min de incubación en la habitación temperatura (TA) se añadieron 300 μ l de cloroformo, el tubo se agitó vigorosamente durante 15 s y se dejó permanecer a temperatura ambiente durante 3 minutos. La muestra fue entonces centrifugada a 13.000 x g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un limpio tubo Eppendorf de 1,5 ml y el ARN se precipitó con 500 μ l de isopropanol a -20 °C durante 2 horas o más.

El ARN precipitado se recogió por centrifugación a 13.000 x g durante 15 minutos a 4 °C, el sedimento se lava con 1 ml de etanol al 75% enfriado con hielo y secado al aire brevemente a temperatura ambiente. Los sedimentos de ARN se resuspendieron en 50 μ l de agua destilada estéril y los dos tubos duplicados combinados.

Método de CTAB modificado por Bekesviova et al (1999):

Materiales:

- Morteros estériles y enfriados a -20°C
- Pistilos estériles y enfriados a -20°C

- Micropipetas
- Puntas para micropipeta estériles y enfriadas a -20°C
- Tubos eppendorf estériles y enfriados a -20°C
- Gradilla para tubos eppendorf enfriada a -20°C
- Tubos falcón de 50ml estériles y enfriados a -20°C
- Reactivos:
- Tris(HCl) 1M, PH 8
- EDTA 0.5M, PH 8
- NaCl 5M
- Acetato de Sodio 3M, PH 5.5
- Alfa-mercaptoetanol 2%
- Cloroformo
- Alcohol Isoamílico
- LiCl 10M
- Etanol

Procedimiento:

El tampón de extracción se preparó con 2% CTAB (m/v), 100mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 M NaCl. Se precalentó 1000µl de tampón de extracción a 65 °C, se vertió la muestra a un mortero y se trituró la muestra, se le adiciona 100µl de a-mercaptoetanol se homogenizo con la muestra, se transfirió a un tubo eppendorf y se agito vigorosamente. La extracción del lisado se realizó dos veces con volúmenes iguales de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 . Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10 000 rpm por 10 min a 4°C y a la fase acuosa obtenida se le agregó 0.25 vol, de LiCl 10 M y se mezcla por pipeteo. Para precipitar el ARN, se incubaron las muestras toda la noche a -20°C. El precipitado se obtuvo centrifugando a 10 000 rpm 20 min a 4°C y se resuspendió con agua destilada estéril. Para precipitar nuevamente el ARN, se adiciono 0.1 vol de Acetato de Sodio (pH 5.2) y 2.5 vol de etanol al 96% e incubaron a -20°C por más de 30 min. Las muestras se centrifugaron a 10 000 rpm por 20 min a 4°C para obtener el precipitado, el cual se lavó con etanol al 70% y se re-suspendió con 50 µl buffer TE. Las muestras se almacenaron a -20°C.

Electroforesis de las extracciones de ARN:

Se utilizo la técnica de electroforesis, en el cuál se utilizó como tinción SYBR-Safe o RED-SVV. Se uso el buffer TAE 1X. El gel se corrió por 60 min a 110 V.

Cuantificación del ARN:

La espectroscopía UV-Vis está basada en el proceso de absorción de la radiación ultravioleta-visible (radiación con longitud de onda comprendida entre los 160 y 780 nm) por una molécula. La absorción de esta radiación causa la promoción de un electrón a un estado

excitado. Los electrones que se excitan al absorber radiación de esta frecuencia son los electrones de enlace de las moléculas [3].

Para la cuantificación de la cantidad de ARN contenida en las muestras se usó con métodos espectroscópicos con un espectrofotómetro de UV-Visible, se midieron absorbancias con longitudes de onda de 230nm, 260nm y 280nm, usando como blanco buffer TE.

La ecuación por usar para poder reportar valores numéricos es:

$$(1) \quad \frac{mg}{ml} \text{ de ARN} = (Abs \ 260 \times Factor \ Dilución \times 40 \frac{mg \text{ARN}}{ml})$$

Para la calidad del ARN se tiene la tabla 1:

Tabla 1. Calidad del ARN

Ratio(longitudes de onda)	Valor	Pureza
260/280	2.0-2.2	ARN de pureza óptima
	>1.7	ARN de pureza aceptable
	<1.7	ARN contaminado con compuestos aromáticos

III. RESULTADOS

Con la finalidad de verificar que método era preciso para obtener material genético de las muestras de los hongos fitopatógenos. Debido al tiempo que se disponía se tuvo que elegir un método para las posteriores extracciones de las otras muestras, se seleccionó la muestra que se encontraba en mayor cantidad y se siguieron los métodos de extracción anteriormente mencionados. Obsérvese la figura 1, como se puede observar, se obtuvo por el método de CTAB modificado por Bekesviova et al (1999) material genético(ARN) con mayor concentración en comparación con el método TRI-Reagent, pero con una calidad menor, por lo que se selecciono el método de CTAB modificado por Bekesviova et al (1999) para posteriores extracciones, siguiendo rigurosamente los pasos marcados para obtener ARN de calidad optima.

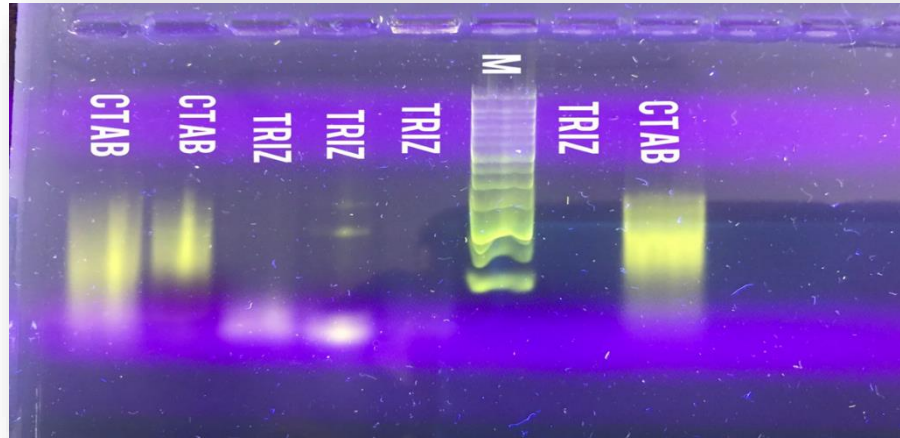


Fig.1. Electroforesis en gel de Agarosa al 1% con el material genético de la muestra: *Colletotrichum gloeosporioides* Control +, extraídas por el método TRIZ-Reagent y método CTAB modificado por Bekesviova et al (1999), marcador SYBER-Safe 100 BP.

Se obtuvo una electroforesis de resultados apreciables en la figura 2, donde se sometieron las muestras con la técnica de CTAB a dos tipos diferentes de buffer de carga los cuales muestran diferentes resultados ya que buffer de carga Red presenta muestras con una mayor concentración a diferencia buffer Blue, cabe mencionar que en el carril 2 y 4 donde se utilizó el Red las muestras además de concentradas salen más limpias, por lo que se optó por utilizar el marcador Red en las posteriores electroforesis.

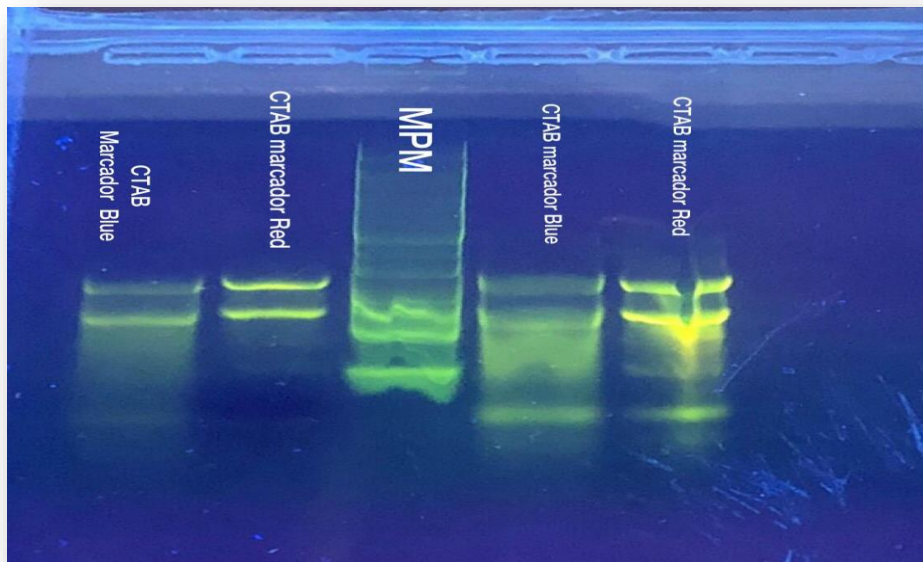


Fig.2 Electroforesis de las extracciones con CTAB utilizando dos buffer de carga diferentes blue y RED

Para un mejor análisis, se dividieron las imágenes de los geles obtenidos por electroforesis por cada muestra de los diferentes hongos fitopatógenos en los que se trabajaron. Para las muestras de *Colletotrichum gloeosporioides* se obtuvo las siguientes corridas de geles por electroforesis apreciables en la figura 3.

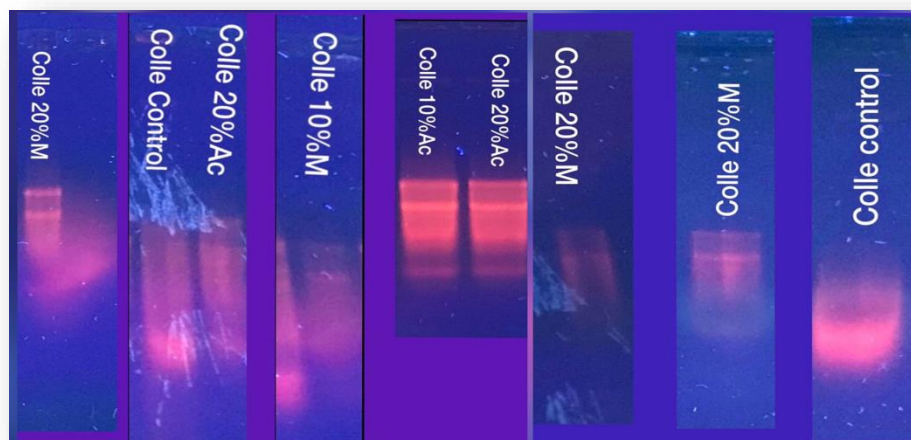


Fig.3. Electroforesis en gel de todas las muestras de material genético(ARN) de *C.gloeosporioides* extraídas por el CTAB modificado por Bekesviova et al (1999), marcador RED-SVV.

Al igual para las muestras de *Fusarium spp* se siguió el mismo tratamiento que para las muestras de *Colletotrichum gloeosporioides* obteniendo la figura 4.



Fig.4. Electroforesis en gel de todas las muestras de material genético(ARN) de *Fusarium spp* extraídas por el CTAB modificado por Bekesviova et al (1999), tinción gel RED-SVV.

Como se puede apreciar tanto en las figuras 3, 4, al usar el método de CTAB modificado por Bekesviova et al (1999), al observar las bandas que se encuentran en el gel de algunas muestras se pueden afirmar que se tiene un contenido considerable de ARN, por el contrario

a la calidad en algunas muestras se pueden observar que además se tienen presente en poca concentración proteínas y también en poca concentración ADN.

Asimismo se puede observar que algunas bandas del gel para las muestras de los dos hongos fitopatógenos usados, se aprecia que la molécula de ARN se degradó, esto se debió a diversos factores, como lo fue la repentina suspensión de suministro eléctrico para la institución, ocasionando que las muestras que se encontraban en refrigeración se fueran descongelando, en consecuencia a esto las muestras de ARN sufrieron una degradación por lo que al momento de realizar la técnica de electroforesis no se puede apreciar alguna banda de algunas muestras.

Para poder afirmar que las muestras de material genético(ARN) extraídas de los hongos fitopatógenos son de calidad óptima para utilizarlos en evaluaciones futuras, se requiere de cuantificar la concentración y reportar que las muestras tienen la calidad que se requiera.

Por lo que con el método de espectroscopia por UV-Visible se tomaron las absorbancias a las longitudes de onda de 230nm, 260nm y 280nm obteniendo los valores de la tabla 1.

Tabla 2. Absorbancias en el espectro de las diluciones con las muestras controles de Colle y fusarium

NO	Index	Mode	A	B	C
			260nm	280nm	230nm
1	7	Abs	0.48702	0.28473	0.36476
2	7	Abs	0.16096	0.1584	0.27226
3	7	Abs	0.13949	0.01054	0.16531

Tabla 3. Datos obtenidos por la aplicación de la ecuación 1, además de seguir las indicaciones de la tabla 1.

MUESTRA	#1	#2
	CTAB	CTAB
µl de Muestra	2	2
µl de H ₂ O	1998	1998
µl/celda	2000	2000
CONCENTRACION DE ARN	9345.44 µg/ml	3215.980 µg/ml
CALIDAD DEL ARN	1.7104	1.0161

Al observar los datos de la tabla 3, para la muestra #1(Colle control) tiene una calidad aceptable de ARN y está en una gran concentración, la muestra #2(Fusarium control) la calidad del ARN es baja, ya que esta contaminada de algunos compuestos aromáticos, además de que su concentración es baja.

Pese a los resultados y las figuras obtenidas, el método de CTAB modificado por Bekesviova et al (1999) es eficaz para poder extraer material de genético en una concentración considerable, por el otro lado no se puede confirmar acerca de la calidad de este, puesto que el equipo con el que se iba a trabajar presento algunas fallas por lo que no se pudo determinar la calidad de todas las muestras.

IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Dado los resultados obtenidos tanto en los geles como la cuantificación de la cantidad de ARN que esta presente en las muestras tratadas, el método de CTAB modificado por Bekesviova et al (1999) es una opción viable para la extracción de material genético para hongos fitopatógenos, solo hay que seguir afinemente la metodología para poder obtener buenos resultados, lamentablemente no se pudo reportar resultados sobre la calidad que ofrece este método, ya que se experimentaron varios eventos que no estaban a nuestro alcance para solucionarlos de una manera eficiente. Un trabajo como este puede atribuir a realizar posteriores evaluaciones de los mecanismos de acción de estos fitopatogenos dado a que la inhibición que ejerceré el extracto del muérdago sobre ellos produce un estrés lo cual la extracción de ARN podría ser pauta a investigaciones sobre las vías de inhibición, comprobando mediante la expresión de genes.

V. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Expreso mis más infinitos agradecimientos a mis padres por ser el apoyo económico, emocional durante mi realización del verano, también agradezco a los organizadores del 24° Verano de la ciencia y a mi profesor el Dr. José Enrique Botello Álvarez por brindarme la oportunidad de ser parte del programa, asimismo agradezco al Instituto Tecnológico Superior de Purísima del Rincón por aceptarme en sus instalaciones para el desarrollo del Verano, agradezco y reconozco el trabajo y el darme la oportunidad de ser parte del proyecto al Dr. Luis Ángel Xoca Orozco, agradezco de igual manera a mis compañeros asignados a trabajar conmigo puesto que se tuvo un agradable ambiente laboral a lo largo del verano.

REFERENCIAS

- [1] Azpeitia, F. and Lara, C. (2006) Reproductive biology and pollination of the parasitic plant *Psittacanthus calyculatus* (Loranthaceae) in central México. *J. Torrey Bot. Soc.* 133, 429–438
- [2] Rodríguez Acosta, M.G. (2013) , Comparación y análisis de extractos de *Psittacanthus calyculatus* y *Phoradendron tomentosum* para su uso en el desarrollo de alimentos funcionales para diabéticos tipo 2. , UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
- [3] "ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA VISIBLE. servicios técnicos de investigación". inicio. Servicios Técnicos de Investigación. <https://sstti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-rayos-x-de-monocristal-y-espectroscopias-vibracional-y-optica/espectroscopia-ultravioleta-visible.html> (accedido el 7 de julio de 2022).
- [4] N. A. S. a. M.-B. W. Ulrike Schumann, «A fast and efficient method for preparation of high-quality RNA from fungal mycelia,» *Research Notes*, vol. ., nº ., p. 5, 2013.
- [5] J. M. M. E. Alinne Martinez Lopez, «Comparacion de tres metodos para la extraccion de ARN total a partir de hojas de cacao,» *Universidad Autonoma de Tabasco*, vol. 13, nº 2, p. 7, 2014.

SOBERANÍA ALIMENTARIA: ESTUDIO SOBRE LA PERCEPCIÓN DE LOS CIUDADANOS A LOS ALIMENTOS CON NUEVAS TECNOLOGÍAS.

Montserrat López Muro
Benemérita Universidad Autónoma de
Aguascalientes
Av. Universidad 940, Ciudad
Universitaria, C.P. 20100,
Aguascalientes, Ags.
al211748@edu.uaa.mx

Dra. Mónica Anzaldo Montoya
Conacyt- El Colegio de San Luis, A.C.
Parque Macul 155, Colinas del Parque,
78294 San Luis, S.L.P.
monica.anzaldo@colsan.edu.mx

Resumen —El objetivo de este trabajo es explorar las percepciones acerca de la seguridad alimentaria y su relación con las oportunidades y riesgos de las nuevas tecnologías y el consumo de insectos. Para ello, nos basamos en la encuesta del “Eurobarómetro especial de seguridad alimentaria”. La mayoría de los encuestados mostraron tener un conocimiento mediano de la importancia de la seguridad alimenticia, pero, la cuestión económica es un factor muy importante e influyente a la hora de decidir qué alimentos consumir. La aceptación de nuevas tecnologías es baja y alta para el consumo de insectos como alimento.

Palabras clave — nuevas tecnologías, seguridad alimentaria, consumo de insectos

Abstract — In this work of study of citizens' perception of food with new technologies, we explore the perspectives of people about the new implementation of these methods, we base ourselves on the survey of the "Special Eurobarometer of food security" and above all we present about the safety that food should have; Through surveys we were able to analyze the data, thus significantly obtaining the opinions and choices of all the people, and based on that, we were able to offer a criterion and visualize a solution.

Keywords — New technologies, perspectives, food security, insect feeding

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes problemas que enfrenta la humanidad -antes y después de la pandemia- es la crisis de los sistemas agroalimentarios. Un síntoma de esta crisis es el hambre en el mundo. De acuerdo con un reciente informe sobre seguridad alimentaria y nutrición publicado por la FAO (Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas), el número de personas afectadas por el hambre en todo el mundo aumentó alcanzó los 828 millones en 2021, un aumento de unos 46 millones desde 2020 y de 150 millones desde el estallido de la pandemia de COVID-19 lo que significa el incumplimiento de los Objetivos de Desarrollo Sostenible establecidos en 2015 (1).

La crisis de los sistemas agroalimentarios se expresa de distintas formas, uno de ellos tiene que ver con la cuestión de la inocuidad alimentaria, que significa asegurarse de que los alimentos que se comercializan no causen daño al consumidor, garantiza la máxima seguridad posible de los alimentos, desde la producción al consumo (1, 2, 3). Otra tiene que ver con el concepto de seguridad alimentaria, que se refiere a que la población tenga

en todo momento acceso físico y económico a alimentos saludables (1, 2, 3). La tercera es la cuestión de la soberanía alimentaria que significa no solo pensar en tener acceso alimentos sanos y nutritivos, sino pensar que es un derecho de las poblaciones a decidir qué producir, cómo producir y para quién producir, de acuerdo con su cultura y territorio (3).

Como puede verse, los problemas de la producción alimenticia están articulados por una dimensión central: el papel de la ciencia y la tecnología. Algunos gobiernos y empresas plantean como opción para resolver los problemas mantenerse por la vía de las nuevas tecnologías a partir de la biotecnología, la nanotecnología, la agricultura 4.0 y el uso de agroquímicos. Otra vía la inclusión de la producción de insectos como fuente alimenticia para animales y personas.

Para conocer qué ideas se tienen de estas soluciones, el objetivo de este trabajo es explorar las percepciones de las personas acerca de la seguridad alimentaria y su relación con las oportunidades y riesgos de las nuevas tecnologías y el consumo de insectos.

I. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación es de tipo exploratorio, descriptiva y cuantitativa. Para alcanzar el objetivo planteado, se llevó a cabo una encuesta con 14 preguntas aplicada a personas mayores de 18 años sin un perfil definido, por medio de la plataforma Google Forms del 04 de julio al 28 de julio. El instrumento se formuló con base en la encuesta “Eurobarómetro especial de seguridad alimentaria” elaborada por la Comisión Europea en 2019 disponible en: <https://www.efsa.europa.eu/es/corporate/pub/eurobarometer19>, a la que se agregaron otras preguntas para conocer la percepción de los encuestados acerca de las aplicaciones de la nanotecnología a la alimentación y el tema del consumo de insectos.

Se enviaron 30 invitaciones, que a su vez fueron compartidas por estos mismos para crear una difusión, se estima un aproximado de 150 invitaciones finales, de las cuales se recibieron N=143 respuestas.

II. ANÁLISIS DE RESULTADOS

A continuación, presentamos los principales resultados del levantamiento de la encuesta, comenzando por las *características sociodemográficas*: El 72% de los encuestados reside en Aguascalientes, consecutivamente sigue Ciudad de México y Sinaloa con el 7% de cada uno, después San Luis Potosí y Ecuador. El 64% de los encuestados son mujeres y 35% hombres, una persona seleccionó “prefiero no decirlo”. La mayoría de los encuestados 74% tienen un rango de edad entre 15 a 25 años y 9% son mayores de 26 años. En cuanto al nivel educativo, el 75% de las personas mencionó tener grado universitario, seguido de grado posgrado y preparatoria con 12%. Finalmente, sobre la ocupación, resultó que la mayoría de las personas que contestaron la encuesta son estudiantes, consecutivamente empleados, después empresarios, autoempleo, jubilado.

La primera pregunta con base al tema principal incluyó saber qué factores toman en cuenta los entrevistados al momento de comprar y elegir sus alimentos (Véase Fig. 1).

De los seis factores que se dieron como opción, los encuestados tenían que elegir al menos tres elementos. En este sentido tenemos que el costo (82,5%) es el factor más relevante para todas las personas, consecutivamente se interesan también por el sabor (69,9%), la inocuidad del alimento (62,9%) y el contenido de nutrientes (58%). En menor proporción se encuentra la ética y otras creencias como religión, bienestar animal, preocupaciones ambientales, etc. (14,7%), finalmente y el tipo de tecnología utilizada en alguna etapa del proceso de producción (biotecnología, nanotecnología) (2,8%).

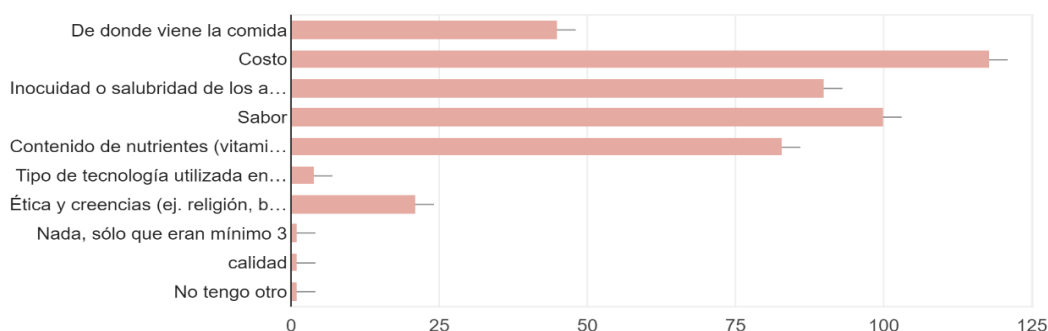


Fig. 1 Respuestas a la pregunta: ¿Cuáles de las siguientes opciones son las más importantes al momento de comprar algún alimento?

Posteriormente, con el objetivo de explorar qué tan informados están los entrevistados respecto a temas de seguridad y riesgo de los alimentos, se pidió que eligieran uno de quince temas que se les presentaron. Los resultados fueron del más común al menos escuchado: los aditivos, como colorantes, conservadores o saborizantes (92,3%); ingredientes genéticamente modificados en alimentos y bebidas (82,5%); higiene alimenticia (71,3%); reacciones alérgicas (67,1%); residuos de antibióticos, hormonas o esteroides en la carne (64,3%); en empate se encuentra la intoxicación alimentaria por bacterias (60,8%) y los residuos de plaguicidas en los alimentos (60,8%), enfermedades encontradas en animales (58,7%); restos de materiales que se encuentran en contacto con los alimentos (plástico, aluminio, presente en los envases) (54,5%); micro plásticos en los alimentos (49%); mohos venenosos en cultivos alimentarios o forrajeros (25,9%); uso de nanomateriales o nanotecnología en agricultura, alimentos y empaques (22,4%), un encuestado indicó no saber cuál tema elegir.

Con la finalidad de conocer la opinión de los entrevistados acerca de la complejidad de evaluar la seguridad y riesgos de los alimentos, la encuesta solicitó a los encuestados que eligieran tres de doce afirmaciones con las que estuvieran de acuerdo. La afirmación con más personas de acuerdo fue "Existen regulaciones para garantizar que los alimentos que consume sean seguros" (72,7%), después, "Hoy en día los productos alimenticios están llenos de sustancias nocivas" (44,1%) y la tercera con más coincidencias de acuerdo es "Para decidir qué tan riesgoso podría ser comer algo, los organismos internacionales

confían en los científicos para que brinden asesoramiento experto” (43,4%); la afirmación que reunió menos acuerdos fue “Puede evaluar los riesgos de inocuidad de los alimentos por sí mismo y no necesita la ayuda de otros” (9,8%).

Preocupación o percepción de riesgos en los alimentos.

En cuanto a la medición de riesgos, se elaboró una pregunta sobre la preocupación de las personas con base a quince temas y se solicitó que seleccionaran los tres de más importancia (Véase Fig 2). El tema que más le preocupa a los encuestados en relación con sus alimentos son los residuos de antibióticos, hormonas o esteroides que pudiera tener la carne (56,6%); después la intoxicación alimentaria por bacterias (53,1%), consecutivamente la higiene alimenticia (47,6%), estos tres temas son los que más les preocupan a las personas cuando se trata de los alimentos que ingieren; después de estos se presentan las enfermedades encontradas en animales (46,9%), los residuos de plaguicidas en los alimentos (46,2%), los ingredientes genéticamente modificados en alimentos y bebidas (43,4%), los aditivos como colorantes, conservadores o saborizantes (35,7%), microplásticos en los alimentos (32,9%), rastros de materiales que entran en contacto con alimentos (ej. plástico o aluminio presente en los envases) (31,5%), enfermedades de las plantas en los cultivos (28%); y los temas que menos ha oído hablar la gente son sobre los mohos venenosos en cultivos alimentarios y forrajeros (23,8%), las reacciones alérgicas (18,2%) y el uso de nanomateriales o nanotecnología en la agricultura, alimentos y empaques (9,8%).

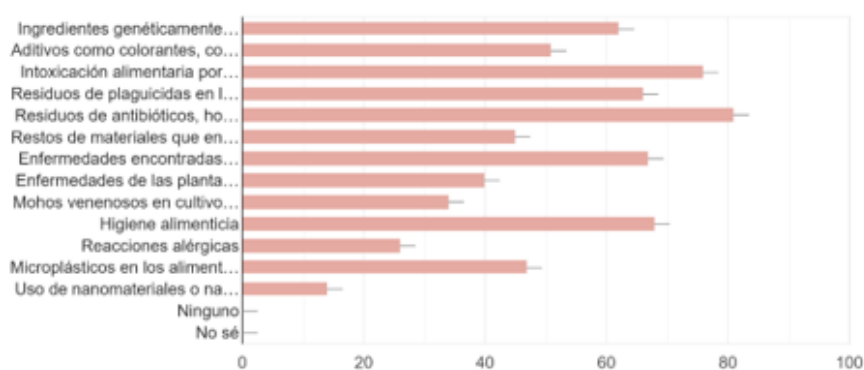


Fig. 2 Cuál de los siguientes temas le preocupa más cuando se trata de alimentos. Los residuos de antibióticos, hormonas o esteroides en la carne es la respuesta más común.

Confianza en las fuentes de información sobre riesgos alimentarios.

Para conocer este tema se preguntó sobre las principales fuentes de información sobre riesgos alimentarios. Se brindaron tres opciones y los encuestados brindaron información sobre otros medios. Los resultados fueron los siguientes: Los medios de comunicación que se dividen en: tradicionales (TV, revistas, periódico, radio) (18,9%) e internet/redes sociales (Instagram, Facebook, Twitter, Tik Tok) (59,4%), eventos organizados por universidades o centros de investigación (14,7%) y se dio la opción de especificar otros medios; entre los cuales mencionaron: investigadores, redes alimentarias, publicaciones científicas, personal

de la salud, noticias de internet con fuentes confiables, doctores dedicados a la industria de los alimentos.

Enseguida se pidió que mencionaran hasta qué punto confían en las fuentes de información que tratan a las siguientes tecnologías: biotecnología agrícola; nanomateriales en la agricultura y la alimentación; agricultura 4.0 o de precisión. Los resultados se presentan en la Fig. 3.

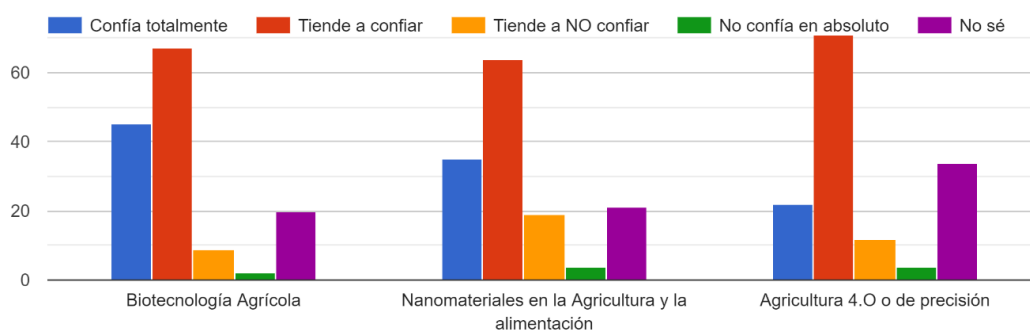


Fig. 3 Grados de confianza en las fuentes de información

Por último, se pidió la opinión en dos cuestiones, la primera sobre el nivel de conocimiento en México sobre los riesgos alimenticios: la mayoría de las respuestas fueron que es muy limitado (45,5%) y consecutivamente a este es muy limitado (39,2%), muy pocas personas opinaron que es adecuado (14,7%) y muy adecuado (0,7%). La segunda cuestión es saber la opinión de estos encuestados con base al planteamiento de promover o no el consumo de insectos como parte de la política alimentaria, considerando que los insectos son una fuente muy rica de proteínas y minerales. La respuesta general de las personas fue de aceptación, que estarían de acuerdo, les parecería bien, les interesa el tema y les gustaría saber más acerca de ello; hubo muy pocas respuestas negativas indicando simplemente que les daría asco, que son insalubres y que no están de acuerdo. La mayoría de las respuestas negativas son por parte de mujeres de entre 15 y 25 años, universitarias estudiantes, dos de rango de edad 48 a 58 años con educación universitaria y siendo empleadas, y una mujer de entre 59-69 años con posgrado y ocupación empleada; por parte de los hombres solo se obtuvieron dos respuestas negativas, una de un hombre de 48 a 58 años con escolaridad hasta secundaria y ocupación jubilado y el otro, de entre 15-25 años siendo estudiante universitario.

IV. CONCLUSIONES

Dados los datos obtenidos podemos evaluar que la mayoría de los encuestados tiene una noción o un conocimiento sobre la importancia de la seguridad alimenticia, pero, la cuestión económica es un factor muy importante e influyente a la hora de decidir qué alimentos consumir o simplemente saber cómo fueron estos fabricados. Cuando se tiene que quedar con una idea sobre esto es que todos están de acuerdo en que los alimentos antes de ser consumidos pasan por un estándar de calidad, sin embargo, estos a veces son pasados

por alto o simplemente hacen que el precio del consumo sea elevado, una insalubridad alimentaria puede causar severos daños para nosotros; siendo así que, aunque las personas están de acuerdo en que aun así hay un cierto riesgo en lo que consumen pueden seguir adquiriendo sus alimentos. En general, las personas tienen un desconocimiento sobre las alternativas que se podrían implementar para tener una agricultura sustentable y por lo tanto menos riesgo de virus, bacterias, hongos y plaguicidas etc., debe comenzarse por ese lado instruyendo a la gente, brindándoles más información sobre las nuevas tecnologías; es necesario aprender a descartar la información sesgada o falsa de redes sociales y tenerse en cuenta todas las otras fuentes de mejor procedencia para poder tener información más precisa y correcta la hora de divulgar o enseñar. Son pocas las personas que tienden a confiar en las nuevas tecnologías integradas a los alimentos, aunque en ese aspecto muchas personas se limitaron a responder “no sé”, es un reto para los científicos y comunicadores de la ciencia lograr que todas las personas adquieran conocimiento sobre estas nuevas tecnologías, pero como consumidores tenemos que aprender a elegir mejor nuestros alimentos. Es un hecho que la agronotecnología deberá seguir buscando su aceptación para poder contribuir al medio ambiente, de igual manera las personas respondieron bien hacia el nuevo implemento de la posibilidad de adquirir insectos como una nueva y viable proteína del futuro.

V. RECONOCIMIENTOS O AGRADECIMIENTOS

Se agradece a las instituciones organizadoras del Verano de la Ciencia Región Centro edición 2022; de igual manera agradezco a El Colegio de San Luis y a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por el apoyo otorgado para la realización de la investigación; también agradezco mucho a la doctora Mónica Anzaldo por motivarme en temas nuevos para mi y crear un nuevo interés.

REFERENCIAS

- [1] FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO. 2022. In Brief to The State of Food Security and Nutrition in the World 2022. Repurposing food and agricultural policies to make healthy diets more affordable. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0640en>
- [2] BSG institute. (s.f.). Seguridad Alimentaria o Inocuidad Alimentaria. 26/07/22, de BSG Sitio web: <https://bsginstitute.com/bs-campus/blog/Seguridad-Alimentaria-o-inocuidad-Alimentaria-70>
- [3] Edelman, Marc. 2016. Estudios agrarios críticos: tierras, semillas, soberanía alimentaria y derechos de las y los campesinos / Marc Edelman.1.^a ed. Quito: Editorial IAEN.

PROPIEDADES DE GOLOSINAS GELIFICADAS SUSTITUIDAS CON BAGAZO GASTADO DE CERVECERIA

Vanessa Mares Zapata

Facultad de Ciencias Biológicas
Carretera Torreón Matamoros Km. 7.5,
Ejido el Águila, 27275 Torreón, Coah.
vmares@uadec.edu.mx

Laura Eugenia Pérez Cabrera

Departamento de Ciencias de los
Alimentos, Universidad Autónoma de
Aguascalientes, Av Universidad N.940,
C.P. 20100 Ags., Ags.
leperez@correo.uaa.mx

Resumen — El objetivo de este trabajo fue revalorizar el residuo generado por la industria cervecera como un nuevo ingrediente rico en fibra y proteínas para el desarrollo de un nuevo producto, por tal motivo se buscó un producto altamente consumible por el público, mayormente en niños, llegando a la conclusión de realizar gomitas con bagazo de cerveza, aplicando la metodología básica de elaboración de golosinas gelificadas para ello se realizó una adecuación del bagazo y posterior una sustitución de la glucosa de la formulación para la incorporación del bagazo. Las golosinas gelificadas se caracterizaron en diferentes parámetros como: proteína, color, pH, textura, entre otros, así mismo se realizará un análisis sensorial con un panel integrado por niños, para poder identificar que tan aceptable es el producto.

Palabras clave — Bagazo, Residuo, Gomitas.

Abstract — The objective of this work was to revalue the residue generated by the beer industry as a new ingredient rich in fiber and protein for the development of a new product, for this reason a highly consumable product was sought for the public, mostly in children, reaching the conclusion of making gummies with beer bagasse, applying the basic methodology of elaboration of gelled candies for it was made an adaptation of the bagasse and later a substitution of the glucose of the formulation for the incorporation of bagasse. The gelled candies were characterized in different parameters such as: protein, color, pH, texture, among others, as well as a sensory analysis with a panel composed of children, to identify how acceptable, the product is.

Keywords — *Bagasse, Residue, Gummies*

I. INTRODUCCIÓN

Un subproducto es un producto secundario además del principal en un proceso de elaboración o fabricación, el cual no se aprovecha de manera eficiente afectando al medio ambiente o bien a la economía de la industria, generando pérdidas y no ganancias al no saber aprovechar estos recursos, sin duda alguna el aprovechamiento de subproductos representa una temática que es altamente promisorio donde se ven grandes avances

importantes y es adoptada por muchas empresas de alimentos que se encuentran comprometidas con la disminución de pérdidas de subproductos. El primer paso para reducir el impacto de la generación de residuos es minimizar su generación dentro de las posibilidades técnicas y económicas en cada caso, con las evidentes precauciones y cumpliendo con todos los estándares sanitarios exigidos el bagazo de cerveza ha comenzado a utilizarse como materia prima para la elaboración de algunos alimentos destinados al consumo humano, debido que la cerveza se presenta como una de las bebidas más consumidas a nivel mundial, lo que genera una gran producción, producción que genera residuos fijos donde uno de ellos es el bagazo, actualmente el destino más común dado a este subproducto es su disposición para la alimentación animal a pesar de ser una fuente de fibra y alto contenido en proteína. La valorización de estos residuos representa una estrategia competitiva que abre la puerta a nuevas posibilidades de negocios, debido a la creciente de alimentos funcionales. [1,2]

El bagazo de cerveza es el subproducto más abundante en la industria cervecera, representando el 85% del total de los residuos generados, el gran volumen generado de este subproducto, sus componentes y su bajo costo lo convierten en un recurso de gran potencial para ser reciclado, el bagazo de cerveza es un material lignocelulósico que consiste en el pericarpio de la cascara y capa de la cubierta que cubre el grano de la cebada original, sus principales componentes son la fibra, proteína y lignina. La fibra puede constituir aproximadamente la mitad de la composición del bagazo en peso seco, mientras tanto las proteínas pueden constituir hasta el 30%, este alto contenido en fibra y proteína hace que el bagazo de cerveza sea una materia prima sumamente interesante para una gran variedad de aplicaciones, por tal caso en este trabajo se busca utilizar el bagazo como materia prima para desarrollar una golosina tipo gomita utilizando la formula clásica, pero incorporando el bagazo, para poder encontrar una aplicación rentable de este subproducto. [3]

II. MARCO TEÓRICO

Los productos de confitería son aquellos que, por definición, están elaborados principalmente con glucosa, sacarosa, fructuosa o combinaciones de estos y se agrupan en: caramelos, gomas y jalea, malvaviscos, gomas de mascar y chocolate. Entre los productos de confitería las gomitas se encuentran en segundo lugar en ventas debido a la gran cantidad de sabores, texturas y formas distintas que estas poseen. Las gomitas son confites, golosinas o caramelos masticables blandos o suaves que se elaboran con un agente gelificante que les proporciona una textura elástica y gomosa a través de la mezcla de diversas materias primas como; grenetina, glucosa, pulpa o jugo de fruta, sacarosa, aditivos alimentarios permitidos por la normatividad oficial mexicana como son saborizantes naturales o sintéticos, colorantes, conservadores, gelificantes, edulcorantes, espesantes, entre otros. [4]

III. MATERIALES Y MÉTODOS

D. Preparación del gabazo

Se pesó el bagazo, enseguida fue llevado a un homogeneizador durante 15 minutos para su molienda, terminado el proceso se pasó a una segunda molienda en una licuadora osterizer con la finalidad de obtener un polvo más fino, al término se tamizó utilizando tres tamices: N.º 50 (0.300 mm), N.º 60 (0.250 mm) y N.º 80 (0.180 mm), para poder identificar que polvo es el más adecuado para la preparación de las gomitas.

