

1. Biotecnología y Ciencias Agropecuarias

CARACTERES MORFOLÓGICOS Y PESO DE BULBO EN AJO (*Allium sativum* L.) BAJO PRODUCCIÓN ORGÁNICA

Miranda C. M. A.¹, García R. G.¹, Alvarado B.E.¹ García, H. N.².

¹Instituto Tecnológico de Roque, ²Jóvenes en la ciencia Gto.

RESUMEN

En las últimas décadas, se han presentado cambios importantes en la producción y el consumo de alimentos no solo en México sino en todo el mundo. Esta tendencia se vincula principalmente con una fuerte preocupación por salud. Debido a que existen nuevas exigencias en los gustos de los consumidores y una mayor conciencia de la importancia de la protección al medio ambiente. El crecimiento de la población humana implica cada vez mayor degradación de los ecosistemas por el mal uso de los fertilizantes inorgánicos y contaminación de manera irracional. Los tratamientos consistieron en combinar suelo agrícola y composta (estiércol vacuno y desechos de jardinería) agregada para formar proporciones de 0, 5, 10, 15, 20 y 25% en macetas de polietileno de 11 kg; además de tamaños mediano (37.6 a 50 mm) y grande (> 50.1 mm) del diente, seleccionados de bulbos de ajo tipo Taiwán de tamaños Extra Flor, Gigante y Extra Gigante. Después del tratamiento sanitario, los tres dientes se plantaron verticalmente en hilera dentro de la maceta, cada 7 cm. El tamaño medio del diente de ajo, resulta una buena opción para la siembra. Un resultado que confirma la decisión de los productores de elegir éste tamaño para plantar, además del tamaño grande del diente. La incorporación de material orgánico al cultivo de ajo, supondría ventajas al mejorar el vigor de la planta y la calidad al formar bulbo de ajo de mayor tamaño. Además, la respuesta de la adición de materia orgánica tiende a adquirir mayor importancia en estadios medios a tardíos del ciclo de ajo.

1. INTRODUCCIÓN

La incorporación de residuos orgánicos cambia las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo y mejora la productividad agrícola sustentable (Sánchez *et al.*, 2004). En la región del Bajío Guanajuatense, el cultivo de ajo demanda cantidades importantes de nutrimentos, tradicionalmente aportados en fertilizantes químicos, sin embargo, el conocimiento técnico indica que no se aprovechan al inicio, sino que ocurre entre 45 y 65 d del ciclo (Burba, 1997). El manejo agronómico de ajo en ésta zona excluye productos orgánicos para mejorar condiciones edáficas y garantizar la nutrición de la planta. Por otro lado, la mayor cantidad de reservas en una semilla grande promueve plántulas vigorosas, que se establecen rápido y desarrollan mejor que las de tamaño menor; esto ocurre en varias especies vegetales. En ajo, el tamaño de bulbo tiene un efecto marcado en el rendimiento del cultivo (Castellanos *et al.*, 2004). Entre otras variables, se recurre a medir peso seco del tejido vegetal durante el ciclo para evaluar el efecto de tratamientos en la planta. Con base a lo anterior, se desarrolló este ensayo con el propósito de evaluar el efecto de material orgánico en la morfología de la planta y variables relacionadas con la calidad de bulbo de ajo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se estableció el 25/10/2012 en Celaya, Gto. Los tratamientos consistieron en combinar suelo agrícola y composta (estiércol vacuno y desechos de jardinería) agregada para formar proporciones de 0, 5, 10, 15, 20 y 25% en macetas de polietileno de 11.5 kg; además de tamaños mediano (37.6 a 50 mm) y grande (> 50.1 mm) del diente, seleccionados de bulbos de ajo tipo Taiwán de tamaños Extra Flor, Gigante y Extra Gigante. Después del tratamiento sanitario, los tres dientes se plantaron verticalmente en hilera dentro de la maceta, cada 7 cm. Los tratamientos se distribuyeron en un diseño de bloques al azar con arreglo en parcelas divididas: dientes en parcelas grandes y niveles de composta en parcelas chicas. Los riegos fueron semanales. Las variables evaluadas fueron altura de planta (AP), diámetro de bulbo (DB) y de falso tallo (DT), peso de bulbo (PB) y de falso tallo (PT), a los 85, 116 y 144 días después del trasplante (ddt), que implicó muestreo destructivo de tres repeticiones, a partir de las cuales se desarrolló el análisis de varianza y comparación de medias con Tukey. La cosecha se realizó el 18/05/2013.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ocurrió una diversidad de respuestas significativas entre variables por efecto de tamaño de diente de ajo (TD), composta (MO) o interacción TD*MO. La respuesta del tamaño de diente confirma la función importante en la adquisición de caracteres asociados con la calidad, como diámetro y peso de bulbo de la planta futura. Tamaño medio de diente plantado resultó ser sobresaliente (datos no mostrados). Jiménez *et al.* (2014) afirman que la calidad del bulbo de ajo se logra con dientes medianos o grandes. En cambio, la composta (MO) se relacionó con la morfología de la planta (AP) y del bulbo (DB y DT) (Cuadro 1). La materia orgánica ausente en el testigo, provoca pérdida gradual de la altura de AP y DB al transcurrir el ciclo, pero se fortalece DT. Mientras, el uso de materia orgánica tiende a favorecer el mayor desarrollo del bulbo (DB), sin establecerse en un nivel en particular, por las condiciones físicas que logra cambiar. El bulbo de ajo encuentra un espacio edáfico apropiado para su desarrollo, una restricción común impuesta por la clase textural arcillosa del suelo predominante en el Bajío de Guanajuato. El análisis nutricional podría complementar el efecto físico que provoca la materia orgánica en la morfología de ajo. Por otro lado, cabe destacar que los cambios en los contenidos de materia orgánica en el suelo, incrementa el peso de bulbo a los 144 ddp (0.6346**), con consecuencias favorables en la producción final de ajo.

Cuadro 1. Comparación de medias de altura de planta y diámetro de bulbo y falso tallo.

Composta (%)	AP1 (cm)	AP3 (cm)	DB2 (mm)	DB3 (mm)	DT2 (mm)	DT3 (mm)
5	28.8 a	30.4 a	19.8 a	21.5 a	12.1 b	13.3 d
10	23.7 ab	30.7 a	16.8 ab	18.5 b	12.6 b	16.2 a
15	22.3 ab	31.5 a	15.3 b	18.0 b	12.1 b	15.0 ab
20	15.5 b	29.9 a	18.6 ab	20.7 a	11.8 b	13.5 cd
25	23.5 b	30.1 a	19.3 a	21.5 a	16.5 a	14.5 bc
0	20.4 b	14.3 b	19.1 ab	18.7 b	12.9 b	13.2 d

Valores iguales en la columna, no son estadísticamente distintos.

4. CONCLUSIONES

El tamaño medio del diente de ajo, resulta una buena opción para la siembra. Un resultado que confirma la decisión de los productores de elegir éste tamaño para plantar, además del tamaño grande del diente. La incorporación de material orgánico al cultivo de ajo, supondría ventajas al mejorar el vigor de la planta y la calidad al formar bulbo de ajo de mayor tamaño. Además, la respuesta de la adición de materia orgánica tiende a adquirir mayor importancia en estadíos medios a tardíos del ciclo de ajo.

LITERATURA CITADA

1. Burba J.L. 1997. Obtención de nuevos cultivares de ajo. En: Burba, J.L. (ed.). pp. 49-56. Cincuenta Temas Sobre la Producción de Ajo. Vol. 2. Mendoza, Argentina.
2. Castellanos R.J.Z., Vargas T.P., Ojodeagua J.L, Hoyos G., Alcántar G.G., Méndez F.S., Álvarez E., Gardea A.A. 2004. Garlic productivity and proflifitability as affected by seed clove size, planting density and planting method. Horticultural Science 39: 1272-1277.
3. Jiménez V.P., Rangel L.J.A., Mendoza E.M., Cervantes O.F., Rivera R.J.G. 2014. Efecto de tamaño del bulbo/bulbillo y densidad de plantación en la emergencia, rendimiento y calidad de ajo (*Allium sativum* L.). *Phyton* 83: 83-91.
4. Sánchez J.E., Harwood R.R., Willson T.C., Kizilkaya K., Smeenk J., Parker E., Paul E.A., Knezek B.D., Robertson G.P. 2004. Managing soil carbon and nitrogen for productivity and environmental quality. *Agronomy Journal* 96: 769-775.

DISPOSICIÓN Y COMPOSICIÓN DE LOS RESIDUOS SÓLIDOS GENERADOS EN CASA-HABITACIÓN.

Elizabeth Margarita Silva Rodríguez¹, Francisco Javier Manríquez Rojas¹ Maribel Quezada Cruz¹.

¹Universidad Tecnológica de Tecamac, Tecamac Estado de México.

RESUMEN

En el Estado de México las autoridades de gobierno son las responsables de suministrar a la población los servicios de recolección y transporte de los residuos sólidos municipales (RSM) al lugar de disposición final; las estaciones de transferencia para la selección y recuperación de materiales son escasas o inexistentes. La cantidad y diversificación de los RSM está directamente relacionado con la urbanización, el consumismo, ingreso económico y la educación ambiental. El derroche de recursos que existe al depositar residuos de valor en rellenos sanitarios se agrava cuando no existe el conocimiento real de la cantidad ni de sus características. El presente estudio consistió de encuestas y capacitación a jefas de familia, y de la cuantificación y características de residuos, generados durante 24 semanas en 80 hogares de municipios del noreste del Estado de México. Respecto a las familias, la mayoría son del tipo nuclear que viven en casas independientes (72%). Un poco más de la mitad de la población conoce del tema del manejo de residuos, sin embargo solo el 40% la separa; dos terceras partes se deshace de los residuos mediante el camión recolector y aún hay gente que los quema (1%). La cantidad promedio de masa total generada en el hogar, por persona al día fue de 0.392 Kg. La relación orgánica/inorgánica fue de 1.02:1. Los residuos inorgánicos comunes son: papel, pet, cartón, plástico, vidrio, metal, tetra pack, y otros (unicel, telas) con 23, 21, 16, 13, 9, 8, 7, y 3%, respectivamente. La poca educación ambiental afecta la recuperación de residuos de valor, aun cuando existen campañas de reciclaje. El impacto ambiental y social presente puede minimizarse con programas de compostaje y de recuperación de reciclables, donde participe la sociedad y el gobierno.