E. Preparación de las gomitas

Se prepararon gomitas con dos diferentes concentraciones de ácido cítrico, la muestra 1 con el 50 % de ácido cítrico y la muestra 2 con el 25 % de ácido cítrico, con una reducción del 6% en sacarosa para incorporar el gabazo y se elaboró un control con la formulación original, para la preparación se optó por utilizar el polvo obtenido en el tamiz N.º 80 (0.180 mm), el proceso de elaboración consta de 5 etapas: hidratación de la grenetina: Se hidrata la grenetina con la cantidad de agua (1) que se encuentra a temperatura ambiente y se deja reposar durante 30 min. (Tabla 1). Preparación del jarabe: la sacarosa junto con el agua (2), se disuelve hasta llegar a 70°C, llegando a la temperatura se agrega la glucosa, se calienta hasta llegar a 84° Brix, se deja enfriar a 100°C, al llegar a la temperatura se agrega la grenetina hidratada, se mezcla perfectamente hasta tener una mezcla homogénea, se agrega el ácido diluido con agua en una proporción 1:1, por último, se agrega el bagazo y se mezcla. (Tabla 1). Moldeo: la mezcla se deposita en un embudo y se vierte en bandejas de almidón preparado con azúcar glass en una proporción 50:50, impresos con la figura deseada, en este caso de forma circular, la función que tienen es eliminar la humedad de la gomita para ayudar en la gelificación y hacer que tengan una forma definida. (Figura 1)

Tabla 1. Formulación gomitas con bagazo (100 gr)

Ingredientes (gr)	Muestra 1	Muestra 2
Grenetina	5.80	5.80
Agua (1)	11.60	11.60
Agua (2)	10.26	10.26
Sacarosa (refinada)	25.71	25.71
Glucosa	37.47	37.74
Ácido cítrico	0.64	0.426
Agua dilución de ácido cítrico	0.64	0.426
Polvo (80)	6	6



a)



b)



c)

Fig. 1. Moldeo de gomitas en cama de almidón a) control, b) Muestra1 50% A.C., c) Muestra2 25% A.C.

El secado se realiza después de verter la mezcla esta deberá ser cubierta con almidón, lo cual ayudará a eliminar humedad y a la formación del gel, se deberá dejar secar por 24h a una temperatura entre 26 a 30 °C. **(Figura 2)**. El desmolde se realizó después de 24 h, a las gomitas se les retiro el exceso de almidón con la ayuda de un cepillo o una brocha **(Figura 2)**

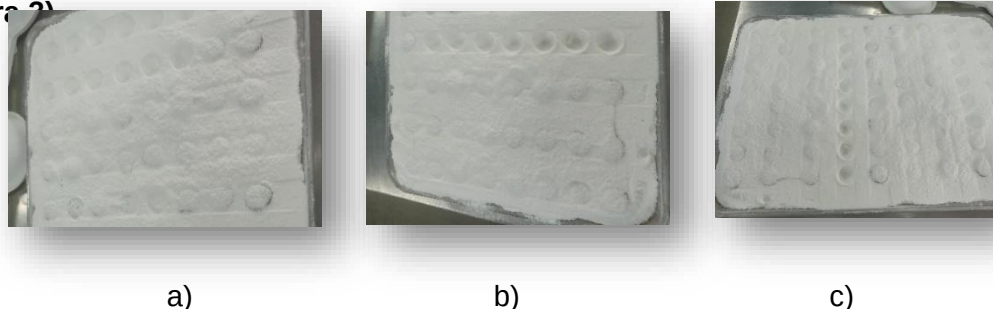


Fig. 2. Secado de gomitas cubiertas de almidón a) control, b) Muestra1 50% A.C., c) Muestra2 25% A.C.

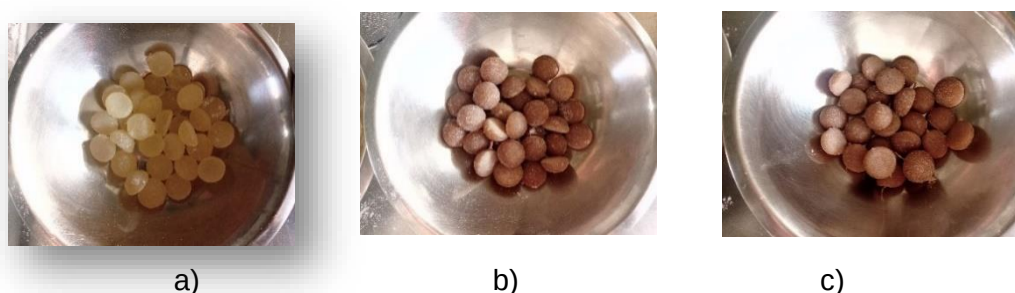


Fig. 3. Desmolde de las gomitas a) control, b) Muestra1 50% A.C., c) Muestra2 25% A.C

F. Determinaciones

Análisis de Proteína

Para el análisis de proteína se pesaron .200 gr de cada muestra por triplicado, se utilizó un determinador de proteína y nitrógeno FP-528 (LECO).

Análisis de textura

Para evaluar la textura de las gomitas se utilizó un texturometro (texturalab/ ta.xt plus textura analyser), en el cual se colocó la gomita en la base, para evaluar la elasticidad y firmeza, utilizando un plato de compresión p/75 (75 mm), se analizaron 16 gomitas de cada muestra.

Evaluación sensorial

Un panel de 50 niños con edades comprendidas entre 6 y 12 años de edad fueron encuestados para determinar su grado de satisfacción sobre el producto en una escala no estructurada **(Figura 4)**. Los niños encuestados indicaron el nivel de agrado o desagrado

marcando en la escala su opinión, la variable respuesta fue el nivel de satisfacción de las gomitas.



Fig. 4. Escala para evaluación sensorial

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Tabla 3. Proteína de gomitas

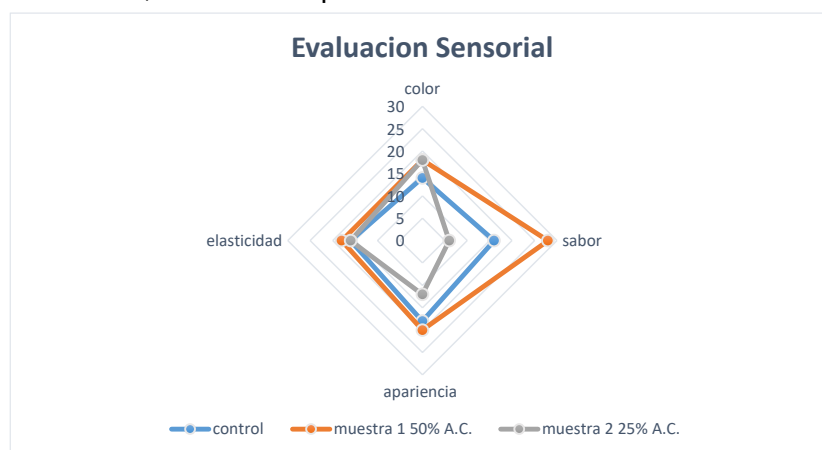
Muestra				%proteína	%nitrógeno	promedio	Desviación
Control				5.8393	0.9343		
Control				5.9417	0.9507	5.9040	0.056310686
Control				5.9311	0.9490		
Muestra A.C.	1	50%	6.9384	1.110			
						6.8323	0.092864471
Muestra A.C.	1	50%	6.7658	1.083			
Muestra A.C.	1	50%	6.7927	1.087			
Muestra A.C.	2	25%	8.3310	1.333			
						8.2693	0.076447193
Muestra A.C.	2	25%	8.2932	1.327			
			8.1838	1.309			
Muestra A.C.	2	25%					

En la tabla 3 se puede observar que la muestra que contiene mayor nivel de proteína es la muestra 2 la cual contiene bagazo y el 25% de ácido cítrico, con un promedio de 8.2693, estando 1.437 arriba de la muestra 1 que contiene 50% de ácido cítrico y bagazo y 2.3653 de la muestra control, con lo cual podemos observar que el bagazo brinda un nivel alto de proteína a las gomitas.

Tabla 4. Textura de gomitas GMIA y GMT

Muestra	Fuerza del gel N		Firmeza N		Elasticidad %	
	Promedio	S. D S.D.	Promedio	Promedio	S.D.	S.D.
Control	2.09	0.54	0.88	0.09	63.83	1.71
Muestra 1	4.26	0.84	0.97	0.77	405.07	427.87
Muestra 2	6.46	0.78	0.11	0.01	1155.29	112.53

En la tabla 4 podemos observar que existen variaciones en las distintas muestras, teniendo que la muestra que pose mayor fuerza y elasticidad es la muestra 2 con 25% de ácido cítrico, teniendo un promedio de 6.46 en fuerza y 1155.20 en elasticidad, pero en firmeza se observa que la muestra 1 que posee el 50% de ácido cítrico, cuenta con mayor firmeza que las demás muestras, teniendo un promedio de 0.97.

**Fig. 4.** Nivel de aceptación de las gomitas en sus diferentes aspectos

Como se observa las gomitas que tienen una mayor aceptación son las de la muestra uno, que contienen el gabazo y la mitad de ácido cítrico, sobresaliendo en todos los aspectos, mientras que la muestra dos es la menos aceptada por los niños, la cual posea gabazo y un tercio del ácido cítrico, solo podemos notar que en color las muestras dos y uno no cuentan con alguna diferencia, haciendo notar que los atributos evaluados son: color, sabor, apariencia y elasticidad.

Observando los resultados se puede ver que la muestra 1 (50% A.C.) cumple el objetivo de este trabajo siendo aceptado por el público al que se encuentra dirigido, haciendo notar que se debe trabajar para mejorar el atractivo visual de la gomita, puesto que el color no es tan llamativo como el de la muestra control, comparando las gomitas elaboradas con gabazo a las tradicionales, se puede notar que son muy parecidas en tanto textura y elasticidad, lo que indica que al agregar el gabazo no afecta esas propiedades, en cambio se realizan

cambios favorables ya que se le agrega un valor proteico lo cual lo convierte en un producto rentable y acepto para su consumo.

V. CONCLUSIONES

Se desarrollo una golosina tipo “gomita” con una reducción en azúcar del 6 % y ácido cítrico del 50%, y agregando un 6 % de gabazo de cerveza, con un sabor, elasticidad y textura aceptables, cuyo nivel de agrado de los niños fue alto, logrando así el objetivo deseado en este trabajo, encontrando una aplicación rentable para este subproducto.

VI. AGRADECIMIENTOS

Al comité organizador del verano de la ciencia región centro, por permitirme tener esta gran experiencia de grandes aprendizajes.

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes por abrirme sus puertas para realizar este verano en forma presencial.

A la Dra. Laura Eugenia Pérez Cabrera, por la dedicación y apoyo que me ha brindado al realizar este trabajo, y compartir conmigo sus conocimientos.

A todas las personas de la posta zootécnica que se encuentran en el departamento de ciencia de los alimentos que me brindaron su apoyo, en especial a la maestra Karla y Rosita.

A la Universidad Autónoma de Coahuila y a la facultad de ciencias biológicas por todo el apoyo brindado para poder asistir a este verano.

REFERENCIAS

Artículo de revista indizada bajado de página web:

[1]"Bagazo de cervecería como ingrediente en el desarrollo de panificados. Impacto del rotulado en la intención de compra y aceptabilidad", *INNOTEC*, n.º 16, junio de 2018. Accedido el 23 de julio de 2022. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.26461/16.02>

Tesis:

[2]R. Cruz, Pamela, Aprovechamiento de subproductos derivados de la elaboración de cerveza artesanal [PhD Máster Universitario]. Universidad de Extremadura, 2018.

Conferencia:

[3]Bucci, Paula; Santos, María Victoria; Zaritzky, Noemí Elisabet, “Extracción de ácido ferúlico a partir de subproductos de la industria cervecera: bagazo de cerveza”, V Jornadas de Investigación, Transferencia y Extensión de la Facultad de Ingeniería (La Plata, 2019)

Artículo de revista indizada bajado de página web:

[4]I. Aranda Gonzáles, O. Tamayo Dzul, E. Barbosa, M. Segura campos, Y. Moguel Ordoñez y D. Betancur Ancona, "Desarrollo de una golosina tipo “gomita” reducida en

calorías mediante la sustitución de azúcares con Stevia rebaudiana B", *Nutrición Hospitalaria*, vol. 31, n.º 1, pp. 334–340, 2015. Accedido el 16 de julio de 2022. [En línea]. Disponible: <http://www.aulamedica.es/nh/pdf/8013.pdf>

IMPACTO DEL USO DE NANO ADITIVOS SOBRE EL CRECIMIENTO Y VALOR NUTRIMENTAL DE *SALVIA HISPANICA* L.

Karina Michelle Gómez Elías

Universidad Autónoma de Coahuila
Carretera Torreón-Matamoros Km. 7.5,
Ciudad Universitaria. Ejido El Águila,
Torreón, Coahuila.
melias@uadec.edu.mx

Dra. Karen Esquivel Escalante

Universidad Autónoma de Querétaro
Centro Universitario, Cerro de las
Campanas, S/N, Las Campanas, Santiago
de Querétaro, Qro.
karen.esquivel@uaq.mx

Resumen: Actualmente la nanotecnología es una excelente opción para mejorar la calidad nutricional en cultivos, productividad de ganado, protección de plantas y la mejora de calidad de semillas, ya que al funcionar como nano-fertilizante y nano-pesticidas, ofrece una alternativa a prácticas agrícolas sostenibles con menos insumos, técnicas seguras, así como el contrarresto de problemas ocasionados a las semillas como el envejecimiento e infecciones por organismos patógenos, que en general, es relativamente poco explorado y con muchos aspectos sin resolver. En el presente estudio se evaluó el impacto en el desarrollo nutricional y crecimiento de la planta de *Salvia hispanica* L. al ser tratada con nanopartículas de dióxido de titanio (TiO_2) y dióxido de titanio dopadas con oro (Au- TiO_2).

Palabras clave: *Nanopartículas, pretratamiento de semillas, antioxidantes.*

Abstract: Currently, nanotechnology is an excellent option to improve the nutritional quality of crops, livestock productivity, plant protection and the improvement of seed quality, since by working as nano-fertilizer and nano-pesticides, it offers an alternative to sustainable agricultural practices. with less inputs, safe techniques, as well as the counteracting of problems caused to the seeds such as aging and infections by pathogenic organisms, which in general, is relatively little explored and with many unresolved aspects. In the present study, the impact on the nutritional development and growth of the *Salvia hispanica* L. plant when treated with titanium dioxide (TiO_2) and gold-doped titanium dioxide (Au- TiO_2) nanoparticles was evaluated.

Key words: *Nanoparticles, seed pretreatment, antioxidants.*

I. INTRODUCCIÓN

La inclusión de nanoaditivos ha llamado mucho la atención debido a los efectos positivos que ha tenido el añadirlos a productos farmacéuticos, cosméticos, de energía y agricultura. Sin embargo, la toxicidad que puede implicar a la salud humana y otros efectos biológicos también son de considerar. A pesar del gran progreso que recientemente se ha visto en el desarrollo de nanopartículas (NPs), a la par de los estudios positivos, otros cuantos estudios han demostrado los efectos de su toxicidad en organismos, sin embargo, pocos reportes prueban a profundidad dichos efectos respecto a plantas. [1]

Las nanopartículas de dióxido de titanio (TiO_2) han tenido una inmensa aplicación en productos de belleza, como bloqueadores solares, en productos antibacteriales y para descomposición de materia orgánica en agua residual, entre otros. Existen estudios que

han demostrado que la adición de nanopartículas de TiO_2 a semillas mejoran su conservación, dureza, resistencia al agua e inclusive otorgan propiedades antimicrobianas. [2].

Chía (*Salvia hispanica* L.) es una planta originaria de México y Guatemala la cual ha sido parte de la alimentación humana por aproximadamente 5,500 años, desde donde se ha utilizado como alimento, parte de medicinas, cosméticos y parte de rituales religiosos en sociedades precolombianas. [3] En general, la semilla de Chía es ampliamente utilizada debido al enorme potencial nutricional y terapéutico que contiene. La semilla de chía se compone de proteínas (15–25 %), grasas (30–33 %), carbohidratos (26 a 41 %), alto contenido de fibra dietética (18 a 30 %), cenizas (4 a 5 %), minerales, vitaminas y materia seca (90 a 93 %). También contiene una gran cantidad de antioxidantes. [4]

Los antioxidantes son compuestos que disminuyen o detienen la oxidación de otras moléculas debido a su capacidad de inhibir reacciones de oxidación en cadena. ABTS y DPPH son procedimientos espectrofotométricos que ayudan a determinar la capacidad antioxidante en extractos de plantas, semillas de alimentos, entre otras sustancias. Al mezclar los radicales (ABTS y DPPH) con soluciones antioxidantes ocurre una ‘formación reversa’ de antioxidantes, donde se toman iones de la solución y esto es observado por una decoloración de los radicales, siendo originalmente violeta oscuro (DPPH) y azul verdoso (ABTS) y cambiando a una tonalidad amarillenta y verdosa, respectivamente. [5]

El reactivo ABTS se utiliza en su forma oxidada con persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) y se reduce en presencia de antioxidantes. [6] DPPH (α , α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) es un radical libre, el cual acepta electrones o radicales H^+ en antioxidantes para lograr su estabilidad, mostrando absorción en un rango de 515-520 nm. [7] La relación entre absorbancia y unión radical-electrón es inversamente proporcional, variando la tonalidad del reactivo en relación a la cantidad de electrones tomados por el radical (DPPH) [8,9] Para la determinación de la actividad antioxidante en muestras, se calcula de forma fotométrica al observar el decremento de la absorbancia con relación al tiempo, estas observancias obtenidas se relacionan con una curva de calibración preparadas con un antioxidante estándar de propiedades ya conocidas. [10] Un ejemplo de antioxidante ampliamente usado es la solución Trolox, para el cual, ambos ABTS y DPPH reaccionan igualmente a la misma relación estequiométrica de reactivo, por lo que para ambos reactivos se empleó la misma preparación de curvas de calibración de Trolox.

Trolox es un derivado de la vitamina E que es soluble en agua y que, debido a sus actividades antioxidantes y estructura sencilla, se utiliza ampliamente como control positivo durante pruebas de antioxidantes, comparándolo con las muestras a estudiar mediante una curva estándar. [11]

En este estudio se realizaron análisis de antioxidantes para evaluar el valor nutrimental en relación con el crecimiento y cambios en la planta de *Salvia hispanica* L. bajo pretratamiento de nanoaditivos como dióxido de titanio (TiO_2) y dióxido de titanio dopado con oro (Au-TiO_2).

II. MATERIALES Y METODOLOGÍA

II.1 *Sembrado de especímenes vegetales*

Se sumergieron semillas de *Salvia hispanica* L. de la marca Hortaflor durante 24 horas en soluciones de 50 ppm de dióxido de titanio (TiO_2) y dióxido de titanio dopado con oro (Au-TiO_2) previamente sintetizadas por el método sol-gel. [12]

II.2 Evaluación de crecimiento

En un semillero de 14x11 pozos se le colocaron 5 semillas pretratadas con nanomateriales a cada uno y se realizaron riegos periódicos de 1.5 mL cada tercer día durante los primeros 7 días, 5 mL cada tercer día los siguientes 7 días y finalmente un volumen de 10 mL cada tercer día después del trasplante a la tercera semana de la siembra. Durante el estudio, se evaluó el desarrollo de la plántula, así como la aparición de hojas verdaderas y el comienzo de la senescencia foliar.

II.3 Análisis de valor nutrimental

Después del pretratamiento se sembraron en un recipiente de 16 cm de diámetro, realizando riegos periódicos cada tercer día con 50 mL de agua potable. Se dejaron crecer las plantas durante 14 días, finalmente se sacaron de la tierra cuidadosamente para la preparación de extractos para determinaciones de antioxidantes DPPH y ABTS.

II.4 Preparación de extractos

Una vez recolectadas las plantas, se liofilizaron durante 24 horas utilizando el equipo FreeZone 2.5 de la marca LABCONCO, posteriormente se molieron con ayuda de un molino eléctrico para después pesar en tubos cónicos tres series de 0.2 mg de muestras las de control, TiO_2 y Au-TiO_2 respectivamente. A cada tubo con la muestra en polvo se le añadieron 10 mL de metanol y se sonicaron durante 30 minutos utilizando el equipo Elmasonic E30H de la marca Elma. Se centrifugaron a 5,500 rpm durante 20 minutos en el equipo Biofuge Primo R de la marca Thermo Scientific, se separó el sobrenadante y se conservó en refrigeración durante 5 días para la realización de pruebas de metabolitos antioxidantes: DPPH y ABTS.

II.5 Prueba de actividad antioxidante por métodos DPPH y ABTS.

Se preparó una solución de DPPH al 1 mM y un stock de trolox a 1mM en metanol de la cual se preparó una curva de calibración con concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 y 800 μM para la determinación de miliequivalentes de trolox en las muestras. Se acomodaron en una microplaca triplicados del blanco, control, la curva estándar y de las muestras respectivamente. El vaciado en la microplaca se realizó en las mismas proporciones (1:10), añadiendo 20 μL de la muestra a medir y 200 μL de la solución del radical DPPH procurando hacerlo en menos de un minuto para procurar evitar la pérdida de muestra-reactivo por volatilización o algún cambio en el radical DPPH por la incidencia de la luz en él. Posteriormente se leyó a 520 nm en el multiscan lecturas a los 0, 4, 10, 30, 60 y 90 min. Los resultados de las lecturas obtenidas se prepararon en un Excel y se interpretaron empleando fórmulas y el resultado de la curva estándar.

La activación del ABTS con persulfato de potasio se realizó similar a lo realizado por *Arnao MB*, con ligeras modificaciones en los volúmenes donde, brevemente, se prepararon soluciones de ABTS (7mM) y persulfato de potasio $K_2S_2O_8$ (140 mM) y se mezclaron 5 mL con 88 μ L respectivamente para la activación del ABTS, se cubrió el recipiente con aluminio y se dejó reaccionar durante 12 horas a temperatura ambiente para la formación del radical. Posteriormente en otro frasco ámbar se diluyó la solución del radical ABTS en etanol hasta lograr una absorbancia de 0.7 ± 0.02 al leerse a 734 nm.

La curva de calibración utilizada fue la misma de Trolox que la empleada para la prueba de DPPH anteriormente explicada. El vaciado en la microplaca se realizó en las mismas proporciones (1:11.5), añadiendo 20 μ L de la muestra a medir y 230 μ L de la solución del radical ABTS para posteriormente leer a 734 nm. El porcentaje de inhibición se calculó de igual forma que en el método DPPH: mediante la implementación de la ecuación 1 así como la aplicación de la ecuación obtenida en la curva de calibración Trolox.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1 Evaluación de crecimiento

A pesar de que el inicio del brote de las plántulas se dio a los mismos días en los tres tratamientos, el desarrollo se dio distinto, marcándose más las diferencia en la proporción del desarrollo entre plantas tratadas con dióxido de titanio y las dopadas con oro. Por ejemplo, al décimo tercer día, había 46 plantas con hojas verdaderas en el control, 25 en las pretratadas con TiO_2 , mientras que en las tratadas con Au – TiO_2 había 15. De las cuales, tanto las hojas como el tallo del control se encontraban más grandes a comparación de los tratamientos con nano aditivos, en la imagen 1 se pueden observar los cambios mencionados.



Imagen 1. Desarrollo de germinados de *Salvia hispánica L.* al décimotercer día, en las imágenes se observan a: control, b: nanoaditivos de TiO_2 y c: nanoaditivos de TiO_2 dopados con oro.

Otro factor importante por considerar fue el volumen de riego: a pesar de que la frecuencia se mantuvo constante, durante el riego de 1.5 mL las plántulas se notaban deshidratadas y las hojas decaídas por el estrés por déficit hídrico, por lo que se optó por aumentar la dosis de riego a 5 mL al cual las plántulas parecieron responder positivamente. A la tercera semana de sembrado se trasplantaron a macetas más grandes e individualmente, ya que

en el semillero se contaba con hasta cinco plántulas a las cuales la falta de espacio estaba causándoles problemas para el desarrollo. A partir del trasplante se aumentó el volumen de riego a 10 mL.

III.2 Análisis de valor nutrimental

Las plantas de *Salvia hispanica* L., fueron observadas durante 14 días. Las plantas comenzaron a brotar al tercer día después de que se sembraron, al sexto se observó un brote mayor y más uniforme en las plántulas pretratadas con TiO_2 y en el control a comparación con las de Au-TiO_2 . La aparición de las hojas verdaderas en las plantas control y en las pretratadas con TiO_2 se dio al séptimo día, y al octavo en las pretratadas con Au-TiO_2 . Para el noveno día se notaba una diferencia significativa en el desarrollo del tallo, donde las plántulas pretratadas con TiO_2 mostraban un largo de aproximadamente 15 cm de largo, mientras que las tratadas con Au-TiO_2 de 8 cm (Tabla 1).

Tabla 1. Días de aparición de hojas después de la siembra de las semillas pretratadas con nanopartículas de TiO_2 , Au-TiO_2 y control.

	Control	TiO_2	$\text{Au} - \text{TiO}_2$
Aparición después de la siembra	Días después de siembra	Días después de siembra	Días después de siembra
Brote	3	4	4
Primer y segunda hoja	7	7	8
Tercer y cuarta hoja	15	17	19

Durante las lecturas del DPPH, no se notó ningún cambio significativo en la coloración de las soluciones; Es decir, el color violeta intenso se mantuvo presente desde el t0 hasta el minuto 90, lo cual a simple vista puede indicar la ausencia o un nivel bastante bajo de inhibición de antioxidantes, asimismo, las muestras no reflejaron ningún porcentaje de inhibición para la prueba de DPPH, obteniendo resultados negativos y desviaciones estándar bastante altas. Se han hecho estudios sobre los efectos de variables como la luz, pH y oxígeno en el radical DPPH para su estabilidad y demostraron que la presencia de luz afecta disminuyendo la absorbancia del DPPH conforme el paso del tiempo. [13] Una variable a considerar para tener estos resultados desiguales en las curvas estándar podría ser el efecto de la exposición prolongada a la luz solar en las microplacas al demorar una cantidad considerable de tiempo durante la preparación de las muestras con el radical DPPH. Otro factor importante podría ser la temperatura del laboratorio y la evaporación de las muestras con el paso del tiempo ya que se trabajó con extractos metanólicos y el metanol volatiliza a temperatura ambiente.

Para la determinación de los miliequivalentes de Trolox por miligramo, se hizo un despeje de x en la fórmula obtenida al realizar la curva de calibración para Trolox y se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 2.

El porcentaje de inhibición para DPPH se calculó empleando la ecuación (1):

$$\% \text{ Actividad antioxidante} = \left[1 - \frac{(Abs \text{ muestra} - blanco) - Abs \text{ blanco}}{Abs \text{ control}} \right] * 100 \quad (1)$$

$$x = \frac{Abs \text{ muestra} - 0.8555}{-0.0009}$$

Donde x corresponde a los meq. Trolox/mg

El porcentaje de inhibición obtenido por ATBS se realizó aplicando la fórmula 1 explicada previamente. La determinación de meq. Trolox por miligramo se hizo despejando la ecuación obtenida en la curva de calibración de Trolox y los resultados se muestran en la Tabla 2.

$$x = \frac{Abs \text{ muestra} - 0.7316}{-0.0009}$$

Para la prueba de ABTS los resultados obtenidos fueron positivos, sin embargo, no significativos en cantidad, ya que tanto para los tres tratamientos observados se obtuvieron porcentajes de inhibición por debajo del 40%, aun así, se destaca que tanto para el porcentaje de inhibición como la cantidad de miliequivalentes Trolox por miligramo, se tuvieron cantidades mayores en las semillas de *Salvia hispanica* L. pretratada con nano aditivos de dióxido de Titanio dopado con oro (Au-TiO₂).

Tabla 2. Resultados de pruebas de capacidad antioxidante por métodos ABTS y DPPH.

	ABTS		DPPH	
	% de inhibición	Meq trolox / mg	% de inhibición	Meq trolox / mg
Control	10.16 ± 2.4	152.98 ± 17.4	-46.23 ± 10.5	-62.74 ± 72.6
TiO₂	16.60 ± 8.9	200.24 ± 64.9	-51.24 ± 7.5	-97.48 ± 51.8
Au-TiO₂	35.47 ± 2.7	338.87 ± 19.7	-51.02 ± 2.5	-95.96 ± 17.2

V. CONCLUSIONES

Si bien, el implemento de nano aditivos como pretratamiento en semillas sigue siendo un campo al cual le falta mucho por explotar, sigue viéndose como una alternativa a métodos convencionales para tratamientos en plantas. La adición de tanto partículas de dióxido de titano como aquellas dopadas con oro no mostraron un impacto significativo en el desarrollo del valor nutrimental en plántulas de *Salvia hispanica* L pero sí en el desarrollo de hojas y largo de la planta. Aun así, al ser diferentes los resultados para antioxidantes puede significar un error humano y/o un mal empleo de las técnicas, ya que varios autores han reportado actividades antioxidantes altas en la semilla de chía. [3]. Estudios futuros podrían realizarse en donde se evalúe con otros pretratamientos, así como estudios en otros estados evolutivos y/o tejidos comestibles de la planta, entre otros.

VI. AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Querétaro por el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano. Así como a la Universidad Autónoma de Coahuila por el apoyo económico brindado. Además, a la Facultad de Ingeniería por el apoyo financiero a través del fondo para atención de problemas nacionales (FI-UAQ-FIN202106 y FONDEC-UAQ 2021 (FIN202116).

VII. REFERENCIAS

- [1] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. mayo de 1999;26(9-10):1231-7.
- [2] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. mayo de 1999;26(9-10):1231-7.
- [3] Ullah R, Nadeem M, Khaliq A, Imran M, Mehmood S, Javid A, Hussain J. Nutritional and therapeutic perspectives of Chia (*Salvia hispanica* L.): a review. *Journal of food science and technology*. 2016 Apr;53(4):1750-8.
- [4] Mohd Ali N, Yeap SK, Ho WY, Beh BK, Tan SW, Tan SG. The promising future of chia, *Salvia hispanica* L. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012 Oct;2012.
- [5] Gülçin İ, Huyut Z, Elmastaş M, Aboul-Enein HY. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian journal of chemistry*. 2010 Jan 1;3(1):43-53.
- [6] Boulebd H. Comparative study of the radical scavenging behavior of ascorbic acid, BHT, BHA and Trolox: Experimental and theoretical study. *Journal of Molecular Structure*. febrero de 2020;1201:127210.
- [7] Ozcelik B, Lee JH, Min DB. Effects of Light, Oxygen, and pH on the Absorbance of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. *J Food Science*. marzo de 2003;68(2):487-90.
- [8] Song U, Shin M, Lee G, Roh J, Kim Y, Lee EJ. Functional Analysis of TiO₂ Nanoparticle Toxicity in Three Plant Species. *Biol Trace Elem Res*. octubre de 2013;155(1):93-103.
- [9] Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*. 2011 Aug;48(4):412-22.
- [10] Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958 Apr;181(4617):1199-200.
- [11] Tian F, Chen W, Wu C, Kou X, Fan G, Li T, et al. Preservation of Ginkgo biloba seeds by coating with chitosan/nano-TiO₂ and chitosan/nano-SiO₂ films. *International Journal of Biological Macromolecules*. abril de 2019;126:917-25.
- [12] Mu S, Gotić M, Ivanda M, Popović S, Turković A, Trojko R, et al. Chemical and microstructural properties of TiO₂ synthesized by sol-gel procedure.
- [13] Arnao MB. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogenic radicals: a practical case. 2000;3.

EXTRACCIÓN DE RNA DE HONGOS FITOPATÓGENOS PARA UNA POSTERIOR EVALUACIÓN DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN

Leonardo Adrian Olivarez Jasso

Instituto Tecnológico Superior de
Purísima del Rincón
Blvd. Del Valle 2301, Guardarrayas
Cp. 36425, Guanajuato, Gto.

LRS18110154@purisima.tecnm.mx

Luis Ángel Xoca Orozco

Instituto Tecnológico Superior de
Purísima del Rincón
Blvd. Del Valle 2301, Guardarrayas
Cp. 36425, Guanajuato, Gto.

luis.xo@purisima.tecnm.mx

Resumen — En este trabajo se presenta la implementación de dos métodos distintos para la extracción de material genético de hongos fitopatógenos, con el fin de obtener ARN de buena calidad y de una concentración considerable. Se siguió la metodología dos métodos de extracción: TRI-Reagent y método de CTAB modificado por Bekesviova et al (1999), resultando que el método de CTAB en comparación con el método de TRI-Reagent se obtuvo una extracción de ARN con mayor concentración del material genético. Si se requiere extraer material genético de hongos fitopatógenos en una concentración aceptable el método de CTAB modificado por Bekesviova et al (1999) es una opción óptima.

Palabras clave — Extracción, ARN, Electroforesis, calidad.

Abstract — This work presents the implementation of two different methods for the extraction of genetic material from phytopathogenic fungi, in order to obtain RNA of good quality and of a considerable concentration. The methodology was followed by two extraction methods: TRI-Reagent and the CTAB method modified by Bekesviova et al (1999), resulting in the CTAB method compared to the TRI-Reagent method, an RNA extraction with a higher concentration of RNA was obtained genetic material. If it is required to extract genetic material from phytopathogenic fungi in an acceptable concentration, the CTAB method modified by Bekesviova et al (1999) is an optimal option.

Keywords — Extraction, ARN, Electrophoresis, quality.

I. INTRODUCCIÓN

Existen un gran número de factores que propician enfermedades en las plantas, por sí solos o bien en combinación con uno o varios más que hacen que sea posible la aparición y desarrollo de la enfermedad. En los cultivos, las enfermedades constituyen uno de los factores de mayor riesgo para su producción, por lo que resulta importante protegerlos del ataque de diversos patógenos. En los últimos años, las enfermedades causadas por hongos han ocasionado fuertes pérdidas económicas en la producción de diferentes cultivos hortícolas en México. Estas pérdidas son variables año con año y han estado en función de las condiciones climáticas, manejo del cultivo y control químico y biológico utilizado, llegando en algunos casos a alcanzar pérdidas del 100%. [1]

El muérdago (*Psittacanthus calyculatus*) es una planta hemiparásita que crece y se desarrolla sobre varias especies de árboles frutales y forestales en el centro y sur de

México. Por los impactos que ocasiona el muérdago a diversas especies forestales y frutales, es considerada como plaga, pues parasita algunas especies como encino (*Quercus* spp.), huizache (*Acacia*), mezquite (*Prosopis*), entre otros. [2] Se ha determinado de manera experimental que esta especie de muérdago contiene grupos funcionales correspondientes a hidroxilos fenólicos, flavonoides, monosacáridos, antocianidinas, flavonas, flavonoles e isoflavonas. [3] El desarrollo de productos antifúngicos de origen natural para la agricultura es una excelente alternativa para sustituir los fungicidas químicos tradicionales los cuales presentan severos daños al medio ambiente y a la salud del consumidor. Actualmente la información sobre la capacidad antifúngica de *P. calyculatus* sobre fitopatógenos es prácticamente nula, sin embargo, ya se cuentan con estudios preliminares en el laboratorio del Instituto Tecnológico Superior de Purísima del Rincón donde se han obtenido resultados positivos que confirman que algunos extractos del muérdago tienen actividad antifúngica ante la inhibición in vitro del diferentes fitopatógenos. Dado el contenido de diferentes compuestos de *P. calyculatus* y a la necesidad de implementar estrategias que coadyuven al control de esta planta parásita en el Laboratorio de Ing. Bioquímica del Instituto Tecnológico Superior de Purísima del Rincón se inició una línea de investigación para determinar algunas de sus actividades biológicas, en este sentido ya se tienen avances con extractos de hojas y flores de *P. calyculatus* obtenido del Área Natural Protegida del Cerro del Palenque, donde dichos extractos se realizaron con un proceso acuoso y uno metanolito teniendo diferentes porcentajes de concentración. En esta investigación se evaluó la capacidad antifúngica in vitro sobre una cepa de *Colletotrichum gloeosporioides* (aislada en trabajos previos), *Fusarium* spp y *Curvularia* spp (aislados de un Viñedo Purísima del Rincón Gto). [4]

En la búsqueda de una explicación más concreta del porque es que este extracto puede inhibir el desarrollo de las dos especies de hongos fitopatógenos, se realizara la extracción de ARN, para la extracción de esta molécula. Se tienen diferentes métodos; algunos de ellos son: Método de TRI-Reagent, Método CTAB modificado por Bekesiova et al (1999), Método de Terbutanol por da Silva et al (2003). Al menos un método de extracción nos permitirá obtener material genético (ARN) de buena calidad, íntegro y de una concentración adecuada para poder utilizarlo en evaluaciones de los mecanismos de acción e investigaciones futuras.

II. MARCO TEORICO

Extracción de ARN.

La extracción de ARN de calidad constituye el primer paso para el análisis de la expresión génica. Sin embargo, su obtención no es sencilla debido a la susceptibilidad de esta molécula a la presencia de contaminantes como ARNasas, proteínas y polisacáridos. Adicionalmente, debido a la diversa composición de la pared celular de los hongos se requiere optimizar los procesos de extracción de ARN para organismos específicos. El análisis de expresión génica es piedra angular en la biología molecular moderna y contribuye a un mejor entendimiento de la genética y la regulación transcripcional. La

obtención de ARN de calidad constituye la base para el desarrollo de diferentes técnicas moleculares, de lo contrario podría comprometer seriamente los resultados de procedimientos posteriores a la extracción, los cuales requieren intensa labor, tiempo adicional y altos costos. Extraer ARN no siempre es sencillo, esta molécula es menos estable que el ADN y la presencia de contaminantes como ARNsas, proteínas, polisacáridos y ADN genómico pueden desafiar su obtención. Adicionalmente, se ha reportado que la presencia de estos contaminantes puede interferir con la amplificación de los ácidos nucleicos. En el caso particular de hongos, la obtención de ARN de baja calidad es frecuente debido a la presencia de paredes celulares o estructuras como las hifas y conidias que no son degradables fácilmente. Adicionalmente, la presencia de alto contenido de fenoles y polisacáridos genera la necesidad de modificar los protocolos de extracción. En la actualidad, existen diferentes metodologías de ruptura y homogeneización de tejidos a través del uso de nitrógeno líquido, arena, esferas o liofilización de micelio. [5]

Electroforesis.

La electroforesis se utiliza comúnmente para separar moléculas en función de su carga, tamaño y forma. Se trata de un medio de separación especialmente eficaz para las biomoléculas cargadas como el ADN, el ARN y las proteínas. [6]

La electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida es una de las metodologías más utilizadas en el laboratorio en todo lo relacionado con el trabajo con ácidos nucleicos. Mediante la electroforesis podemos separar fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño, visualizarlos mediante una sencilla tinción, y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, teniendo una estimación de su concentración y grado de entereza. Podemos además extraer del gel los fragmentos de ADN que sean de interés, para posteriormente utilizarlos en diferentes aplicaciones. La electroforesis de ARN fue, y sigue siendo, una herramienta de importancia primordial en el desarrollo de las técnicas del ARN recombinante o ingeniería genética. La agarosa es un polímero lineal compuesto de residuos alternantes de D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa unidos por enlaces glucosídicos. Las cadenas del polímero de agarosa forman fibras helicoidales, que al solidificar forma una malla tridimensional de canales con diámetros entre 50 y >200 nm. Existen diferentes tipos de agarosa que se clasifican en función de la temperatura a la que se disuelven y solidifican. Las agarosas estándar se disuelven en el buffer a una temperatura de 90-95°C y solidifican a 35-45°C. Las agarosas de bajo punto de fusión se disuelven a unos 65°C y solidifican a 30-35°C. Existen además otros tipos, como las agarosas de alta fuerza de gel o las de baja viscosidad, que permiten respectivamente una mejor separación y un rango inferior del tamaño de las moléculas a separar. La concentración (p/v) de la agarosa es un parámetro de gran importancia pues determina el rango de tamaños en los que obtendremos una buena separación de los fragmentos de ARN. [7]

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1-Pretratamiento de los extractos con el material fúngico

Materiales:

- Morteros estériles y enfriados a -20°C
- Pistilos estériles y enfriados a -20°C
- Tubos eppendorf estériles y enfriados a -20°C
- Tubos Falcón de 50ml estériles y enfriados a -20°C
- Hielo seco
- Espátulas estériles

Procedimiento:

Los extractos con material fúngico se sometieron a centrifugación a 4°C, posteriormente se retiró el sobrenadante y se almacenó en tubos falcón estériles, el precipitado se colocó en un mortero previamente esterilizado y enfriado con hielo seco, se molió el extracto hasta tener una consistencia de polvo muy fino, posteriormente se pasó a un tubo eppendorf estéril. Se resguardaron cada uno de los extractos con el hielo seco en un congelador a -20 °C.

2-Extracción de ARN

Método de TRI-Reagent :

Materiales:

- Morteros estériles y enfriados a -20°C
- Pistilos estériles y enfriados a -20°C
- Micropipetas
- Puntas para micropipeta estériles y enfriadas a -20°C
- Tubos eppendorf estériles y enfriados a -20°C
- Gradilla para tubos eppendorf enfriada a -20°C
- Tubos falcón de 50ml estériles y enfriados a -20°C

Reactivos:

- Reactivo Trizol
- Cloroformo
- Alcohol Isopropanol
- Agua Estéril

Procedimiento:

Se añadió la muestra congelada al mortero agregando 2 ml de reactivo TRIzol (Invitrogen, Mulgrave, VIC, Australia) posteriormente la muestra se molió más hasta que la suspensión se había descongelado. La muestra se dividió en dos volúmenes iguales y se transfirió a 2 ml tubos Eppendorf. Después se incubó 5 min a -20 °C, en seguida se añadieron 300 µl de cloroformo, el tubo se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se dejó permanecer a temperatura ambiente durante 3 minutos. La muestra se centrifugó a 13.000 x g durante 15 minutos a 4°C. Una vez separadas las fases por el sobrenadante se transfirió a un limpio tubo Eppendorf y el ARN se precipitó con 500 µl de isopropanol, se incubó a -20 °C durante 2 horas o más.

El ARN precipitado se recogió por centrifugación a 13.000 × g durante 15 minutos a 4 °C, el sedimento se lava con 1 ml de etanol al 75% enfriado con hielo y secado al aire brevemente a temperatura ambiente. Los sedimentos de ARN en el tubo seco se re-suspendió en 50 µl de agua destilada estéril.

Método de CTAB modificado por Bekesviova et al (1999):

Materiales:

- Morteros estériles y enfriados a -20°C
- Pistilos estériles y enfriados a -20°C
- Micropipetas
- Puntas para micropipeta estériles y enfriadas a -20°C
- Tubos eppendorf estériles y enfriados a -20°C
- Gradilla para tubos eppendorf enfriada a -20°C
- Tubos falcón de 50ml estériles y enfriados a -20°C

Reactivos:

- Tris(HCl) 1M, PH 8
- EDTA 0.5M, PH 8
- NaCl 5M
- Acetato de Sodio 3M, PH 5.5
- Alfa-mercaptoetanol 2%
- Cloroformo
- Alcohol Isoamilico
- LiCl 10M
- Etanol
- CTAB

Procedimiento:

El Buffer de extracción se preparó con 2% CTAB (m/v), 100mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 M NaCl. Se precalentó el Buffer de extracción a 65 °C y se agregan 1000 µl del Buffer caliente a el mortero frio con la muestra congelada, se trituro la muestra hasta reducir sólidos, se le adiciona 100µl de mercaptoetanol y se homogenizó con la muestra triturando con el pistilo, se transfirió a dos tubo eppendorf con volúmenes iguales y se agito vigorosamente. La extracción del lisado se realizó dos veces con volúmenes iguales de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1, centrifugando en cada lisado a 10 000 rpm por 10 min a 4°C, posteriormente a la fase acuosa obtenida se le agregó 0.25 vol, de LiCl 10 M y se mezcla por pipeteo. Para precipitar el ARN, se incubaron las muestras toda la noche a -20°C. El precipitado se obtuvo centrifugando a 10 000 rpm 20 min a 4°C retirando el sobrenadante y se resuspendiendo con 50µl de agua destilada estéril. Para precipitar nuevamente el ARN, se adicionó 0.1 vol de Acetato de Sodio (pH 5.2) y 2.5 vol de etanol al 96%, después se incubaron a -20°C por más de 30 min. Las muestras se centrifugaron a 10 000 rpm por 20 min a 4°C para obtener el precipitado, el cual se lava con etanol al 70% y por último se resuspende con 50 µl buffer TE.

3-Electroforesis de las extracciones de ARN

Se realizó la técnica de electroforesis en gel de agarosa a todas las extracciones, cargando en cada pozo 8µl de muestra y 1µl de buffer de carga. Las muestras se tiñeron con SYBR-Safe o RED-SVV, se utilizó un marcador de peso molecular de 1kb. Se uso el buffer TAE 1X para la cubrir el gel dentro de la cámara. El gel se corrió por 60 min a 110 V.

4-Cuantificación del ARN

Para la cuantificación de la cantidad de ARN contenida en las muestras se usó con métodos espectroscópicos con un espectrofotómetro de UV-Visible, se midieron absorbancias con longitudes de onda de 230nm, 260nm y 280nm, usando como blanco buffer TE.

La ecuación por usar para poder reportar valores numéricos será:

$$\frac{mg}{ml} \text{ de ARN} = (Abs\ 260 \times Factor\ Dilución \times 40 \frac{mgARN}{ml}) \quad (1)$$

Para la calidad del ARN se tiene la tabla 1:

Tabla 1. Calidad del ARN

Ratio(longitudes de onda)	Valor	Pureza
260/280	2.0-2.2	ARN de pureza óptima
	>1.7	ARN de pureza aceptable
	<1.7	ARN contaminado con compuestos aromáticos

IV. RESULTADOS

Con la finalidad de verificar que método era preciso para obtener material genético de las muestras de los hongos fitopatógenos y debido al tiempo y los recursos que se disponía se tuvo que elegir un método para las posteriores extracciones de las otras muestras, se seleccionó la muestra que se encontraba en mayor cantidad y se siguieron los métodos de extracción anteriormente mencionados. En la figura 1 se puede apreciar que se obtuvo por el método de CTAB modificado por Bekesviova et al (1999) material genético(ARN) con mayor concentración en comparación con el método TRI-Reagent, pero de calidad menor, por lo que se decidió proseguir con el método de CTAB modificado por Bekesviova et al (1999) para futuras extracciones, siguiendo rigurosamente los pasos marcados para obtener ARN de calidad aceptable.

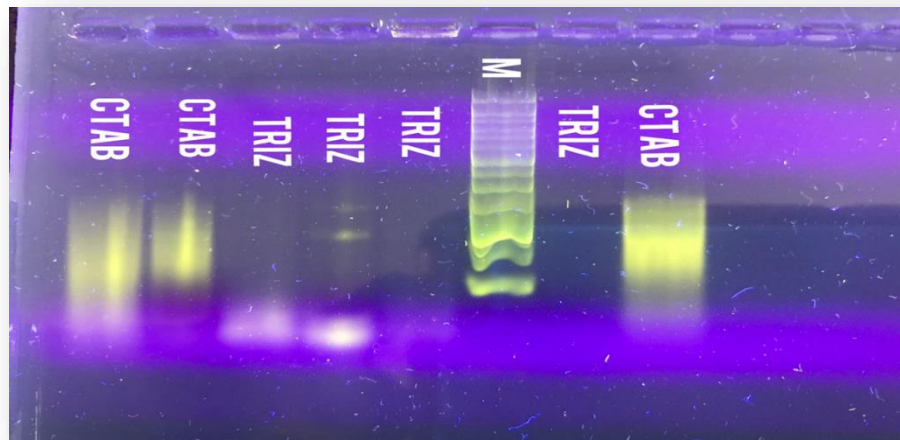


Fig.1. Electroforesis en gel de Agarosa al 1% con el material genético de la muestra: *Colletotrichum gloeosporioides* Control +, extraídas por el método TRIZ-Reagent y método CTAB modificado por Bekesviova et al (1999), tinción con SYBR-Safe y marcador 1kb.

Se obtuvo una electroforesis de resultados apreciables en la figura 2, donde se sometieron las muestras con la técnica de CTAB a dos tipos diferentes de buffer de carga muestran diferentes resultados ya que el buffer de carga Red presenta muestras con una mayor concentración a diferencia del buffer de carga Blue, cabe mencionar que en el carril 2 y 4 donde se utilizó el Red las muestras además de concentradas salen más limpias, por lo que se optó por utilizar el buffer de carga Red en las posteriores electroforesis.

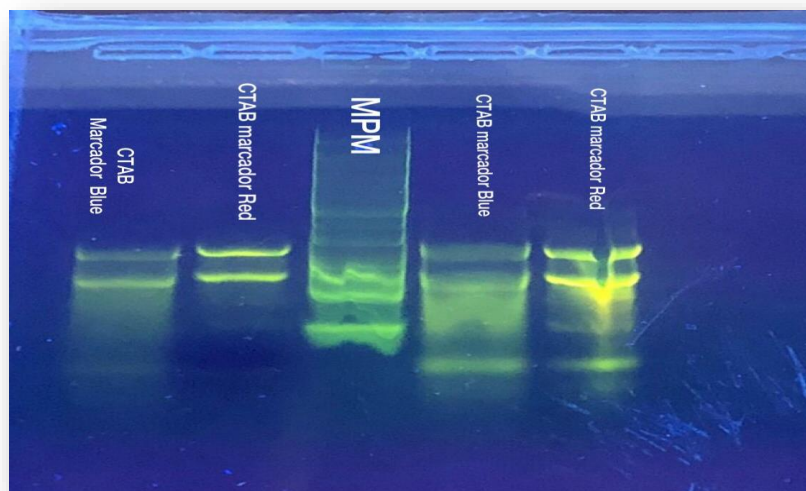


Fig.2 Electroforesis de las extracciones con CTAB sometidas a diferentes marcadores de muestras, tinción con SYBER-Safe

Para poder comprobar que el método de CTAB modificado por Bekesviová et al (1999) se podía obtener mayor concentración de material genético, se volvió a realizar un gel de agarosa al 1% sometido a electroforesis, se cambió el marcador por el RED-SVV, como se puede observar en la figura 2 no todas las muestras presentaron alguna presencia de material genético, mientras que para las demás muestras se obtuvo ARN en una concentración considerable, además de tener a simple vista por el gel un ARN de calidad aceptable.

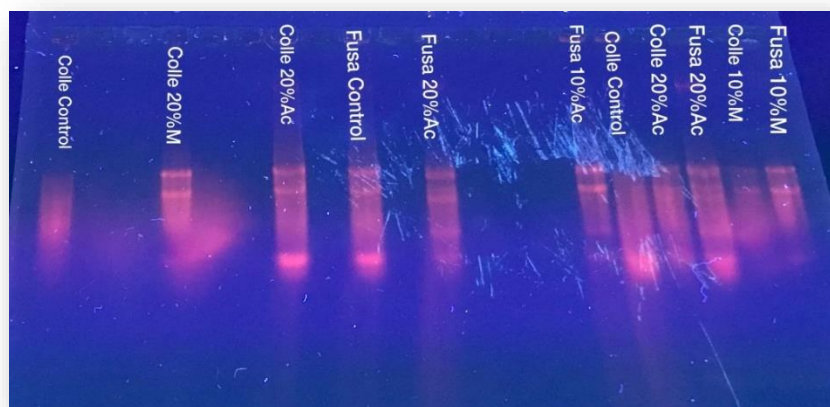


Fig.2. Electroforesis en gel de todas las muestras de material genético(ARN) de *C.gloeosporioides* y *Fusarium* spp extraídas por el CTAB modificado por Bekesviová et al (1999), marcador RED-SVV.

Por los resultados obtenidos en el anterior gel, se decidió extraer de nueva cuenta las muestras que no se apreció alguna presencia de material genético, y se corrieron en nuevo gel con las muestras que si habían presentado presencia de ARN, además para un mejor análisis se realizaron por separado cada muestra de los diferentes hongos fitopatógenos.

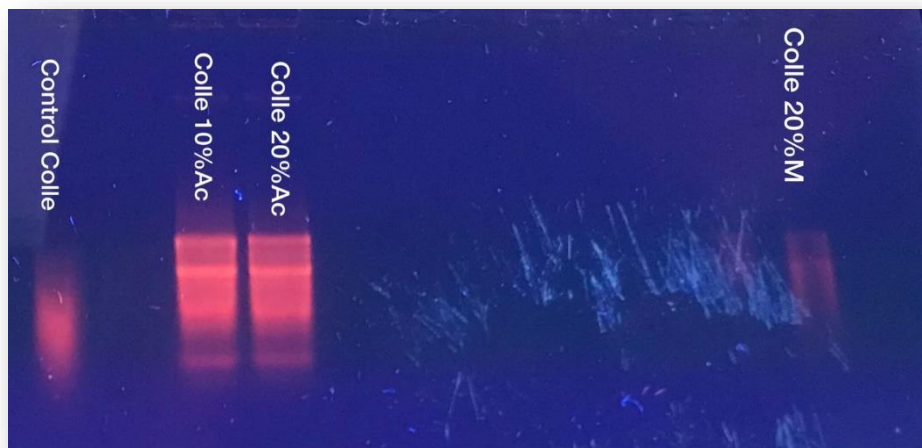


Fig.3. Electroforesis en gel de todas las muestras de material genético(ARN) de *Colletotrichum gloeosporioides* extraídas por el CTAB modificado por Bekesviova et al (1999), marcador RED-SVV.

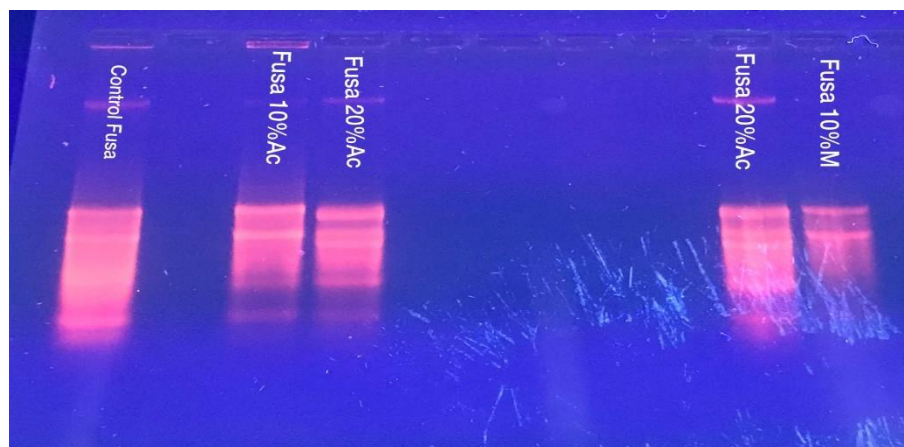


Fig.4. Electroforesis en gel de todas las muestras de material genético(ARN) de *Fusarium* spp extraídas por el CTAB modificado por Bekesviova et al (1999), marcador RED-SVV.

Al observar las figuras 3 y 4, algunas muestras no presentaron algún indicio de que estuviera presente ARN, esto puede deberse a varios factores, por mencionar que uno de ellos fue que el suministro eléctrico de la institución repentinamente se suspendió, ocasionando que los equipos de almacenamiento para las muestras no funcionaran, provocando que las muestras que se les sometió a la extracción de material genético no resultara satisfactorio, ya que al no tener un almacenamiento adecuado la molécula de nuestro interés el “ARN” se degradara, y como ya se había mencionado esta molécula es muy sensible a cambios por lo que su degradación es rápida.

Cuantificación y calidad del ARN.

Para poder afirmar que las muestras de material genético (ARN) extraídas de los hongos fitopatógenos son de calidad óptima para utilizarlos en evaluaciones futuras, se requiere de cuantificar la concentración y reportar que las muestras tienen la calidad que se requiera.

Por lo que con el método de espectroscopia por UV-Visible se tomaron las absorbancias a las longitudes de onda de 230nm, 260nm y 280nm.

Tabla 2. Datos obtenidos por la aplicación de la ecuación 1, además de seguir las indicaciones de la tabla 1.

MUESTRA	#1	#2
	CTAB	CTAB
µl de Muestra	2	2
µl de H ₂ O	1998	1998
µl/celda	2000	2000
CONCENTRACION DE ARN	9345.44 µg/ml	3215.980 µg/ml
CALIDAD DEL ARN	1.7104	1.0161

Al observar los datos de la tabla 2, para la muestra #1(colle control) tiene una calidad aceptable de ARN y está en una gran concentración, la muestra #2(fusarium control) la calidad del ARN es baja, ya que está contaminada de algunos compuestos aromáticos, además de que su concentración es baja.

Pese a los resultados y las figuras obtenidas, el método de CTAB modificado por Bekesviova et al (1999) es eficaz para poder extraer material de genético en una concentración considerable, por el otro lado no se pudo determinar la calidad de todos, puesto que el equipo con el que se iba a trabajar presento algunas fallas por lo que no se pudo determinar la calidad de todas las muestras.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Dado los resultados obtenidos, el método de CTAB modificado por Bekesviova et al (1999) resulto ser la mejor opción de los dos métodos de extracción de material genético para hongos fitopatógenos, dado que se obtuvo en concentración mayor, cabe mencionar que este tipo de técnica se puede seguir mejorando en cuestión de mejorar la limpieza del material genético y así poder obtener resultados más favorables, a lo que respecta a la cuantificación lamentablemente no se pudo reportar resultados sobre la calidad de cada una de las muestras, ya que a pesar de tener la cuantificación de por lo menos dos muestras

que fueron los controles de cada hongo las demás muestras restantes no se pudieron medir calidad debido a fallas en el espectrofotómetro por lo que se recomienda la calibración previa de este tipo de equipos. Un trabajo como este puede atribuir a realizar posteriores evaluaciones de los mecanismos de acción de estos fitopatógenos dado a que la inhibición que ejerceré el extracto del muérdago sobre ellos produce un estrés, por lo que la extracción de ARN podría ser pauta a investigaciones sobre las vías de inhibición, comprobando mediante la expresión de genes.

VI. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Expreso mis agradecimientos a los organizadores del 24° verano de la ciencia quienes hacen todo esto posible, al Instituto Tecnológico de Purísima del Rincón por brindarme la oportunidad de realizar esta estancia de verano, al Dr. Luis Ángel Xoca Orozco por darme la oportunidad de realizar este proyecto y tener el honor de trabajar con un gran Doctor como el, agradezco el apoyo de mis compañeros con quienes trabaje y a Dios por bendecirme todos los días.

REFERENCIAS

- [1] L. P. M. Luis Roberto Pérez Rodríguez, «Sensibilidad in vitro de hongos fitopatógenos causantes de enfermedades en fresa a controladores biológicos y fungicidas, en el estado de Guanajuato, México,» *Scielo*, vol. ., nº ., p. 11, 1999 09 2020.
- [2] F. a. L. C. Azpeitia, «Reproductive biology and pollination of the parasitic plant *Psittacanthus calyculatus* (Loranthaceae) in central México.,» *J. Torrey Bot. Soc.*, vol. ., nº ., p. 429–438, 2006.
- [3] M. Rodríguez Acosta, «Comparación y análisis de extractos de *Psittacanthus calyculatus* y *Phoradendron tomentosum* para su uso en el desarrollo de alimentos funcionales para diabéticos tipo 2,» *UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO*, vol. ., nº ., p. ., 2013.
- [4] X. Orozco, «Transcriptomic Analysis of Avocado Hass (*Persea americana* Mill) in the Interaction System Fruit-Chitosan-Colletotrichum,» *Plant Sci*, vol. ., nº 8, pp. 11-13, 2017.
- [5] F. M. O. E. T. R. Jhon Felipe Sandoval, «Evaluación de diferentes métodos de extracción de ARN a partir del hongo nativo *Xylaria* sp,» *Universidad Nacional de Colombia*, vol. 19, nº 1, p. 11, 2017.
- [6] E. a. T. B. E. Company, «Principios y práctica de la electroforesis en gel de agarosa,» *EDVOTEK and The Biotechnology Education Company*, vol. ., nº ., p. 16, 2016.
- [7] F. F. Fierro, «Electroforesis,» *INECC*, p. 1, 2011.
- [8] N. A. S. a. M.-B. W. Ulrike Schumann, «A fast and efficient method for preparation high-quality RNA from fungal mycelia,» *Schumann et al. BMC Research Notes*, vol. 1, nº ., p. 5, 2013.

EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE COMPUESTOS FITOQUÍMICOS EN LA ELABORACIÓN DE SUPLEMENTOS A BASE DE ORUJO DE UVA.

Adriana Tronco Rodríguez

Universidad Autónoma de Querétaro
Cerro de las Campanas S/N, Las Campanas,
76010 Santiago de Querétaro, Qro.
anairda.tronco@gmail.com

Rosalía Reynoso Camacho

Universidad Autónoma de Querétaro
Cerro de las Campanas S/N, Las Campanas, 76010
Santiago de Querétaro, Qro.
rrcamachomx@yahoo.com.mx

Resumen — En el presente trabajo se evaluó la estabilidad de compuestos fitoquímicos presentes en tres suplementos formulados a base de orujo de uva, tomando en cuenta tiempo y temperatura, con la finalidad de seleccionar el suplemento con una mayor estabilidad de compuestos polifenólicos. Los resultados indicaron la disminución de compuestos polifenólicos tras el almacenamiento prolongado del suplemento, sin embargo en la variedad Tempranillo se reportó un aumento de flavonoides y polifenoles no extraíbles entre los 10 y 40 días a 45°C.

Palabras clave — Fitoquímicos, orujo de uva, estabilidad.

Abstract — In the present work, the stability of phytochemical compounds present in three supplements formulated based on grape pomace was evaluated, taking into account time and temperature, in order to select the supplement with a greater stability of polyphenolic compounds. The results indicated the decrease of polyphenolic compounds after prolonged storage of the supplement, however in the Tempranillo variety an increase of flavonoids and non-extractable polyphenols was reported between 10 and 40 days at 45°C.

Keywords — Phytochemical, grape pomace, stability.

I. INTRODUCCIÓN

La uva es uno de los frutos con una alta producción alrededor del mundo, con valores de más de 75 millones de toneladas anuales, en donde el 80% de la producción de la uva está destinada a la fabricación de vino [1]. Los residuos generados en la vinificación, se caracterizan por presentar como metabolitos secundarios compuestos polifenólicos, que son clasificados por el número de carbonos o el número de anillos de benceno presentes en su molécula, como simples (ácidos fenólicos) o complejos (estilbenos, cumarinas, flavonoides, antocianinas, taninos condensados, entre otros.) [2], los cuales se extraen principalmente de la cáscara y semillas. Estos compuestos polifenólicos son de importancia por los beneficios que pueden brindar, ya sea como antioxidantes, o bien por otros beneficios a la salud tales como poseer propiedades antimicrobianas y antivirales [3]; además de la mejora del peso corporal, la esteatosis hepática y la resistencia a la insulina [4]. Es por ello que recientemente se propuso utilizar estos valiosos residuos para la elaboración de un suplemento alimenticio que brinde beneficios a la salud, del cual ya se han probado algunas formulaciones.

Sin embargo, dada la importancia que los polifenoles pueden tener en la prevención de enfermedades, resulta esencial conocer la estabilidad que poseen éstos compuestos

fitoquímicos a diferentes condiciones de tiempo y temperatura, por lo tanto en éste estudio se buscó evaluar la estabilidad de estos compuestos en un posible suplemento alimenticio, con los orujos de tres variedades de uvas tintas: Syrah, Cabernet Sauvignon y Tempranillo, para así determinar cual variedad es que presenta una mayor estabilidad en compuestos fitoquímicos a diferentes tiempos y temperaturas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluó el contenido de compuestos polifenólicos de un suplemento a base de orujo de uva a los 10, 40, 60 y 80 días a 35 y 45 °C. Donde lo único que variaba era el orujo utilizado (Syrah, Tempranillo y Cabernet) no la formulación, la cual consistía en 2.5 g de orujo de uva, 112.5 mg de vitaminas, 0.25 g de minerales, 0.1 g de carboximetil celulosa, 1.5 g de chía, 0.5 g de saborizante y 1.75 g de endulzante.

A. Cuantificación de polifenoles extraíbles (EP).

Para la obtención de los polifenoles extraíbles se realizaron extractos empleando la metodología descrita por Jimenez-Escrig y col, ver [5], la cual se basa en que los EP son compuestos de bajo peso molecular solubles en disolventes orgánicos.

Para ello se pesaron 0.5 gramos de muestra y se le agregó 20 mL de una solución de metanol/agua (50:50), se agitaron 1 hora a temperatura ambiente y se centrifugaron a 4000 rpm 10 minutos a 23 °C y se recuperó el sobrenadante (extracto A), posteriormente al residuo se le agregó 20 mL de acetona/agua (70:30), se agitó 1 hora y se centrifugó a 3000 rpm 10 minutos a 23 °C, se recuperó el sobrenadante (extracto B) y el residuo se guardó para la determinación de compuestos polifenólicos no extraíbles. Posteriormente se mezclaron 10 mL del extracto A con la misma cantidad de extracto B (extracto final).

Todo lo anterior se realizó cuidando que la muestra no se expusiera a la luz ya que los compuestos polifenólicos son fotosensibles, además todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

1) Determinación de fenoles totales

Para la determinación de polifenoles totales extraíbles se utilizó el método de Folin y Ciocalteu. Se colocaron 10 µL del extracto final de cada muestra (apartado A) en microplaca de manera consecutiva y se les añadieron 40 µL de agua destilada para posteriormente agregar 25 µL del reactivo de Folin Ciocalteu 1N diluido (1:1) con agua destilada, se agitó por 5 minutos para posteriormente añadir 125 µL de Na₂CO₃ al 20% y se dejó reposar 30 minutos protegiendo de la luz. Una vez transcurrido el tiempo se midió a una absorbancia de 765 nm. La cuantificación se realizó mediante una curva estándar de ácido gálico y los resultados fueron reportados como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de muestra.

2) Flavonoides

Para la cuantificación de flavonoides se tomaron 5 µL del extracto final (apartado A) y se le añadieron 120 µL de agua destilada, a continuación, se le agregaron 7.5 µL de NaNO₂ al

5% y se reposó durante 6 min, a continuación, colocaron 15 µL de AlCl_3 se esperaron 5 min y finalmente se agregaron 50 µL de NaOH seguido de 52.5 µL agua. La microplaca con las muestras se leyó a 510 nm.

3) Determinación de antocianinas monoméricas

Para su determinación se empleó el método de pH diferencial de Giusti y Wrolstad, ver [6], en el cual se emplearon dos soluciones: KCl, 0.25 M a pH 1 y $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$, 0.4 M a pH 4.5. Se colocaron en microplaca 50 µL de muestra (extracto final) y se le añadieron 175 µL de la solución amortiguadora (se realizó para ambas soluciones). La absorbancia se midió a 510 y a 700 nm. La cuantificación se reportó como mg de equivalentes de cianidina-3-glucósido por gramo de muestra. Se emplearon las siguiente Ec. (1) y (2):

$$Abs_{total} = [(Abs_{510\text{ nm}} - Abs_{700\text{ nm}})_{pH\ 1} - (Abs_{510\text{ nm}} - Abs_{700\text{ nm}})_{pH\ 4.5}] \quad (1)$$

Donde:

Abs= Absorbancia total

$$Antocianinas\ monoméricas = \frac{Abs \times PM \times factor\ de\ dilución}{\epsilon \times distancia} \quad (2)$$

Donde:

PM= Peso molecular, 463.3 g/mol de la cianidina-3-glucósido

ϵ = Coeficiente de extinción molar 28000 L/ mol*cm de la cianidina-3-glucósido

B. Cuantificación de polifenoles no extraíbles.

1) Proantocianidinas no extraíbles (NEPA)

Para la cuantificación de NEPA, se utilizó el residuo del extracto de polifenoles extraíbles, el cual fue previamente secado a 46 °C por 24 horas, posteriormente a 100 mg de residuo seco se le agregó 2 mL de la solución butanol/HCl (5:95, v/v) con 1.17 de FeCl_3/L (solución A) y se incubó a 82 °C por 1 hora, posteriormente se centrifugó a 2500 rpm por 10 min recuperando el sobrenadante. Se realizaron 3 lavados con 1 mL de la solución, se recolectaron los sobrenadantes y se aforó a 5 mL con la misma solución. Las absorbancias se leyeron a 450 y 555 nm [7].

2) Polifenoles hidrolizables (HPP)

Para la cuantificación de los HPP se realizó una hidrólisis ácida para cuantificar los compuestos asociados a fibra por medio de enlaces glucosídicos [8]. Se pesaron aproximadamente 3 g de residuo seco y se le añadieron 22 mL de metanol/ H_2SO_4 (90:10) y se incubó a 85°C durante 20 horas. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante. Después de tres lavados con agua destilada se centrifugó nuevamente a 5000 rpm por 10 minutos. Los HPP se cuantificaron mediante la técnica de Folin y Ciocalteu antes mencionada.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A. Cuantificación de polifenoles extraíbles.

Los compuestos fenólicos totales solamente fueron determinados en las muestras almacenadas 45 °C. Para las tres variedades la cantidad de polifenoles disminuyó, para Cabernet se presentó una pérdida del 56%, para Syrah del 25% y para tempranillo del 69% a los 80 días de almacenamiento. Estos resultados sugieren que la muestra Syrah es la más estable, a pesar de su baja concentración de estos compuestos fitoquímicos. En el caso de los flavonoides (Figura 2), para Cabernet y Syrah se presentó una disminución al día 60 y se mantuvo la concentración en el día 90. Sin embargo, para Tempranillo se observó un efecto no esperado, ya que este suplemento incrementó el contenido de flavonoides, este efecto puede ser atribuido a un acomplejamiento de compuestos fenólicos simples.

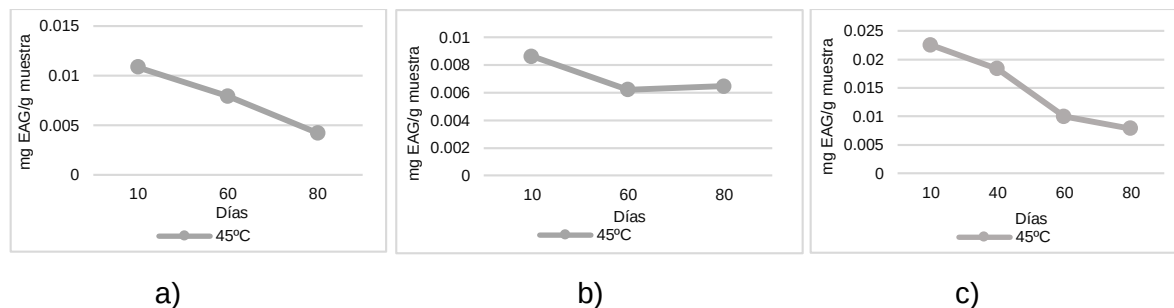


Figura 1. Estabilidad de compuestos fenólicos totales en suplementos elaborados con diferentes variedades de uva a) Cabernet Sauvignon, b) Syrah, c) Tempranillo

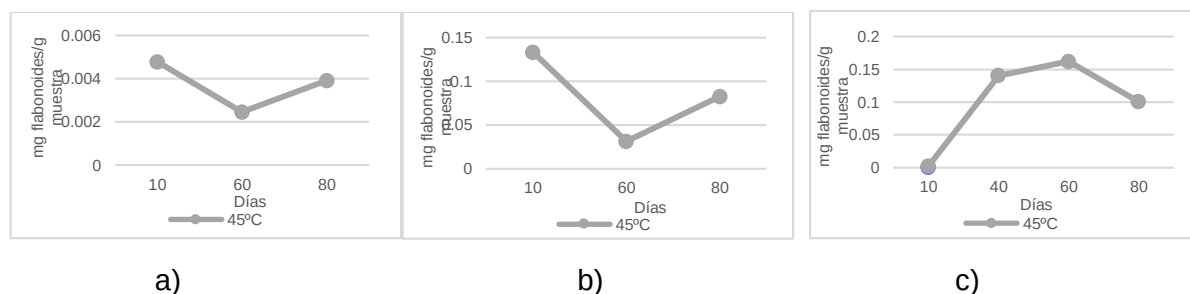
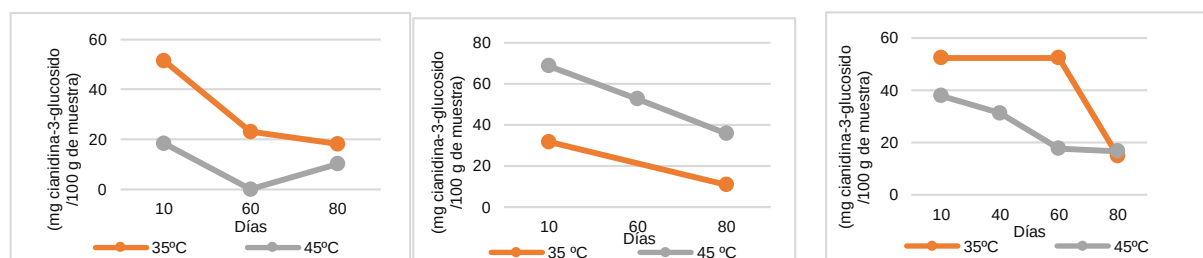


Fig. 2. Estabilidad de flavonoides en suplementos elaborados con diferentes variedades de uva: a) Cabernet, b) Syrah, c) Tempranillo



a)

b)

c)

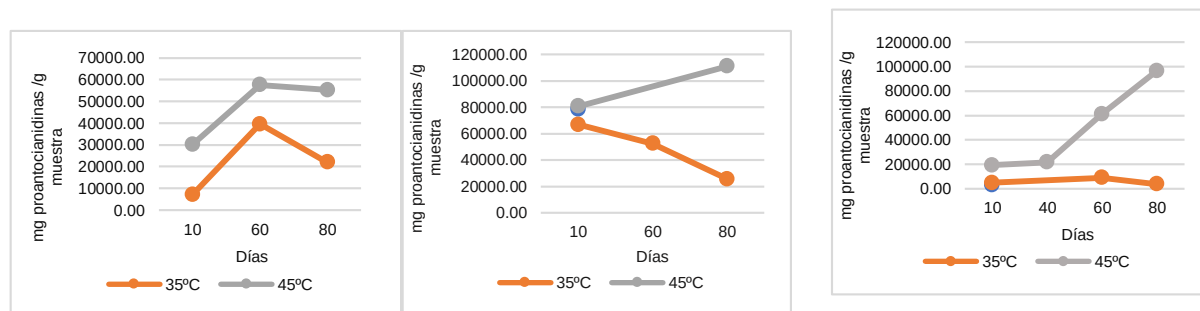
Figura 3. Estabilidad de antocianinas monoméricas en suplementos elaborados con diferentes variedades de orujo de uva: a) Cabernet, b) Syrah, c) Tempranillo

En el análisis de antocianinas monoméricas, se encontró que en las tres variedades hay una tendencia a la disminución de estos compuestos, siendo Tempranillo la variedad que mantuvo una mayor estabilidad de antocianinas los primeros 60 días a 35 °C de almacenamiento (Figura 3).

B. Cuantificación de polifenoles no extraíbles.

Como se muestra en las figuras 4 y 5, se obtuvo una mayor estabilidad en los polifenoles no extraíbles a comparación de los extraíbles, ya que se observó una menor disminución de éstos compuestos. Sin embargo, nuevamente se encontró un aumento en polifenoles hidrolizables en la variedad Tempranillo a partir del día 40, lo cual como ya se mencionó pudo haber ocurrido debido al acomplejamiento de los compuestos polifenólicos específicamente en ésta variedad; diversos autores han reportado comportamientos similares atribuidos a la temperatura de almacenamiento, ya que se ha demostrado que la luz no afecta de manera significativa en comparación con la temperatura [9].