INTRODUCCIÓN

En México se generaron 42,102.75 miles de toneladas de basura en 2012, casi el doble respecto a diez años antes, y también respecto a la generación diaria a nivel nacional, 115 miles de toneladas (SEDESOL, 2013). Los residuos sólidos municipales son los generados principalmente en los hogares, además de los generados en la calle: los residuos que provienen de cualquier otra actividad dentro de establecimientos o en la vía pública que genere residuos con características domiciliarias y los resultantes de la limpieza (DOF, 2003). El problema en la disposición de los residuos, además de su abundancia, es que a la mayor parte de ellos se les trata como basura (Moreno, 2012), generando problemáticas en su eliminación, el derroche de los recursos contenidos en éstos y el impacto ambiental (Robles, 2005).

México concentra sus zonas urbanas en diez ciudades, con el 70% de la población. Esta urbanización afecta los patrones de consumo de la población, los cuales resultan en una mayor heterogeneidad en la composición de los residuos y un incremento en la cantidad generada. (Buenrostro, 2003). El aumento de la población, la industrialización y el poder adquisitivo de las familias es directamente proporcional al volumen y diversificación de los residuos generados. Además existen bajas tasas de valorización de residuos y la falta de compromiso individual de separar los residuos en el origen.

El 12.8% de la población nacional vive en el Estado de México y de esta cantidad, el 11% se concentra en el municipio de Ecatepec; aledaños a éste se encuentran los municipios de Coacalco Tecámac, Zumpango y Acolman. Estos municipios, al igual que otros del Estado de México, tienen en común la escasa planeación urbana, en algunos pueblos se sigue careciendo de servicios municipales como recolección de basura, red de transporte municipal, áreas recreativas, alumbrado público o una red de drenaje adecuada. (H. Ayuntamiento de Ecatepec de Morelos, 2013). Respecto a Infraestructura Nacional para la disposición de residuos, se tiene que el número de rellenos sanitarios se incrementó de 30, en 1995 a 260 en 2012, con lo cual la capacidad estimada de almacenamiento total creció de 5.95 a 27.98 millones de toneladas; en el estado de México existen 16 rellenos sanitarios (SEMARNAT, 2014). Para los municipios mencionados existe un tiradero controlado en Ecatepec, un relleno sanitario municipal en Tecámac y un relleno sanitario privado que recibe residuos industriales y RSM de al menos otros cinco municipios. Existen municipios que no cuentan con confinamientos de basura, por lo que utilizan tiraderos a cielo abierto o pagan por depositar sus desperdicios en Rellenos Sanitarios Particulares ubicados en otros municipios.

El transporte de residuos en estos municipios, del origen al lugar de disposición final, está a cargo de la Dirección de Servicios Públicos, quien da concesiones a recolectores formales o informales; en estos municipios no existen centros de transferencia, incineradores o algún otro proceso de tratamiento. Los recolectores inician la selección de los residuos de valor desde el momento que tienen los residuos en la unidad de transporte; la basura la depositan en tiraderos o en el mejor de los casos en un relleno sanitario público o privado. Esta actividad hasta el momento es controlada por los responsables municipales y por grupos de pepenadores, quienes dependen económicamente de la venta de residuos a empresas recicladoras. Las prácticas mencionadas conllevan a la falta de datos estadísticos o información disponible de la composición y características de los residuos que se generan en estos municipios. De los 123 municipios del Estado solo en cinco se han hecho estudios sobre la generación de residuos y de éstos, solo en cuatro, estudios de composición (INEGI, 2011).

Ecatepec es el municipio con mayor población en el país, en este se generaron 385, 594 ton/año y 0.6678 ton/hab/año en 2000 y 575 321 ton/año y 0.8140 ton/hab/año en 2010; Tecámac, municipio que en los últimos cinco años aumentó su población en un 20%, generó 63 242 ton/año y 1.0614 ton/hab/año y 93 609 ton/año y 1.2624 ton/hab/año en las mismas fechas. El aumento en la generación total fue de 49% y 48% y en la generación per cápita de 22% y 18% en Ecatepec y Tecámac, respectivamente (INE, 2007). Para el resto de los municipios no existe información. Por lo anterior, son esenciales estudios de investigación en materia de generación, disposición y características, con el fin de mejorar su manejo, transporte y disposición. En este trabajo se realizó un estudio de cuantificación y composición de residuos en el origen.

TEORÍA

Existen diferentes estudios sobre residuos sólidos municipales, en los que se destaca la cuantificación, la caracterización, el transporte y la disposición final. Algunos gobiernos de Unión Europea, además tener datos confiables de los residuos generados, tiene un programa de "basura cero" basado en un orden jerárquico del manejo de los residuos que consiste de: prevención, reuso, reciclaje, recuperación, y como última opción la disposición, que incluye el depósito de residuos en rellenos sanitarios y la incineración con la recuperación de energía (European Commission, 2016).

En América Latina el método más común de disposición de residuos sólidos es en basurero a cielo abierto, opción que presenta una serie de riesgos ambientales y de la salud humana a corto y largo plazo. Falta el desarrollo de políticas en el manejo de residuos y un programa de educación ambiental de la población.

Mientras la Unión Europa está enfocada en el programa basura cero, cuya meta es eliminar los rellenos sanitarios, en México y otros países de Latinoamérica la preocupación es disponer los residuos colectados en rellenos sanitarios en lugar hacerlo en tiraderos a cielo abierto. Por otro lado, México ha utilizado tecnologías como composteo (para residuos orgánicos), reutilización y confinamiento que no han tenido el éxito esperado por diversos motivos, como falta de interés por los municipios. A nivel nacional existían 260 rellenos sanitarios en 2012, 700% más que en 1995; el reciclaje fue de 3.6% en 2008 y en el estado de México solo se recolecta 88 % de los residuos que se generan (SEMARNAT, 2014). En algunas ciudades de país se han implementado políticas en la gestión de residuos, un caso exitoso es el relleno Sanitario de la Ciudad de Nuevo León, que genera energía eléctrica a partir de la captura y uso del metano; el Programa de Gestión Integral de los Residuos Sólidos para el DF es otro ejemplo de que la comunicación y educación ambiental es la mejor estrategia en la modificación de hábitos de la sociedad (Gaceta Oficial DF, 2010).

PARTE EXPERIMENTAL

La investigación para generar información de la cantidad y composición de residuos sólidos municipales se llevó a cabo en el origen, es decir, se capacitó a amas de casa para la separación de los residuos generados en su hogar y poder realizar la cuantificación y caracterización in situ. El estudio se realizó durante 24 semanas en cada hogar en el periodo Enero a Diciembre de 2015. Participaron 80 hogares de municipios aledaños a la Institución Educativa.

Área de estudio

Ecatepec, Coacalco, Tecámac, Zumpango, Acolman, Melchor Ocampo, Teoloyucan y Teotihuacán, son municipios al noreste del Estado de México aledaños a la Universidad Tecnológica de Tecámac (Figura 1). La superficie total ocupada por estos cinco municipios es de 659 km² y están a 2250 msnm (INEGI, 2012). Las características sociodemográficas de las viviendas de estos municipios son similares, por ejemplo, el porcentaje de viviendas sin servicios básicos es de 5.6, 0.2, 3.8, 9.3 y 29.1, respectivamente; la pobreza varía de 20 a 40 % de la población y alrededor del 21% de los hogares son de jefatura femenina (CONEVAL, 2012).



Figura 1. Zona de estudio en el Estado de México

Colección de información

En cada vivienda se realizó una encuesta respecto al conocimiento del manejo de los residuos, se dio capacitación para la separación de residuos y se solicitó el apoyo para la separación de los residuos en orgánicos e inorgánicos en cada casa. Los recipientes se etiquetaron para cada tipo de residuos y se registraron los volúmenes; una vez llenos se pesaron con una balanza de muelle de 10 kg de capacidad. Con los primeros datos de volúmenes y pesos se calcularon las densidades de cada tipo de residuos, se usó la Ecuación 1 y se obtuvo el promedio de los resultados.

$$\rho = \frac{\text{Masa de un tipo de residuo}}{\text{Volumen del recipiente}}$$

Ecuación 1

Una vez conocida la densidad de los residuos solo se contabilizó la cantidad de recipientes generados durante el periodo de la investigación. Las cantidades en unidades de masa se determinaron con la Ecuación 2.

$$Masa = \rho_{residuo} * Volumen_{del\ recipiente} * Total_{de\ recipientes} \quad \text{Ecuación 2}$$

La caracterización de residuos inorgánicos se realizó una vez por semana, separando los residuos de acuerdo a su composición y pesando por separado con una balanza electrónica comercial con capacidad de 20 kg y sensibilidad de 0.001 kg. El porcentaje de cada tipo de residuos y la generación per cápita total y por fracción diaria de residuos se calcularon con las Ecuaciones 3 y 4, respectivamente.

$$\% \text{ de la fracción} = \frac{Peso_{del\ residuo\ separado}}{Peso_{total\ de\ residuos\ inorgánicos}} * 100$$

Ecuación 3

$$Generación \text{ de residuos per cápita} = \frac{Peso_{del\ residuo\ generado\ por\ vivienda}}{Total_{de\ personas\ en\ la\ vivienda} * Dias_{totales\ de\ generación}}$$

Ecuación 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La población de los municipios participantes tienen características sociales, económicas y culturales muy semejantes; pertenecen a una región económica donde además de la actividad industrial predominan las actividades comerciales y de servicios. La mayoría de la población es de clase baja a media. La aportación del gasto familiar corresponde en mayor parte al jefe de familia y para el apoyo a las familias de bajos recursos existen programas sociales de gobierno.

De los resultados de las ochenta encuestas realizadas se tiene que la mayoría de las casas son viviendas de tipo nuclear, de 1 a 8 habitantes, cuatro en promedio. Los tipos de vivienda son independientes (72%), en privada (18%) o en departamento (10%). En el tema de manejo de los residuos, un poco más de la mitad de los participantes conoce el tema, 51.61%. Solo una tercera parte realiza la separación de residuos en su forma básica, orgánicos – inorgánicos (Figura 2). Aún con la capacitación al iniciar el estudio la población no da la importancia real a éste problema, siguen considerando que es un problema que deben resolver las autoridades de gobierno.