Zhang et al, ver [10], evaluaron el efecto del secado por aspersión sobre los compuestos fenólicos del jugo de arándano y su estabilidad durante el almacenamiento, y reportaron que el ácido protocatecúico (ácido fenólico) y la quercetina (flavonoide) aumentaron de 3 a 5 veces y de 9 a 16 veces a 45 °C, respectivamente, lo cual es similar a los resultados obtenidos en éste estudio. Por lo tanto, estos resultados sugirieron que una temperatura más alta (45 °C) puede facilitar la liberación de compuestos fenólicos en la variedad de Tempranillo, lo cual podría explicar el aumento tanto en flavonoides como en proantocianidinas no extraíbles.



a)

b)

c)

Fig. 4. Estabilidad de proantocianidinas no extraíbles en suplementos elaborados con diferentes variedades de orujo de uva: a) Cabernet, b) Syrah, c) Tempranillo

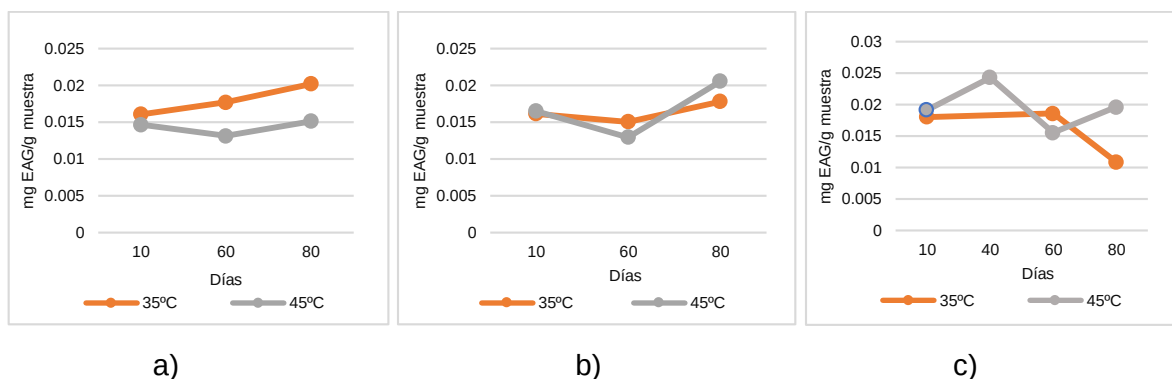


Fig. 5. Estabilidad de polifenoles hidrolizables en suplementos elaborados con diferentes variedades de orujo de uva: a) Cabernet, b) Syrah, c) Tempranillo

IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Estudios previos realizados con esta misma formulación del suplemento han demostrado que del día 1 al 10 de almacenamiento, el suplemento pierde una gran cantidad de compuestos polifenólicos a las mismas temperaturas reportadas, en esta investigación en continuación a la previa, se demostró que a partir del décimo día la concentración de compuestos polifenólicos en los suplementos continua con un comportamiento de disminución, sin embargo en la variedad de Tempranillo aumenta significativamente la cantidad de estos compuestos a los 45 °C, lo cual se debe al acomplejamiento de éstos compuestos por la temperatura de almacenamiento, motivo por el cual vale la pena continuar y profundizar con éstos estudios de estabilidad para así determinar las condiciones favorables para el almacenamiento del suplemento así como la fecha ideal de consumo para que éste producto tenga efectos significativos en la salud del consumidor.

V. RECONOCIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Querétaro y la investigadora anfitriona Rosalía Reynoso Camacho por las facilidades y el apoyo otorgado para la realización de ésta estancia de verano.

REFERENCIAS

- [1] R. Fontana, A. Antonioli, and R. Bottini, "Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics," *J Agric. Food Chem.*, vol. 61, no. 38, pp. 8987–9003. September 2013. Disponible en <https://doi.org/10.1021/jf402586f> [consultado en 2022].
- [2] P. Rodríguez, "Caracterización del contenido nutricional, compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de maíces pigmentados (*Zea mays L.*) nativos del sur de Nuevo León," Sc. D. dissertation, Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, Mty, 2019.
- [3] D. Amaya, A. C. Flores, A. Iliná, C. N. Aguilar, L. Sepúlveda, J. A. Ascancio, L. A. Prado, and M. L. Chávez, "La industria vinícola como fuente de valiosos residuos agroindustriales," *CienciAcierta*, no. 67, pp. 123-145, September 2021.

- [4] J. Yu, R. R. Bansode, I. N. Smith, and S. L. Hurley, "Impact of grape pomace consumption on the blood lipid profile and liver genes associated with lipid metabolism of young rats," *Food & function*, vol. 8, no. 8, pp. 2731-2738, August 2017.
- [5] A. Jiménez, M. Rincón, R. Pulido, and F. Saura, "Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber," *J Agric. Food Chem.*, vol. 49, no. 11, pp. 5489-5493, September 2001. Disponible en <https://doi.org/10.1021/jf010147p> [consultado en 2022].
- [6] M. Giusti, and R.E. Wrolstad, "Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy," *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 00(1), F1.2.1–F1.2.13, 2001. Disponible en <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00> [consultado en 2022].
- [7] J. Zurita, M. E. Díaz, and F. Saura, "Improved procedure to determine non-extractable polymeric proanthocyanidins in plant foods," *Int. J. Food Sci. Nutr.*, vol. 63, no. 8, pp. 936-939, Apr 2012. Disponible en <https://doi.org/10.3109/09637486.2012.681634> [consultado en 2022].
- [8] Y. Martínez, "Aplicación de Descompresión Instantánea Controlada (DIC) para mejorar la biodisponibilidad de bioactivos de subproductos de mango y uva para el control de la obesidad y sus complicaciones," Sc. D. dissertation, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, Qro, 2021.
- [9] I. Esparza, M. J. Cimminelli, J. A. Moler, N. Jiménez, and C. Ancín, "Stability of Phenolic Compounds in Grape Stem Extracts," *Antioxidants MDPI.*, vol. 9, no. 8, August 2020. Disponible en <https://doi.org/10.3390/antiox9080720>
- [10] J. Zhang, X. Chen, and S. Y. Quek, "Effect of spray drying on phenolic compounds of cranberry juice and their stability during storage," *J. Food E.*, June 2019. Disponible en 109744.doi:10.1016/j.jfoodeng.2019.109744

IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS NOSOCOMIALES EN UN HOSPITAL VETERINARIO DE GRANDES ESPECIES.

Leslie Amairani Esparza Saucedo

Universidad Autónoma de Coahuila.
Carr. Torreón - Matamoros km. 7.5
Ejido El Águila. Ciudad Universitaria.
C.P. 27087
aesparza@uadec.edu.mx

Dr. Diego Josimar Hernández Silva.

Universidad Autónoma de Querétaro.
Universidad Autónoma de Querétaro, Campus
Aeropuerto. Carr. a Chichimequillas S/N, Ejido
Bolaños, 76140. Santiago de Querétaro, Qro.
diego.hernandez@uaq.mx

Resumen —Este proyecto de investigación tuvo como objetivo la búsqueda intencionada, así como la identificación de bacterias con un potencial de estar asociadas a infecciones hospitalarias en superficies y objetos inanimados de un hospital veterinario de grandes especies. Además de los métodos de preparación de los diferentes medios de cultivo utilizados para el aislamiento y crecimiento de microorganismos y su posterior identificación con pruebas bioquímicas y técnicas moleculares. Por medio de hisopos estériles se muestrearon las diferentes áreas del hospital veterinario. Se lograron aislar diferentes microorganismos con las características bioquímicas que sugieren pertenecer a los Enterobacteriales, y se sugiere la identificación por métodos moleculares y de secuenciación para confirmar los hallazgos.

Palabras clave —Bacterias, infecciones hospitalarias, hospital veterinario de grandes especies, pruebas bioquímicas, técnicas moleculares, microorganismos, Enterobacteriales, métodos moleculares, secuenciación.

Abstract — The aim of this project is the intentional search and identification of bacterias that can cause Hospital-Acquired Infection on surfaces and inanimate objects from a Large Animal Veterinary Hospital. Additionally, we describe the preparation methods for different culture media used for isolation and growth of microorganisms and the subsequent identification with biochemical and molecular techniques. Using sterile swabs different areas from the hospital were sampled. Different microorganisms were isolated with Enterobacterial biochemical characteristics, it is suggested its identification with molecular and sequencing methods to confirm this findings.

Keywords — Bacteria, hospital infections, large species veterinary hospital, biochemical tests, molecular techniques, microorganisms, Enterobacteriaceae, molecular methods, sequencing

I. INTRODUCCIÓN.

La epidemiología generalmente ha sido considerada una disciplina útil solamente para aquellos que trabajan en actividades de salud pública. Esta es una ciencia relacionada con las circunstancias bajo las cuales los animales se enferman o permanecen enfermos y, para remediar esto, es básico alterar estas circunstancias de manera de proteger al animal de una recurrencia de la enfermedad. (Acha, 1964)

El diagnóstico de las enfermedades infecciosas se basa en una historia clínica completa con la búsqueda de factores de riesgo epidemiológicos que orientan, localizan y permiten establecer un diagnóstico de sospecha. (García Palomo et al., 2010)

Las infecciones nosocomiales representan un problema de gran importancia clínica y epidemiológica debido a que condicionan mayores tasas de morbilidad y mortalidad, son aquellas donde se lleva a cabo la multiplicación de un patógeno en el paciente o en el trabajador de la salud que puede o no dar sintomatología, y que fue adquirido dentro del hospital o unidad médica. Son de gran importancia en medicina humana pero aún se desconoce cuál es su papel en medicina veterinaria. (Aarón et al., 2021)

Las bacterias son consideradas como los agentes nosocomiales de mayor importancia, ya que son responsables del 90% de estas. Entender el papel que juegan los equipos hospitalarios y el ambiente con respecto al mantenimiento de infecciones nosocomiales y la transmisión es crucial, por lo cual se planteó el objetivo de identificar la presencia de bacterias asociadas a infecciones hospitalarias en ambientes y superficies de un hospital veterinario universitario. (Arroyave et al., 2019)

I. MARCO TEÓRICO

El estudio de las infecciones nosocomiales es un tema de gran relevancia mundial, su importancia se manifiesta siglos atrás. Su frecuencia se incrementa como consecuencia de los avances tecnológicos de la medicina y al aumento de la resistencia bacteriana de los patógenos nosocomiales, dependiendo de los hospitales y de los servicios. Se denomina infección nosocomial a aquella que no estaba presente ni estaba incubando en el momento de ser admitido el paciente en un hospital. De forma arbitraria, se establece un plazo de 48 – 72 horas como mínimo necesario para considerar la infección como “adquirida en el hospital”. Se considera así mismo que un paciente tiene infección nosocomial 48 horas después de dada el alta hospitalaria. Para que una infección ocurra se requiere de varios factores: número suficiente de microorganismos patógenos, huésped susceptible, un ambiente que permita entrar en contacto con el huésped. (Mejía, s. f.)

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Preparación de medios

Se llevó a cabo la preparación de diferentes tipos de medios de cultivo: Mc Conckey, Agar sangre, Bard Parker, Test DNAsa, Sal y Manitol, Citrato de Simmons, Caldo Urea, Malonato, TSI, siguiendo las instrucciones del fabricante en cuanto a cantidades y condiciones de

B. *Muestreo de áreas de Hospital Veterinario de Grandes Especies (HVGE)*

Las muestras fueron tomadas utilizando hisopos estériles humedecidos con Agua Peptonada Amortiguada estéril o solución salina estéril para posteriormente deslizar el hisopo por las superficies que se desean muestrear. Una vez tomada la muestra se depositó el hisopo dentro del tubo estéril que contenía el medio de transporte para mantener la viabilidad de los microorganismos, eliminando con tijeras la parte del hisopo que tocó el analista. El hisopo se utilizará para realizar la descarga en cada agar. Durante todo el procedimiento el personal analista que tomó las muestras usó guantes, cubre bocas y gafas de seguridad. Los sitios para muestrear se tomaron basados en el croquis del hospital (Figura 1). Las áreas muestreadas fueron:

- 11. Quirófano de equinos (Manija, escotilla, puerta de acceso, mesas de material, y uso general, lámparas, mangueras, monitores, interruptores)
- 06. Vestidor (Manija, apagador)
- 07. Área de lavado cirujanos (Tarja, botella de jabón, interruptor, manija de puerta)
- 17. Quirófano bovinos (Rumiantes) (Manijas, interruptores, mesas de material y uso general, casilleros, planchas de cirugía, tarja)
- 08. Farmacia (casilleros, interruptor, manija, mesas, vitrina)
- 15. Área lavado Cirujanos (Tarja, botella de jabón, manija de acceso)

[illegible]

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO Folio: HVGE-11-01 (Ejemplo)
Facultad de Ciencias Naturales

Proyecto: Identificación de Bacterias Nosocomiales en Hospitales Veterinarios

Responsable del Proyecto: Dr. Diego Josimar Hernández Silva

Fecha: Lugar de muestreo:

Nombre analista:

Área de muestreo (número y nombre del área):

Describe el objeto o superficie que se
muestreo:

•
•

Observaciones:

Figura 2. Etiquetas para identificar los tubos con muestras.

- 1) Agar Sangre
- 2) Mc Konkey.

Al terminar de sembrar las muestras, se colocaron las cajas de Agar Sangre dentro de un recipiente con tapa y se introdujo un tubo con ácido acético y bicarbonato de sodio, para generar un ambiente de CO₂.

C. Incubación

Se incubaron a 37° C y se observó el crecimiento.

D. Tinción de Gram

En las cajas donde se observó crecimiento, se procedió a clasificar las colonias de acuerdo con sus morfologías y se les asignó una numeración (Ej.: 1, 2, 3, etc.). Ya clasificadas las colonias se realizó una tinción de Gram a cada una de ellas.

Se etiquetó el portaobjetos con el folio correspondiente del muestro y el número de colonia. Se consideraron a los cocos Gram+ y bacilos Gram- para someterlos a pruebas bioquímicas.

1) COCO GRAM +

Se sometió a la prueba de catalasa, si el resultado fue positivo se resembró en los medios Sal y Manitol, Test DNAsa y Barid Parker

2) BACILO GRAM-

Se sembraron en los medios TSI, LIA, MIO, Simmons, Malonato y Urea para realizar una identificación por medio de pruebas bioquímicas, después se resembraron en medio Mac Conkey en un solo cuadrante, tendiendo un total de 4 diferentes colonias por caja.

E. Pruebas bioquímicas.

La interpretación de los resultados de las pruebas bioquímicas se basó de acuerdo a la lectura de la Tabla 1.

	<i>E. tarda</i>	<i>E. coli</i>	<i>H. alvei</i>	<i>M. morganii</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. rubideu</i>	<i>P. rustigianii</i>	<i>C. braakii</i>
Producción de	+	+	-	+	-	-	-	+	v
Indol	+	-	-	-	+	-	-	-	v
H ₂ S (TSI)	+	-	-	-	+	-	-	-	v
Citrato de Simmons	-	-	v	-	v	v	v	-	+
Lisina descarboxilasa	+	v	+	-	-	+	v	-	-
Arginina dehidrolasa	-	v	-	-	-	-	-	-	v
Ornitina descarboxilasa	+	v	+	+	+	-	-	-	+
Hidrólisis de Urea	-	-	-	+	+	v	v	-	v
Utilización Malonato	-	-	v	-	-	v	v	-	-
Gas de Glucosa	+	+	+	v	+	+	v	v	+
Fermentación de:									
Lactosa	-	v	v	-	-	v	+	-	+
Sorbitol	-	v	-	-	-	v	-	-	+
Arabinosa	v	+	+	-	-	v	+	-	+
Sacarosa	-	v	v	-	v	v	+	v	-
Manitol	-	+	+	-	-	+	+	-	+
Dulcitol	-	v	-	-	-	v	-	-	v
Adonitol	-	-	-	-	-	v	v	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	+	v	-	-
Rafinosa	-	v	-	-	-	+	+	-	-
Motilidad (36°C)	+	v	+	v	+	-	v	v	+

(+) positivo; (-) negativo; (v) variable

Tabla 1. Pruebas bioquímicas.

F. Técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se sometieron los aislados de interés a la técnica de PCR punto final para obtener el gen de interés amplificado de los microorganismos aislados utilizando cebadores universales (U3 y U5 como Forward, y U4 como Reverse). (Aguilera et al., 2014)

III. RESULTADOS

Durante las pruebas realizadas se evidenció la presencia de microorganismos viables y con potencial nosocomial en algunas de las superficies muestreadas de las seis áreas evaluadas en el hospital veterinario. En total se obtuvieron 11 microorganismos aislados de verdadero interés, como se muestra en la Figura 3. Los cuales fueron seleccionados de acuerdo con las diferentes pruebas a los que fueron sometidos. Se examinaron las muestras de PCR con la técnica de electroforesis con la ayuda de un marcador de talla molecular (Bio-33025) para intentar identificar los microorganismos de interés. Las pruebas realizadas con la técnica de PCR se lograron observar libres de contaminantes, a pesar de lo complicado que puede ser respecto a los cebadores universales utilizados. Con respecto a las lecturas de pares de bases que se pudieran mostrar de las muestras de los aislados de interés, no se lograron leer con claridad en las pruebas realizadas (Figura 4)



Figura 3. Tinciones de microorganismos aislados del muestreo del hospital veterinario de grandes especies.

IV. ANALISIS DE RESULTADOS

Se lograron encontrar bacterias que pertenecen a los Enterobacteriales que generalmente son las que presentan multirresistencia. Se confirma de manera parcial la presencia de un riesgo para los pacientes de este hospital por lo que se sugiere continuar con la identificación molecular por medio de la secuenciación del gen 16s del RNA ribosomal y la caracterización de los perfiles antimicrobianos.

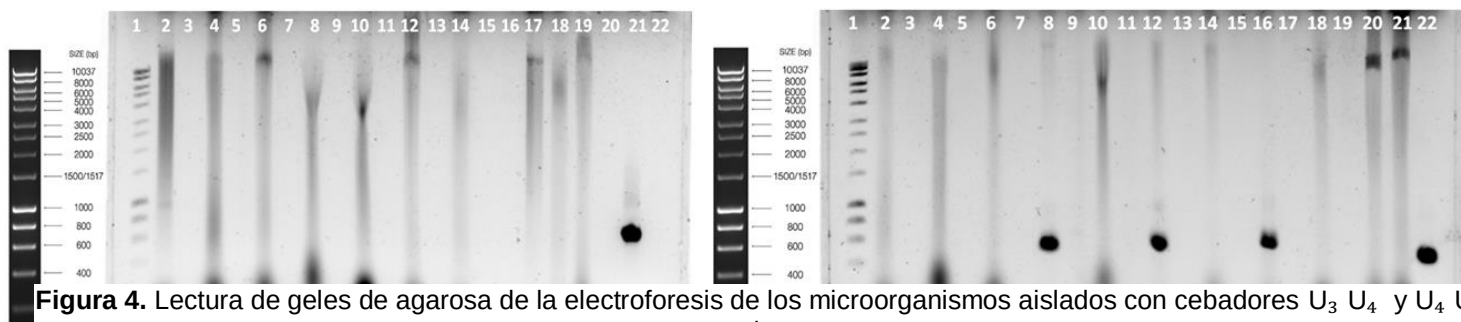


Figura 4. Lectura de geles de agarosa de la electroforesis de los microorganismos aislados con cebadores U₃ U₄ y U₄ U₅, respectivamente.

V. CONCLUSIONES

La presente investigación muestra un panorama de puntos críticos donde pueden ser localizados patógenos nosocomiales de interés. Cabe hacer notar las diferencias por el tipo de temática en los hospitales veterinarios. Esto se debe a la manera distinta de llevar a cabo los procedimientos por parte del personal y al tipo de infecciones nosocomiales que se puedan enfrentar los pacientes. Una debilidad del presente análisis es que no se cuenta con la información específica de ciertos microorganismos que se lograron aislar, por lo que el siguiente paso es mandar a analizar al Hospital Infantil de Morelia “Eva Sámano de López Mateos”.

VI. RECONOCIMIENTO (AGRADECIMIENTO)

Al comité organizador del 24º Verano de la ciencia de la región centro. Al Dr. Diego Josimar Hernández Silva por aceptar mi solicitud para este proyecto de investigación y a los tesistas Mayra Becerra Reyes y Carlos Rivera Ballesteros por sus asesorías en las técnicas que llevamos a cabo.

REFERENCIAS

- [1] Acha, D. N. (1964). *EPIDEMIOLOGIA Y MEDICINA PREVENTIVA EN LA ENSEÑANZA DE LA MEDICINA VETERINARIA*. Epoca V. Vol. VI , 5.
- [2] Aarón, M., Orozco, P., Claudia, D., & Palars, B. (2021). C.P. MA. CRISTINA LUCIA GONZÁLEZ MONCIVAIS. 26.
- [3] Aguilera, P., Ruiz-Tachiquín, M.-E., Rocha, M., Pineda, B., & Chanez-Cardenas, M. (2014). PCR en tiempo real (pp. 175-201).
- [4] Arroyave, E., Uribe-Buriticá, J., Granados-Acevedo, S., Gutierrez, L. A., Arismendi, L. M., Arboleda, J. L. V., Londoño, A. F., Arroyave, E., Uribe-Buriticá, J., Granados-Acevedo, S., Gutierrez, L. A., Arismendi, L. M., Arboleda, J. L. V., & Londoño, A. F. (2019). Aislamiento e identificación de bacterias con potencial nosocomial procedentes de ambientes y superficies de una clínica veterinaria Universitaria Infectio, 23(3), 227-233. <https://doi.org/10.22354/in.v23i3.785>
- [5] García Palomo, J. D., Agüero Balbín, J., Parra Blanco, J. A., & Santos Benito, M. F. (2010).. Criterios de sospecha de enfermedad infecciosa. Pruebas diagnósticas complementarias. Criterios de indicación. Medicine, 10(49), 3251-3264. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(10\)70027-5](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(10)70027-5)
- [6] Mejía, E. (s. f.). “PRESENCIA DE INFECCIONES NOSOCOMIALES Y USO DE ANTIBIÓTICOS EN LOS PACIENTES INTERNADOS EN EL HOSPITAL BINACIONAL DE LA CIUDAD DE MACARÁ DE LA PROVINCIA DE LOJA DURANTE EL PERIODO SEPTIEMBRE-2005 A SEPTIEMBRE-2008”. 182.

MEDICIÓN DE PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN HÍGADO DE RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA HIPERCALÓRICA Y SUPLEMENTADA CON HARINA DE GRILLO (*ACHETA DOMESTICUS*)

Natalia Estrada Hernández

Arkansas State University Campus Querétaro
Carretera Estatal 100, km 17.5, C.P. 76270,
Colón, Querétaro, México
natalia.estradah@smail.astate.edu

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

Universidad Autónoma de Querétaro
Cerro de las Campanas, C.P. 76010, Querétaro,
Querétaro, México.
rrcamachomx@yahoo.com.mx

Resumen — El uso de insectos comestibles ha incrementado en la dieta humana, en especial el uso de harina de grillo (*Acheta domestica*, AD), debido a su alto valor nutricional. Por consiguiente, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el impacto de una dieta alta en fructosa y grasas saturadas, y suplementada con harina de AD sobre el estrés oxidativo en hígado de ratas. Para el estudio del modelo *in vivo*, una dieta alta en fructosa y grasas saturadas fue suplementada con 4% y 8% de harina AD. La dieta suplementada con 8% de harina de AD presentó los mejores resultados en los tres parámetros de estrés oxidativo, oxidación de lípidos, proteínas y niveles de colesterol hepático. La reducción del colesterol total y la mejora en marcadores de estrés oxidativo en hígado en los animales que consumieron AD, demuestra el potencial que tiene la harina de AD contra el estrés oxidativo inducido por la dieta.

Palabras clave — *acheta domestica*, estrés oxidativo, actividad antioxidante.

Abstract — The use of edible insects has increased in the human diet, especially the use of cricket flour (*Acheta domestica*, AD), due to its high nutritional value. Therefore, the present work aimed to evaluate the impact of a diet high in fructose and saturated fats supplemented with AD flour on oxidative stress in rat liver. For the *in vivo* model study, a diet high in fructose and saturated fat was supplemented with 4% and 8% AD flour. The diet supplemented with 8% AD flour presented the best results in the three parameters of oxidative stress, lipid oxidation, proteins and liver cholesterol levels. The reduction of total cholesterol and the improvement in markers of oxidative stress in liver in animals that consumed AD, demonstrates the potential that AD flour has against diet-induced oxidative stress.

Keywords — *acheta domestica*, oxidative stress, antioxidant activity.

I. INTRODUCCIÓN

Cada año la población mundial aumenta de forma exponencial, las últimas proyecciones sugieren que la población mundial alcanzará 9,700 millones para 2050 [1]. Como consecuencia, para 2050 la producción de alimentos tendrá que aumentar el 60% para poder alimentar a 9,700 millones de personas [2]. Sin embargo, por el estado crítico de nuestro planeta no es viable esta producción masiva de alimentos. A causa de esto, se ha tenido que buscar alternativas para alimentos con alta calidad nutricional que sean sostenible para el medio ambiente, haciendo que los insectos sean una buena alternativa.

El consumo de insectos en la dieta humana ha existido desde hace 7000 años y actualmente hay aproximadamente 2300 especies de insectos comestibles en el mundo [3]. Sin embargo, recientemente el interés por los insectos comestibles ha aumentado rápidamente debido a su alto valor nutricional y el menor impacto ambiental de su producción [4]. Los grillos han destacado como los insectos más consumidos en todo el mundo puesto que tiene un contenido proteico alto entre 55 - 73%, lípidos, fibra y vitaminas [5]. Actualmente la literatura ha reportado que los grillos poseen propiedades antioxidantes las cuales ayudan a controlar la obesidad [6]. Por ejemplo, Quinteros et al reportaron que el concentrado de proteína de la especie de grillo *Gryllus assimilis*, presentó una alta actividad antioxidante (28,062 - 70,034 $\mu\text{mol TE/g CPC}$) [6].

Por otra parte, *Acheta domesticus* (AD) es una de las especies de grillo más preferida para la producción a gran escala puesto que es fácil de producir por sus costos bajos y además de que tiene varias ventajas sobre otras especies de grillos como el grillo *Gryllus bimaculatus* [7]. Un estudio realizado por Navarro del Hierro et al, reporta que AD extractos presentaron actividad antioxidante [8]. Investigaciones recientes del grupo de trabajo del laboratorio de la Dra. Rosalía Reynoso-Camacho, han demostrado que la suplementación con harina de AD al 4 y al 8% en una dieta alta en grasa y fructosa pueden disminuir la resistencia a la insulina y la ganancia de peso en ratas winstar. Sin embargo, actualmente las investigaciones sobre los beneficios del consumo de harina de AD sobre el estrés oxidativo son limitadas. Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación es evaluar el impacto de una dieta en grasa y fructosa, suplementada con harina de AD sobre el estrés oxidativo, como la oxidación de proteínas y lípidos.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Procedimiento experimental in vivo

Se usaron ratas Wistar macho de edad de seis semanas, con pesos 160-200 g, del Instituto de Neurobiología de la Universidad Autónoma de México (UNAM, Querétaro, México). Las ratas fueron asignadas aleatoriamente a cuatro grupos experimentales. El grupo control sano fue alimentado con una dieta estándar (DS) (Rodent Lab chow 5001, Purina). El segundo grupo fue alimentado con una dieta alta en fructosa y grasas saturadas (DAFG) que consiste en 60% dieta estándar, 20% manteca de cerdo, 20% fructosa, 0.03% minerales y vitaminas. El tercer y cuarto grupo fueron alimentados con DAFG mezclada con harina comercial AD al 4% y 8% (DAFG + 4% y DAFG + 8%). Al completar las 16 semanas, después de ayuno durante la noche, las ratas fueron sacrificadas por medio de decapitación, se recolectó sangre y tejidos adiposos blancos de los tejidos adiposo visceral, epidídimos y retroperitoneales. Todos los tejidos fueron lavados con solución salina al 0.9% y pesados.

B. Determinación de lípidos oxidados

Para la extracción de lípidos oxidados, 50 mg de hígado congelado se homogenizaron siguiendo la metodología de Folch [9]. Se separó la fase orgánica del sobrenadante. Para realizar la prueba de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico se usó la metodología descrita por Wright et al [10]. Se agregaron 0.3 ml de 5 N HCl y 0.625 ml de ácido tricloroacético al 40 %. Se agregó 0.625 ml de ácido tiobarbitúrico 2 % y las muestras se incubaron a 90 °C por 20 minutos. Después, las muestras se colocaron en hielo por 5 minutos y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 minutos. Para determinar la concentración de lípidos oxidados se midió a 523 nm y usando el coeficiente de extinción molar $1.56 \times 10^5 M^{-1}cm^{-1}$.

C. Determinación de proteína oxidada

Para la extracción de proteína, 150 mg de hígado congelado se homogenizaron usando 1 mL de buffer de lisis. Se centrifugaron a 11,000 rpm a 4 °C por 10 minutos, después en el sobrenadante se cuantificó el contenido de proteína usando el método de Bradford [11]. Muestras con aproximadamente 2 mg de proteína fueron pipeteadas en microtubos y se secaron. Después, se agregaron 500 µL de 10 mM 2,4-dinitrofenilhidrazina en 2 M HCl. Las muestras se dejaron una hora a temperatura ambiente agitando en un vortex cada 15 minutos. Se agregaron 500 µL de 20 % ácido tricloroacético y se centrifugaron a 11,000 rpm por 3 minutos. El precipitado se lavó 3 veces con 1 ml de etanol:acetato de etilo (1:1), se centrifugó entre cada lavado. La proteína precipitada se disolvió en 0.6 mL de 6 M de guanidina HCl, 20 mM fosfato de potasio y se colocó en un baño ultrasónico aproximadamente 30 minutos. Se centrifugó a 11,000 rpm por 3 minutos para separar la proteína insoluble. Se midió a 370 nm y se calculó la concentración usando el coeficiente de extinción molar $22,000 M^{-1}cm^{-1}$.

D. Determinación de nivel de colesterol

Se procesaron 50 mg de hígado congelados se homogenizaron siguiendo la metodología de Folch [9]. Se separó la fase orgánica del sobrenadante y se cuantificó usando un kit de determinación cuantitativa de colesterol (Spinreact, Vall D'En Bas, Girona, España).

III. RESULTADOS

Se realizaron mediciones de diferentes parámetros de estrés oxidativo en hígado de rata, ya que se buscaba conocer qué efectos tiene el consumo de harina de AD en una dieta alta en grasa y fructosa. El primer parámetro que se midió fue el peso del hígado presentado en Figura 1a y el peso relativo presentado en Figura 1b. Los demás parámetros que se midieron fueron peroxidación lipídica presentado en Figura 2, oxidación de proteínas presentado en Figura 3 y nivel de colesterol en el hígado presentado en Figura 4.

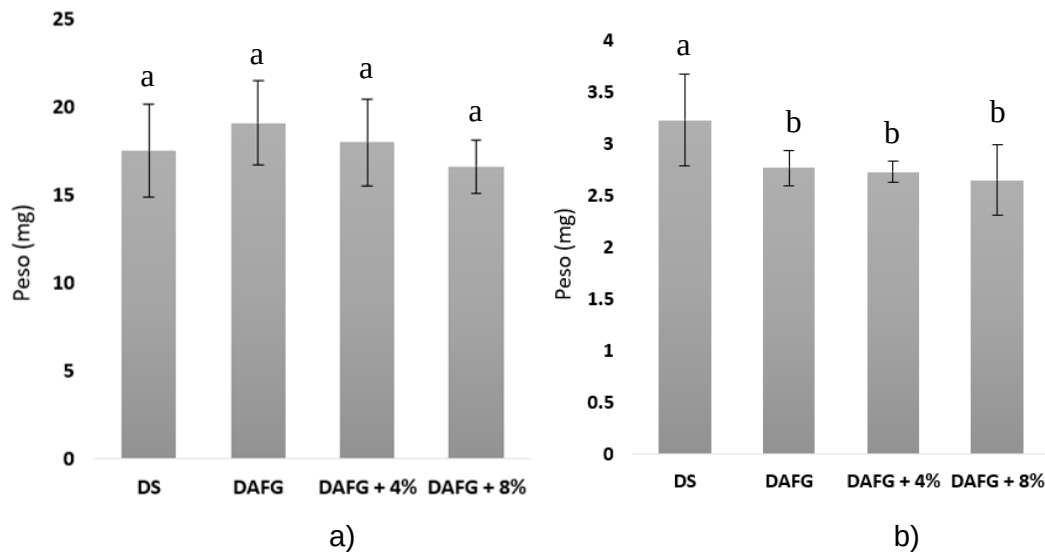


Fig. 1. Efecto de dieta alta en fructosa y grasas saturadas suplementada con AD a) peso de hígado de rata y b) peso relativo de hígado de rata.

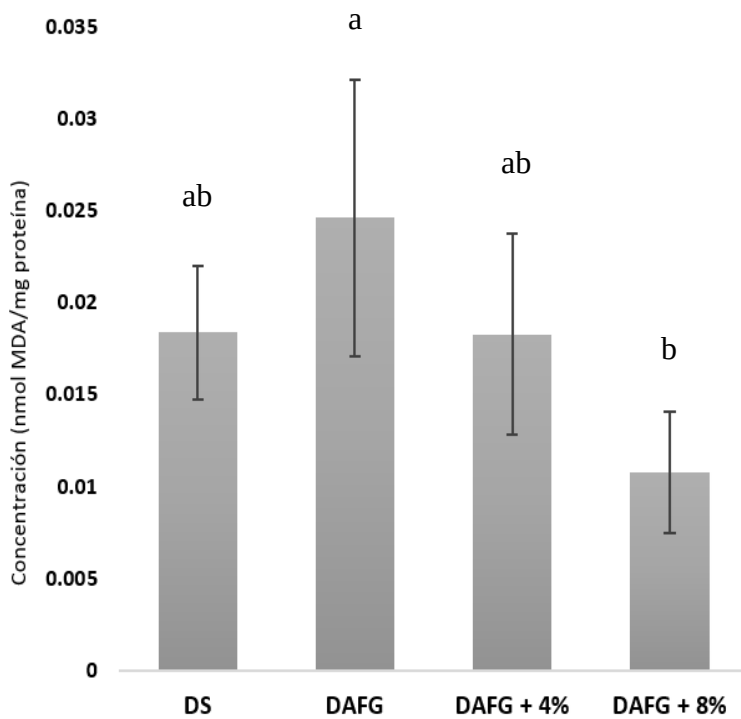


Fig. 2. Efecto de dieta alta en fructosa y grasas saturadas suplementada con AD sobre la peroxidación lipídica de hígado.

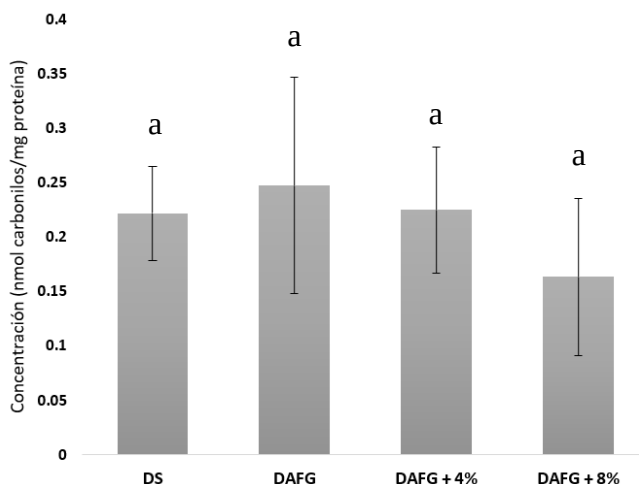


Fig. 3. Efecto de dieta alta en fructosa y grasas saturadas suplementada con AD sobre la oxidación de proteínas.

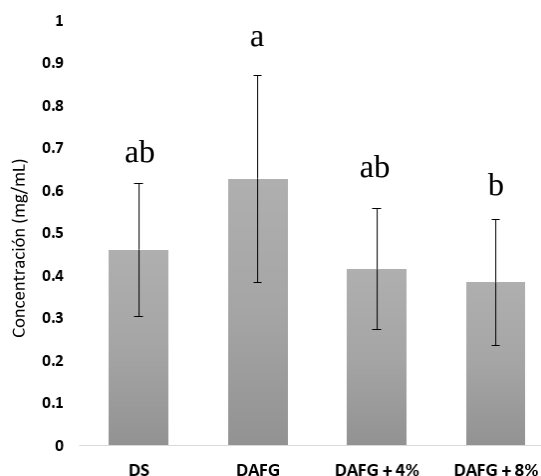


Fig. 4. Efecto de dieta alta en fructosa y grasas saturadas suplementada con AD en niveles de colesterol hepáticos.

IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados de la medición de los parámetros de estrés oxidativo, indican que hubo un efecto positivo tras suplementar una dieta alta fructosa y grasa con harina de AD. Figura 1a muestra de manera visible que solo la dieta suplementada con 8% de harina de grillo disminuyó el peso del hígado. Además, se puede observar que la suplementación de 4% de harina de AD pudo prevenir el aumento del peso del hígado, manteniendo un peso similar al del grupo DS. Por otra parte, en Figura 1b se puede observar que la suplementación de 8% de harina de AD resultó en el peso relativo más bajo y el grupo DS obtuvo el peso relativo más elevado [12]. En base a estudios realizados, el alto contenido de fibra baja el peso corporal lo cual causa que el peso relativo del hígado disminuye, asimismo el alto contenido de proteína también disminuye

el peso relativo del hígado [13].

De acuerdo con Figura 2, se puede observar que el grupo con suplementación de 8% de harina de AD tuvo la concentración de peroxidación lipídica más baja. De igual forma, la dieta suplementada con 4% de harina de AD se mantuvo en una concentración similar a la del grupo DS. Los resultados obtenidos se pueden atribuir a las propiedades antioxidantes que la harina de AD contiene las cuales contribuyen a inhibir la propagación de la peroxidación de lípidos. Del mismo modo, los resultados presentados en Figura 3 se puede atribuir a las propiedades antioxidantes de la harina de AD. En Figura 3 se puede observar una concentración de oxidación de proteínas baja de la dieta suplementada con 8% de harina de AD. Además, una concentración similar de la dieta suplementada con 4% de harina de AD con el grupo DS, lo cual muestra que la harina AD tiene las propiedades necesarias para prevenir el daño oxidativo de proteínas y lípidos causados por una dieta alta grasa y fructosa.

En la Figura 4, se muestra de manera visible que la dieta suplementada con 8% de harina de AD, disminuyó la concentración de colesterol en el hígado, y de la misma forma, el grupo con suplementación de 4% de harina de AD tiene una concentración menor que el grupo DS. Estos resultados se pueden atribuir a las propiedades de la harina de AD, estudios reporta que la quitina podría ayudar a reducir el colesterol total y el colesterol de lipoproteína de baja densidad (C-LDL) [14]. Por otra parte, a la fibra soluble (1.3%) se le atribuye una capacidad para disminuir los niveles de colesterol total y C-LDL [15].

V. CONCLUSIONES

Los hallazgos obtenidos en la presente investigación podrían respaldar que suplementar una dieta alta en grasa y fructuosa con harina de AD puede atribuir beneficios positivos, puesto que tiene resultados positivos sobre los diversos parámetros de estrés oxidativo. Por lo tanto, se puede concluir que el consumo de AD en especial la suplementación de 8% de harina de AD es importante para reparar daños oxidativos y reducir el colesterol hepático.