La generación per cápita en promedio fue de 0.392 kg/per/día. Se ha encontrado una generación de 0.35 a 0.42 kg/día/persona en un estudio hecho en residuos recién recolectados en viviendas (Castillo y De Medina, 2014).

La densidad promedio, en kg/m³, fue 279 para la fracción orgánica, 36 para residuos sanitarios y 91.5 para la fracción inorgánica. En estudios realizados a la llegada de residuos al relleno sanitario se obtuvo una densidad de 261 kg/m³ para un generación de 1.09 kg/día/persona (Saldaña et al., 2013) y una densidad de 311.73 kg/m³, para una generación de 0.97 kg/día/persona (Murugaian y Sulaiman, 2014). Dado a que el estudio se realizó en el origen, existen diferencias en los volúmenes de residuos recién generados y los volúmenes en los rellenos sanitarios, pues además de que ya pasaron por un proceso de selección y recuperación “pepena”, por

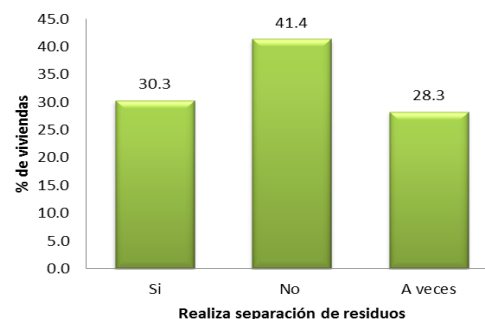


Figura 2. Práctica de separación de residuos.

parte de los recolectores, su manejo y transporte los compacta cada vez, por lo que además de un factor de compactación por el peso, se suma el efecto de los lixiviados.

De la cantidad generada, se tiene que la fracción orgánica es del 51% (Figura 2), en su mayoría residuos de frutas, verduras y alimentos preparados. En estadísticas regionales, se tiene que la mayor cantidad de residuos generados es de orgánicos con el 60%; en el Estado de México la generación total de residuos era de 1.01 -1.4 kg/hab/día hace diez años, de esta cantidad correspondía 49% a la residuos de comida, de jardines y materiales orgánicos similares, 17% a otro que incluyen residuos finos y pañales desechables y el 32 % restante a inorgánicos que incluyen papel, cartón, plástico, vidrio, metal y textiles (SEMARNAT, 2005).

De la fracción inorgánica, se encontró que siete de los principales residuos son adecuados para ser reciclados, papel, pet, cartón, plástico (de diferentes polímeros, bolsas, material de empaque, envases), vidrio, metal (aluminio y hojalata), tetra pack y otros, ver Figura 3. En otros, se encuentran los residuos sanitarios, de telas y poli estireno expandido (unicel).



Figura 3. Relación del tipo de residuos generados.

Aún separados, estos residuos son poco valorados; por ejemplo, el papel y el

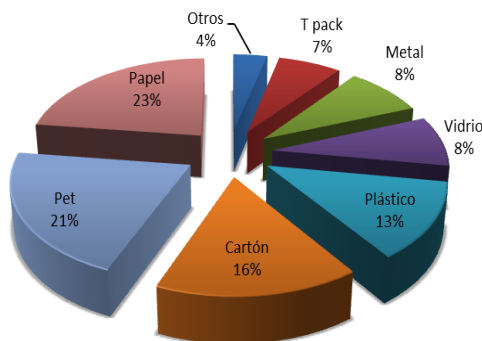


Figura 4. Composición de los residuos Inorgánicos.

mayor cantidad, tienen un valor promedio de 1 y 3 \$/kg, respectivamente; para el resto, cartón, plástico, vidrio, metal y tetra pack su valor promedio en pesos por kg es 2, 3, 0.5, 1 y 2, respectivamente. Si la selección es más específica, las latas de aluminio se llegan a vender hasta en \$17/kg. El tereftalato de polietileno, pet, es un material con el que se puede hacer fibra sintética, por lo que compite con el algodón que es una fibra natural, su precio depende de las fluctuaciones en el mercado nacional e internacional. Esta información se obtuvo directamente de los centros de acopio que existen en las localidades estudiadas, donde además los vendedores deben llevar sus residuos absorbiendo ellos los costos de transporte.

CONCLUSIONES

Los residuos sólidos generados en casa habitación, para los municipios estudiados fue de 0.392 kg diarios per cápita. La composición de los residuos sólidos generados en casa habitación de los municipios estudiados presentan un fracción orgánica alta, 51%, considerando que la mayoría son residuos de alimentos o que en algunos hogares dichos residuos son alimento para crías de cerdos o aves. La poca educación ambiental afecta la recuperación de residuos de valor, aun cuando existen campañas de reciclaje. Aunque como nación México se enfrenta a cambios ambientales y políticos respecto a los residuos sólidos, la sociedad no considera que los residuos sean un problema colectivo; la gestión de los residuos aún es total responsabilidad de las autoridades municipales, sin importar el impacto ambiental y social presente. Parte de las propuestas de solución en materia de residuos sólidos es el sistema de recolección de residuos que tiene como función principal la disposición en rellenos sanitarios; sin embargo la caracterización puede sugerir alternativas de manejo y disposición de valor económico, ambiental y social, como son programas de compostaje y recuperación de reciclables a nivel doméstico, comunitario y municipal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Buenrostro O., Bocco G. 2003. Solid waste management in municipalities in Mexico: goals and perspectives. *Resources, Conservation and Recycling*. 39: 251–263
2. Castillo G. E. y De medina S. L. 2014. Generación y composición de residuos sólidos domésticos en localidades urbanas pequeñas en el estado de Veracruz, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 30:81-90.
3. DOF. Ley General para la Prevención y Gestión Integral de Residuos. México. 2003 (8 de Octubre).
4. European Commission. 2016. Environment - Waste. Encontrado en <http://ec.europa.eu/environment/waste/index.htm>
5. Gaceta Oficial del Distrito Federal. 2010. Programa de gestión integral de los residuos sólidos para el Distrito Federal.
6. H. Ayuntamiento de Ecatepec de Morelos 2013 - 2015. 2013. Cuaderno de Información Estadística y Geográfica Municipal No. 1. Sistema Municipal de Información estadística y geográfica.
7. INE. 2007. Generación y composición de los residuos sólidos municipales. Instituto Nacional de Ecología. Encontrado en <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/128/cap3.html>
8. INEGI. 2011. Residuos sólidos urbanos. Censo Nacional de Gobiernos Nacionales y Municipales 2011.
9. INEGI. 2012. México en cifras. Indicadores del Banco de Información del Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
10. Moreno P. S. 2012. La infraestructura para la confinación y tratamiento de los residuos sólidos urbanos. *Reporte Cesop*, 51: 11-19.
11. Murugaian P. T. y Sulaiman H. 2014. Generation and composition of Municipal Solid Waste (MSW) in Muscat, Sultanate of Oman. *Procedia APCBEE*. 10: 96-102
12. Robles M. F. 2005. Generación de biogas y lixiviados en los rellenos sanitarios. México: Instituto Politecnico Nacional.
13. Saldaña D.C., Hernández R.I., Messina F.S. y Pérez P.J. Caracterización física de los residuos sólidos urbanos y el valor agregado de los materiales recuperables en el vertedero el Iztete, de Tepic-Nayarit, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 29:23-32
14. Secretaría de Desarrollo Social. 2013. Dirección General de Equipamiento e Infraestructura en Zonas Urbano-Marginadas.
15. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2014. El medio ambiente en México, Residuos Sólidos Urbanos.
16. CONEVAL. 2012. Informe anual sobre la situación de pobreza y rezago social de los municipios de Acolman, Coacalco, Ecatepec, Tecámac y Zumpango. Consejo Nacional de Evaluación de la política de Desarrollo Social. Secretaría de Desarrollo Social.
17. SEMARNAT (2005). Generación de residuos sólidos municipales per cápita y por composición. Instituto Nacional de Ecología. Encontrado en http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_resumen/08_residuos/cap8.html.
18. SEMARNAT (2014) El Medio Ambiente en México, Residuos Sólidos Urbanos. http://apps1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_resumen14/07_residuos/7_1_2.html

GERMINACIÓN IN VITRO, ACLIMATACIÓN Y MORFOMETRÍA DE LA SEMILLA DEL “NÍSPERO” *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl

María Luisa Cárdenas Avila, Jorge Alberto Villarreal Garza, Sergio Moreno Limón, Rahim Foroughbakhch P., María Adriana Núñez González, Marcela González Álvarez y José Guadalupe Almanza Enríquez.

Universidad Autónoma de Nuevo León, (UANL), Facultad de Ciencias Biológicas, AV. Universidad s/n, Cd. Universitaria San Nicolás de los Garza Nuevo León, México.

RESUMEN

La planta del níspero *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl es muy común en México, la textura de su follaje agrega un toque tropical a los jardines, contrastando bien con muchas otras plantas. En esta investigación se logra la germinación in vitro de sus semillas (previa prueba topográfica de viabilidad del tetrazolio) en el medio de cultivo de Murashige-Skoog (MS 1962) bajo condiciones controladas de luz y temperatura, la posterior aclimatación de las vitroplantas (en 10 semanas) en sustrato tierra y perlita (1:1): riego con medio MS líquido y mismas condiciones del cultivo in vitro y; reporta también valores promedio de los parámetros largo, ancho y peso de las semillas. Las plantas in vitro aclimatadas se establecieron fácil y exitosamente en sustrato tierra y perlita (1:1), a temperatura ambiente (25-38 °C), riego con agua corriente; resultando plantas sanas y vigorosas con una altura promedio de 1.15 m después de seis meses de su aclimatación.

1. INTRODUCCIÓN

El níspero pertenece a la familia de las Rosáceas, subfamilia Pomoideas, género *Eriobotrya* y especie japónica; de nombre vulgar: «níspero japonés». Sinonimia científica: *Crataegus bibas* Lour., *Mespilus japonica* Thunb., *Photinia japonica* (Thunb.) Benth. & Hook. f. ex Asch. & Schweinf.

La planta del níspero *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl alcanza una media de 5 a 6 m. de altura, la forma de la copa es esférica. Las hojas son perennes, de forma oblongo-lanceolada, con bordes aserrados y tamaños que oscilan entre los 18 y 40 cm. de longitud. Son de consistencia coriácea, con la cara superior algo rugosa, de un color verde oscuro brillante y la inferior de un color gris ceniza. Las flores están reunidas en racimos (panículas) y son de color blanco o blanco-amarillento. El tamaño de las panículas oscila entre 18 y 25 cm de anchura y longitud y el número de flores por panícula varía entre 150 y 250, según variedades. El fruto es un pomo, de diferentes formas según las variedades (achatadas, redondeadas, ovaladas, elípticas), con una coloración de piel que varía desde el amarillo pálido al anaranjado fuerte. Florece en otoño o a comienzos del invierno, y los frutos maduran a finales del invierno y principio de la primavera. La maduración ocurre, entre los meses de Marzo y Junio. Las semillas en número que oscila de 1 a 5, están agrupadas y recubiertas por un tegumento de color castaño. Los nísperos se emplean en medicina tradicional china contra los resfríos, dolor de garganta, como expectorante, antiinflamatorio, astringente, digestivo y sedativo. En México es muy común, la textura de su follaje agrega un toque tropical a los jardines, contrastando bien con muchas otras plantas. Su gran ventaja es la sombra permanente. El propósito de esta investigación es desarrollar un protocolo para lograr la germinación y establecimiento in vitro de semillas del níspero *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl; caracterizar la morfometría de las semillas y la aclimatación de las vitroplantas.

2. TEORÍA

VIABILIDAD. La prueba de tetrazolio, desarrollada por la internacional Seed Testing Association (normas ISTA, 1976) es un análisis bioquímico que permite determinar en forma rápida la viabilidad de las semillas y da una referencia de su poder germinativo. En este ensayo el cloruro o bromuro de tetrazolio es usado como un indicador de las reacciones de óxido reducción que tiene lugar en las células que respiran, poniendo de manifiesto la actividad metabólica propia de las células vivas. Esta sal soluble en agua e incolora, es absorbida por las semillas; al penetrar en las células reacciona con las enzimas de la respiración y se transforma en un compuesto rojo (formazán) insoluble en agua, estable y no difusible, que permanece en las células que se formó.

MEDIO DE CULTIVO. En términos generales, la mayor parte de los tejidos vegetales se pueden cultivar exitosamente en un medio que contenga cualquiera de varias mezclas de sales minerales diseñadas para mantener el crecimiento de tejidos y órganos. Los ingredientes del medio de cultivo se pueden clasificar en: agua, compuestos orgánicos, y compuestos inorgánicos. Se ha demostrado que la fórmula de Murashige y Skoog (1962), es el medio adecuado para una gran variedad de especies, así como para diferentes partes de la planta. Esta fórmula contiene grandes cantidades de macronutrientes; además de una alta concentración de nitrógeno en forma de NH_4NO_3 y KNO_3 . Dentro de las sustancias hormonales, las auxinas y las citocininas son las más utilizadas. La sacarosa es la fuente de carbono más ampliamente usada, y se emplea a una concentración de 1 a 3%. (Hurtado y Merino, 1987). ASEPSIA. Una de las condiciones básicas que se requieren para el CTV es la asepsia, es decir, la ausencia en el sistema de cualquier organismo contaminante que pudiera afectar los resultados o incluso matar al tejido vegetal cultivado (Pérez et al, 1999). En general, casi siempre se usan soluciones de hipoclorito de calcio o sodio, los cuales liberan al cloro como agente desinfectante activo. Las concentraciones empleadas son 0.1 a 2 y 2 a 10% respectivamente. Usualmente, antes de poner el material vegetal en contacto con el agente desinfectante, se sumerge en alcohol etílico al 70% durante 30 segundos (“dip”), con lo cual se eliminan las grasas de la superficie y se permite una mejor penetración del agente desinfectante en el material. Se recomienda usar unas gotas de algún agente humectante como detergente líquido, por ejemplo “Tween”. Los agentes desinfectantes posteriormente son lavados con agua destilada y esterilizada (Hurtado y Merino, 1987). Los blanqueadores comerciales contienen aproximadamente un 5% de hipoclorito de sodio (NaOCl), por lo que pueden ser utilizados en concentraciones del 10 al 100% (Pérez et al, 1999).

3. PARTE EXPERIMENTAL

Se realizaron colectas de frutos de “níspero” *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl en la Cd. Universitaria de la UANL. Se seleccionaron los frutos maduros, sanos y sin daño mecánico para la obtención de las semillas, las cuales fueron extraídas manualmente y se secaron a temperatura ambiente (Figuras 1y 2). Prueba de viabilidad de la semilla. Se realizó la prueba topográfica de tetrazolio al 0.5% (cloruro de 2, 3,5, trifenil) (TZ) según ISTA (2010), ésta se llevó a cabo por triplicado con 10 semillas por unidad experimental; las cuales se mantuvieron en obscuridad a temperatura ambiente por un periodo de 48 a 72h. Morfometría. Se evaluaron los parámetros de longitud, diámetro y peso de 100 semillas utilizando para los registros vernier y balanza analítica (SARTORIUS BL 120 S). Asepsia. Las semillas fueron sumergidas en agua destilada estéril por 10 minutos, seguido de alcohol etílico absoluto por 1 minuto y luego fueron clodadas en una solución de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex®) diluido al 20% (v/v), conteniendo 0.1% de Tween 20 por 15 minutos; el agente desinfectante se elimina dentro de la campana de flujo laminar (RYE) enjuagando con 500 mL de agua destilada estéril. Germinación in vitro. Posterior a la asepsia las semillas se sembraron en Agar (7 g/L) y en las sales básicas de Murashige-Skoog (MS 1962) modificado (con mioinositol 100, Ac. Nicotínico 0.5, Piridoxina.HCl0.1, tiamina. HCL 0.1, glicina 2.0 en mg/L), sacarosa 30 g/L y 0.4% de fitogel y con los reguladores de crecimiento vegetal (RCV): Ac. Indolacético (IAA) 1 mg/L y Bencil-amino purina (BAP) 2 mg/L, y el testigo sin RCV; a pH 5.7 y esterilizado en autoclave automática (FELISA FE-398) a 121°C y 15 lb de presión durante 15

minutos. Cada tratamiento consistió de seis repeticiones con 3 semillas cada uno. Condiciones del cultivo: fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ en cámara bioclimática (BIOTRONETTE Mark III) Aclimatación. Las vitroplantas obtenidas, para lograr establecerlas in vivo, se transfirieron a macetas utilizando tierra y perlita (1:1), como sustrato, se cubrieron con plástico y se regaron con medio MS líquido (sin fitogel y sin sacarosa) 100%, con MS diluido con agua destilada en relación 1:1, 1:2, 1:3 y solo agua corriente cada tercer día durante dos semanas en cada dilución. Durante la aclimatación (10 semanas) se mantuvieron bajo las mismas condiciones de luz y temperatura que el cultivo in vitro. Después de las 2 semanas del riego con agua se les retiró el plástico que las cubría, se retiraron de la cámara bioclimática; se mantuvieron a la intemperie bajo condiciones ambientales y riego necesario con agua corriente.

4. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Prueba de viabilidad de la semilla. La prueba de viabilidad con tetrazolio (cloruro de 2,3,5, trifenil tetrazolio) al 0.5% se consideró positiva, al virar el reactivo incoloro a rojo, a las 48 horas (Figura 3)

Morfometría. Los valores promedio de los parámetros de morfometría obtenidos a partir de la medición y pesaje de 100 semillas de "níspero" *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl se muestran en la Tabla 1.

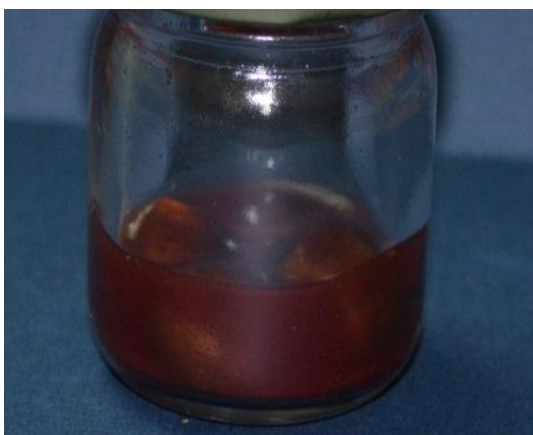
Parámetro	Peso	Largo	Ancho
Promedio	1.32 gramos	3.10 cm	1.26 cm

Tabla 1. Promedios de los parámetros largo y ancho (en centímetros); peso (en gramos) de 100 semillas de "níspero" *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl

Germinación in vitro. El inicio de la germinación in vitro de las semillas de "níspero" *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl se observó en todas las semillas del medio MS (1962) testigo (sin RCV) con la emergencia de radícula a los 10 días de la siembra. A partir de los 45 días se obtuvieron vitroplantas vigorosas y de color verde brillante (Figuras 4 y 5). En el medio MS con RCV germinaron unas pocas semillas a los 15 días de la siembra, pero no continuaron su desarrollo. En el agar no se presentó la germinación.

Aclimatación. Las vitroplantas obtenidas lograron aclimatarse fuera de las cámaras bioclimáticas en tierra y perlita (1:1) como sustrato a temperatura ambiente, riego con agua corriente (Fig. 6 y 7). Las plantas se transfirieron nuevamente a macetas de mayor capacidad con mismo sustrato y presentan una altura promedio de 1.15 m a 6 meses después de su aclimatación. (Figuras 8, 9 y 10).

Concluimos que la germinación *in vitro* del níspero *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl no requiere de RCV, ya que se obtuvo la germinación más rápido y plantas *in vitro* más vigorosas en el tratamiento testigo. Las plantas *in vitro* aclimatadas se establecieron fácil y exitosamente bajo las condiciones extremas de temperatura ambiente de la localidad ($25-38^\circ\text{C}$) resultando en el desarrollo de plantas bien desarrolladas, sanas y vigorosas.