VI. AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Querétaro por abrir sus instalaciones y la disposición de los recursos necesarios para poder realizar esta estancia. A la Dra. Rosalía Reynoso Camacho por el conocimiento brindado este verano y a su estudiante de doctorado Alexandro Escobar Ortiz por ayudarme, guiarme y motivarme durante este trabajo. Por igual manera quiero agradecer a la Universidad de Arkansas State Campus Querétaro por el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano.

REFERENCIAS

- [1] United Nations Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2022). “*World Population Prospects 2022: Summary of Results*”. UN DESA/POP/2022/TR/NO. 3. https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/wpp2022_summary_of_results.pdf [consultado en julio 2022].
- [2] Graziano Da Silva, J. (2012). “Feeding the World Sustainably”. United Nations, Vol. 49 . <https://www.un.org/en/chronicle/article/feeding-world-sustainably#:~:text=According%20to%20estimates%20compiled%20by,world%20population%20of%209.3%20billion.> [consultado en julio 2022].
- [3] Tang, C., Yang, D., Liao, H. et al. “Edible insects as a food source: a review”. *Food Prod Process and Nutr* 1, 8 (2019). <https://doi.org/10.1186/s43014-019-0008-1> [consultado en julio 2022].
- [4] Kim, T. K., Yong, H. I., Kim, Y. B., Kim, H. W., & Choi, Y. S. (2019). “Edible Insects as a Protein Source: A Review of Public Perception, Processing Technology, and Research Trends”. *Food science of animal resources*, 39(4), 521–540. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2019.e53> [consultado en julio 2022].
- [5] Magara, H., Niassy, S., Ayieko, M. A., Mukundamago, M., Egonyu, J. P., Tanga, C. M., Kimathi, E. K., Ongere, J. O., Fiaboe, K., Hugel, S., Orinda, M. A., Roos, N., & Ekesi, S. (2021). “Edible Crickets (Orthoptera) Around the World: Distribution, Nutritional Value, and Other Benefits-A Review”. *Frontiers in nutrition*, 7, 537915. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.537915> [consultado en julio 2022].
- [6] Quinteros, M. F., Martínez, J., Barrionuevo, A., Rojas, M., & Carrillo, W. (2022). “Functional, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Properties of Cricket Protein Concentrate (*Gryllus assimilis*)”. *Biology*, 11(5), 776. <https://doi.org/10.3390/biology11050776> [consultado en julio 2022].
- [7] van Huis, A. (2020). “Edible crickets, but which species?” *Journal of Insects as Food and Feed*, 6(2), 91–94. <https://doi.org/10.3920/jiff2020.x001> [consultado en julio 2022].
- [8] Navarro del Hierro, J., Gutiérrez-Docio, A., Otero, P., Reglero, G., Martín, D. (2020). “Characterization, antioxidant activity, and inhibitory effect on pancreatic lipase of extracts from the edible insects *Acheta domesticus* and *Tenebrio molitor*”. *Food Chemistry*, 309. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125742> [consultado en julio 2022].

- [9] Folch, J., Lees, M., Sloana Stanley, G. H. (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues". *The Journal of biological chemistry*, 226(1), 497–509.
- [10] Wright, J. R., Colby, H. D., & Miles, P. R. (1981). "Cytosolic factors which affect microsomal lipid peroxidation in lung and liver". *Archives of biochemistry and biophysics*, 206(2), 296–304. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(81\)90095-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(81)90095-3) [consultado en julio 2022].
- [11] Bradford M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical biochemistry*, Vol. 72, pp 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999> [consultado en julio 2022].
- [12] Escobar-Ortiz, A., Hernández-Saavedra, D., Lizardi-Mendoza, J., Pérez-Ramírez, I. F., Mora-Izaguirre, O., Ramos-Gómez, M., & Reynoso-Camacho, R. (2022). "Consumption of cricket (*Acheta domesticus*) flour decreases insulin resistance and fat accumulation in rats fed with high-fat and -fructose diet". *Journal of food biochemistry*, e14269. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14269> [consultado en agosto 2022].
- [13] Pond, W. G., Varel, V. H., Dickson, J. S., & Haschek, W. M. (1989). "Comparative response of swine and rats to high-fiber or high-protein diets". *Journal of animal science*, 67(3), 716–723. <https://doi.org/10.2527/jas1989.673716x> [consultado en agosto 2022].
- [14] Stull, V. J. (2021). "Impacts of insect consumption on human health". *Journal of Insects as Food and Feed*, 7(5), 695–713. <https://doi.org/10.3920/jiff2020.0115> [consultado en agosto 2022].
- [15] Bazzano, L.A. (2008). "Effects of soluble dietary fiber on low-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease risk". *Current atherosclerosis reports*, 10(6), 473–477. <https://doi.org/10.1007/s11883-008-0074-3> [consultado en agosto 2022].

EFFECTO EN LA GERMINACIÓN DE CHÍA (*SALVIA HISPANICA* L.) TRATADA CON TiO_2 Y Au-TiO_2

Victor Eduardo Camacho Romero

Universidad Autónoma de
Aguascalientes
Centro de Ciencias Básicas
Av. Universidad # 940, Ciudad
Universitaria, C.P. 20100,
Aguascalientes, Ags. México.
vicamachoedu@gmail.com

Dra. Karen Esquivel Escalante

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería-Campus Aeropuerto
Carr. a Chichimequillas s/n
C.P. 76140, Querétaro, Qro. México.
karen.esquivel@uaq.mx

Resumen — El uso de nanopartículas tiene múltiples aplicaciones y potencial en el área agrícola. Se han reportado efectos beneficiosos al aplicarse nanopartículas en la germinación de semillas, resultando en una mayor velocidad de germinación. Sin embargo, aún faltan pruebas para determinar sus efectos y seguridad en cultivos. La semilla de chía resulta de gran valor nutricional y versatilidad para su uso en distintos alimentos para consumo humano y animal. En este trabajo se realizó la germinación de semillas de chía con tratamientos con NPs de TiO_2 y Au-TiO_2 para evaluar sus efectos. Se obtuvo un mayor porcentaje de germinación con los tratamientos de NPs, además se determinaron los fenoles totales con reactivo Folin dando cantidades mayores en plantas con tratamientos de NPs.

Palabras clave — Chía, nanopartículas, germinación, fenoles.

Abstract — The use of nanoparticles has multiple applications and potential in the agricultural area. Beneficial effects have been reported when nanoparticles are applied to seed germination, resulting in a higher germination speed. However, tests are still lacking to determine its effects and safety in crops. Chia seed is of great nutritional value and versatility for use in different foods for human and animal consumption. In this work, chia seeds were germinated with TiO_2 and Au-TiO_2 NPs treatments to evaluate their effects. A higher germination percentage was obtained with the NPs treatments, and total phenols were determined with Folin reagent, giving higher amounts in plants with NPs treatments.

Keywords — Chia, nanoparticles, germination, phenols.

I. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología y los materiales que con ella se crean han llamado la atención por su potencial de aplicación en diversos campos como el ambiental, alimenticio, agricultura, etc. En el área agrícola se ha planteado su uso como potenciadores de fertilizantes, utilización eficiente de agua, protección contra insectos y enfermedades, y sensores. Esto conlleva primeramente, el conocimiento de los efectos de estos materiales en las distintas etapas de vida de las plantas. Se requiere la experimentación exhaustiva que permita determinar el tipo de nanopartícula, la concentración, tamaño y forma de aplicación adecuada [1,2].

La fase inicial y de gran importancia en un cultivo es la germinación de las semillas; la calidad y condiciones de desarrollo de éstas determinará su posterior desarrollo como planta adulta y, por lo tanto, el rendimiento que llegue a presentar. La mayoría de los estudios reportan efectos positivos en la germinación con una mayor emergencia y uniformidad debido principalmente a la penetración de nanomateriales en la semilla, que aumentan la imbibición de agua y micronutrientes, acelerando la degradación de reservas, y beneficiando a las primeras etapas del proceso germinativo [1].

El TiO_2 , es una sustancia inorgánica, sólida, de color blanca, es térmicamente estable, no inflamable, poco soluble y no es considerada peligrosa por la ONU y el Sistema Globalmente Armonizado de la Naciones Unidas de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA) [3]. Como nanomaterial es ampliamente utilizado y en germinación de semillas no es la excepción, ya que se han reportado que puede aumentar la absorción de nutrientes aprovechables por la semilla, mejorando la velocidad de germinación [4]. El hecho de poder adicionar otros materiales al TiO_2 abre la posibilidad a nuevos e incluso mejores efectos en la germinación de semillas.

La chía (*Salvia hispanica*) es cultivo que cada vez se usa más y que tiene gran potencial. Es ideal para enriquecer gran cantidad de productos como fórmulas para bebés, alimento para animales, barras nutritivas, entre otros. De entre sus compuestos de importancia se encuentran antioxidantes fenólicos tales como ácidos clorogénico y cafeico y flavonoles (miricetina, quecetina y kaempferol). La importancia de los mismos radica en su protección frente a la oxidación lipídica que afecta tanto la calidad de los alimentos como la salud de los consumidores [6]. Algunos compuestos fenólicos son de gran importancia para consumo humano, tanto por valor nutricional como funcional, además de que el conocer cuáles y de qué manera se encuentran en cierto cultivo permite saber si el cultivo se encuentra en buenas condiciones [5].

En este trabajo se plantea un sistema de germinación de semillas de chía usando dos soluciones de nanopartículas a partir de TiO_2 para observar el efecto de estas a nivel morfológico y de compuestos fenólicos.

II. METODOLOGÍA

2.1 Germinación de semillas de chía

Para la parte de germinación de las semillas se necesitó de soluciones de TiO_2 y Au-TiO_2 sintetizadas por método sol-gel a una concentración de 50 mg/L [7].

Se realizó la germinación de las semillas de chía en charolas de germinación colocando alrededor de 5 semillas por pocillo y también en pequeños baldes sin separación entre semillas. Para ello se realizaron tres germinados:

1. Control. Semillas sin ningún tipo de tratamiento.
2. Pretratamiento con TiO_2 . Semillas que se dejaron remojando en solución de TiO_2 (50 mg/L) durante 24 horas previas a su siembra.

3. Pretratamiento con Au-TiO₂. Semillas que se dejaron remojando en solución de Au-TiO₂ (50 mg/L) durante 24 horas previas a su siembra.

Posterior a su siembra, todas las semillas se regaron con agua corriente cada tercer día. Las plantas recolectadas se liofilizaron, se machacaron obteniendo 200 mg de muestra y se obtuvo un extracto de los compuestos mediante el uso de metanol como solvente. Este extracto es el que se utilizó para la prueba de determinación de fenoles totales.

2.2 Determinación de fenoles totales

La determinación se realizó a partir de la cuantificación espectrofotométrica UV-Vis, usando una curva de calibración de ácido gálico como referencia. Se preparó una curva de calibración a partir de una solución de ácido gálico, agua destilada, Folin, y Na₂CO₃ en distintas concentraciones. Estas se dejaron reposar dos horas y se leyó su absorbancia.

Posteriormente, para cada una de las muestras (control, pretratamiento con TiO₂ y pretratamiento con Au-TiO₂) se colocaron, en tubos Eppendorf, 40 µL del extracto, 460 µL de agua destilada, 250 µL de Folin y 1250 µL de Na₂CO₃. Se agitaron los tubos en vortex y se dejaron reposar 2 horas en oscuridad. Transcurrido el tiempo se colocaron en una placa de 96 pozos, 200 µL de cada muestra y de las soluciones para la curva de calibración. Se leyó la absorbancia a 760 nm. Se analizaron los resultados obtenidos con base en la curva de calibración y con unidades de mg equivalentes de ácido gálico.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Entre los distintos tipos de germinación empleada, las de TiO₂ presentaron un mayor crecimiento en tamaño y cantidad, seguidas por las de Au-TiO₂ y finalmente las plantas control (Fig. 1). En cuanto al proceso de germinación, aquellas semillas que recibieron el tratamiento con TiO₂ presentaron un mayor crecimiento en cuanto a elongación de la planta, seguido, sin diferencias muy significativas, de las semillas con tratamiento con Au-TiO₂ y finalmente las semillas control, de las cuales si hubo una considerable reducción en el número y tamaño de plantas; todo esto dentro del mismo tiempo a los 15 días de su siembra.

Asimismo, las plantas con tratamientos de nanopartículas presentaron hojas primordiales de mayor tamaño y presencia de hojas vegetativas en menor tiempo que las plantas control. En cuanto a otras características morfológicas como color, forma de las hojas y raíces no se observaron diferencias significativas. En algunas de las plantas tratadas con NPs se presentó palomilla blanca, sin embargo, fue en muy pocas plantas, lo que no interfirió con las pruebas posteriores. En este caso el estrés causado por las nanopartículas resultó beneficioso en la germinación y crecimiento de la plántula lo que coincide con el trabajo de Gordillo-Delgado *et al.* [8] que evaluó el efecto de nanopartículas de Ag-TiO₂ en semillas de espinaca y donde menciona que el efecto positivo podría estar asociado a la generación de especies reactivas de oxígeno, a la actividad antimicrobiana, al aumento de los atributos bioquímicos, a la actividad enzimática o a la mejora de la absorción de agua. En este trabajo se manejó la misma metodología de remojar las semillas antes de su siembra, solo que se realizó por periodos de 2 horas durante 3 días.



Fig. 1. Plantas de chía germinadas. a) Plantas control a los 15 días de germinación. b) Plantas con pretratamiento de TiO_2 y Au-TiO_2 a los 15 días de germinación. c) Plantas control de chía recolectadas. d) Plantas con pretratamiento de TiO_2 y Au-TiO_2 recolectadas.

En el trabajo de Feizi *et al.* [9] se evaluó el impacto de TiO_2 a granel y nanoestructurado en germinación de semillas de trigo, viendo mejores resultados de crecimiento en las semillas con TiO_2 nanoestructurado a bajas concentraciones de hasta 10 ppm. Se hace mención de la importancia de las concentraciones, ya que a concentraciones elevadas puede haber una inhibición de la semilla; el tratamiento también se realizó remojando las semillas. En caso contrario, en el trabajo de Basahi [10] se reportaron efectos negativos en la germinación por parte del TiO_2 , así como estrés oxidativo, afectaciones del peso seco y las actividades de las enzimas. Para la germinación se dejaron las semillas en papel humedecido con la solución de nanopartículas a concentración de 50 mg/L. A pesar de los efectos negativos mencionados, también se señala que existieron algunos efectos positivos, pero varían significativamente en función de la dosis y del tiempo de tratamiento.

Posteriormente se realizó el extracto de las plantas de cada tratamiento y a estos se les determinaron los fenoles totales por triplicado mediante la medición de su absorbancia (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de las mediciones de absorbancias de las muestras. mg eq. ác. gálico/100g: miligramos equivalentes de ácido gálico por cada 100 g de muestra.

Chía	Absorbancia	mg eq. ác. gálico/100g	Promedio
Control	0.0552	1973.9	2017.3
	0.0627	2136.9	
	0.0537	1941.3	
TiO ₂	0.0706	2308.6	2096.3
	0.0544	1956.5	
	0.0575	2023.9	
Au-TiO ₂	0.0770	2447.8	2568.1
	0.0851	2623.9	
	0.0855	2632.6	

En cuanto a la determinación de fenoles totales, las plantas con tratamiento de Au-TiO₂ presentaron una mayor cantidad, seguidas de las tratadas con TiO₂ y el control, estas dos últimas sin mucha diferencia entre ellas. En el trabajo de Alasalvar *et al.* [11] en el que se hace una revisión bibliográfica de los compuestos de varias semillas, entre ellas la chía, se menciona que las semillas tienen entre 970 y 1422 mg de equivalentes de ác. gálico/100g, mientras que el aceite de chía tiene entre 73 y 486 mg de equivalentes de ác. gálico/100g. Cabe destacar que estos valores se aplican a la semilla y durante la germinación ocurren una serie de procesos que llegan a afectar la cantidad y el tipo de compuestos fenólicos presentes, por lo que se deben tomar en cuenta valores para las plantas o plántulas de chía. En el trabajo de Abdel-Aty *et al.* [12] se realizó la medición de fenoles totales durante varios días de germinación, teniendo su máximo a los 7 días con 9 mg de equivalentes de ác. gálico/g (900 mg de equivalentes de ác. gálico /100g). Existe una gran diferencia entre los valores obtenidos en este trabajo y el obtenido en el trabajo de Abdel-Aty *et al.* [12], sin embargo, se debe considerar que las diferencias en los contenidos fenólicos podrían deberse a la especie de chía cultivada como factor principal, además de las condiciones de germinación como la temperatura, la humedad, la luz y el tiempo como factores menores; asimismo se considera el tipo de proceso usado para la extracción de los compuestos fenólicos como prensado en frío, refinado y extracción con fluidos supercríticos, entre otros [11,12].

En este trabajo la germinación se llevó a cabo en tierra, lo que puede influir en la cantidad de fenoles por la disponibilidad de nutrientes (por ejemplo en las plantas control), además este aumento de la cantidad de compuestos fenólicos a tantos días de la germinación podría atribuirse al tratamiento con NPs, ya que esto mismo puede observarse en el trabajo de Rivera-Guitierrez *et al.* [13] en donde se aplicaron NPs de ZnO por aplicación foliar y se observó un incremento de los fenoles a diversas concentraciones, siendo la de 50 mg/L la de mayor incremento. También el trabajo de Nourozi *et al.* [14] se observó un aumento en la cantidad de fenoles de importancia clínica de hasta 70 veces con una concentración de 50 mg/L de TiO₂. En el trabajo de Jurkow *et al.* [15] se aplicaron NPs de platino, plata y oro de manera foliar en lechuga y se observó un incremento de compuestos fenólicos en un 15 a 17%.

IV. CONCLUSIONES

El efecto de las nanopartículas de TiO₂ y Au-TiO₂ a concentración de 50 mg/L presentó resultados positivos en la germinación de semillas de chíá, generando una mayor velocidad de germinación y mayor elongación de las plántulas, sin diferencias significativas entre resultados de ambos materiales.

La cantidad de fenoles totales se vio incrementada derivado de las condiciones de siembra y con el posible efecto positivo de incremento por parte de las nanopartículas. Se mostró un buen desempeño del uso de nanopartículas a la concentración mencionada en la germinación sin efectos negativos para la planta durante las primeras semanas de desarrollo.

V. AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Querétaro, por las facilidades y el apoyo otorgado. Además, a la Facultad de Ingeniería por el apoyo financiero a través del fondo para atención de problemas nacionales (FI-UAQ-FIN202106 y FONDEC-UAQ 2021 (FIN202116). A la Universidad Autónoma de Aguascalientes, a la Dra. Iliana Medina para la realización de la estancia de verano. A mis amigos por la motivación y preocupación por la realización de la estancia.

REFERENCIAS

- [1] Ruiz, N.A., García, J.I., Lira, R.H., Vera, I. y Méndez, B. *Segundo Mini Simposio-Taller de Agronanotecnología*. 75-114, 2016.
- [2] Razzaq, A., Ammara, R., Jhanzab, H.M., Mhamood, T., Hafeez, A. and Hussain, S. *Journal of Nanoscience and Technology* 2(1): 55–58, 2016.
- [3] TDMA. *European Chemical Industry Council*. 2018.
- [4] Savithramma, N., Ankanna, S. and Bhumi, G. *Nano vision* 2: 61-68, 2012.
- [5] Leyva, D.E. Tesis, Universidad Tecnológica de la Mixteca, Oaxaca, México, 2009.
- [6] González, F.E. Tesis, Instituto Politécnico Nacional, México, 2010.

- [7] Hernandez, R., Hernández, J.R., Cruz, M., Velázquez-Castillo, R., Escobar-Alarcón, L., Ortiz-Frade, L. & Esquivel, K. *Catalysts*, 10(9): 1052, 2020. <https://doi.org/10.3390/catal10091052>
- [8] Gordillo-Delgado, F., Zuluaga-Acosta, J. & Restrepo-Guerrero, G. *PloS one*, 15(12), e0244511, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244511>
- [9] Feizi, H., Rezvani Moghaddam, P., Shahtahmassebi, N. & Fotovat, A. *Biological trace element research*, 146(1), 101–106, 2012. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-9222-7>
- [10] Basahi, M. *Saudi journal of biological sciences*, 28(11), 6500–6507, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.07.023>
- [11] Alasalvar, C., Chang, S. K., Bolling, B., Oh, W. Y., & Shahidi, F. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 20(3), 2382–2427, 2021. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12730>
- [12] Abdel-Aty, A. M., Elsayed, A. M., Salah, H. A., Bassuiny, R. I. & Mohamed, S. A. *Food science and biotechnology*, 30(5), 723–734, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10068-021-00902-2>
- [13] Rivera-Gutiérrez, R.G., Preciado-Rangel, P., Fortis-Hernández, M., Betancourt-Galindo, R., Yescas-Coronado, P. & Orozco-Vidal, J.A. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 12(5), 791-803, 2021. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i5.2987>
- [14] Nourozi, E., Hosseini, B., Maleki, R., & Abdollahi Mandoulakani, B. *Plant physiology and biochemistry: PPB*, 167, 934–945, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.09.017>
- [15] Jurkow, R., Pokluda, R., Sękara, A., & Kalisz, A. *BMC plant biology*, 20(1), 290, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02490-5>

ERRADICACIÓN DE HONGO FITOPATÓGENO DE ÁRBOL DE CHIRIMOYO (*ANNONA CHERIMOLA*) MEDIANTE EL USO DE BACTERIAS

Moreno Oñate Verónica Alejandra
Instituto Tecnológico Superior de
Purísima del Rincón
Blvd. Del Valle 2301, Guardarrayas,
36425, Gto
Lrs19110222@purisima.tecnm.mx

María Rico Martínez
Instituto Tecnológico Superior de Abasolo
Cuitzeo de 401 Cuitzeo de los Naranjos
36976, Los Naranjos, Abasolo, Gto
maria.rm@abasolo.tecnm.mx

Resumen — El presente trabajo es una revisión sobre el género *Bacillus*. Este género se encuentra ampliamente distribuido en diversos ambientes como agua y suelo debido a su amplia versatilidad metabólica y la presencia de una estructura de resistencia la capacidad de diferentes metabolitos, como lo son la producción de fitohormonas como las auxinas, el control biológico mediado por la producción de antibióticos, sideróforos y enzimas líticas para diferentes tipos de hongos fitopatógenos, como *Colletotrichum*. Creando así la pudrición de frutos y necrosis en hojas.

Palabras clave — Control Biológico, *Bacillus subtilis*, *Colletotrichum*.

Abstract — This paper is a review of the genus *Bacillus*. This genus is widely distributed in diverse environments such as water and soil due to its metabolic versatility and the extensive presence of a resistance structure, the capacity of different metabolites, such as the production of phytohormones such as auxins, biological control mediated by production of antibiotics, siderophores and lytic enzymes for different types of phytopathogenic fungi, such as *Colletotrichum*. Thus creating fruit rot and leaf necrosis.

Keywords — Biological control, *Bacillus subtilis*, *Colletotrichum*.

I. INTRODUCCIÓN

La utilización de microorganismos en el control biológico de patógenos es una alternativa eficiente y ecológica, bacterias del género *Bacillus* presentan potencial debido a su capacidad para ejercer actividad antagonista mediante competencia, producción de antibióticos y producción de enzimas líticas [1]. Los microorganismos antagonistas tienen la capacidad de ejercer un efecto de control sobre diversos patógenos y se han empleado para controlar enfermedades en frutos y hortalizas. *Bacillus subtilis* presentan un alto grado de tolerancia a factores ambientales y ha sido utilizado como biocontrol de muchos hongos fitopatógenos. [2] Teniendo por objetivo implementar bacterias *Bacillus subtilis* como un factor antagonista frente a un hongo fitopatógeno que afecta a árboles de chirimoyo (*Annona cherimola*) ubicados en la sierra de Pénjamo, buscando contrarrestar el problema agrícola que esto conlleva, es decir, pérdida de cultivos y daños ecológicos que afectan el ecosistema de la sierra y la economía de la población [1].

II. MARCO TEÓRICO

Entre las características del género *Bacillus* destaca su crecimiento aerobio o en ocasiones anaerobio facultativo, Gram positivas, morfología bacilar, movilidad flagelar, y tamaño variable (0.5 a 10 μm), su crecimiento óptimo ocurre a pH neutro, presentando un amplio intervalo de temperaturas de crecimiento, aunque la mayoría de las especies son mesófilas (temperatura entre 30 y 45 °C), su diversidad metabólica asociada a la promoción del crecimiento vegetal y control de patógenos; además destaca su capacidad de producir endosporas (ovales o cilíndricas) como mecanismo de resistencia a diversos tipos de estrés [3]. La producción de enzimas involucradas en la degradación de la pared celular de agentes fitopatógenos es uno de los mecanismos de control biológico más reportados, especialmente contra patógenos de origen fúngico, estas enzimas son responsables de la degradación de los principales polisacáridos que conforma la pared celular de hongos, mediante la hidrólisis de sus enlaces glucosídicos [3].

Una de las principales plagas fungosas en anona es la enfermedad antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en donde los frutos presentan pequeñas manchas hundidas, necróticas, irregulares, de color marrón oscuro. Un fruto con avanzado estado de antracnosis presenta fisuras que penetran la pulpa, afectando por tanto la calidad de esta. También se pueden observar puntos negros formando círculos concéntricos en las lesiones. Cuando el ataque de un insecto antecede la entrada de antracnosis, generalmente el fruto queda momificado en el árbol [4].

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Identificación de bacterias de la especie *Bacillus subtilis*

Una muestra de cultivo de maíz fue llevada al laboratorio en la cual se encontró presencia de *Bacillus subtilis* y se hizo una identificación de forma molecular, obteniendo cultivos puros en cajas Petri. Se tomaron varias muestras para reconocer si la bacteria aún seguía presente en tal medio, se inocularon 4 cajas Petri de agar nutritivo, dos siendo por estriado y las otras se colocaron pedazos de agar. Prosiguiendo con la creación de los reactivos, para realizar correctamente la tinción de gram y no hubiese resultados incorrectos. Siendo así el cristal violeta 0.25 g de este y 100 ml de agua destilada, se colocó en un frasco color ámbar. La safranina por 100 ml, se tomaron 1 g de safranina y alcohol al 50 % y para finalizar el Lugol, se tomaron 2 g de yodo (I_2), 6 g de yoduro de potasio (KI), agua destilada 100 ml. Las colonias obtenidas de la inoculación en agar nutritivo fueron descritas macroscópica y microscópicamente, tomando en cuenta su aspecto, consistencia, color, elevación, bordes y la forma de bacilo. Estas se rotularon con respeto al día de inoculación y de donde fueron tomadas.

Identificación de la enfermedad en los árboles de chirimoyo

Los árboles seleccionados de chirimoyo para ser sometidos al tratamiento con *Bacillus subtilis*, fueron analizados a través de observación de los síntomas presentes en las hojas, tallos y frutos, haciendo una investigación bibliográfica de las similitudes de los daños generados por el hongo fitopatógeno se determinó la infección por hongo.

Ensayos de exploración respecto al crecimiento en caldo nutritivo expuestos a diferentes temperaturas

Se preparó para cada envase 300 ml con 2.3 g de caldo nutritivo, prosiguiendo a esterilizarlos en el autoclave a 121°C a 15 psi por 15 min, dejando enfriar por unas horas, una vez que se encuentran a temperatura ambiente se procedió a inocular uno de los envases, se tomó de una de las cajas Petri ya identificadas, se llevó a cabo en la campana, de este se tomó con el asa cubierta de la bacteria y se introdujo en el caldo ya estéril, este llevo a incubación a una temperatura de 35°C, durante 72 horas. Se procedió a realizar diluciones para determinación de concentración. Se realizaron diluciones de 1/10, 1/100 y 1/1000, tomando 1 ml de la solución madre, llevándolo a 9 ml de agua estéril, tomando 1 ml de esa solución y llevándolo a nuevamente a 9 ml de agua estéril y por último se repitió lo mismo para la última dilución. Se llevó el conteo por medio de la cámara de Neubauer, el cual se obtuvo la concentración de la dilución 1/10. Posteriormente se llevó a cabo la inoculación de los envases faltantes ya que se conoce el crecimiento con respeto a la temperatura. 10 de ellos se colocaron dentro de la incubadora y 27 se incubaron a temperatura ambiente. Lo cual macroscópicamente se observó mayor crecimiento en los sometidos a 35°C, creando más precipitado.

Ensayos in vitro de hongos fitopatógenos y aplicación de *Bacillus spp* en arboles de chirimoyo en la sierra de Pénjamo

Se tomaron muestras de diferentes arboles infectados. Seleccionando 7 árboles con una separación de 2 a 3 metros de lo demás arboles de exploración. Se tomaron muestras de tierra cerca de las raíces, fruto y hojas infectadas. Las muestras fueron antes y después de agregar el primer tratamiento de *Bacillus subtilis*. Estas muestras se llevaron al laboratorio, colocando las muestras que no contenían ningún tratamiento con *Bacillus subtilis*, en refrigeración y los que contenían algún tratamiento con *B. subtilis*, se mantuvieron a temperatura ambiente. Se procedió los ensayos con las muestras de la tierra con ningún tratamiento. Se tomó 1 g de tierra con 9 ml de agua destilada, el cual se mezcló hasta lograr que se homogeneizara. Por consiguiente, se realizaron diluciones hasta 10^{-5} , utilizando tubos eppendorf con 900 μ m de agua estéril y tomando 100 μ m de la muestra madre, estas diluciones se inocularon en cajas Petri preparadas posteriormente, utilizando agar nutritivo (AN) y agar papa dextrosa (PDA), para el crecimiento óptimo de bacterias y hongos que se pudieran encontrar en las muestras. Se rotularon de acuerdo con el árbol de estudio, de donde provenían y el medio en el cual se inoculaban. Los árboles utilizados para hacer la experimentación fueron nombrados como: A₁, A₂, A₃, A₄, A₅, y A₆. Los primeros 3 fueron regados con la bacteria (1-3) y los últimos 3 fueron asperjados en las hojas con *B. subtilis*. Se tomaron muestras de suelo, hoja, fruto, posteriormente fueron inoculadas en cajas Petri

con AN o PDA. La hoja y el fruto, se desinfectaron con cloro al 3% durante 5 minutos, posteriormente se enjuagaban con agua estéril y se machacaron en un tubo eppendorf con 900 µm de agua estéril, esto para que rompiera la membrana de las bacterias u hongos que se encontraran en su interior y salgan, estas se llevaron hasta una dilución de 10^{-3} y se procedieron a inocular e incubar a 35°C.

Se realizó la aplicación de *Bacillus subtilis*, se mezclaron 20 l de agua proporcionada, con 3 envases de 300 ml de caldo con concentración de 3.14×10^8 UFC/ml. Lo cual al agua proporcionada se le hizo análisis. Posterior de cada uno de los árboles, se procedió a despejar más sus raíces para colocarle el tratamiento humedeciendo toda la tierra cerca de las raíces, se volvió a colocar la tierra cubriendo sus raíces y se volvió a color el tratamiento. Esto se le realizo a 4 árboles, y los otros 3 árboles fue por esparcido, se les coloco el tratamiento en tronco y hojas.

Ensayos in vitro de antagonismo con hongos fitopatógenos y *Bacillus subtilis*

Se llevó a cabo pruebas de confrontación directo por los hongos obtenidas de las muestras de tierra y hojas. Se inocularon 4 cajas Petri por estriado en Angulo recto, posterior se tomó un pequeño disco del hongo ya aislado, con ayuda del sacabocado, colocando esta boca debajo, donde se observe el crecimiento. Por consiguiente, se llevó a incubación a 35°C por 72 horas, para desechar cualquier resultado incorrecto.

IV. RESULTADOS

En la **Figura 1** se realizó la prueba de tinción de gram para la identificación de *Bacillus subtilis*, observando una coloración violeta, indicando que lo observado microscópicamente tiene presencia de bacilos gram positivos y confirmando que el cultivo cuenta con las características morfológicas del *Bacillus subtilis*.

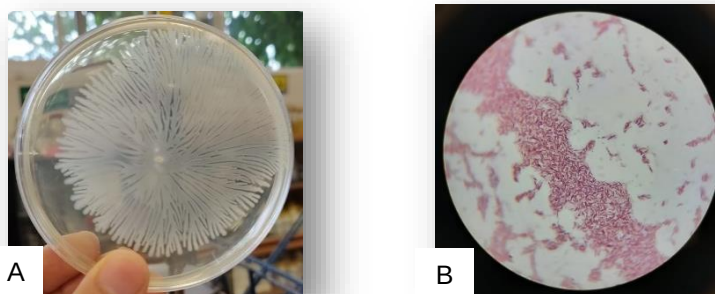


Fig. 1. A) Cultivo de *Bacillus subtilis* analizado B) Prueba de tinción de gram para identificar presencia de *Bacillus subtilis* gram positivo en el cultivo puro inicial.

Se observa en la **Figura 3**, el total de microorganismos que existen dentro de cada una de las muestras de estudio, tal y como en el agua con la cual se preparó el tratamiento, como la tierra, hojas y fruto. Se tomaron pruebas antes y después de agregar el primer tratamiento de *Bacillus subtilis*. Se tomó como base agar PDA, para lograr fácilmente el crecimiento óptimo de los hongos de interés, siendo estos los que crean la decoloración y putrefacción

del fruto al madurar. Al realizar cada una de las pruebas pertinentes, en el agua se encontraron diversos microorganismos provenientes de la misma familia de *Bacillus subtilis*, observándose microscópicamente siendo singulares bacilos, evitando la hipótesis de que podría alterar el tratamiento empleado. Claramente se puede observar en **Figura 4** el crecimiento más óptimo cuando no hay presencia de *Bacillus subtilis* que cuando se encuentra esta, el crecimiento de los hongos se ve afectado, gracias a capacidad que tiene *Bacillus subtilis* de ser antifúngico. Al presentarse el primer tratamiento no se presentó la inhibición parcial de los hongos, ya que este se debe realizar por ciclos, siendo este al 3 día de la primera aplicación y luego a los 7 días de la segunda aplicación. Se observó lo mismo con la experimentación con hojas y frutos, hubo mejor crecimiento de estos cuando se llevaron a refrigeración, en el caso de las cajas inoculadas sin presencia de *Bacillus subtilis* se observa la esporulación con mayor crecimiento. Al analizar las segundas muestras tomadas al ser aplicado el segundo tratamiento, se observó que dicha enfermedad antracnosis en los árboles de chirimoyo, la cual genera puntos de necrosis (manchas negras o marrones) y contorno de clorosis (contorno amarillento), estos habían perdido coloración en las singulares manchas, de lo que se había observado por primera vez, **Figura 5**. Por último, al observar las cajas Petri inoculadas con *Bacillus subtilis*, para observar así el antagonismo sobre el sospechado hongo *Colletotrichum spp*, entre otros. Por lo cual se pudo observar que uno fue inhibido totalmente, por otra parte, otros de los dos hongos no hubo tanto crecimiento, fue controlado.



Fig. 3 Muestras de colonias obtenidas por análisis de agua, macroscópica y microscópicamente por medio de tinción de gram .

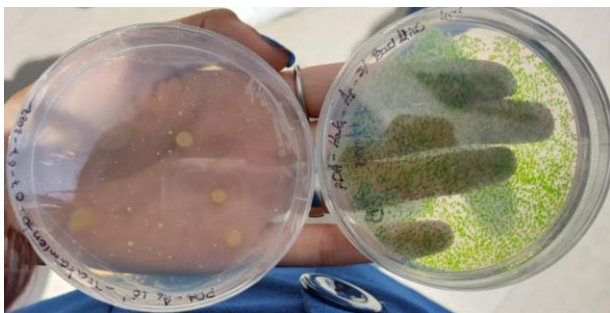


Fig. 4 Comparación antifúngica de *Bacillus subtilis* de muestras con presencia y sin presencia de esta, primera y segunda dosis.



Fig. 5 Comparación de enfermedad creada por antracnosis en los árboles de chirimoyo, antes y después de su segunda aplicación de *Bacillus subtilis*.

V. DISCUSIÓN (O ANÁLISIS DE RESULTADOS)

A base de los resultados obtenidos y consultados, los síntomas presentados, que son más evidentes a primera vista, ya que por su singularidad de la llamada “Mancha negra”, que llega aparecer en los frutos y hojas del árbol infectado. Se menciona que, en regiones tropicales y subtropicales, *Colletotrichum* causa antracnosis en hortalizas, frutales. En frutales *C. gloeosporioides* causan pudrición en frutos, estolones, hojas y pecíolos. Lo que se debería a que *C. gloeosporioides* y otras especies de esta misma familia logre la pudrición de frutos en chirimoya (*Annona cherimola*). Tal como se observa en nuestros resultados, la sintomatología por la presencia de lesiones necróticas circulares de tamaños variables en los frutos y hojas de los árboles de estudio [5]. Al no haber realizado pruebas de patogenicidad, se realizó solo aislamiento y caracterización morfológica de los hongos obtenidos de las muestras, comprando los resultados de la investigación consultada. Siendo la misma morfología obtenida en las muestras del Árbol₆, en hojas y tierra, confirmando así que la colonia obtenida se trata de diferentes familias de *Colletotrichum* [6]. Con respecto al antagonismo, *Bacillus subtilis* mostró por su parte, la forma indirecta de promoción del crecimiento vegetal está relacionada con la producción de sustancias que actúan como antagonistas de patógenos, significativo al inhibir el crecimiento micelial y/o induciendo resistencia en las plantas [8]. Debido a la producción de metabolitos fungitoxicos. Variando un poco los resultados entre los diferentes aislamientos obtenidos de las muestras, ya que este al hacer su conveniente comparación, hubo crecimiento siendo este más limitado debido a su capacidad inhibitoria para cada una de las especies de hongos encontrados en dichas muestras [7]. A lo observado en la disminución de microorganismos, tratándose tanto de hongos como bacterias, se debería a la capacidad de producción de antibióticos; urfactina, iturina y fengicina. Iturina y fengicina tienen fuertes propiedades de biocontrol ya que pueden inhibir un rango amplio de patógenos de plantas [9].

Al igual a la producción de enzimas líticas, las cuales se tratan de las quitinasas, hidrolasas y proteasas que actúan fundamentalmente sobre los hongos [8].

I. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Es necesario estudiar las potencialidades de las bacterias en el mejoramiento de los cultivos de importancia económica y social. Como lo es *Bacillus subtilis*, que creo que uno de los puntos más importantes que tomar siendo que no habría necesidad de la utilización de compuestos químicos, como lo son los pesticidas, lo que a mi parecer crea efectos negativos en el ambiente y la creación de resistencia por parte de los agentes patógenos, causando así grandes pérdidas a las personas dedicadas a la agricultura. Actualmente, diversas formulaciones comerciales cuentan como ingrediente activo cepas del género *Bacillus*, debido a su capacidad de colonización, fácil reproducción y alta persistencia asociada a la formación de endosporas, siendo esta última una característica de especial interés ya que les permite sobrevivir bajo condiciones de estrés abiótico, facilitando su producción y almacenamiento durante largos periodos de tiempo, aplicando así un control biológico.

II. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Principalmente quiero agradecer a la profesora María Rico Martínez y al Instituto Tecnológico Superior de Abasolo, los cuales me dieron la oportunidad de conocer este tema un poco más a fondo y despertar mi curiosidad sobre todos los tipos de microorganismos y conocer su institución y a las personas que son parte de esta. De igual forma a mi universidad; Instituto Tecnológico Superior de Purísima del Rincón, por darnos la apertura de participar en tipo de convocatorias, al igual que mis profesores por despertar esa incertidumbre de aprender más. Y, por último, pero no menos importante a mi familia y pareja.

REFERENCIAS

- [1] M. Úbeda, «Aislamiento e identificación de *Bacillus subtilis* y evaluación del antagonismo in vitro frente hongos fitopatógenos,» *Revista científica Nexo*, vol. 30, nº 02, pp. 96-110, Noviembre 2017.
- [2] A. B. Pérez, *Antagonismo de *Bacillus subtilis* sobre hongos fitopatógenos y su efecto en *capsicum spp.**, Conkal, Yucatán: Tecnológico Nacional de México, 2019.
- [3] M. Villarreal, E. Villa y L. Cira, «EL género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola,» *Revista mexicana de fitopatología*, vol. 36, nº 1, 2018.
- [4] J. J. C. Retona, *Cultivo de la anona (Annona cherimola, Mill)*, San José: MAG, 2007.
- [5] Ramón Villanueva–Arce , María de J. Yáñez–Morales , Ana M. Hernández–Anguiano. (2008). Especies de *Colletotrichum* en chirimoya (*Annona cherimola* Mill.). 29 de julio del 2022, de Scielo Sitio web: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952008000600009
- [6] Elizabeth Álvarez, César Andrés Ospina, Juan Fernando Mejía y Germán A. Llano. (2004). CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, PATOGENICA Y GENÉTICA DEL AGENTE CAUSAL DE LA ANTRACNOSIS (*Colletotrichum gloeosporioides*) EN GUANÁBANA (*Annona muricata*) EN EL VALLE DEL CAUCA CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, PATOGENICA Y GENÉTICA DEL AGENTE CAUSAL DE LA ANTRACNOSIS (*Colletotrichum gloeosporioides*) EN GUANÁBANA (*Annona muricata*) EN EL VALLE DEL CAUCA. ACADEMIA, 28, 9.
- [7] Gutiérrez-Alonso, J.G., Gutiérrez-Alonso, O., Nieto-Ángel, D., Téliz-Ortiz, D., Zavaleta-Mejía, E., Delgadillo-Sánchez, F., y Vaquera-Huerta, H. 2003. Evaluación in vitro de agentes biológicos y físicos para el control de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:199-206.
- [8] Berto Tejera-Hernández, Marcia M. Rojas-Badía y Mayra Heydrich-Pérez. . (7 de abril de 2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *CENIC Ciencias Biológicas*, 42, 9.
- [9] Juan Arturo Ragazzo–Sánchez¹; Alejandra Robles–Cabrer¹; Leopoldo Lomelí–González¹; Guadalupe Luna–Solano²; Montserrat Calderón–Santoyo. (18 de febrero, 2011). Selección de cepas de *Bacillus spp.* productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. *Chapingo Ser.Hortic*, 17, 1

DESARROLLO DE UNA PASTA ALTA EN PROTEÍNA A BASE DE HARINA DE TRIGO Y GARBANZO SUPLEMENTADA CON “*ACHETA DOMESTICUS*”

Nicté García Carrillo

Benemérita Universidad Autónoma de
Aguascalientes
Avenida Universidad 940, Ciudad
Universitaria, 20100 Aguascalientes,
Ags
Al227619@edu.uaa.mx

Rosalía Reynoso Camacho

Universidad Autónoma de Querétaro
C.U. Cerro de las Campanas s/n, Cp.
76010, Querétaro, Querétaro
rrcamachomx@yahoo.com.mx

Resumen —El grillo *Acheta domesticus* (AD) es una alternativa alimentaria debido a que su producción tiene bajo impacto ambiental. Este contiene altas cantidades de proteína y es una fuente de fibra y ácidos grasos poliinsaturados. Además, se ha demostrado que presenta beneficios en el control de la resistencia a insulina y triglicéridos. Por lo que la incorporación de este a harinas para preparar pastas podría mejorar su calidad nutrimental, así como sus beneficios a la salud. El ingrediente principal de las pastas es sémola de trigo haciendo que la calidad nutricional de estos alimentos sea baja, debido a su alto contenido en almidones y bajo contenido en proteína y fibra. Por lo tanto, una tendencia es la incorporación de productos en la formulación de pastas para mejorar sus características nutricionales, sin afectar sus características organolépticas, además, existe una tendencia en el desarrollo de pastas libres de gluten. El objetivo de este proyecto fue desarrollar una pasta libre de gluten y suplementada con harina de grillo (*Acheta domesticus*), con alto contenido de proteínas y fibra y con buena aceptabilidad sensorial. Se desarrollaron 4 formulaciones de pasta; harina de trigo (control), harina de trigo más grillo, harina de garbanzo (libre de gluten) y harina de garbanzo más grillo. Se determinó el tiempo óptimo de cocción y una vez establecido, se coció la pasta y se analizó su aceptabilidad sensorial, se determinó el índice de absorción de agua, volumen de expansión y color, se evaluó el contenido proximal y el contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante. Como resultados se encontró que la adición de grillo disminuía el tiempo de cocción y la capacidad de retención de agua posiblemente al reducirse el contenido de almidón de la pasta. Además de lo anterior, la adición de grillo generó una reducción en la luminosidad, dando como resultado pastas más oscuras, en cuanto a la aceptabilidad sensorial, la adición de 15% de grillo en la pasta a base de harina de trigo, generó un incremento en la aceptabilidad del sabor, consistencia y olor. Sin embargo, no se vio el mismo efecto en la pasta a base de harina de garbanzo. Por último, la adición de grillo en ambas formulaciones generó un incremento en el contenido de proteína, ceniza, fibra, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante de las pastas

Palabras clave — harina de grillo, pasta alta en proteína, composición proximal, evaluación sensorial, parámetros de cocción.

Abstract — The *Acheta domestica* (AD) cricket is a food alternative because its production has a low environmental impact. It contains high amounts of protein and is a source of fiber and polyunsaturated fatty acids; it has also been shown to have benefits in controlling insulin resistance and triglycerides. Therefore, the incorporation of this into flour to prepare pasta could improve its nutritional quality, as well as its health benefits. The main ingredient in pasta is wheat semolina, making the nutritional quality of these foods low due to its high starch content and low protein and fiber content. Therefore, a trend is the incorporation of products in the formulation of pasta to improve its nutritional characteristics without affecting its organoleptic characteristics; in addition, there is a trend in the development of gluten-free pasta. The purpose of this project was to develop a gluten-free pasta supplemented with cricket flour (*Acheta domestica*), with a high content of protein and fiber, with good sensory acceptability. Four paste formulations were developed; wheat flour (control), wheat flour plus cricket, chickpea flour (gluten-free), and chickpea flour plus cricket. The optimal cooking time was determined, and once the pasta was established, its sensory acceptability was analyzed, the rate of water absorption, expansion volume, color, proximal analysis, phenolic compounds content and antioxidant capacity were determined. As a result, it was found that the addition of cricket decreased the cooking time and the water retention capacity, possibly by reducing the starch content of the pasta. In addition to the above, the addition of cricket generated a reduction in luminosity, resulting in darker pasta; in terms of sensory acceptability, adding 15% cricket in pasta based on wheat flour increased the acceptability of the flavor, consistency and smell. However, the same effect was not seen in the pasta based on chickpea flour. Finally, the addition of cricket in both formulations generated an increase in the content of protein, ash, fiber, total phenolic compounds and antioxidant capacity of pasta.

Keywords — cricket powder, high protein pasta, proximal composition, sensory evaluation, cooking properties.

I. INTRODUCCIÓN

Las pastas alimenticias son una de las comidas favoritas y más populares en todo el mundo. Su aceptación global tiene que ver con su bajo costo relativo, versatilidad y conveniencia (Lezcano, 2016). Tradicionalmente, el ingrediente principal de las pastas ha sido la sémola de trigo, la cual hace que este alimento contenga carbohidratos (del 74 % al 77 %) y proteínas (del 11 % al 15 %). Sin embargo, la calidad de la proteína de la pasta es baja debido a las limitaciones en las cantidades de aminoácidos esenciales, en particular la lisina. Existen componentes que pueden ser agregados en su producción para incrementar el valor nutricional o bien ejercer un efecto beneficioso sobre la salud, en los últimos años se ha vuelto muy popular esta práctica (Duda et al., 2019). La harina de grillo resulta un aditivo proteico muy interesante.

La proteína es parte esencial de cualquier dieta. En muchos países las proteínas de origen animal son caras y por lo tanto no son accesibles para toda la población, esto tiene como consecuencia que en muchos países no desarrollados o en vías de desarrollo, el consumo de proteínas de origen animal es escaso, y se utiliza como fuente principal de proteína, a los vegetales. Además, cada vez más estudios relacionan niveles más altos de colesterol, riesgo de enfermedades cardiovasculares y cáncer al consumo de proteínas de origen animal. Esto ha contribuido de manera significativa a un creciente interés en la producción rica en proteínas, pero no a base de carne. Sin embargo, se ha demostrado que tanto la digestibilidad, como la cantidad de aminoácidos esenciales de proteínas vegetales en el

consumo humano es un factor determinante para su aprovechamiento. Y el principal problema con las proteínas vegetales, son la baja digestibilidad y solubilidad debido a la presencia de sustancias anti nutricionales (Cabuk, 2020).

Los insectos comestibles, entre los que se encuentra el grillo, son una excelente elección de alimento ya que contienen una cantidad significativa de macronutrientes, son una potente fuente de proteínas y energía. Además, presentan altos niveles de ácidos grasos monoinsaturados y/o poliinsaturados, y son ricos en micronutrientes como cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, selenio y zinc, además de vitamina A, vitamina B12. Además, las proteínas de insectos tienen mayores niveles de digestibilidad que las proteínas vegetales (Laureano et al., 2020).

Si bien hay un creciente interés por el consumo de este tipo de proteínas, aun no existen muchos productos que las contengan, es por eso que en el presente proyecto se elaboraron pastas de trigo y garbanzo adicionadas con harina de grillo y se determinaron su contenido nutrimental, compuestos fenólicos, propiedades fisicoquímicas y sensoriales.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Preparación de la pasta: fueron llevadas a cabo 4 formulaciones diferentes, para la primera se pesaron 300 g de harina de trigo, en la segunda 300 g de harina de garbanzo integral, para la tercera se mezclaron 255 g de harina de trigo con 45 g y por último se mezclaron 255 g de harina de garbanzo integral con 45 g de harina de grillo. Una vez homogeneizadas, a cada una se le añadió 128 g de agua y 110 g de huevo. Cada una fue amasada por aproximadamente 20 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se dejó reposar durante 20 minutos. La masa fue cortada utilizando una máquina Atlas 150, las piezas cortadas se dejaron secando en una bandeja a temperatura ambiente durante 24 horas.

2.2. Absorción de agua y expansión de volumen: 3 g de pasta fueron colocados en 150 ml de agua hirviendo, se dejaron cocinar durante el tiempo óptimo de cocción previamente determinado. Una vez transcurrido el tiempo, la pasta fue escurrida y pesada, obteniendo así el porcentaje de absorción de agua. En cuanto al volumen de expansión, pasta cruda fue sumergida en una probeta graduada, con 150 ml de agua, posteriormente pasta cocida fue sumergida, observando el volumen de agua desplazado y obteniendo el valor de expansión mediante la diferencia de los valores obtenidos.

2.3. Tiempo óptimo de cocción: se colocaron 3 g de pasta en 150 ml de agua hirviendo, luego de 8 minutos en agua hirviendo, se tomaron muestras cada minuto, aplastando cada una de ellas hasta que el núcleo blanco desapareció, y con ellos se determinó el tiempo óptimo de cocción.

2.4. Análisis de color: Se utilizó un colorímetro (Konica Minolta, Japón), colocando 30 g de pasta molida.

2.5. Análisis sensorial: se realizó una prueba sensorial de aceptabilidad donde participaron estudiantes de la Universidad Autónoma de Querétaro, se usaron a 25 panelistas no

entrenados excluyendo a personas con alergias a los mariscos y crustáceos. Se evaluó mediante una escala hedónica de 9 puntos, donde 1 es me disgusta extremadamente y 9 me gusta extremadamente (Meilgaard et al., 2015).

2.6. Cuantificación de fenoles: El contenido de fenoles totales en las pastas se determinó espectrofotométricamente según el procedimiento de Folin-Ciocalteu.

2.7. Capacidad antioxidante por DPPH: se preparó una solución estándar de trolox, a partir de la cual se llevó a cabo la curva de calibración, preparando en tubos eppendor diferentes concentraciones. Se preparó la solución DPPH añadiendo una pizca de radical y disolviendo con el metanol necesario para obtener una absorbancia de 0.75 a 0.78 u.a. a 517 nm. Una vez teniendo esta solución, se montó la placa, por triplicados, agregando blanco y control; teniendo un volumen total por pocillo de 220 µl. Ya que se obtuvo la curva, las muestras se midieron agregando 20 µl de la muestra y 200 µl de DPPH.

2.8. Análisis proximales:

2.8.1 Determinación de humedad: se realizó colocando 0.5 g de cada muestra en crisoles a peso constante, se dejaron en una estufa convencional (Scorpion Scientific, E.U.A) a 110 ± 1 °C durante 1 h. Posteriormente se cuantificó el porcentaje de humedad por la diferencia de pesos con la siguiente ecuación:

$$\%Humedad = \frac{\text{Peso de la muestra (g)} - (\text{Peso final (g)} - \text{Peso Crisol(g)})}{\text{Peso de la muestra (g)}} \times 100$$

2.8.2 Cuantificación de proteínas: se utilizó el método de Kendalj, de acuerdo con ISO 20483 que consta de una digestión y una posterior destilación.

2.8.3. Cenizas: se realizó cuantificando el contenido de materia orgánica mediante calcinación. Se pesaron 0.4 g de muestra en un crisol (a peso constante), después se carbonizó la muestra sobre una flama de mechero y se colocó dentro de una mufla (Thermolyne, E.U.A) a 550 ± 1 °C durante 5 h. Luego se dejaron enfriar las muestras en el desecador. Finalmente, las muestras fueron pesadas y se calculó el porcentaje de cenizas con la ecuación:

$$\%Cenizas = \frac{\text{Peso del residuo (g)}}{\text{Peso de la muestra en base seca (g)}} \times 100$$

2.8.4 Determinación de fibra soluble e insoluble: se llevó a cabo utilizando el kit de ensayo de fibra soluble e insoluble de la marca SIGMA.

III. RESULTADOS Y DISCUSIONES

El volumen de expansión es uno de los factores significativos utilizados para predecir la calidad de cocción de la pasta (Cabuk, 2020). En la Tabla 1 se observa que la adición de harina de grillo no tiene impacto en esta propiedad. En cuanto al porcentaje de absorción de agua, en general, se ve disminuido mediante la adición de grillo, así como por el grosor

de las pastas preparadas. Esta tendencia podría atribuirse a que estas muestras tienen estructura más fibrosa y con menor concentración de almidón, lo que permite una menor penetración de las moléculas de agua, dando como resultado una menor capacidad de hidratación. Además, la adición de harina de grillo causó un decremento en el tiempo óptimo de cocción.

La evaluación de los alimentos por parte de los consumidores se basa no solo en el valor nutricional o los posibles efectos favorables a la salud, sino también en las características sensoriales que afectan directamente las preferencias, la selección y los deseos del consumidor. Entre estas propiedades sensoriales, el color es una de las características más fáciles de evaluar. El uso del aditivo de harina de grillo para la producción de pasta resultó en claras diferencias de color. Las muestras de pasta que contenían harina de grillo fueron notoriamente más oscuras. Los resultados del análisis de color (Tabla 2) mostraron que el valor del parámetro L*, relacionado directamente con la luminosidad de la pasta, en la pasta de trigo adicionada con grillo, disminuyó en casi 12% comparada con la pasta de trigo, mientras que, en la pasta de garbanzo con grillo, disminuyó solamente un 1.5 %, este resultado se aprecia en las fotografías de las pastas de la Figura 2.

Tabla 1. Volumen de expansión, porcentaje de absorción de agua y tiempo óptimo de cocción de las cuatro diferentes pastas con distintos grosores: 4, 5 y 6; establecidos en la máquina Atlas 150.

Pasta	Grosor	Volumen de expansión (%)	Absorción de agua (%)	Tiempo óptimo de cocción (minutos)
Trigo	4	5±0 ^a	4.65± 0.21 ^{de}	14± 0.0 ^a
Trigo	5	5±0 ^a	4.9±0.14 ^{cde}	14± 0.0 ^a
Trigo	6	5±0 ^a	5.5± 0.14 ^f	12.5± 0.71 ^{abc}
Trigo con grillo	4	5± 0 ^a	2.85±0.21 ^{bc}	13± 0.0 ^{ab}
Trigo con grillo	5	5± 0 ^a	4.25±0.07 ^e	11± 0.0 ^{cde}
Trigo con grillo	6	5± 0 ^a	5.9±0.14 ^{ab}	11± 0.0 ^{cde}
Garbanzo	4	5± 0 ^a	5.05±0.07 ^{bcde}	12± 0.0 ^{bcd}
Garbanzo	5	5± 0 ^a	5.75±0.35 ^{bc}	12.5± 0.71 ^{abc}
Garbanzo	6	5± 0 ^a	9.75±0.35 ^a	11± 0.0 ^{cde}
Garbanzo con grillo	4	5± 0 ^a	4.6±0.14 ^{de}	10.5± 0.71 ^{de}
Garbanzo con grillo	5	5± 0 ^a	4.9±0.28 ^{cde}	9.5± 0.71 ^{ef}
Garbanzo con grillo	6	5± 0 ^a	5.75±0.35 ^{bc}	8.5± 0.71 ^f

Tabla 2. Coordenadas cromáticas de color de las pastas elaboradas

Nombre datos	L*(D65)	a*(D65)	b*(D65)
Trigo	89	1.31	9.5
Trigo con grillo	78.3	2.8	12.87
Garbanzo	81.53	2.75	15.48
Garbanzo con grillo	80.27	2.89	15.14



Figura 2. Pastas cocidas, ordenadas de izquierda a derecha: pasta de harina de trigo, pasta de harina de trigo adicionada con harina de grillo, pasta de harina de garbanzo, pasta de harina de garbanzo adicionada con harina de grillo.

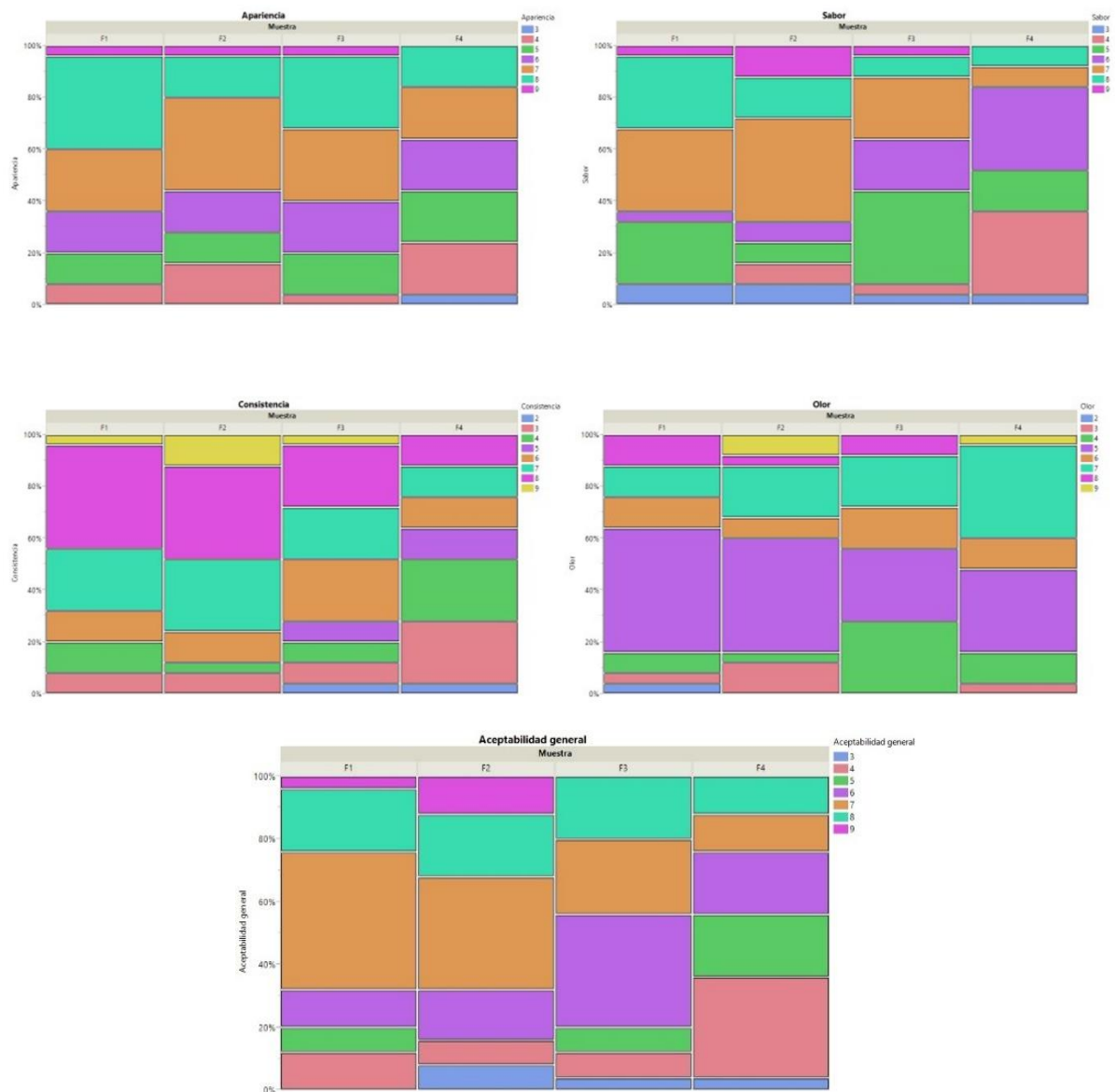


Figura 3. Resultados de los análisis sensoriales aplicados a las pastas preparadas con harina de trigo, harina de trigo adicionada con harina de grillo, harina de garbanzo y harina de garbanzo adicionada con harina de grillo. F1:trigo; F2: garbanzo grillo ; F3:rigo con grillo ; F4: garbanzo.

Las propiedades visuales como la apariencia y color suelen influir en la aceptación del consumidor hacia un determinado producto. Los resultados de la evaluación sensorial muestran que la aceptación a la apariencia de la pasta adicionada con harina de grillo fue menor que la de solo trigo. Sin embargo, en sabor, consistencia, olor y aceptabilidad general, se presentaon mejores resultados para la primera. Ahora bien, la pasta de garbanzo adicionada con harina de grillo obtuvo valores menores en todos los rangos en comparación con la de garbanzo, excepto en el parámetro del olor.

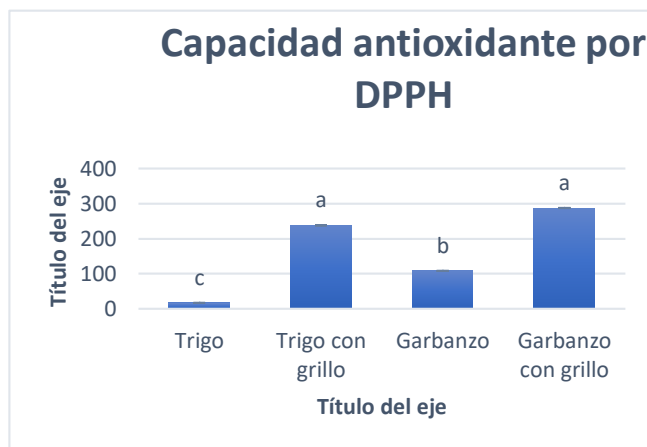
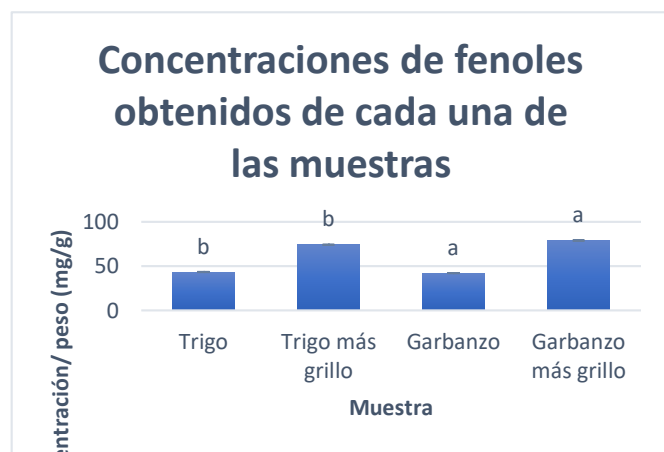


Figura 4. Compuestos fenólicos de las pastas adicionadas con grillo

Figura 5. Capacidad antioxidante de las diferentes pastas por el método DPPH

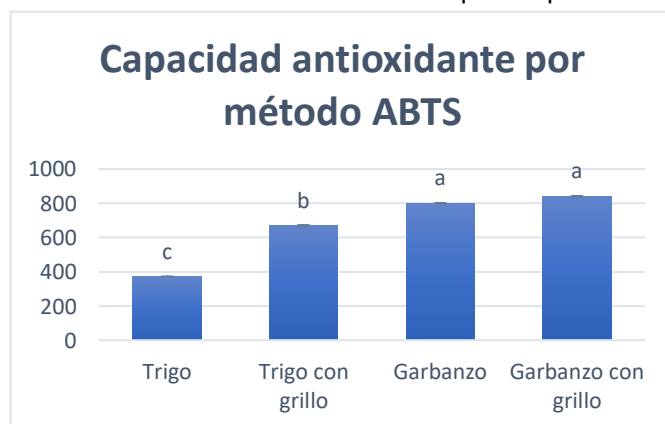


Figura 6. Capacidad antioxidante de las diferentes pastas por el método ABTS

Los compuestos fenólicos inhiben principalmente la oxidación de lípidos a través de la eliminación de los radicales libres y transformación de radicales fenólicos resultantes en una forma de baja energía que no promueve la oxidación (Quinteros, 2021). En la figura 4 se observa que no existe diferencia estadísticamente significativa en las concentraciones de los compuestos fenólicos entre las pastas fortificadas con harina de grillo y las no fortificadas. Los compuestos antioxidantes en los alimentos juegan un papel importante como sustancias protectoras contra los radicales libres, por ejemplo, las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Quinteros, 2021). La capacidad antioxidante fue evaluada por dos distintas metodologías, obteniendo un común denominador: hay un incremento significativo en dicha actividad entre la pasta de trigo y la de trigo fortificada con grillo, esto coincide con Quinteros (2021) quien menciona que los insectos comestibles, incluidos los grillos, son ricos en proteínas las mismas que se consideran ser una fuente valiosa de péptidos bioactivos con actividad antioxidante. Mientras que en la pasta a base de garbanzo no existe diferencia significativa puesto que las leguminosas como el garbanzo son ricas en antioxidantes (Silva et al. 2010).

Tabla 3. Análisis químico proximal de pastas elaboradas a base de trigo, garbanzo y grillo

Muestra	Humedad (%)	Proteínas (%)	Cenizas (%)
Trigo	8.53 ± 0 ^a	11.74 ± 0.31 ^c	0.89
Trigo con grillo	8.28 ± 0.01 ^a	17.97 ± 0.16 ^b	1.30
Garbanzo	7.34 ± 0 ^a	19.51 ± 2.25 ^b	3.51
Garbanzo con grillo	7.92 ± 0 ^a	25.58 ± 0.30 ^a	3.67

El contenido de humedad es un factor significativo que afecta la duración del almacenamiento y la calidad microbiana de ciertos productos como la pasta (Cabuk, 2020). Los resultados muestran que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre formulaciones. En cuanto al contenido de proteínas, en la tabla 3 se observa que se tiene un incremento significativo en el porcentaje de estas al fortificar la pasta con harina de grillo. Tanto en la pasta de trigo como de garbanzo, hubo un aumento de más del 6%, debido a que la harina de grillo es un producto alto en proteínas, esto concuerda con lo descrito por Duda et al. (2019). Se aprecia también un incremento en el contenido de minerales, dicho aumento es más significativo en la pasta a base de harina de trigo (0.86%), mientras que en la pasta a base de harina de garbanzo es mucho menor la diferencia (0.16%). El conjunto de estas características en una pasta hace que sea un producto de interés para los consumidores en general, pero en especial para los deportistas (Volek et al., 2014).

Tabla 4. Determinación de porcentaje de fibra de pastas elaboradas a base de trigo, garbanzo y grillo

Muestra	Fibra insoluble (%)	Fibra soluble (%)	Fibra total (%)
Trigo	1.10 ± 0.02 ^{ab}	0.05 ± 0.00 ^a	1.15 ^a
Trigo con grillo	3.85 ± 0.01 ^{ab}	0.10 ± 0.00 ^a	3.95 ^a
Garbanzo	5.77 ± 0.01 ^a	0.3 ± 0.00 ^a	6.07 ^a
Garbanzo más grillo	6.87 ± 0.01 ^a	0.05 ± 0.00 ^a	6.92 ^a

Como puede observarse en la Tabla 4, el contenido de fibra tuvo un incremento al adicionar las pastas con harina de grillo, el aumento fue más notorio en la pasta con base de trigo, con casi el 3%, mientras que en las pastas de garbanzo la diferencia fue menor al 1%. Dicho aumento en la fibra total se debe a que los grillos, cuentan con un mayor contenido de fibra cruda en su estructura química (Stull et al., 2018; Van Huis et al., 2013). No obstante, las diferencias ya mencionadas no fueron significativas.

IV. CONCLUSIONES

La adición de 15% de harina de grillo para la formulación de una pasta a base de harina de trigo y garbanzón, genera una disminución en la capacidad de hinchamiento, atribuible a su contenido de almidón, además de que generará cambios en la coloración de la pasta. Por otro lado, la adición de grillo en una base de harina de trigo incrementa la aceptación sensorial, sin embargo la adición de harina de grillo en una base de harina de garbanzo, generará una disminución de los atributos sensoriales. Por último la adición de grillo genera un incremento en el contenido de proteínas, fibra, ceniza, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante, tanto en la base de harina de trigo como en la de garbanzón. Por lo tanto, la adición de harina de grillo es una excelente opción para mejorar las características nutricionales de pastas comestibles.

V. AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento hacia la doctora Rosalía Reynoso Camacho por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme ser parte de la investigación llevada a cabo en él. Además, agradezco al Candidato a Dr doctor Alejandro Escobar Ortiz por asesorarme en todo momento, así como a la Benemérita Universidad Autónoma de Aguascalientes por el apoyo brindado. Por último, doy las gracias a mi familia por ser mi mayor sostén en todo momento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Çabuk, B., & Yılmaz, B. (2020). *Fortification of traditional egg pasta (erişte) with edible insects: nutritional quality, cooking properties and sensory characteristics evaluation. Journal of Food Science and Technology.* doi:10.1007/s13197-020-04315-7

- [2] Duda, A., Adamczak, J., Chełmińska, P., Juskiewicz, J., & Kowalczewski, P. (2019). Quality and Nutritional/Textural Properties of Durum Wheat Pasta Enriched with Cricket Powder. *Foods*, 8(2), 46. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/foods8020046>
- [3] ISO 20483:2013 Cereals and Pulses—Determination of the Nitrogen Content and Calculation of the Crude Protein Content—Kjeldahl Method; ISO: Geneva, Switzerland, 2013.
- [4] Laureano Carhuallanqui, A. K., Bustamante Rubio, G. M., Ccahua Quispe, M. I., Bellido Tufiño, N. P., & Flores Soto, R. R. (2020). Estudio de pre-factibilidad para la producción y comercialización de galletas a base de harina de Acheta domesticus.
- [5] Lezcano, E. (2016). Pastas alimenticias. *Alimentos argentinos*, (70), 41-48.
- [6] Pilco Romero, G. T. (2021). *Utilización del grillo Acheta domesticus en la elaboración de productos derivados de cereales: implicaciones nutricionales, funcionales y tecnológicas* (Master's thesis, Quito).
- [7] Stull VJ, Finer E, Bergmans RS, Febvre HP, Longhurst C, Manter DK, Patz JA, Weir TL (2018) Impact of edible cricket consumption on gut microbiota in healthy adults, a doubleblind, randomized crossover trial. *Sci Rep* 8(1):10762. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29032-2>.
- [8] Van Huis A, Van Itterbeeck J, Klunder H, Mertens E, Halloran A, Muir G, Vantomme P (2013) Edible insects: future prospects for food and feed security, vol 171. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome Volek, J. S., Noakes, T., & Phinney, S. D. (2014). *Rethinking fat as a fuel for endurance exercise*. *European Journal of Sport Science*, 15(1), 13–20.
- [9] Quinteros Meneses, M. F. (2021). Evaluación de las actividades biológicas in vitro de los aislados proteicos obtenidos a partir de la harina de grillo (*Gryllus assimilis*) (Master's thesis, Ecuador: Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC)).
- [10] L. Silva-Cristobal , P. Osorio-Díaz , J. Tovar & L. A. Bello-Pérez (2010) Chemical composition, carbohydrate digestibility, and antioxidant capacity of cooked black bean, chickpea, and lentil Mexican varieties Composición química, digestibilidad de carbohidratos, y capacidad antioxidante de variedades mexicanas cocidas de frijol negro, garbanzo, y lenteja, *CyTA – Journal of Food*, 8:1, 7-14, DOI: 10.1080/19476330903119218.

IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS NOSOCOMIALES EN UN HOSPITAL VETERINARIO DE GRANDES ESPECIES

Abril Sánchez Ledesma

Universidad Autónoma de Querétaro
Cerro de las campanas S/N, Centro
Universitario, 76010, Santiago de Querétaro,
Qro.
abril4ledesma@gmail.com

Diego Josimar Hernández Silva

Universidad Autónoma de Querétaro
Carretera a Chichimequillas S/N, Ejido Bolaños,
Campus Aeropuerto, Santiago de Querétaro, Qro.
diego.hernandez@uaq.mx

Resumen — Las infecciones nosocomiales representan un grave problema en pacientes de hospitales veterinarios en la actualidad, ya que incrementan el riesgo de deterioro del sistema inmunológico y la disminución de las defensas naturales del organismo. A continuación, se presentan un conjunto de técnicas de biología molecular y microbiología para la identificación de patógenos nosocomiales. Entre los métodos destaca el cultivo en medios enriquecidos y pruebas tanto morfológicas como bioquímicas. Finalmente, se realizó PCR y electroforesis con el objetivo de demostrar cuál par de *primers* tenían mejor reconocimiento con una secuencia específica. Los resultados obtenidos nos indicaron que los cebadores U4-U5 mostraban mayor especificidad y pudo inferirse la presencia de posibles patógenos. Futuros estudios abren la posibilidad a la complementación de este proyecto.

Palabras clave — Patógenos nosocomiales, PCR, electroforesis, hospital veterinario.

Abstract — Nosocomial infections today represent a serious problem in veterinary hospital patients, since they increase the risk of deterioration of the immune system and the reduction of the body's natural defenses. Below is a set of molecular biology and microbiology techniques for the identification of nosocomial pathogens. Among the methods, were used bacterial culture in enriched media and both morphological and biochemical tests. Finally, PCR and electrophoresis were performed to show which pair of primers had better recognition with a specific sequence. The results obtained indicated that the primers U4-U5 showed greater specificity and the presence of possible pathogens could be inferred. Future studies open the possibility of complementing this project.

Keywords — Nosocomial pathogens, PCR, electrophoresis, veterinary hospitals.

I. INTRODUCCIÓN

Una infección puede darse debido a que existe la presencia y multiplicación de microorganismos patógenos, quienes tienen la capacidad de provocar un desequilibrio en el sistema inmunitario del hospedero. Estas infecciones pueden ocurrir incluso dentro de los hospitales y son conocidas como infecciones nosocomiales [1].

Con el paso de los años, se han descubierto una infinidad de patógenos en hospitales humanos y por ello hoy en día se tiene un vasto conocimiento y base de datos acerca de estos. Sin embargo, en hospitales veterinarios en México no se ha considerado la misma relevancia, por lo que no hay muchas investigaciones al respecto. Incluso hay estudios epidemiológicos que demuestran que, con una infraestructura de 3 500 hospitales, 62 000 camas y 7 millones de admisiones por año, las tasas de infecciones nosocomiales son de

5 al 19% en salas de hospitalizados, y más altas aun en unidades de cuidados intensivos [2]. Es claro que erradicar a los patógenos resulta inevitable, pero es necesario reducir las infecciones nosocomiales ya que se pueden presentar severas consecuencias como la elevación en la tasa de mortalidad, la prolongación de la estancia hospitalaria y el aumento de los costes asistenciales. Debido a lo anteriormente mencionado, surge la necesidad de identificar microorganismos patógenos. Esto nos proporcionará información de suma importancia para posteriormente implementar medidas de prevención y por lo tanto reducir el número de infecciones que pudieran darse dentro del hospital veterinario de grandes especies (HVGE), ubicado en Amazcala, perteneciente a la Universidad Autónoma de Querétaro [3].

II. MARCO TEÓRICO

La definición de patógeno normalmente es utilizada para cualquier microorganismo (bacterias, virus, hongos y parásitos) con potencial para causar enfermedades. El microorganismo tiene la capacidad de entrar al hospedero, encontrar un nicho, evitar someter defensas naturales del hospedero y multiplicarse lo suficiente para establecer su progenie o moverse a un hospedero susceptible [4]. Por su parte el término de “nosocomial” deriva de las palabras griegas *nosos* (enfermedad) y *komein* (cuidar), o sea, “donde se cuidan enfermos” [5]. Así, los patógenos nosocomiales pueden dar origen a infecciones asociadas con los cuidados de la salud que se brindan a los pacientes. Estas son ocasionadas por la microbiota intrahospitalaria, del personal de salud e incluso del mismo paciente. Es un problema de gran importancia clínica y epidemiológica, debido a que generan altas tasas de morbilidad y mortalidad, extensión de los días de hospitalización y dispendio de los recursos económicos [5].

Como sabemos, los microorganismos tienen la capacidad de replicarse. El significado genético de la replicación es el de conservar información genética y transmitirla al momento de dividirse, dando lugar a una bacteria hija con la misma información genética. Son muchas las enzimas (ADN polimerasas, ligasa, nucleasas, helicasas, topoisomerasas, factores de iniciación, etc.) que participan en este proceso y en general se divide en 3 etapas: iniciación, elongación y terminación. En términos generales la iniciación implica el reconocimiento del posicionamiento de las moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN), la elongación se produce en la horquilla de replicación donde se copian los polinucleótidos parentales y en la terminación la molécula madre se ha replicado por completo [6].