Figuras 1 y 2 .Colectas de frutos de "níspero" Eriobotrya japónica (Thunb.) Lindl en la Cd Universitaria de la UANL y extracción manual de las semillas.

Figura 3. Prueba positiva de viabilidad con tetrazolio de las semillas de "níspero" Eriobotrya japónica (Thunb.) Lindl



Figuras 4 y 5. Vitroplantas de "níspero" Eriobotrya japónica (Thunb.) Lindl vigorosas y de color verde brillante a los 45 y 60 días de la siembra en medio MS (1962) testigo (sin RCV).



Figuras 6 y 7. Vitroplantas de "níspero" *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl transferidas a macetas utilizando tierra perlita (1:1), como sustrato. Izq inicio de la aclimatación, derecha: término de la aclimatación



Figuras 8,9 y 10. Las pantas de "níspero" *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl presentan una altura promedio de 1.15 m a los 6 meses después de su aclimatación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Constituents of Eriobotrya Japonica. A Study of Their Antiviral Properties. Nunziatina E Tommasi, France--Doe Simone, C Osimop m, Journal of Natural Products Vol. 55, No. 8. pp. 1067-1073. Aug 1992. 1067.
2. --Hurtado D.V. y E. Merino M. 1987. Cultivo de Tejidos Vegetales. Ed. Trillas. 1a. Edición. p. 94-97.
3. ISTA. 2010. Reglas Internacionales para el Ensayo de Semillas. Ministerio de Agricultura. Dirección General de Producción Agraria.
4. Murashige, T. & F. Skoog 1962. A Revised Medium For Rapid Growth and Bioassays With Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plantarum* 15:473-497.
5. Pérez Molphe Balch, Ramírez Malagón, Nuñez Palenius y Ochoa Alejo. (1999). Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes, México. pp.: 37-40, 47.

CULTIVO DE CONSORCIOS FOTOSINTÉTICOS EN AGUAS RESIDUALES PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA

Jaquelina González Castañeda, Citlaly Prado Martínez, Martha Verónica Almanza Estrada,
Gabriela Ana Zanor

Departamento de Ciencias Ambientales, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato, Ex Hacienda El Copal, km 9 Carretera Irapuato-Silao, Apdo. Postal 311, C.P. 36500, Irapuato, Guanajuato, México.

RESUMEN

El crecimiento de los microorganismos fotosintéticos, se ve afectado por la concentración de nutrientes en el medio de cultivo, como carbono, nitrógeno, fósforo, entre otros, estos nutrientes son transformados en biomasa, la cual puede tener aplicaciones biotecnológicas en la industria bioenergética, alimentaria y farmacéutica. El objetivo de la investigación fue evaluar la producción de biomasa de dos consorcios fotosintéticos, RL7 y LA11, cultivados en agua residual. Los consorcios se incubaron con fotoperiodos de 12 horas luz/oscuridad, durante quince días, expuestos a una irradiancia de $38\mu\text{Molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, con aireación. Se midió la densidad celular con la Cámara de Neubauer, la producción de biomasa por diferencia de peso, el contenido de clorofila y Demanda Química de Oxígeno (DQO) por espectrofotometría. El consorcio RL7 presentó la mayor densidad celular, 18×10^6 células mL^{-1} , en comparación con LA11 (17×10^6 células mL^{-1}). A los diez días la producción de biomasa fue similar en ambos consorcios (RL7 y LA11, 1313 y 1320 mgL^{-1} , respectivamente). El contenido de clorofila para ambos consorcios fue de 5 a 7.5 veces más, con respecto al testigo. La DQO mostró una disminución de 26.73 y 44.48% al día 2 de incubación, para RL7 y LA11, respectivamente. Los consorcios RL7 y LA11, representa una alternativa potencial en el tratamiento de aguas residuales y para la obtención de biomasa con valor agregado.

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día es innegable la existencia de un cambio climático a nivel planetario (Brennan & Owende 2010, Stager 2012). La magnitud de este fenómeno es tal, que forma parte de la agenda política de los estados y organismos internacionales (Chiu et al. 2011; Stager 2012). Cambio climático involucra, entre otros, sequías, inundaciones y/o acidificación de los océanos, a nivel local y global (Chen et al. 2011; Stager 2012), siendo la actividad humana la principal responsable, en especial, por la combustión de combustibles fósiles (Olguín 2003; Chen et al. 2011; Chiu et al. 2011; Stager 2012), impulsor del 80% de producción de energía (Chen et al. 2011). El rápido desarrollo industrial impone un alto riesgo a la disponibilidad y calidad de las aguas (Dominic et al. 2009; Abdel-Raouf et al. 2012) y del aire, debido a la cantidad de productos contaminantes generados, como nutrientes y CO_2 (Chiu et al. 2011; González-López et al. 2011; Abdel-Raouf et al. 2012). La contaminación de los cuerpos de agua radica en la eutrofización, que es causada por la liberación de compuestos orgánicos e inorgánicos al medio (Lavoie & de la Noüe 1985; Rawat et al. 2011).

Las microalgas son generalmente organismos fotoautótrofos, es decir, organismos que obtienen la energía de la luz proveniente del sol y se desarrollan a partir de materia inorgánica. Sin embargo,

algunas especies de microalgas son capaces de crecer empleando la materia orgánica como fuente de energía o de carbono.

La composición de las microalgas (su contenido en lípidos, carbohidratos y proteínas) es variable y puede ser manipulada mediante varios parámetros durante su proceso de cultivo. Las microalgas son las plantas con mayor crecimiento de la tierra (100 veces más rápido que los árboles) y pueden crecer en distintos ambientes tanto de pH como de temperatura.

El desarrollo de tecnologías orientadas al cuidado del medio ambiente, a la reutilización de los residuos y a la generación de energías limpias de bajo costo se ha tornado indispensable. Entre estas tecnologías, los cultivos de microalgas adquieren un gran protagonismo, al ser considerados eco-amigables (ecofriendly process), ya que reciclan eficientemente contaminantes desde medios líquidos y gaseosos (Olguín 2003; Dominic et al. 2009; Doušková et al. 2010, León & Chaves 2010; González-López et al. 2011; Rawat et al. 2011), incorporándolos a su metabolismo para generación de biomasa (Markou & Georgakakis 2011).

En comparación con otros sistemas de tratamientos de aguas, los cultivos de microalgas son considerados una tecnología de mediana complejidad, con desarrollo en escala de plantas pilotos (Flotats et al. 2011). Al tratarse de organismos vivos involucran una serie de parámetros (i.e., nutrientes, luz) que deben ser considerados, evaluados, determinados y medidos para realizar con éxito un cultivo.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Se tomaron las muestras de aguas residuales de dos sitios en recipientes de polietileno, con cierre hermético con un volumen aproximado de 20 L, se realizaron las pruebas de laboratorio inmediatamente o en su caso, se guardaron en refrigeración hasta la realización de las mismas, con base a la norma NMX-AA-003-1980.

Para la obtención de biomasa, se utilizaron, dos consorcios de microalgas-bacterias fotosintéticas dulceacuícolas, identificados como RL7 y LA11, de una colección de 10 consorcios, del Laboratorio de Biotecnología Ambiental, de la División de Ciencias de la Vida. Los consorcios se aislaron de cuerpos de agua dulce del Estado de Guanajuato. Se prepararon preinóculos con 30 mL de cada consorcio, adicionados a 270 mL de medio mínimo de Dubos, se incubaron a 25°C, con fotoperiodos de 12:12 horas (luz: oscuridad), a una irradiancia de $38\mu\text{Molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, con aireación y pH de 8.00, durante quince días. Posteriormente el preinóculo se adicionó a cada uno de los reactores con agua residual. Los sólidos sedimentables se realizaron con base a la norma NMX-AA-004-SCFI-2013.

Inoculación del consorcio en el agua residual de rastro urbano

Se inocularon 500 mL de cada consorcio fotosintético dulceacuícola (RL7 y LA11), ajustados a una absorbancia de 0.800, en reactores con 2500 mL de agua residual sin esterilizar, se incubaron a 25 °C, con fotoperiodos de 12:12 horas (luz: oscuridad), a una irradiancia de $38\mu\text{Molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ y aireación durante un periodo de quince días.

Cinética de crecimiento por conteo de células se realizó mediante la cámara de Neubauer. La medición de pH con base a la norma NMX-AA-008-SCFI-2011, con un potenciómetro marca Conductronic

Biomasa

Se realizaron muestreos cada cinco días, durante el periodo de incubación, la determinación se hizo por medio de filtración y posteriormente diferencia de peso.

Contenido de clorofila

Se realizó mediante la técnica de Gómez *et al.* (2009), cada 48h, la extracción se realizó con etanol al 90% y se leyó la absorbancia a 649 y 665 nm, en un espectrofotómetro marca Biospectrometer Eppendorf Kinetic El contenido de clorofila se determinó con las ecuaciones reportadas por Rowan (1989).

$$\text{Clorofila a} = 13.7(\text{Abs } 665\text{nm}) - 5.76(\text{Abs } 649\text{nm}) \quad \text{Ecuación (1)}$$

Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La determinación de la demanda química de oxígeno se realizó con base a la norma NMX-AA-030/2-SCFI-2011, mediante la adición de dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) y Sulfato de plata (Ag_2SO_4), se preparó un blanco usando una cantidad de agua equivalente a la alícuota de la muestra, se leyó la absorbancia a 620 nm, en un espectrofotómetro marca Biospectrometer Eppendorf Kinetic.

3. RESULTADOS

La Figura 1, muestra el comportamiento del pH en los consorcios fotosintéticos RL7 y LA11, inoculados en el agua residual R1, como puede observarse, los dos consorcios mostraron un comportamiento similar en el pH, en con valores entre 8 y 9, durante los quince días de incubación.

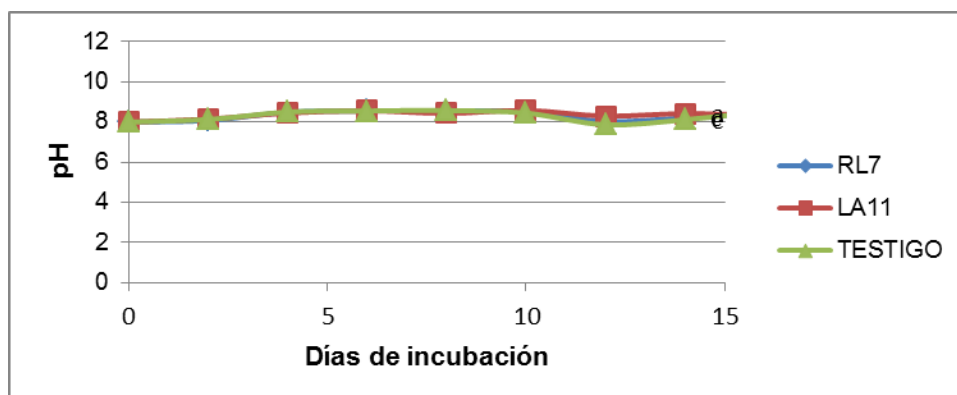


Figura 1. Comportamiento del pH de los consorcios fotosintéticos RL7 y LA11, inoculados en agua residual de rastro urbano urbano

La Figura 2, muestra la densidad celular en los consorcios fotosintéticos RL7 y LA11, como puede observarse, los consorcios muestran un crecimiento exponencial a partir del día cinco. RL7 mostró el mayor crecimiento de microorganismos al día quince, con un valor de 18×10^6 celmL⁻¹.

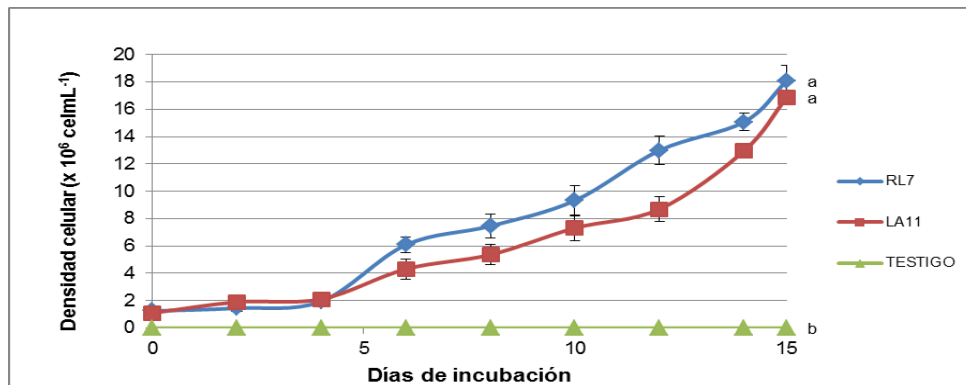


Figura 2. Densidad celular de los consorcios fotosintéticos RL7 y LA11, inoculados en agua residual de rastro urbano

La producción de biomasa de los consorcios fotosintéticos RL7 y LA11 se muestra en la Figura 3, como puede observarse, los consorcios muestran la mayor producción de biomasa seca con un valor de 1300 mgL⁻¹, al día diez de incubación.

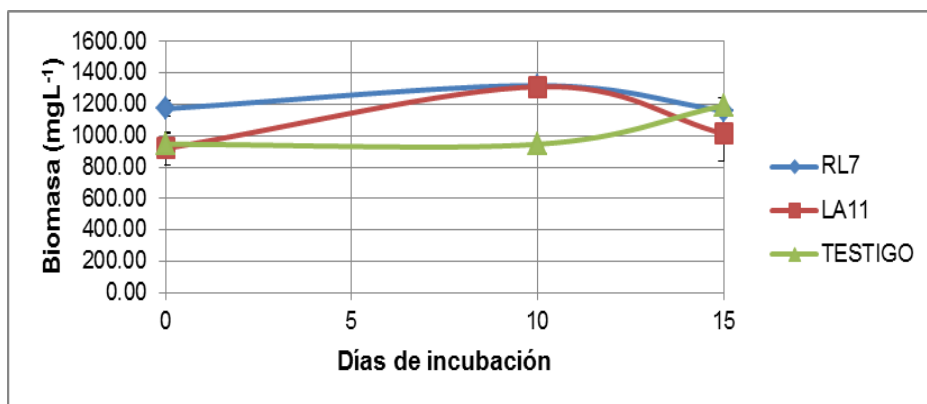


Figura 3. Biomasa de los consorcios fotosintéticos RL7 y LA11, inoculados en agua residual de rastro urbano

La Figura 4, muestra el contenido de clorofila en los consorcios fotosintéticos RL7 y LA11, como puede observarse, RL7 y LA11 muestran un contenido de clorofila entre 4 y 5 veces más con respecto al testigo a los quince días de incubación.

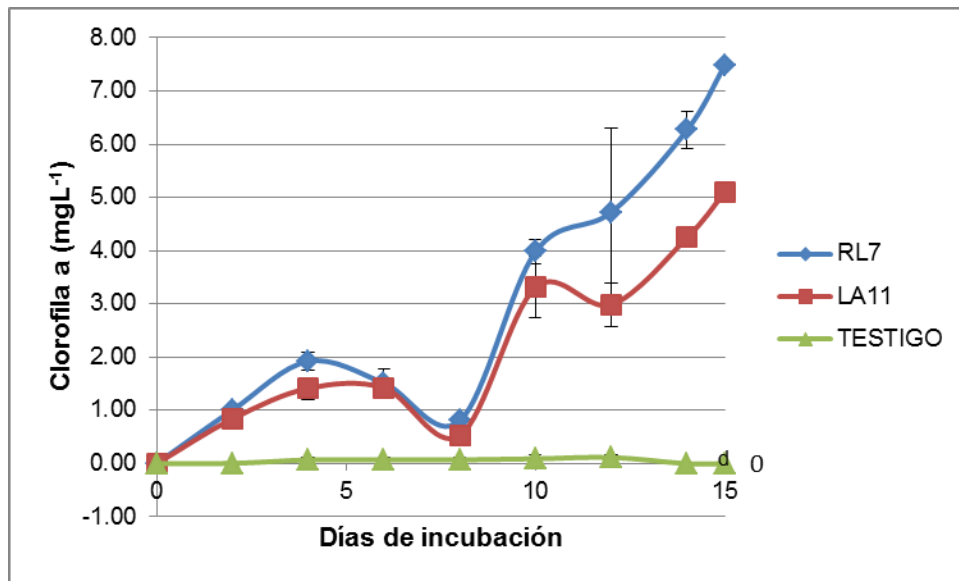


Figura 4. Contenido de clorofila a de los consorcios fotosintéticos RL7 y LA11, inoculados en agua residual de rastro urbano

La Figura 5, muestra la DQO de los consorcios fotosintéticos RL7 y LA11, como puede observarse, la tendencia de ambos es similar durante los quince días de incubación. Con una disminución de la DQO para ambos consorcios, de aproximadamente el 50%.

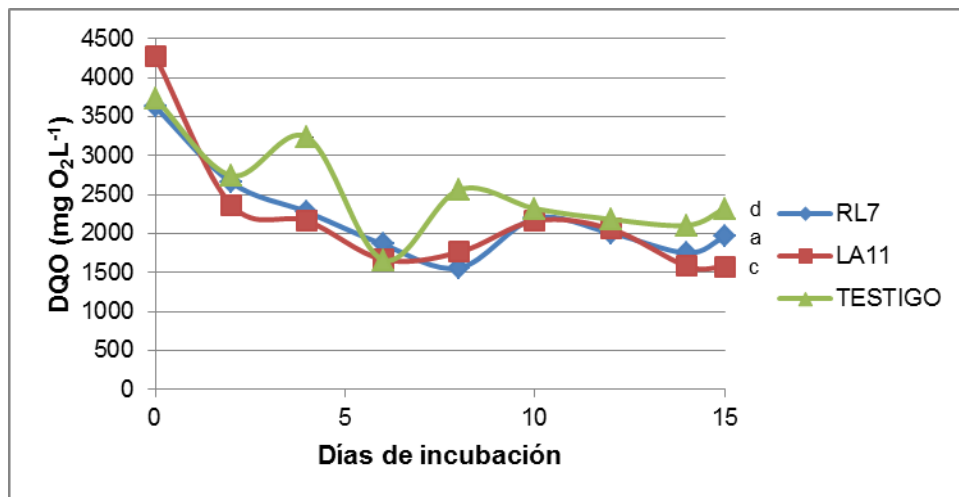


Figura 5. DQO de los consorcios fotosintéticos RL7 y LA11, inoculados en agua residual de rastro urbano

4. CONCLUSIONES

El agua residual favorece el crecimiento de RL7 y LA11, la mayor producción de biomasa se obtuvo en RL7, lo que representa una alternativa potencial para la obtención de productos con valor agregado y en el tratamiento de aguas residuales.

El agua residual permite el crecimiento de los consorcios microalga-bacteria RL7 y LA11, el mayor número de células y contenido de clorofila se obtuvo en RL7, ambos consorcios mostraron la capacidad para reducir la DQO del agua residual, siendo una alternativa para la reutilización de las aguas residuales de rastro, obteniendo un producto con valor agregado como es la biomasa de microorganismos fotosintéticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abdel-Raouf N, AA Al-Homaidan & IBM Ibraheem. 2012. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences* 19: 257-275.
2. Brennan L & P Owende. 2010. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 557-577.
3. Chiu S-Y, C-Y Kao, T-T Huang, C-J Lin, S-C Ong, C-D Chen, J-S Chang & C-S Lin. 2011. Microalgal biomass production and on-site bioremediation of carbon dioxide, nitrogen oxide and sulfur dioxide from flue gas using *Chlorella* sp. cultures. *Bioresource Technology* 102: 9135- 9142.
4. Dominic VJ, S Murali & MC Nisha. 2009. Phycoremediation efficiency of three algae *Chlorella vulgaris*, *Synechocystis salina* and *Gloeocapsa gelatinosa*. *Academic Review* 16(1- 2): 138-146.
5. Doušková I, F Kaštánek, Y Maléterová, P Kaštánek, J Doucha & V Zachleder. 2010. Utilization of distillery stillage for energy generation and concurrent production of valuable microalgal biomass in the sequence: Biogascogeneration-microalgae-products. *Energy Conversion and Management* 51: 606-611.
6. Flotats X, HL Foged, AB Blasi, J Palatsi, A Magri & KM Schelde. 2011. Manure Processing Activities in Europe - Project reference: ENV.B.1/ETU/2010/0007 Manure Processing Technologies. Technical Report 2, European Commission, Directorate-General Environment, 184 pp.
7. González-López CV, FG Acién, JM Fernández-Sevilla & E Molina. 2011. Uso de microalgas como alternativa a las tecnologías disponibles de mitigación de emisiones antropogénicas de CO₂. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental Algal* 2(2): 93-106.
8. Lavoie A & J de la Noüe. 1985. Hyperconcentrated cultures of *Scenedesmus obliquus*: A new approach of wastewater biological tertiary treatment? *Water Research* 19(11): 1437-1442.
9. León C & D Chaves. 2010. Tratamiento de residual vacuno utilizando microalgas, la lenteja de agua *Lemna aequinoctiales* y un humedal subsuperficial en Costa Rica. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental Algal* 1(2): 155-177.
10. Markou G & D Georgakakis. 2011. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy* 88: 3389-3401.
11. NMX-AA-003-1980. Aguas residuales, municipales e industriales. Muestreo. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 25 de marzo de 1980.