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*) es una técnica *in vitro* que se basa en la replicación celular, ya que permite obtener millones de copias de un fragmento de ADN a partir de una sola molécula. Aunado a esto, permite amplificar el material genético de una secuencia de interés y facilita su observación, por lo que es la técnica más importante y revolucionaria en biología molecular [7]. En ella participan una serie de elementos como DNTPs, *primers*, *buffers*, Taq polimerasa, ADN molde y Mg^{2+} . Todos los productos de PCR se identificaron mediante electroforesis en gel de agarosa para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. La agarosa es un polímero en el cuál las moléculas de ADN de doble cadena migran de

manera inversamente proporcional al $\log^{10}$ de sus tamaños moleculares y debido a que el grupo PO_4^- le confiere la carga negativa al ADN, entonces la migración en la cámara ocurre del polo negativo hacia el positivo [8].

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1) Preparación de medios de cultivo y caldos

Se preparan los medios de cultivo y caldos correspondientes tanto para el cultivo de microorganismos, así como sus posteriores pruebas bioquímicas. Los volúmenes necesarios para cada uno se establece de 750 mL para el agar sangre y Mac Conkey, de 300 mL en Bard Parker y test DNAsa, de 160 mL en TSI/LIA/ MIO y 100 mL en malonato y urea. Se esterilizan y después de enfriar en el caso del agar respectivo se agrega el 10% de sangre. Finalmente se vierten en cajas de petri y los de pruebas bioquímicas en tubos de ensayo, se etiquetan correctamente (nombre del agar y la fecha de su elaboración) y se almacenan en el refrigerador a 4°C.

2) Muestreo y cultivo

Se acudió al HVGE ubicado en Amazcala. De acuerdo con la **Figura 1**, se realiza una toma de muestra utilizando hisopos estériles humedecidos con solución salina estéril (en este caso fue en las áreas 11, 6, 7, 17, 8 y 15). Los objetos de muestreo fueron manijas, escotillas, puertas de acceso, lámparas, tarjas, lockers, interruptores, etc. Las muestras se depositan en el medio de transporte “Amies”. Así mismo se rotula el tubo y se realiza un registro de datos como el folio (HVGE-número de área-número de muestra), nombre del proyecto, fecha, Objetos/Superficie/Instrumento de donde se tomó la muestra, observaciones, etc. En el laboratorio las muestras se cultivan por estriado de cuatro cuadrantes en los siguientes medios de cultivo respetando el siguiente orden: 1) Agar Sangre, 2) Agar Mac Conkey. Después se rotulan y se incuban a 37°C por no más de 18 horas.

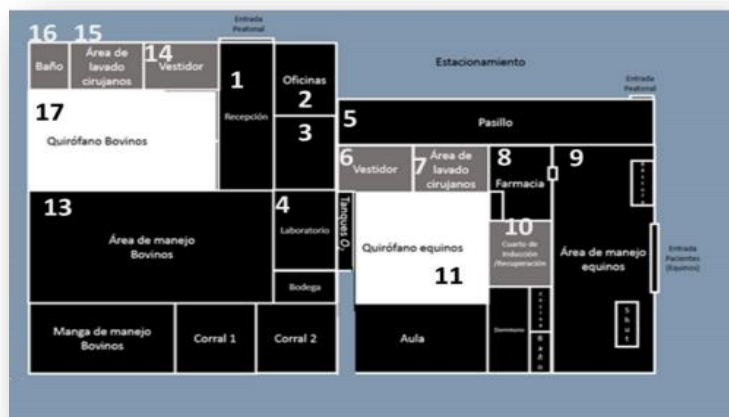


Figura 1. Mapa de las zonas de muestreo en el HVGE.

3) Pruebas bioquímicas

Se observa si después de la incubación hay colonias bacterianas con morfologías sugestivas, estas se identifican numerándolas y se procede a realizar una tinción gram y se observan en el microscopio cada una de ellas. Primeramente, se consideran a los cocos gram positivos y al ser catalasa positiva se realizan pruebas de azúcares (Sal y Manitol, test DNAsa y Bard Parker). También, se consideran los bacilos Gram negativos, los cuales se siembran en agar Mac Conkey y se les realizan pruebas bioquímicas en orden: te orden: 1) TSI, 2) LIA, 3) MIO, 4) Citrato de Simons, 5) Malonato, 6) Urea. Se incubaron durante 18 horas y posteriormente se leyeron de acuerdo con **Tabla 1** en donde se reporta a qué patógenos puede ser sospechoso.

Tabla 1. Interpretación de pruebas bioquímicas.

	<i>E. tarda</i>	<i>E. coli</i>	<i>H. alvei</i>	<i>M. morganii</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. rubidea</i>	<i>P. rustigianii</i>	<i>C. braakii</i>
Producción de Indol	+	+	-	+	-	-	-	+	v
H ₂ S (TSI)	+	-	-	-	+	-	-	-	v
Citrato de Simmons	-	-	v	-	v	v	v	-	+
Lisina descarboxilasa	+	v	+	-	-	+	v	-	-
Arginina dehidrolasa	-	v	-	-	-	-	-	-	v
Ornitina descarboxilasa	+	v	+	+	+	-	-	-	+
Hidrólisis de Urea	-	-	-	+	+	v	v	-	v
Utilización Malonato	-	-	v	-	-	v	v	-	-
Gas de Glucosa	+	+	+	v	+	+	v	v	+
Fermentación de:									
Lactosa	-	v	v	-	-	v	+	-	+
Sorbitol	-	v	-	-	-	v	-	-	+
Arabinosa	v	+	+	-	-	v	+	-	+
Sacarosa	-	v	v	-	v	v	+	v	-
Manitol	-	+	+	-	-	+	+	-	+
Dulcitol	-	v	-	-	-	v	-	-	v
Adonitol	-	-	-	-	-	v	v	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	+	v	-	-
Rafinosa	-	v	-	-	-	+	+	-	-
Motilidad (36°C)	+	v	+	v	+	-	v	v	+

(+) positivo; (-) negativo; (v) variable

4) PCR y electroforesis

Para identificar las bacterias por métodos moleculares se realizó una PCR y siguiendo las recomendaciones publicadas por James, G. (2010) [9]. Para ello se utilizarán los primers universales U3 (5'-AGT GCC AGC AGC CGC GGT AA-3'), U4 (5'-AGG CCC GGG AAC GTA TTC AC-3') y U5 (5'-TCA AAK GAA TTG ACG GGG GC-3' (K = G+T)), realizando las combinaciones U3+U4 y U4+U5 [9]. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y analizadas en el fotodocumentador.

IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

De acuerdo con el cultivo de las muestras y el crecimiento de una serie de colonias en el agar sangre y Mac Conkey, se realizaron las correspondientes pruebas bioquímicas. Una vez comparado con tablas en donde se tiene registro sobre el comportamiento y el patógeno, se pudo inferir sobre la posible presencia de estos. Por ejemplo, en la muestra HVGE-11-05 se obtuvo que es Lac (+), Glc (+), Lys (-), Ornitina (-), Movilidad (+), Indol (-),

Malonato (+) y Urea (-), lo cual nos indica la presencia de *Shigella*. Entonces con ello se obtuvo la presencia de posibles patógenos como *Shigella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Hafnia* en el área de los quirófanos de equinos (área número 11). Para el caso de la zona de lavado cirujano (área número 07) existe la posibilidad de haber encontrado *Salmonella* y *Citrobacter*. En el quirófano de bovinos (área número 17) se tiene la sospecha de presencia de *Salmonella*, *Klebsiella pneumoniae* y *Hafnia alvei*. En la Farmacia (área número 08) y la zona de lavado cirujano (área número 15) se cree que se tiene la presencia de *Enterobacter aerogenes* y *Citrobacter freundii*.

En la primera PCR y electroforesis realizada, se puede observar que hubo contaminación con los primers U3-U4 al observarse amplificaciones en los carriles de control negativo (**Figura 2**, inciso a). Esto sucedió porque se tienen *primers* con dianas genéticas universales que pueden verse comprometidas por la presencia de otras bacterias contaminantes durante la recolección, procesamiento de la muestra y configuración de la PCR. Para ello se consideró trabajar con la mayor esterilidad posible [9]. Mientras tanto, en los cebadores U4-U5 las muestras MC-07-01, AS-11-10, AS-17-03 y el control se amplificaron en los 250 pb aproximadamente.

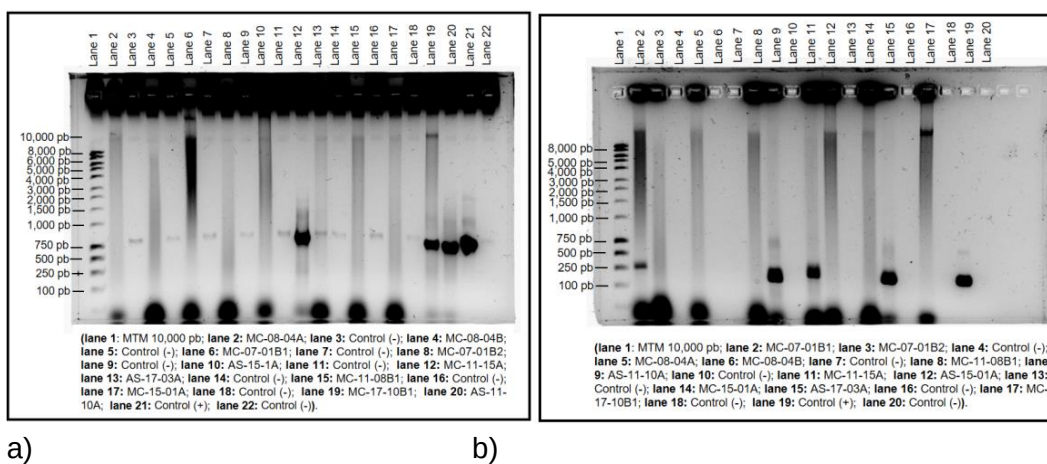
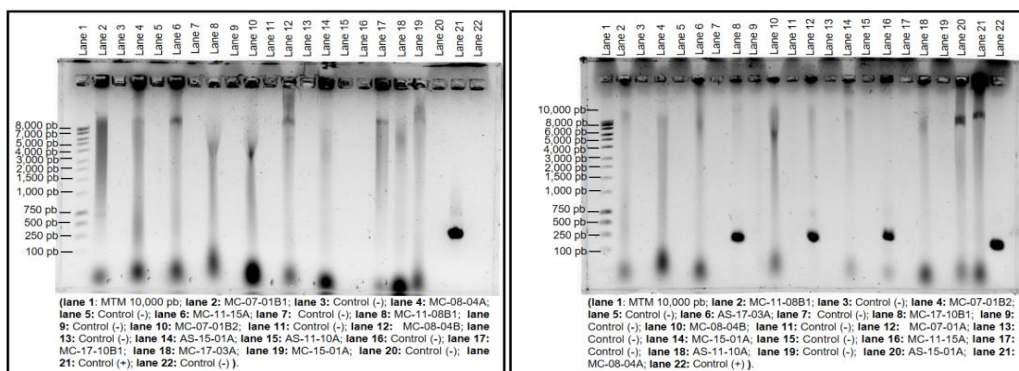


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos amplificados para la identificación de patógenos nosocomiales, realizado el 06 de julio de 2022. Se utilizaron los siguientes *primers*. a) U3-U4 b) U4-U5.

Una vez que se repitió nuevamente la PCR y electroforesis, se pudo observar en la **Figura 3** que se logró quitar la contaminación en los cebadores U3-U4 y sólo se pudo observar una banda muy débil en el primer carril correspondiente a la muestra MC-07-01 B2, por lo que no se tuvo la concentración suficiente de ADN en la muestra cargada al gel o se degradan muy fácilmente el ADN. En el caso de los cebadores U4-U5 se amplificaron las muestras MC-17-10B1, MC-07-01B1 y MC-11-15A entre los 250 y 300 pb.



a)

b)

Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos amplificados para la identificación de patógenos nosocomiales, realizado el 11 de julio de 2022. Se utilizaron los siguientes primers. a) U3-U4 b) U4-U5.

V. CONCLUSIONES

A lo largo de este proyecto se logró realizar una identificación de los posibles patógenos presentes en el hospital veterinario. Se demostró que el uso de los cebadores es una herramienta clave para lograr amplificar el ADN de las muestras de interés. El *primer* U4-U5 tuvo una menor capacidad de contaminación y mayor reconocimiento de secuencias específicas que puede amplificarse. Esto es sin duda el comienzo de una amplia investigación que puede realizarse en diferentes hospitales y tomar las medidas necesarias para poder obtener un servicio de mejor calidad y reducir la posible presencia de estos patógenos.

Este proyecto posee un gran potencial futuro de identificación específica de patógenos presentes en el HVGE. Con la ayuda de técnicas como secuenciación de Sanger y pruebas de antibiogramas, permitirían hacer una comparación especializada con bancos de secuencias y así determinar el patógeno presente en las distintas áreas muestreadas. Además, se planea una colaboración con el laboratorio de diagnóstico, referencia, enseñanza e investigación en microbiología del Hospital Infantil de Morelia “Eva Sámano de López Mateos” para remitir dichas bacterias que sean identificadas y realizar así las pruebas de susceptibilidad a antibióticos.

VI. AGRADECIMIENTOS

Expreso ampliamente mis agradecimientos hacia el Dr. Diego Hernández y sus correspondientes tesis Mayra y Juan Carlos, los cuales nos brindaron en todo momento una gran disposición y entusiasmo por transmitirnos un poco de todo su vasto conocimiento, sin duda alguna son un ejemplo para seguir. Así mismo a la Universidad Autónoma de Querétaro por proporcionarnos las instalaciones y el apoyo para el desarrollo del proyecto de investigación.

VII. REFERENCIAS

- [1] J.D. García, J. Agüero, J.A. Parra, M.F. Santos. “Enfermedades infecciosas. Concepto. Clasificación. Aspectos generales y específicos de las infecciones. Criterios de sospecha de enfermedad infecciosa. Pruebas diagnósticas complementarias. Criterios de indicación”, *Revista Medicine*, Vol. 10, Issue 49, pp 3251-3264. Disponible en: DOI [10.1016/S0304-5412\(10\)70027-5](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(10)70027-5) [consultado en 2022].
- [2] A. Garay, J.A. Gayosso, R.D. Díaz, Y. Velázquez, C. Marcial, M.R. Zambrana, V.E. Anya, “Factores de riesgo específicos en cada tipo de infección nosocomial”, *Revista Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, Vol. 30, Issue 3, pp 91-99. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2010/ei103d.pdf> [consultado en 2022].
- [3] D.J. Hernández. *Protocolo para toma de muestras*. Universidad Autónoma de Querétaro. 2022.
- [4] R.C. Rocha, P. Lozano, Y. Martínez, *Mecanismos de patogenicidad e interacción parásito-hospedero*, Ed. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México, 2004.
- [5] L. Pérez, A. Fernández, Y. Olivera, Y. Puig, A. Rodríguez, “Infecciones nosocomiales y resistencia antimicrobiana”, *Revista Cubana de Medicina Intensiva y Emergencias*, Vol. 18(1), pp 1-17, Marzo. 2019. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.mexoft.2013.12.001> [consultado en 2022].
- [6] T.A. Brown, *Genomas*, Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, 2008.
- [7] H.G. Pérez, “Establishment of a polymerase chain reaction for detection of bacteria and fungi: Importance for the diagnosis of ocular infectious diseases”, *Revista Mexicana de Oftalmología*, Vol. 88, Issue 2, pp 67-72, Abril 2014. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.mexoft.2013.12.001> [consultado en 2022].
- [8] C. Puerta, C.P. Ureña, *Prácticas de biología molecular*, Ed. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, 2005.
- [9] G. James. *Universal Bacterial Identification by PCR and DNA Sequencing of 16SrRNA Gene*, Ed. Springer, Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-90-481-9039-3_28 [consultado en 2022].

BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE Y PLATA UTILIZANDO EXTRACTOS DE *PSEUDOMONAS MEDITERRANEA* Y *PANTOEIA ANTHOPHILA*.

Jocelyn Covarrubias Garcia

Universidad Autónoma de Coahuila
Carretera Torreon Matamoros, Ejido el Aguila,
27275 Torreon, Coahuila
jocelyn.covarrubias@uadec.edu.mx

Dra. Karen Esquivel Escalante

Universidad Autónoma de Queretaro
Centro Universitario, Cerro de las Campanas, S/N,
Las Campanas Santiago de Queretaro,
karen.esquivel@uaq.mx

Resumen – El uso de bacterias en la biosíntesis de nanopartículas ha ganado reconocimiento debido a su enfoque rentable y ecológico. En este proyecto se evaluó la síntesis biológica de nanopartículas de plata (Ag NPs) y cobre (Cu NPs) utilizando extractos de bacterias de *Pseudomonas mediterranea* y *Pantoeia anthophila* en medios de cultivo Luria Bertani (LB) y Mueller Hilton (MH). Se utilizaron concentraciones de los extractos (1:1, 1:2 y 1:5) para la síntesis. Las nanopartículas fueron caracterizadas por espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis) para determinar la concentración del extracto que tuviera mayor producción de nanopartículas y deducir el tamaño y estabilidad de estas. Las nanopartículas mostraron un pico de absorción alrededor de 410 nm para Ag NPs y alrededor de 350 nm para Cu NPs. El extracto obtenido de las bacterias *Pseudomonas mediterranea* y *Pantoeia anthophila* en medio luria bertani es el mejor propuesto para la producción de nanopartículas de plata y cobre a concentraciones 1:2 y 1:5 respectivamente.

Palabras clave – Biosíntesis, Nanopartículas, Espectroscopia UV-Vis

Abstract – The use of bacteria in nanoparticle biosynthesis has gained recognition due to its cost-effective and environmentally friendly approach. In this project, the biological synthesis of silver (Ag NPs) and copper (Cu NPs) nanoparticles was evaluated using bacterial extracts of *Pseudomonas mediterranea* and *Pantoeia anthophila* in Luria Bertani (LB) and Mueller Hilton (MH) culture media. Concentrations of the extracts (1:1, 1:2 and 1:5) were used for the synthesis. The nanoparticles were characterized by ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis) to determine the concentration of the extract that had the highest production of nanoparticles and to deduce their size and stability. The nanoparticles showed an absorption peak around 410 nm for Ag NPs and around 350 nm for Cu NPs. The extract obtained from *Pseudomonas mediterranea* and *Pantoeia anthophila* bacteria in luria bertani medium is the best proposed to produce silver and copper nanoparticles at concentrations of 1:2 and 1:5, respectively.

Keywords – Biosíntesis, Nanopartículas, Espectroscopia UV-Vis

I. INTRODUCCION

La biosíntesis o síntesis verde es un proceso eficiente y amigable con el ambiente que utiliza compuestos naturales como agentes de protección, estabilización y reducción en lugar de los productos químicos que tienden a ser costosos y tóxicos. Los compuestos naturales utilizados para sintetizar nanopartículas pueden ser extractos de plantas, bacterias y hongos (Kalyani et al., 2022). El tamaño y forma de las nanopartículas se determinan a partir de la fuente de la cual se

sintetizan, en el caso de la síntesis mediada por bacterias, éstas cuentan con mecanismos innatos para reducir las sales metálicas debido a sus compuestos activos que juegan un papel importante como agentes reductores, algunos de estos compuestos son enzimas intracelulares, azúcares, proteínas, las enzimas dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) (Safi & Jam, 2021).

En el caso específico de las las bacterias *Pseudomonas mediterranea* una bacteria fitopatogena que causa necrosis medular en el tomate (Alippi & Lopez, 2009) y *Pantoea anthophila* una bacteria endófito, se ha mostrado que al aplicar dichas bacterias en procesos de síntesis verde se obtienen buenos resultados en la producción y estabilidad de las nanopartículas y estas exhiben buena actividad antimicrobiana (Nirmala & Sridevi, 2021).

Las nanopartículas de cobre y plata tienen una gran variedad de áreas de aplicación, pueden utilizarse como agentes anticancerígenos, antimicrobianos, antifúngicos, agricultura, tratamiento de agua, almacenamiento de energía, catalizadores, antivirales entre otras (Khodijah et al., 2022) por lo cual es importante continuar con su investigación.

La caracterización de las nanopartículas se puede realizar mediante espectroscopia infrarroja (IR), espectroscopia de rayos X de dispersión de energía (EDX), microscopia electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y Espectroscopia UV-Visible (UV-Vis). En este proyecto se utilizó la espectroscopia UV-Visible ya que es una técnica sencilla de confirmar la formación de nanopartículas, esto se debe a que tienen propiedades ópticas únicas como el cambio en el índice de refracción cerca de la superficie (Samar et al., 2017).

II. MATERIALES Y METODOLOGÍA

2.1 Bacterias y reactivos químicos

Se utilizaron los extractos obtenidos de las bacterias *Pseudomonas mediterranea* y *Pantoea anthophila* cultivadas en conjunto en 2 medios distintos Luria Bertani (LB) y Mueller Hilton (MH) los cuales fueron etiquetados con la serie 751-749 LB y 751-745 MH y se prepararon las soluciones de nitrato de plata (AgNO_3) y nitrato de cobre ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$) a 1 mM.

2.2 Biosíntesis de nanopartículas de plata y cobre y caracterización

Se agregaron cada uno los extractos 751-749 LB y 751-745 MH al nitrato de plata con una relación 1:1, 1:2 y 1:5 (AgNO_3 :Extracto) obteniendo un volumen final de 4, 6 y 6 mL respectivamente en cada muestra de nitrato de plata con extracto 751-749 LB (**Fig. 1a**) y 751-745 MH (**Fig. 1b**). Se realizó lo mismo para el nitrato de cobre, pero solo con el extracto 751-749 LB (**Fig. 1c**).

También se prepararon soluciones blanco para realizar las lecturas en el espectrofotómetro, los blancos se prepararon agregando solamente los medios de cultivo LB y MH al nitrato de plata con una relación 1:2 (AgNO_3 :Medio) obteniendo un volumen final de 6 mL en cada

solución de nitrato de plata con medio de cultivo LB y MH. Se realizó lo mismo para obtener las soluciones blanco del nitrato de cobre, pero solo con el medio LB.

Las soluciones se colocaron sobre una parrilla Thermo Scientific a 70 °C con agitación por 105 minutos, después de los 105 minutos se mantuvo en agitación durante 24 hrs a temperatura ambiente, todo el proceso se llevó a cabo bajo condiciones de obscuridad.

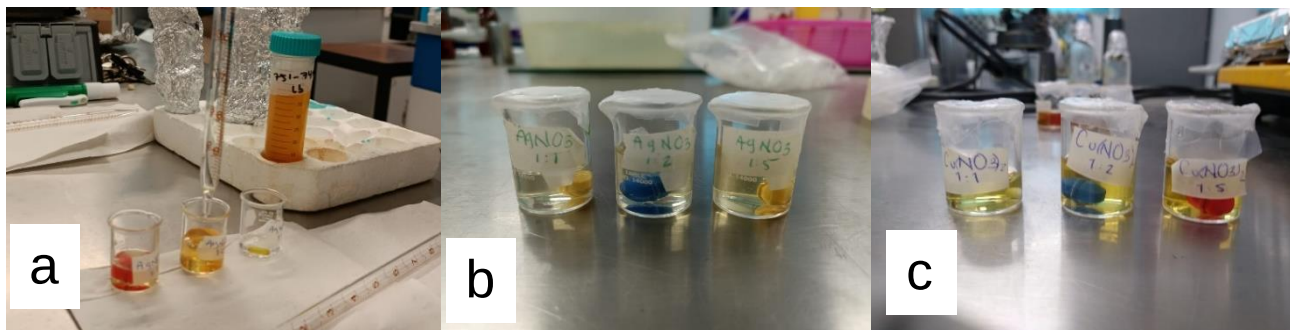


Fig. 1. (a) Extracto 751-749 LB en concentraciones 1:1, 1:2 y 1:5 en AgNO_3 , (b) Extracto 751-745 MH en concentraciones 1:1, 1:2 y 1:5 en AgNO_3 y (c) Extracto 751-749 LB en concentraciones 1:1, 1:2 y 1:5 en $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$

Una forma simple para confirmar la formación de nanopartículas es mediante la espectroscopia UV-Vis, para ello se utilizó el espectrofotómetro de Haz Halo XB-10 de la marca Dynamica y el espectro de absorbancia de las muestras fue obtenido en el rango de 250 a 800 nm utilizando como referencia las soluciones blanco preparadas anteriormente.

III. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Biosíntesis de nanopartículas de plata y cobre

Las nanopartículas de plata tienen un cambio de color de amarillo claro a amarillo oscuro luego verde y por último se tornan color gris, este cambio de color indica la formación de nanopartículas debido a la reacción de reducción que ocurre durante el proceso de AgNO_3 a iones de plata (Badi'ah et al., 2019). En la **Figura 2(a)** se muestra la diferencia de color (antes y después) de las Ag NPs biosintetizadas con el extracto 751-749 LB a diferentes concentraciones y en la **Figura 2(b)** se muestra la diferencia de color de las Ag NPs biosintetizadas con el extracto 751-745 MH a diferentes concentraciones.

Las nanopartículas de cobre sintetizadas con $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ tienen un cambio de color de marrón oscuro a verde claro que indica la reducción del $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ a iones de cobre (Prabhu & Pavani, 2017). En la **Figura 2(c)** se muestra la diferencia de color de las Cu NPs (antes y después) biosintetizadas con el extracto 751-749 LB a diferentes concentraciones.

El cambio de color en las muestras indicaba la formación de nanopartículas, para la verificación de dicha observación se llevaron a cabo las mediciones de UV-Vis.

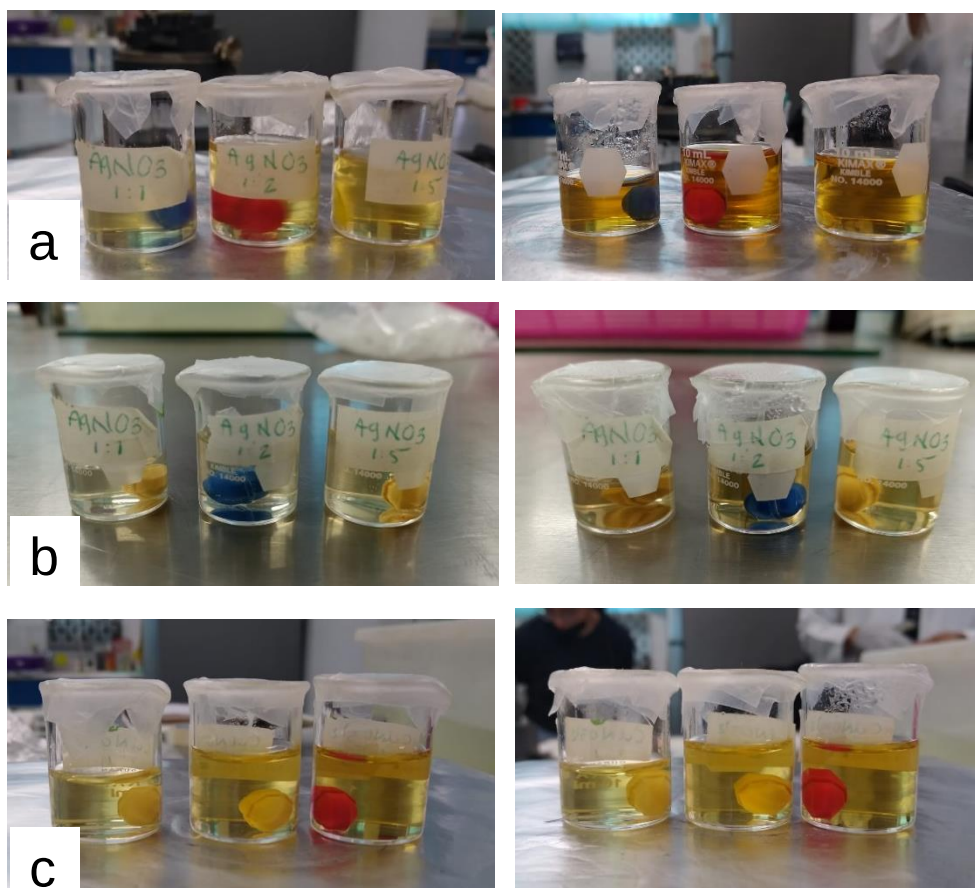


Fig. 2. (a) Biosíntesis de Ag NPs con extracto 751-749 LB a concentraciones 1:1, 1:2 y 1:5, **(b)** Biosíntesis de Ag NPs con extracto 751-745 MH a concentraciones 1:1, 1:2 y 1:5 y **(c)** Biosíntesis de Cu NPs con extracto 751-749 LB a concentraciones 1:1, 1:2 y 1:5

Las nanopartículas de plata analizadas en el espectro mostraron un pico de absorción alrededor de 410 nm con el extracto 751-749 LB y 430 nm con 751-745 MH, de acuerdo a lo reportado (Nirmala & Sridevi, 2021), las Ag NPs biosintetizadas con extractos de *Pantoea anthophila* muestran un pico de absorción alrededor de 410 nm lo que indica que en las muestras si había presencia de Ag NPs. También se observa que los plasmones de resonancia de superficie se encuentran en la misma longitud de onda por lo que el tamaño de las nanopartículas se sugiere igual en las distintas concentraciones (Oleg et al., 2012). En las **Fig. 3 y 4** se muestran los espectros UV-Vis de las Ag NPs sintetizadas a diferentes concentraciones (1:1, 1:2 y 1:5) con los distintos extractos. Las nanopartículas de cobre mostraron un pico de absorción alrededor de 350 nm con el extracto 751-749 LB lo que indica la presencia de Cu NPs biosintetizadas en las muestras. Se encontró que estas investigaciones experimentales estaban de acuerdo con los

resultados presentados en la literatura (Ashajyothi et al., 2014). En la **Fig 5** se muestran los espectros UV-Vis de las Cu NPs sintetizadas a diferentes concentraciones (1:1, 1:2 y 1:5).

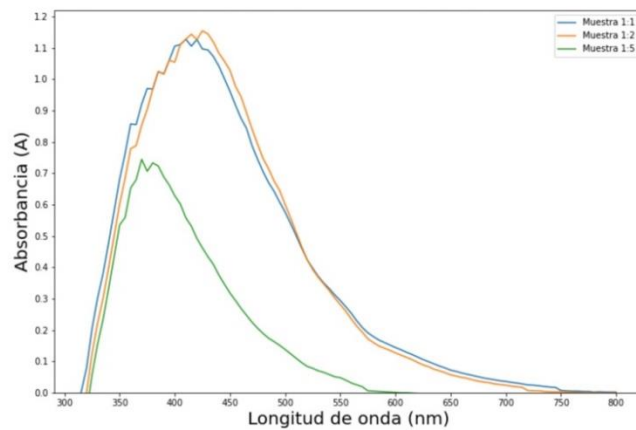


Figura. 3. Espectros Uv-Vis de las Ag NPs sintetizadas a diferentes concentraciones con el extracto 751-749 LB

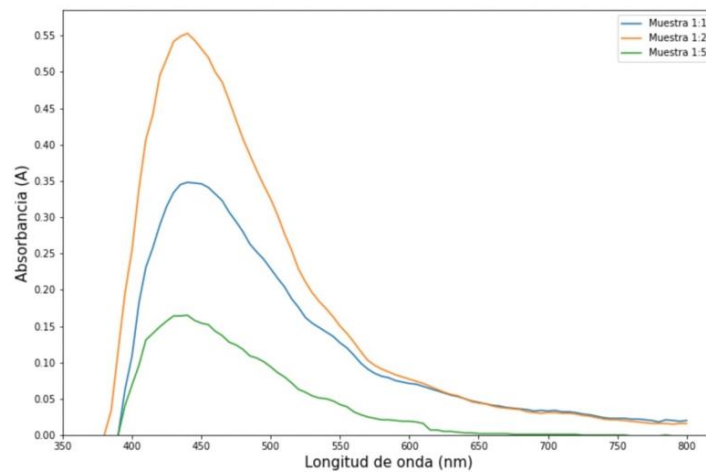


Figura. 4. Espectros Uv-Vis de las Ag NPs sintetizadas a diferentes concentraciones con el extracto 751-745 MH

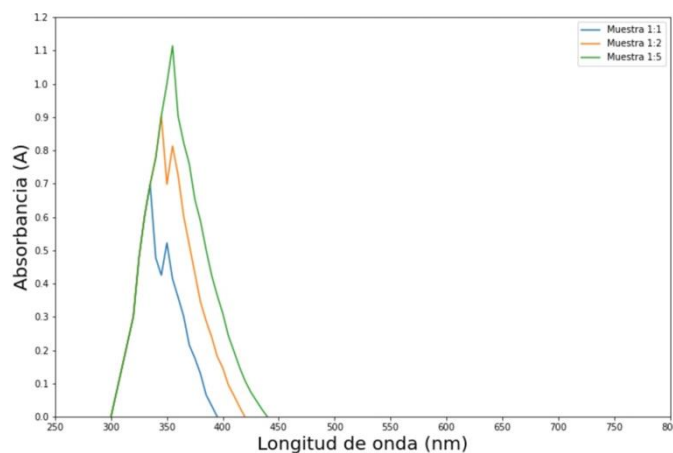


Figura. 5. Espectros Uv-Vis de las Cu NPs sintetizadas a diferentes concentraciones con el extracto 751-749 LB

IV. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, se propone utilizar el extracto 751-749 LB con una relación de concentración 1:2 para la producción de Ag NPs ya que es el que muestra mayor absorbancia lo que se puede relacionar a una mayor producción de Ag NPs. También sería factible utilizarlo con una relación de concentración 1:5 para la producción de Cu NPs, en cuanto a investigación en otras áreas las nanopartículas de cobre tienen cierta ventaja con respecto a las de plata ya que son más fáciles de conseguir en cuanto a costos, por ello su estudio e investigación es económicamente atractivo.

V. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro y al comité del Verano de la Ciencia de la Región Centro por brindarme la oportunidad de participar en el proyecto, así como también a la Universidad Autónoma de Coahuila por brindarme su apoyo económico en esta estancia. Además, a la Facultad de Ingeniería por el apoyo financiero a través del fondo para atención de problemas nacionales (FI-UAQ-FIN202106 y FONDEC-UAQ 2021 (FIN202116).

VI. REFERENCIAS

- [1] Alippi A. M. & Lopez A.C., (2010) First report of *Pseudomonas mediterranea* causing tomato pith necrosis in Argentina. *Plant Pathology*, vol. 52, pp. 287-302
- [2] Ashajyothi C, Kudsi & Kelman CR. Biosynthesis and characterization of copper nanoparticles from *Enterococcus faecalis*. *Int J Pharm Bio Sci* 2014;5(4):204-11
- [3] Badi'ah et al., (2019) IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 217 012005
- [4] Fatma S., Kalainilla P. & Ravindran E. (2017) Green Synthesis of copper nanoparticle from *Passiflora foetida* leaf extract and its antibacterial activity. *Asian Journal of pharmaceutical and clinical research*, vol. 10, issue 4, pp 79-83
- [5] Kalyani S. et al., (2022) Green Functionalized Nanomaterials for Environmental Applications En *Micro and Nano Technologies*, pp. 155-178. Elsevier
- [6] Khodijah C. S., et al., (2022) Bionanotechnology: The formation of copper nanoparticles assisted by biological agents and their applications as antimicrobial and antiviral agents. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, vol. 18, 100703 DOI: 10.1016/j.enmm.2022.100703
- [7] Nirmala C. & Sridevi M., (2021) Characterization, Antimicrobial and Antioxidant Evaluation of Biofabricated Silver Nanoparticles from Endophytic *Pantoea anthophila*. *J. Inorg. Organomet. Polym.* 2021;31:3711–3725. DOI: 10.1007/s10904-021-01974-7
- [8] Oleg A. et al., (2012) Size and Temperature Effects on the Surface Plasmon Resonance in Silver Nanoparticles. *Plasmonics*, vol 7, pp 685 – 694 ; Springer link
- [9] Prabhu Y.T. & Pavani T., (2017) A facile biosynthesis of copper nanoparticles: A microstructural and antibacterial activity investigation. *Journal of Saudi Chemical Society*, vol. 21, issue 2, pp. 180-185
- [10] Safi & Jam., (2021) Nanoparticles: Mechanism of biosynthesis using plant extracts, bacteria, fungi, and their applications, *Journal of Molecular Liquids*, vol. 334, 116040. DOI: 10.1016/j.molliq.2021.116040

OBTENCIÓN DE EXUDADOS PRODUCIDOS POR HONGOS

Édgar Fabián Macías Gómez

Instituto Tecnológico Superior de
Purísima del Rincón
Av. Guardarrayas No.2301 C.P.
Purísima del Rincón, GTO
lrs17110367@purisima.tecnm.mx

Varinia López Ramírez

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Carretera Irapuato-Silao km.12.5 Col. El
Copal, C.P. 36821 Irapuato, GTO
varinia.lr@irapuato.tecnm.mx

Resumen — En este trabajo se evaluaron las condiciones para el crecimiento *in vitro* de diferentes especies fúngicas para la obtención de exudados. Inicialmente los aislados se caracterizaron macro y microscópicamente. Se determinaron las condiciones de crecimiento que promovieran la generación de exudados empleando diferentes valores de pH, temperatura y medios de cultivo sólidos. Los resultados obtenidos muestran que de los cinco aislados, el de *Simplicillium sp.* presentó la mejor producción de exudado cuando crece en agar Dextrosa Sabouraud a pH 6.5 y 30°C. La caracterización de las condiciones de crecimiento realizadas en este proyecto da la pauta para continuar con la caracterización de metabolitos secundarios presentes en los exudados fúngicos.

Palabras clave — Caracterización macro y microscópica, Cinética de crecimiento, Producción de exudados.

Abstract — In this work, the conditions for the *in vitro* growth of different fungal species to obtain exudates were evaluated. Initially the isolates were characterized macroscopically and microscopically. The growth conditions that will promote the generation of exudates were determined using different pH values, temperature and solid culture media. The results obtained show that of the five isolates, *Simplicillium sp.* showed the best exudate production when it grows in Sabouraud Dextrose agar at pH 6.5 and 30°C. The characterization of the growth conditions carried out in this project gives the guidelines to continue with the characterization of secondary metabolites present in the fungal exudates.

Keywords — Macroscopically and microscopically characterized, Cinetic of growth, exudate production.