12. NMX-AA-004-SCFI-2013. Análisis de agua - medición de sólidos sedimentables en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - Método de prueba. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 13 de noviembre de 2013.
13. NMX-AA-008-SCFI-2011. Análisis de agua - Determinación del pH - Método de prueba. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 5 de octubre de 2011.
14. NMX-AA-030/2-SCFI-2011. Análisis de agua - Determinación de la demanda química de oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - Método de prueba - Parte 2 - Determinación del índice de la demanda química de oxígeno – Método de tubo sellado a pequeña escala. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 27 de junio de 2013.
15. Olguín EJ. 2003. Phycoremediation: key issues for costeffective nutrient removal processes. *Biotechnology Advances* 22: 81-91.
16. Rawat I, R Ranjith-Kumar, T Mutanda & F Bux. 2011. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy* 88: 3411-3424.
17. Stager C. 2012. El futuro profundo: Los próximos 100.000 años de vida en la Tierra, 358 pp. Editorial Crítica, Barcelona.

USO DE DIFERENTES PELÍCULAS DE EMPAQUE PARA CONSERVAR LA CALIDAD POSCOSECHA DE FLOR DE CALABAZA (*Cucurbita máxima*)

Elia Nora Aquino-Bolaños¹, Quetzabel Moreno Mayorga, Arelly Capistran Carabarin, Rubén Corona Velázquez, Vicente Velásquez Melgarejo¹ y José Luis Chávez Servia²

1 Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Veracruzana, Dr. Rafael Sánchez Altamirano S/N, Industrial Animas, Xalapa, 91192, Veracruz, México. 2 Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR Unidad Oaxaca, Hornos No. 1003, Santa Cruz Xoxocotlan, 71230 Oaxaca, México

RESUMEN

En México, la flor de calabaza es altamente empleada en la elaboración de platillos tradicionales y algunas recetas sofisticadas. Pero su corta vida de anaquel (un día a temperatura ambiente) representa un problema para su comercialización, lo que limita su adquisición únicamente en mercados locales. En el presente trabajo se estudiaron los cambios en su composición química y calidad subjetiva de la flor de calabaza (*Cucurbita maxima*) durante 12 días de almacenamiento poscosecha a 5 °C en una atmósfera modificada de empaque (AME; 5% O₂, 10% CO₂ y N₂ como balance) con cuatro diferentes películas plásticas de Polipropileno Biaxialmente Orientado (PBO), Poliamida/Poliestireno (PA/PS), Poliamida (PA) y laminado de Polietileno tereftalato/Polietileno (PET/PE). El contenido de azúcares totales (inicial = 7.22 mg·g⁻¹) disminuyó durante el almacenamiento, en mayor proporción en PET/PE y PA que perdió casi el 60% después de seis días. PET/PE y PA/PS mostraron un sustancial decremento de ácido ascórbico (inicial 0.18 mg·g⁻¹) perdiendo alrededor del 70% en el día 8, PBO y PA también disminuyeron sus niveles pero en menor proporción. En el día 3, el pH incrementó de 4.2 a 6.3 unidades, en todos los tratamientos. La presencia de zonas acuosas y la pérdida de turgencia fueron las principales causas de la pérdida de calidad subjetiva. El uso de la película de PBO extendió la vida de anaquel de las flores de calabaza hasta por 12 días. Durante su almacenamiento poscosecha, las flores de calabaza experimentaron profundos cambios en su composición química y calidad subjetiva, confirmando su alta perecibilidad. No obstante, el uso de la atmósfera modificada de empaque y la película PBO retardaron notablemente la pérdida de la calidad poscosecha de flor de calabaza manteniendo su condición de comercializable hasta por doce días.

1. INTRODUCCIÓN

Las flores de calabaza se caracterizan por su textura suave y sabor delicado ligeramente dulce, por lo cual es un ingrediente apreciado en la gastronomía de diversas culturas. En México, la mayoría de las flores comestibles de las plantas nativas son colectadas y consumidas localmente en la región y en la estación de floreo. Las flores de calabaza, sin embargo, tienen gran demanda durante todo el año y en la actualidad la planta es cultivada por sus frutos, así como también por sus flores (Sotelo *et al.*, 2007). Las flores se consumen en diferentes formas: en tacos o quesadillas, crudas en ensalada, cocidas al vapor o en sopa con otras hortalizas.

Las flores de calabaza contienen una gran cantidad de vitaminas B1, B2 y C, carotenos, hierro, fósforo y calcio (Talavera, 1999). A pesar que es ampliamente consumida, su comercialización esta limitada por su corta vida de anaquel, de 1-2 días a temperatura ambiente. Existen pocos datos disponibles acerca de sus atributos de calidad, la estabilidad de los nutrientes, así como

información de los tratamientos poscosecha para retardar la pérdida de calidad (Aquino-Bolaños *et al.*,2013; Villalta *et al.*, 2004).

La senescencia poscosecha es la mayor limitación para comercializar las flores cortadas (Bowyer *et al.* 2003). Las flores comestibles de diferentes especies responden de manera diferente al almacenamiento a bajas temperaturas (Kelley *et al.*,2003).

Las atmósferas modificadas involucran la alteración de los gases alrededor de un producto para producir una composición diferente a la del aire (Al-Ati y Hotchkiss, 2002); bajos niveles de O₂ y altos niveles de CO₂ podrían reducir la velocidad de respiración en los productos frescos, retrasando la senescencia y en consecuencia extendiendo su vida de anaquel. Estudios previos indicaron que con el uso de atmósferas controladas con 5% O₂ + 10% CO₂ + 85% N₂ ó 10% CO₂ + Aire puede prolongar la vida de anaquel de flor de Calabaza hasta por 16 días (Aquino-Bolaños *et al.*,2013) sin embargo no se tiene información del uso de atmósferas modificadas. El propósito de este estudio fue evaluar los cambios en la composición y calidad subjetiva de la flor de calabaza durante su almacenamiento poscosecha bajo una atmosfera modificada de empaque y cuatro diferentes películas plásticas.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal (flores)

Las flores de calabaza (*Cucurbita máxima*) en estado de madurez comercial (completamente abiertas) fueron obtenidas de un productor local en Tulancingo, Hidalgo, México. Para reducir la variabilidad natural entre las flores estudiadas, se seleccionadas aquellas de color y tamaño uniforme y que estuvieran libres de defectos físicos.

Condiciones de almacenamiento

Lotes de cuatro flores fueron colocados en bolsas (0.17 x 0.30 m) de diferentes películas poliméricas, y se utilizó una empacadora con inyección de gas (VC999 Mod. CH-9100, Inauen Maschinen AG, Herisau, Switzerland) para desplazar el 60% del aire de la bolsa y sustituirlo con una atmósfera compuesta de 5% O₂, 10% CO₂ y 85% N₂ (INFRA S.A. de C.V., México). Cuatro películas (RAMZ, México) fueron utilizadas como material para formar las bolsas: Polipropileno Biaxialmente Orientado (PBO) (15 µm espesor), Poliamida/Poliestireno (PA/PS) (38 µm espesor), Poliamida (PA) (37 µm espesor); y laminado de Polietilen tereftalato/Polietileno (PET/PE) (45 µm espesor). Las flores empacadas fueron almacenadas en una cámara ambiental a 5 ± 1 °C y 90% H.R. Seis bolsas fueron tomadas de cada tratamiento (película de empaque) después de 0, 3, 6, 8, 10 y 12 días y se evaluaron en las flores intactas los parámetros subjetivos de calidad visual, firmeza y pudrición macroscópica. Los pétalos de ocho flores por tratamiento y periodo de muestreo fueron homogenizados para analizar por triplicado el contenido de azúcares totales, azúcares reductores, sólidos solubles totales, ácido ascórbico, pH y acidez titulable.

Métodos analíticos

Azúcares totales y reductores. La extracción de los azúcares se realizó homogenizando 1 g de tejido fresco con 9 ml de etanol al 95% durante 30 s, el homogenizado se dejó reposar durante 12 h a -20 °C; el sobrenadante fue separado para analizar el contenido de azúcares totales y azúcares reductores. Los azúcares totales fueron cuantificados siguiendo el método fenol-sulfúrico de Dubois *et al.* (1956). Una curva estándar de glucosa (0-100 mg·l⁻¹) fue utilizada para cuantificar los azúcares totales y los resultados fueron reportados en mg·g⁻¹ tejido fresco (tf). Los azúcares reductores fueron cuantificados utilizando 1 ml del extracto etanólico adicionado de 1 ml de reactivo de cobre y calentado en un baño de agua a 85 °C durante 10 min, se dejó enfriar y se agregó 1 ml de una solución de arseno-molibdato, la mezcla fue agitada con un vortex; posteriormente, se dejó reposar durante 30 min en la oscuridad antes de leer su absorbancia a 560

nm. Una curva estándar de glucosa ($0-150 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) fue utilizada para cuantificar los azúcares reductores y los resultados fueron reportados en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ tf (Nelson, 1944).