I. INTRODUCCIÓN

Los hongos filamentosos son organismos productores de metabolitos secundarios con actividad biológica. Para incrementar la producción de dichos metabolitos, se debe actuar sobre la ruta de biosíntesis de los metabolitos de interés y sobre otras rutas que indirectamente pudieran afectar a la primera como son: rutas de secreción, transporte, regulación genética; convirtiendo de esta manera a los hongos filamentosos en fábricas celulares que con las modificaciones adecuadas pueden producir en cantidades económicamente significativas cualquier compuesto para el que exista o se pueda generar una ruta biosintética en hongos filamentosos (Gutiérrez et al., 2000). Algunos de los

metabolitos secundarios suelen estar presentes en exudados. En este proyecto nuestro objetivo fue estandarizar las condiciones de crecimiento que permitieran la obtención de exudados en aislados fúngicos.

II. MARCO TEÓRICO

Los hongos enfrentan múltiples factores bióticos y abióticos, que van desde la interacción con otros microorganismos hasta la privación de nutrientes, cambios de pH y temperatura; como respuesta fisiológica, producen una gran cantidad de metabolitos secundarios con actividad biológica como son antibióticos, ciclosporinas, ácidos orgánicos, alcaloides, biopolímeros, entre otros (Gutiérrez et al., 2000; Macheleidt et al., 2016). Algunos pueden ser de estructura orgánica simple, pero con frecuencia son compuestos de estructura un poco más compleja, muchos de ellos son toxinas peptídicas cíclicas y lineales, las que se derivan de otros metabolitos primarios, en algunos casos con estructuras inusuales, acompañadas ocasionalmente de procesos de biosíntesis específicos (Dayamí Borges et al., 2010). Los metabolitos secundarios se pueden dividir en cuatro clases químicas principales: policetidos, terpenoides, compuestos derivados del ácido shikimico y péptidos no ribosómicos (Pusztahelyi et al., 2015).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Caracterización macro y microscópica de aislados fúngicos

Las cepas empleadas en este estudio se sembraron e incubaron por una semana a 30°C en medio sólido para poder definir la morfología colonial del micelio, su textura, forma y coloración del anverso y reverso. Para describir las estructuras microscópicas se realizaron microcultivos utilizando cubos de 1 cm² de PDA, inoculados por picadura y colocados sobre un portaobjetos y cubiertos con un cubreobjetos. Para dar las condiciones de humedad se adiciono glicerol al 20% (v/v) sobre un trozo de algodón colocado en el interior de una placa Petri. Las placas se incubaron a 30°C hasta observar el desarrollo micelial. Posteriormente, los cubreobjetos fueron retirados y colocados sobre un portaobjetos nuevo con azul de lactofenol, utilizando una pinza fina, se realizó una ligera presión para eliminar el exceso de colorante empleando un papel absorbente. Cada montaje fue observado al microscopio a 40X y 100X.

B. Cinéticas de crecimiento con diferentes medios sólidos

El crecimiento micelial de las cepas seleccionadas se evaluó en cajas Petri de 90x15 mm empleando los siguientes medios de cultivo sólidos: malta Sabouraud (MSA), dextrosa Sabouraud (DSA), extracto de malta (EMA), papa dextrosa (PDA) y Czapek. Las cajas se inocularon con un sacabo de 5 mm de diámetro y se incubaron a 30°C durante un periodo de 10-12 días, monitoreando diariamente su crecimiento radial.

C. Cinéticas de crecimiento a diferentes pH

Una vez seleccionado el medio de crecimiento donde se observó la mayor producción de exudado para cada cepa, se realizó un nuevo ensayo ajustando el pH del medio a 5, 5.5,

6, 6.5 y 7, respectivamente. Las cajas se inocularon nuevamente con 5 mm de micelio y se inocularon a 30°C durante 10-12 días. Se monitoreo el crecimiento racial diariamente.

D. Cinética de crecimiento a diferente temperatura

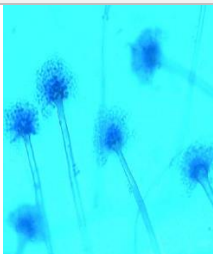
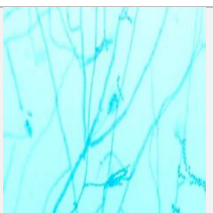
Después de identificar el medio y valor de pH al cual los aislados producían mayor cantidad de exudado, se realizó una nueva cinética de crecimiento a diferentes temperaturas. Las cajas Petri con medio de cultivo y el pH ajustado se inocularon con 5 mm de diámetro de micelio y se incubaron a 30°C, 37° y 45°C durante un periodo de 10-12 días, monitoreando el crecimiento radial de las colonias.

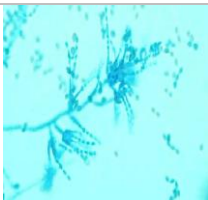
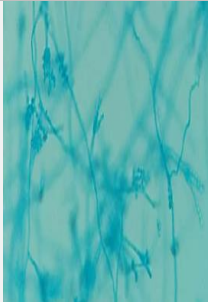
IV. RESULTADOS

A. Caracterización macroscópica y microscópica de aislados fúngicos

La caracterización macro y microscópica de aislados empleados en este estudio se describe en la Tabla 1.

Tabla 1. Descripción morfológica macro y microscópica de aislados fúngicos empleados en este estudio.

Aislado	Color	Textura	Margen de la cepa	Pigmento exudado	Morfología	Microscopia
A21H2a (<i>Simplicillium sp</i>)	Centro amarillo / Naranja	Aterciopelada con elevación	Blanco y liso	Amarillento viscoso	Conidióforos solitarios, verticilados sobre hifas aéreas, conidios hialosporoso, Hialino, ápices redondeados, unicelulares.	
T21H3.1 (<i>Aspergillus sp</i>)	Blanco/ Amarillo	Algodonoso con elevación	Blanco e irregular	Verdoso acuoso	Conidióforos, simples, lisos en la superficie, con cabezas conidiales catenulados nacidos de fiálides en vesículas su globosas.	
ES11H5.1 (<i>Penicillium sp</i> ¹)	Verde claro/ beige	Algodonoso con elevación	Blanco e irregular	No hubo producción	Conidióforos hialinos erectos, ramificados, fiálides terminales. fialosporos	

T21H2.2 (<i>Penicillium sp</i>²)	Verde pardo	Algodonos o con elevación	verdoso extendido	No hubo producción	Conidióforos hialinos erectos, ramificados, Conidios fialosporosos.	
LDIM 270 (<i>Penicillium sp</i>³)	Blanco	Similar a levadura	Claro y liso	Translucido o viscoso	Conidióforos hialinos erectos, ramificados, fiálides terminales, fiálides puntiagudas con puntas cónicas. Conidios fialosporosos,	

De acuerdo con Watanabe (2002), se realizó la descripción de las cinco cepas (Tabla 1), con la cual se pudo identificar que los aislados presentan características que permiten asociarlos con los géneros *Simplicillium sp*, *Aspergillus sp* y tres cepas distintas de *Penicillium sp*, notando diferencias en la disposición de los conidios y fiálides, dicha identidad deberá confirmarse posteriormente mediante su caracterización molecular.

B. Cinéticas de crecimiento de aislados fúngicos en diferentes medios

En las Figuras 1 y 2, se observa el desarrollo general de los aislados en los diferentes medios inoculados, destaca la cepa de *Simplicillium sp*. (A), la cual presenta un mejor crecimiento en PDA, mientras que en agar Czapek su desarrollo fue mínimo, la producción de exudados para este aislado, se observó en mayor proporción cuando se inoculó en EMA, DSA y MSA, los exudados fueron detectados a partir del sexto día de crecimiento. Para *Aspergillus sp*. (B), su crecimiento fue óptimo en PDA, DSA y MSA, con producción de exudado en DSA a partir del noveno día. En el caso de *Penicillium sp*¹ (C) su mejor crecimiento se observó en DSA y PDA mientras que el crecimiento en los demás medios era de manera similar. En el caso de la cepa de *Penicillium sp*³ (E), mostro el mismo comportamiento que la cepa de *Simplicillium sp*, con la diferencia de que solo hay producción de exudado en DSA a partir del décimo día (E).

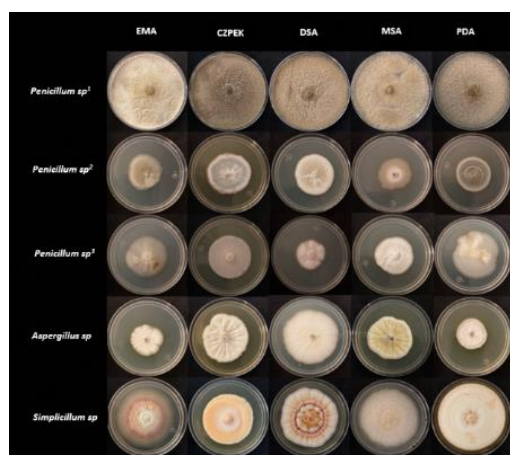


Figura 1. Crecimiento fúngico en diferentes medios.

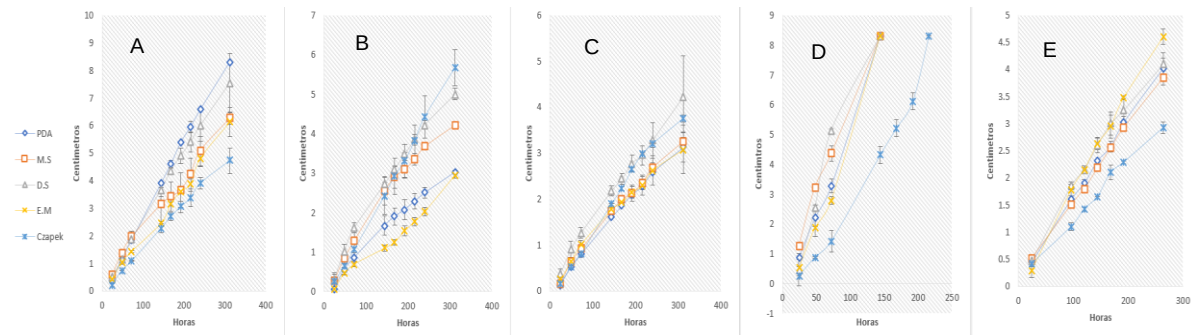


Figura 2. Cinéticas de crecimiento radial en diferentes medios de cultivo a 30°C. A) *Simplicillium sp.*, B) *Aspergillus sp.*, C) *Penicillium sp.*¹, D) *Penicillium sp.*², E) *Penicillium sp.*³

Con base a estos resultados se determinaron los medios adecuados para resembrar las cepas de *Simplicillium sp.* (Figura 3), *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.*³, ya que fueron que presentaron una mayor producción de exudados, para lo cual, se evaluó su desarrollo frente a diferentes valores de pH adecuado para evaluar su misma producción de metabolitos secundarios (Figura 4).

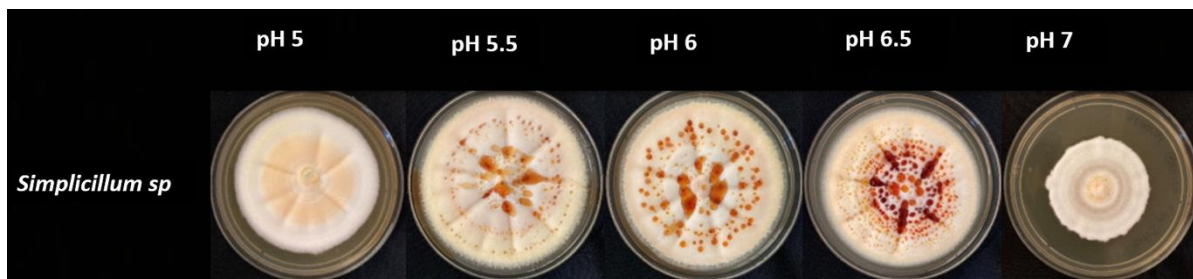


Figura 3. Crecimiento de *Simplicillium sp.* en medio DSA diferentes valores de pH.

En la Figura 4 C-E se observa el crecimiento de *Simplicillium sp.* en diferentes pH en medio MSA, DSA y EMA respectivamente, donde no hubo variaciones con respecto a su crecimiento, sin embargo, la mejor producción de metabolitos se observó en DSA en los pH 5.5, 6 y 6.5 (Figura 3), presentando la mayor cantidad de exudado en este ultimo los cuales comenzaron a visualizarse a partir del séptimo día.

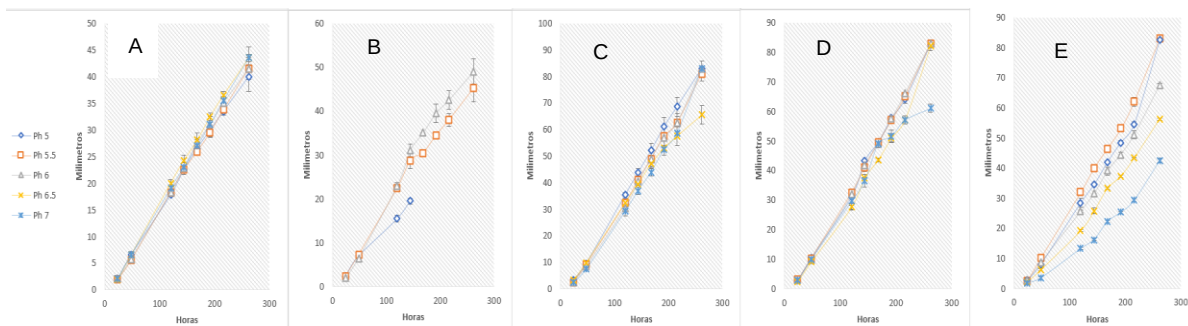


Figura 4. Cinéticas de crecimiento radial a 30°C y diferentes valores de pH. A) *Penicillium sp.*³ en DSA, B) *Aspergillus sp.* en MSA, C) *Simplicillium sp.* en MSA, D) *Simplicillium sp.* en DSA, E) *Simplicillium sp.* en EMA.

Para la cepa de *Aspergillus sp.*, su desarrollo optimo se observó en DSA a pH 5.5 y 6 con producción de exudados en ambos casos con mayor cantidad en pH 6 (Figura 5B) y para *Penicillium sp.*³, no hubo variaciones en su crecimiento en los distintos valores de pH, sin embargo, la producción de exudados solo se presentó en los pH 5.5 a 6.5 (Figura 5A). A partir de estos datos se determinó el valor de pH adecuado para la producción de exudado para cada cepa.

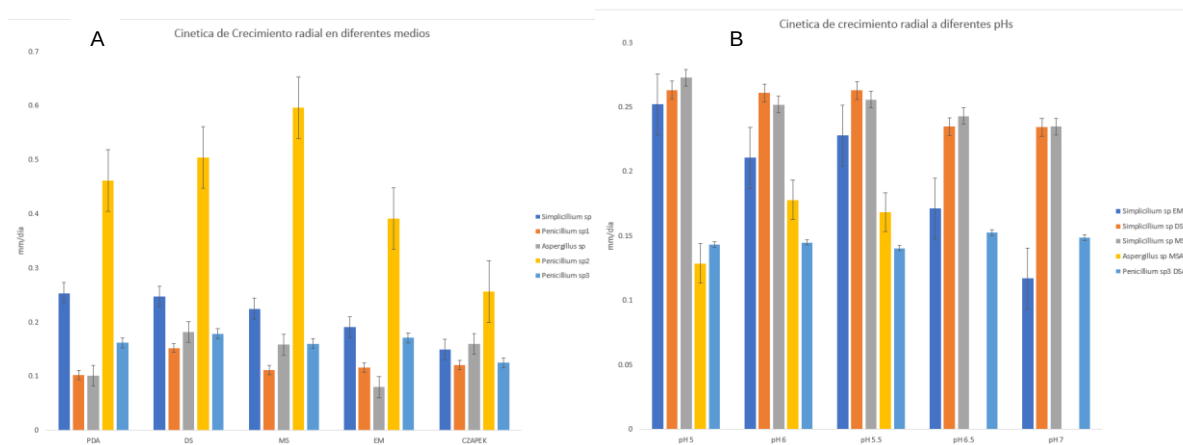


Figura 5. Cinética de crecimiento radial A) en diferentes medios y B) a diferentes pH.

El crecimiento a diferentes temperaturas de las cepas de *Simplicillium sp.*, *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.*³ su mejor crecimiento se presentó a los 30°C, pero en menor medida a los 37°C, mientras que a temperatura de 45°C no hubo desarrollo en ninguna de las cepas evaluadas.

V. DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos y a lo descrito para aislados del género *Simplicillium*, en medio PDA mantiene un crecimiento moderado que alcanza un diámetro de 31-36 mm, en 14 días a 25°C (Chen et al., 2021), mientras que en este estudio el crecimiento fue mayor llegando a los 83 mm a los 12 días cuando se incubó a 30°C, a partir de estos datos podemos decir que temperaturas mayores a 30°C en medio PDA, el aislado evaluado presento un desarrollo optimo. Respecto al desarrollo de los aislados a diferentes valores de pH, se observó un crecimiento variable siendo mayor a pH 5. Dai y col. (2018), determinaron que el rango pH entre 7.4-7.8 es adecuado para el crecimiento de *Simplicillium* (Dai et al., 2018), en nuestra evaluación, el aislado de *Simplicillium sp.* se desarrolló adecuadamente a pH por debajo de 7 y la producción de exudados fue mayoritaria a pH 6.5. Otro de los géneros evaluados fue *Aspergillus sp.*, el cual mostro una velocidad de crecimiento de 0.181 mm/día siendo menor a la tasa de crecimiento reportada por Rodríguez (2015), quién determino que la velocidad de crecimiento radial de diferentes

especies de *Aspergillus* las cuales están en un rango de 0.216-0.277 mm/h en medio sólido (Rodríguez-Durán et al., 2015).

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La identificación morfológica de los aislados fúngicos empleados en este estudio se asocia con los géneros de *Simplicillium* sp., *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. Las condiciones óptimas de crecimiento mostraron la preferencia de los aislados por el medio DSA, a valores de pH en el rango de 5.5 a 6.5 y 30°C. Las condiciones de crecimiento evaluadas permitieron determinar los medios de cultivo, los valores de pH y de temperatura que deberán ser empleados para la obtención de exudados, mismos que serán evaluados en trabajos futuros.

VII. RECONOCIMIENTOS

Agradecemos al Comité del Verano de Ciencia de la Región Centro, al Laboratorio de Biotecnología del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, por apoyar la realización del proyecto, a la Dra. Elizabeth Quintana Rodríguez por proporcionar las cepas evaluadas en este estudio y al Instituto Tecnológico Superior de Purísima del Rincón, por el apoyo económico para permitir la estancia en la Cd. de Irapuato.

REFERENCIAS

- [1] Chen, W. H., Han, Y. F., Liang, J. D., & Liang, Z. Q. (2021). Taxonomic and phylogenetic characterizations reveal four new species of *Simplicillium* (Cordycipitaceae, Hypocreales) from Guizhou, China. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94893-z>
- [2] Dai, Y., Lin, Y., Pang, X., Luo, X., salendra, L., Wang, J., Zhou, X., Lu, Y., Yang, B., & Liu, Y. (2018). Peptides from the Soft Coral-associated Fungus *Simplicillium* sp. SCSIO41209. *Phytochemistry*, 154, 56–62.
- [3] <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.06.014>
- [4] Dayamí Borges, Angela O. Díaz, Ana Nelis San Juan, & Eulalia Gómez. (2010). ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar Metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar, 44, 49–55.
- [5] Gutiérrez, S., Casqueiro, J., & Martín, J. F. (2000). Los hongos como factorías celulares: biodiversidad de metabolitos secundarios. In *Rev Iberoam Micol* (Vol. 17).
- [6] Macheleidt, J., Mattern, D. J., Fischer, J., Netzker, T., Weber, J., Schroeckh, V., Valiante, V., & Brakhage, A. A. (2016). Regulation and Role of Fungal Secondary Metabolites. In *Annual Review of Genetics* (Vol. 50, pp. 371–392). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035203>
- [7] Pusztahelyi, T., Holb, I. J., & Pócsi, I. (2015). Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Frontiers in Plant Science*, 6(AUG). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00573>
- [8] Rodríguez-Durán, L. V., Ramírez-Coronel, M. A., Favela-Torres, E., Aguilar-González, C., & Saucedo-Castañeda, G. (2015). Selección de cepas fúngicas productoras de clorogenato hidrolasa. XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Guadalajara, Jalisco.
- [9] Watanabe Tsuneo. (2002). Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. CRC Press. 2nd Edition. New York, N.Y.

APROVECHAMIENTO DE LOS DESECHOS DE LA INDUSTRIA DEL VINO, PARA LA ELABORACIÓN DE SUPLEMENTOS

Aide Areli Cortés Rodríguez

Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química-Centro

Universitario

Cerro de las Campanas S/N, C.P. 76010,
Querétaro, Qro.

acortes06@alumnos.uaq.mx

Rosalía Reynoso Camacho

Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química-Centro

Universitario

Cerro de las Campanas S/N, C.P. 76010,
Querétaro, Qro.

rrcamachomx@yahoo.com.mx

Resumen — Actualmente, el orujo de uva (OU), subproducto de la industria vitivinícola, ha destacado por ser una fuente rica de compuestos fenólicos y fibra dietaria, sin embargo, su poca solubilidad dificulta su utilidad como ingrediente funcional, razón por la cual resulta un reto encontrar un componente que mejore estas propiedades. Tal es el caso de la chía, un estabilizante natural con propiedades nutraceuticas. El objetivo de este proyecto fue evaluar diferentes concentraciones de chía y estabilizantes de referencia como agente estabilizante del OU, realizando el análisis bromatológico de la chía y evaluación tecnofuncional, encontrando una mezcla de chía y goma Xantana (1:1) ideal para su adición a un suplemento alimenticio, debido a las excelentes propiedades encontradas (solubilidad, sedimentación, dispersabilidad y color).

Palabras clave — *Salvia hispanica*, estabilizante, orujo de uva, suplemento

Abstract — Currently, grape pomace (OU), a by-product of the wine industry, has stood out for being a rich source of phenolic compounds and dietary fiber, however, its low solubility hinders its usefulness as a functional ingredient, which is why it is a challenge to find a component that improves these properties. Such is the case of chia, a natural stabilizer with nutraceutical properties. The objective of this project was to evaluate different concentrations of chia and reference stabilizers as a stabilizing agent of the OU, carrying out the bromatological analysis of chia and techno-functional evaluation, finding a mixture of chia and Xanthan gum (1:1) ideal for its addition to a food supplement, due to the excellent properties found (solubility, sedimentation, dispersibility and color).

Keywords — *Salvia hispanica*, stabilizer, grape pomace, supplement

I. INTRODUCCIÓN

El orujo de uva es un residuo orgánico considerado el principal subproducto del proceso de elaboración de vinos. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación estima que estos residuos superan los 20 millones de toneladas anuales en todo el mundo, lo que genera un problema sustancial del manejo de residuos [1]. El orujo ha destacado en los últimos años por tener cantidades significativas de fibra dietética y diversos fitoquímicos como los flavonoides (2-6.5%), los cuales están asociados con actividades antioxidantes, cardioprotectoras, anticancerígenas, antiinflamatorios y antimicrobianas, entre muchas otras [2]. El orujo de uva brinda una oportunidad para

recuperar estos compuestos con efectos biológicos y ser agregados a productos alimenticios tales como suplementos, sin embargo, su poca solubilidad dificulta su utilidad como ingrediente funcional, por lo que actualmente se busca un componente que ayude en la mejora de esta propiedad, siendo la semilla de chía (*Salvia hispanica*) una gran opción, ya que ha demostrado funcionar como agente espesante y estabilizador natural. Además, la chía ha destacado por sus propiedades nutraceuticas, ya que ha demostrado ser buena fuente de vitaminas, antioxidantes, proteínas, fibra dietética y lípidos, de los cuales se incluye omega 3 (54.08 %), omega 6 (18.69 %) y omega 9 (10.24 %) [3]. Por ello, el objetivo de este estudio fue la búsqueda de una mezcla de chía que funcione como espesante y estabilizante del orujo de uva, mientras potencia los efectos biológicos dada sus propiedades, esto para su adición en un suplemento alimenticio de gran calidad nutricional.

I. MARCO TEÓRICO

La reconstitución de los alimentos en polvo es de particular importancia tanto para los fabricantes como para los consumidores, ya que es uno de los puntos de referencia críticos de la calidad de estos productos para su consumo [4]. Se pueden obtener conclusiones sobre la calidad midiendo propiedades funcionales del producto, en donde los datos recopilados permiten hacer otras suposiciones útiles. Estas propiedades incluyen su capacidad para disolverse en agua, así como su dispersabilidad y sedimentación. En particular, el índice de solubilidad en agua (WSI) y el índice de absorción de agua (WAI) son dos índices vinculados a la estimación del comportamiento del material si se procesa más para su uso como aglutinante, estabilizador o fuente de proteína en bebidas, salud y barras nutritivas, horneados y sistemas alimentarios de carne molida/emulsificada [5]. Anderson *et al.* [6] registraron un método para estimar la cantidad de material que se puede extraer con agua de un producto extruido.

Por otro lado, el color del producto es otro atributo de calidad importante para los alimentos en polvos, ya que sirve como el principal aspecto reconocido por el consumidor de la aceptación de los alimentos. El color puede verse influido por las temperaturas de secado por aspersión y los aditivos alimentarios, junto con otros factores durante el secado por aspersión [7].

II. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Análisis bromatológico de chía

Se determinó el contenido de humedad, cenizas, proteína cruda, fibra dietaria y carbohidratos por duplicado, utilizando el método estandarizado de la AOAC (2005) [8], a partir de una muestra representativa de semillas de chía molida (por método de cuarteo).

III.2 Diseño de mezclas con estabilizantes

Se realizó un diseño de 32 mezclas con 4.0 g de orujo de uva secado y tamizado de variedad Cabernet (obtenido del Viñedo del Marqués del estado de Querétaro, México) con goma Xantana, Carboximetilcelulosa (CMC) y Pectina (como estabilizantes de referencia) y chía, empleando 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 g de cada una, así como mezclas de goma Xantana en cantidad de 0.1, 0.25, 0.3 y 0.5 g con 1.0, 2.0 y 3.0 g de chía.

III.3 Evaluación tecnofuncional de mezclas

III.3.1 Índice de dispersabilidad

Se añadió 1.0 g de la muestra a 10 mL de agua a 25 °C y se mezcló durante 15 s, realizando 25 movimientos. Posteriormente, las mezclas se colocaron en un tamiz de 250 µm y, aquella que pasó por él, se recolectó y secó a 105 °C durante 12 h, obteniendo el peso de la materia seca y, con ello, el índice de dispersabilidad mediante la Ec. (1).

$$(1) \quad \text{Índice de dispersabilidad (\%)} = \frac{P_{ms} + (100 + P_m)}{P_m + \frac{100 - H}{100}}$$

donde P_{ms} es el peso de la muestra seca después de tamizar (% p/p), P_m es el peso de la muestra y H es el contenido de humedad de la muestra (% p/p).

III.3.2 Índice de solubilidad en agua (ISA)

Se empleó la metodología de Anderson *et al.* [6], en donde se mezcló 1.0 g de muestra con 20 mL de agua destilada, se agitó durante 30 min y, posteriormente, la suspensión se centrifugó a 3000 x g por 15 min. El sobrenadante se decantó y secó a 100 °C durante 24 h. El ISA se calculó con la Ec. (2):

$$(2) \quad \text{ISA (\%)} = \frac{\text{Peso del residuo de evaporación}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

III.3.3 Índice de sedimentación

Se midieron 25 mL de las mezclas (con concentración de 0.04 g/mL) y se dejaron reposar durante 30 min. Transcurrido el tiempo se registró el volumen de sedimento y el índice de sedimentación se reportó como la relación entre el nivel de sedimentación inicial (0%) y el volumen final de sedimentación.

III.3.4 Color

Las muestras en polvo se colocaron en cajas Petri y se registraron las lecturas correspondientes al espacio CIELAB, empleando un colorímetro marca Minolta 2002.

III. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS



Figura 1. Análisis bromatológico de harina de semillas de chía (*Salvia hispanica*). Resultados expresados como porcentaje.

La comparación del análisis bromatológico (Figura 1) con estudios anteriores demostró que en este estudio se obtuvo un mayor contenido de proteína (22.48%), carbohidratos (26.9%) y fibra dietética, (38%). Sin embargo, se obtuvo un contenido menor de cenizas (0.22%), variaciones causadas posiblemente a las condiciones climáticas y de cultivo, lugar de siembra y de riego de las semillas de chía utilizadas [9].

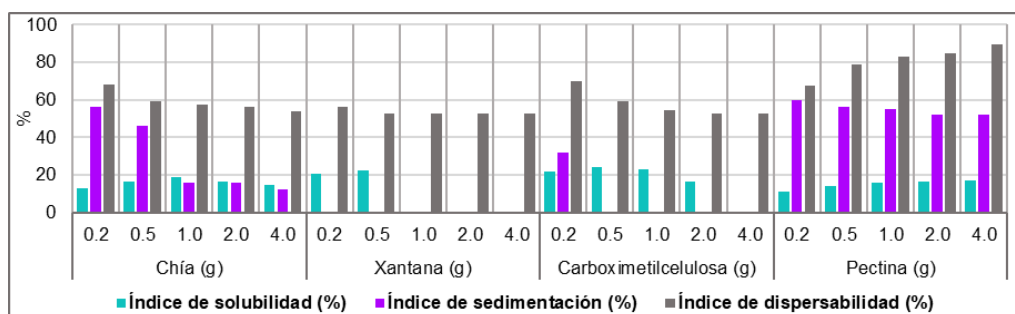


Figura 2. Estudio tecnofuncional en mezclas de orujo de uva con chía, goma Xantana, CMC y Pectina (0.2, 0.5, 1, 2 y 4 g). Datos expresados como porcentaje.

No fue posible medir el índice de solubilidad de las concentraciones más altas de la goma Xantana (2, 3 y 4 g) y la de CMC (4 g), ya que estas cantidades provocaron un aumento en la viscosidad y, con ello, la formación de un gel que impidió el contacto del agua con las partículas de la muestra (Figura 2). De igual forma, las muestras con goma Xantana y CMC (excepto en 0.2 g) no sedimentaron debido a este fenómeno. El aumento de la viscosidad con el aumento de la concentración se atribuye a la interacción intermolecular que aumenta las dimensiones macromoleculares efectivas y el peso molecular [10]. Cabe destacar que la chía, a pesar de mantener una solubilidad menor que las primeras concentraciones de goma Xantana y CMC, presentó esta propiedad en un valor mayor que la pectina (alcanzando su máximo valor en 1 g), así como una sedimentación menor que en las concentraciones de la pectina y dispersabilidad similar a la goma Xantana y CMC.

Considerando las mejores propiedades tecnofuncionales obtenidas, se seleccionó a la goma Xantana (0.1, 0.25, 0.3 y 0.5 g) para formar mezclas con harina de semilla de chía (1, 2 y 3 g), obteniendo los resultados presentados en la Figura 3:

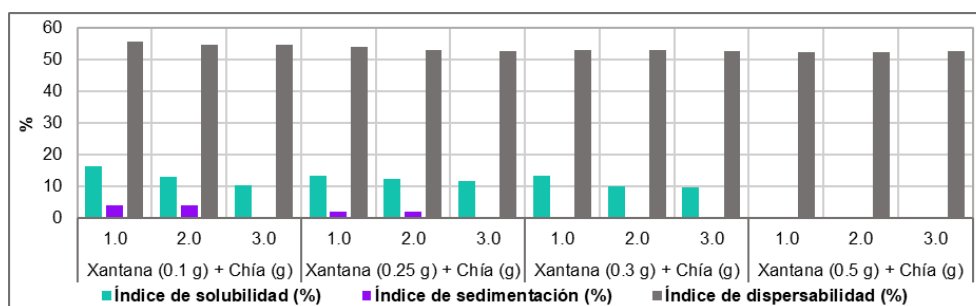


Figura 3. Estudio tecnofuncional en mezclas de orujo de uva (4 g) con chía (1,2 y 3 g) y goma Xantana (0.1, 0.25, 0.3 y 0.5 g). Datos expresados como porcentaje.

En la muestra de 0.25 g de Xantana con 3 g de chía y todas las muestras de Xantana de 0.3 y 0.5 g, se observó un aumento de la viscosidad por la alta cantidad de goma, obteniendo con ello un índice de sedimentación de 0 (%) y, además, se presentó una disminución en los índices de solubilidad de las muestras, excepto en la primera concentración de Xantana (0.1 g) y chía (1 g). Esta última mezcla presentó una mayor dispersabilidad, por lo que esta concentración es la ideal para su adición en un suplemento, debido a que presenta las mejores propiedades tecnofuncionales.

Tabla 2. Color de muestras de orujo de uva con diferentes estabilizantes y concentraciones.

Contenido (con 4.0 g de orujo de uva)	Color		
	CIE L*	CIE a*	CIE b*
Chía (0.2 g)	27.81	4.35	0.99
Chía (0.5 g)	28.50	3.88	0.51
Chía (1 g)	28.00	4.59	1.48
Chía (2 g)	27.04	4.45	1.74
Chía (4 g)	25.48	4.63	1.57
Xantana (0.2 g)	26.59	4.21	0.83
Xantana (0.5 g)	27.21	4.15	0.67
Xantana (1 g)	27.07	3.97	0.80
Xantana (2 g)	29.02	4.16	0.59
Xantana (4 g)	29.80	4.35	0.56
CMC (0.2 g)	27.05	4.09	1.19
CMC (0.5 g)	26.24	3.54	1.23
CMC (1 g)	26.48	3.48	0.30
CMC (2 g)	27.39	2.95	0.49
CMC (4 g)	27.45	3.48	0.58
Pectina (0.2 g)	27.85	4.37	0.73
Pectina (0.5 g)	30.12	4.72	0.60

Pectina (1 g)	30.73	4.23	0.94
Pectina (2 g)	31.99	4.54	0.17
Pectina (4 g)	35.57	4.03	0.58
Xantana (0.1 g) + Chía (1 g)	29.26	5.58	1.94
Xantana (0.1 g) + Chía (2 g)	30.1	5.14	1.90
Xantana (0.1 g) + Chía (3 g)	30.48	5.65	2.7
Xantana (0.25 g) + Chía (1 g)	28.31	5.17	2.08
Xantana (0.25 g) + Chía (2 g)	30.48	5.37	2.02
Xantana (0.25 g) + Chía (3 g)	31.65	4.81	2.24
Xantana (0.3 g) + Chía (1 g)	29.77	5.57	2.4
Xantana (0.3 g) + Chía (2 g)	30.99	5.41	2.23
Xantana (0.3 g) + Chía (3 g)	32.14	5.5	2.36
Xantana (0.5 g) + Chía (1 g)	27.8	3.42	0.86
Xantana (0.5 g) + Chía (2 g)	28.16	4.62	1.69
Xantana (0.5 g) + Chía (3 g)	29.92	4.62	1.87

L*Luminosidad; L=0 color negro, L=100 color blanco; a* negativo = verde, positivo= rojo; b* negativo = azul, positivo= amarillo.

Finalmente, se obtuvieron los parámetros cromáticos (CIELAB) de todas las muestras, los cuales pueden apreciarse en la Tabla 1. De acuerdo con estos resultados, la intensidad de color en las muestras de los estabilizantes de referencia con orujo de uva, varía aleatoriamente dentro de un estrecho dominio, sin embargo, los valores máximos de luminosidad e intensidad de color en las mezclas de chía y goma Xantana se encontraron en aquellas que contenían la mayor cantidad de chía, con lo que puede establecerse que la chía proporciona luminosidad y aumento en la intensidad del tono de las muestras, considerando a la mezcla de goma Xantana (0.1 g) con chía (0.1g) como una de las muestras que mantiene este parámetro en un valor intermedio, la cual confirma su uso ideal en el desarrollo de un suplemento alimenticio, al contar con esta propiedad tecnofuncional de color en un margen aceptable.

IV. CONCLUSIONES

La incorporación de la chía en conjunto con la goma Xantana para mejorar las propiedades del orujo de uva, condujo a propiedades tecnofuncionales mejoradas, comprobando con ello su actividad como estabilizante. Cabe destacar que estos parámetros se vieron afectados negativamente con el incremento en la cantidad de los estabilizantes de referencia debido al aumento de viscosidad. Asimismo, el análisis bromatológico permitió reconocer a la chía como una rica fuente de fibra, por lo que además podría potenciar los beneficios a la salud del orujo, permitiendo con ello su incorporación en un suplemento dietético y así, aprovechando su bajo costo y propiedades biológicas, en comparación con los estabilizantes utilizados normalmente en las industrias alimentarias.

V. AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Querétaro, así como a la Dra. Rosalía Reynoso Camacho y su equipo de trabajo, Berenice Valdez Rodríguez y Raúl Herrera Jr., por todo el apoyo otorgado durante la estancia de verano.

REFERENCIAS

- [1] Saha, M., Gitto, G. & Dally, B.B. (2020). Burning characteristics of grape marc under mild combustion conditions. *Experimental Thermal and Fluid Science*, 114. <https://doi.org/10.1016/j.expthermflusci.2020.110059>
- [2] Yu, J. & Ahmedna, M. (2012). Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(2), 221–237. doi:10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x
- [3] Coorey, R., Tjoe, A. & Jayasena, V. (2014). Gelling Properties of Chia Seed and Flour. *Journal of Food Science*, 79(5), 859–866. doi:10.1111/1750-3841.12444
- [4] Chen, X.D. & Patel, K.C. (2008). Manufacturing Better Quality Food Powders from Spray Drying and Subsequent Treatments. *Drying Technology*, 26(11), 1313–1318. doi:10.1080/07373930802330904
- [5] Kim, C.H., Maga, J.A. & Martin, J.T. (1989). Properties of extruded blends of wheat dried distiller grain flour with other flours. *International Journal of Food Science and Technology*, 24(4), 373–384.
- [6] Anderson, R.A. (1982). Water absorption and solubility and amylograph characteristics on roll-cooked small grain products. *Cereal Chemistry*, 59: 265-269.
- [7] Abadio, F.D.B., Domingues, A.M., Borges, S.V. & Oliveira, V.M. (2004). Physical properties of powdered pineapple (*Ananas comosus*) juice-effect of maltodextrin concentration and atomization speed. *J. Food Eng.*, 64, 285–287.
- [8] AOAC (2005). Official method of Analysis. 18th Edition, Association of Officiating Analytical Chemists, Washington DC, Method 935.14 and 992.24.
- [9] Salgado, M., Cedillo, D. & Beltrán, M. (2008). Estudio de las Propiedades Funcionales de la Semilla de Chía (*Salvia hispánica*) y de la Fibra Dietaria Obtenida de la Misma. Universidad Autónoma de Nuevo León, México D.F.
- [10] Dintzis, F.R., Babcock, G.E. & Tobin, R. (1970). Studies on dilute solutions and dispersion of the polysaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. *Carbohydrate Research*, 13(2), 257–267. doi:10.1016/s0008-6215(00)80832-0

El presente volumen fue editado por el Departamento Editorial del Instituto Tecnológico Superior de Monclova en el marco del Verano de la Ciencia de la Región Centro 2022. Su edición es digital para su descarga y lectura gratuita en línea. El registro ISSN se encuentra en trámite.