Ácido ascórbico (vitamina C). El contenido de ácido ascórbico fue analizado tomando como referencia la técnica descrita por Miller (2003) y reportado como $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ tf.

Sólidos solubles totales y pH. Las mediciones de sólidos solubles totales fueron realizadas colocando 2 gotas de jugo del tejido sobre el prisma de un refractómetro digital (ATAGO 0-32%, Honcho, Itabashi-ku, Tokyo, Japan) previamente calibrado con agua destilada y los resultados fueron expresados como grados Brix ($^{\circ}\text{B}$). Para la determinación de pH, 5 g de tejido fueron homogenizados con 50 ml de agua destilada durante 30 s, se filtró y se tomó la lectura directamente en un potenciómetro (Thermo Orion 420A, Orion, Boston, USA). La acidez titulable fue determinada con hidróxido de sodio 0.01 N y reportada como $\text{g ácido cítrico}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ tf.

Evaluación subjetiva

Para estimar la vida de anaquel de la flor de calabaza bajo las condiciones estudiadas, se evaluó su calidad subjetiva a través de los parámetros de calidad visual, textura y pudrición macroscópica. Una escala de 1 a 9 fue utilizada evaluar la calidad visual, una calificación de 5 fue considerada como límite de comercialización (el final de su vida de anaquel): 9 = excelente, esencialmente libre de defectos; 7 = buena, defectos menores; 5 = regular, defectos moderados; 3 = pobre, defectos severos; 1 = extremadamente pobre, múltiples defectos. La textura fue evaluada en una escala de 1 a 5: 5 = firme y turgente; 4 = firme, 3 = moderadamente firme, 2 = flácida, 1 = indeseable, muy flácida. La escala para la pudrición macroscópica fue de 1 a 5: 1 = no se presenta; 2 = ligera; 3 = moderada; 4 = moderadamente severa y 5 = severa.

Análisis de datos

La unidad experimental consistió de dos bolsas (ocho flores). Tres réplicas por tratamiento fueron analizadas para cada día y las determinaciones fueron realizadas por triplicado. Para evaluar la significancia de las diferencias entre las medias se utilizó la prueba de Tukey a un nivel $p < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete Statistica ver. 8.0 (StatSoft, Inc. Tulsa, OK, USA).

3. RESULTADOS

Parámetros subjetivos

La calidad visual en las flores de calabaza disminuyó durante el almacenamiento (Figura 1A), en mayor proporción en los tratamientos de PA y PET/PE que, en el día ocho, fueron calificadas como regular y pobre, principalmente debido a la aparición de zonas acuosas en el tejido. Las flores en los tratamientos de PBO Y PA/PS fueron evaluadas con calidad visual entre excelente y buena en el día ocho, alcanzando su límite de comercialización en el día doce.

Los cambios en la textura durante el almacenamiento fueron principalmente debido a la pérdida de firmeza y turgencia de los pétalos. La mayor la pérdida de textura en las flores almacenadas durante ocho días se observó en los tratamientos de PA (moderada) y PET/PE (indeseable) (Figura 1B). Las flores en los tratamientos de PBO y PA/PS tuvieron calificaciones de moderadamente firme en el día ocho (sin diferencias entre ellas), después de este periodo y hasta el final del almacenamiento la textura fue calificada como moderadamente firme (PBO) y flácida (PA/PS).

No se observó pudrición macroscópica en las muestras almacenadas en los tratamientos de PBO, PA/PS y PA en los primeros diez días y en el día doce este parámetro fue calificado como ligero. En el tratamiento de PET/PE, por el contrario, la pudrición macroscópica se observó a partir del día tres y alcanzó una calificación de moderada en el día ocho.

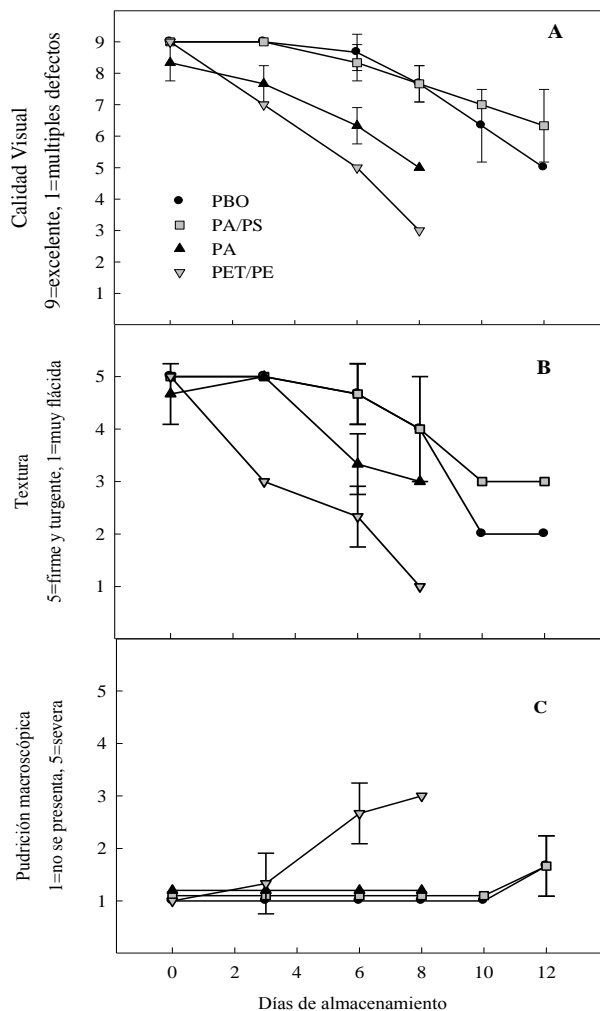


Figura 1. Calidad visual (A), textura (B) y pudrición macroscópica (C) en flor de calabaza almacenada a 5 °C y utilizando las películas de Polipropileno Biaxialmente Orientado (PBO), Poliamida/Poliestireno (PA/PS), Poliamida (PA) y laminado de Polietileno tereftalato/Polietileno (PET/PE) como material de empaque. Cada punto es el promedio de tres replicas por película \pm desviación estándar.

Parámetros objetivos

El contenido de azúcares totales (contenido inicial = $7.22 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ tf}$) descendió durante el almacenamiento (Tabla 1). Los tratamientos de PA y PET/PE perdieron el 76 y el 72% de los azúcares en el día ocho. En este mismo periodo, los tratamientos de PBO y PA/PS perdieron el 51.8 y el 41.55%. El contenido de azúcares reductores (contenido inicial = $4.1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ tf}$) disminuyó en mayor proporción en el tratamiento PA, en el día ocho registró un valor de $1.4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ tf}$ (Tabla 1). Solo se observó diferencia significativa entre PBO y PA/PS en el día diez, en el que PBO tuvo un mayor contenido de azúcares reductores.

El contenido de sólidos solubles totales (SST), medidos como $^{\circ}\text{Brix}$, en el tiempo inicial fue de 3.53°B , durante el almacenamiento sólo se observó diferencia significativa, después de ocho y diez días, en los tratamientos de PET y PA/PS, respectivamente (Tabla 2). Hasta el día seis, no se observaron cambios significativos en el contenido de ácido ascórbico (contenido inicial = $0.18 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de tejido fresco) en los tratamientos de PBO, PA/PS y PA (Tabla 2). En el día ocho, los tratamientos de PET/PE y PA/PS perdieron alrededor del 70% de su contenido, el tratamiento de PBO 22% y el tratamiento PA 16%.

TABLA 1. Azúcares totales y reductores en flor de calabaza almacenada a 5 °C y utilizando diferentes películas como material de empaque

Tiempo (días)	Azúcares totales (mg glucosa·g ⁻¹)				Azúcares reductores (mg glucosa·g ⁻¹)			
	PBO	PA/PS	PA	PET	PBO	PA/PS	PA	PET
0	7.22 ^{A,a}	7.22 ^{A,a}	7.22 ^{A,a}	7.22 ^{A,a}	4.11 ^{A,a}	4.11 ^{A,a}	4.11 ^{A,a}	4.11 ^{A,a}
3	4.26 ^{B,a}	5.24 ^{AB,a}	5.15 ^{AB,a}	6.07 ^{A,a}	4.02 ^{A,a}	3.90 ^{A,a}	3.59 ^{A,a}	4.02 ^{A,a}
6	3.79 ^{B,a}	4.94 ^{BC,a}	4.05 ^{BC,a}	2.78 ^{B,a}	3.62 ^{AB,a}	3.48 ^{A,a}	2.56 ^{AB,a}	3.62 ^{A,a}
8	3.48 ^{B,ab}	4.22 ^{BC,a}	1.76 ^{C,b}	2.02 ^{B,b}	2.69 ^{BC,a}	2.99 ^{AB,a}	1.40 ^{B,a}	2.15 ^{B,a}
10	3.44 ^{B,a}	3.27 ^{BC,a}	-	-	1.98 ^{CD,a}	1.30 ^{B,b}	-	-
12	3.39 ^{B,a}	3.06 ^{C,a}	-	-	0.70 ^{D,a}	1.03 ^{B,a}	-	-

^{A,B} Para cada parámetro, medias en el mismo renglón con diferente letra mayúscula son significativamente diferentes ($p < 0.05$); ^{a,b} Medias en la misma columna con diferente letra minúscula son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En el día 3, el pH inicial (4.2) incrementó drásticamente hasta 6.3 en todos los tratamientos (Tabla 3); subsecuentemente el incremento fue más lento, obteniendo valores de 6.5 a 6.7, en el día ocho, sin observar diferencias entre los tratamientos. La acidez titulable mostró diferencia significativa, respecto del contenido inicial (0.108 g ácido cítrico/100 g tf) sólo después de diez y doce días en los tratamientos de PBO y PA/PS, respectivamente.

TABLA 2. Sólidos solubles totales y ácido ascórbico en flor de calabaza almacenada a 5 °C y utilizando diferentes películas como material de empaque

Tiempo (días)	Sólidos solubles totales (°B)				Ácido ascórbico (mg·g ⁻¹)			
	PBO	PA/PS	PA	PET	PBO	PA/PS	PA	PET
0	3.53 ^{A,a}	3.53 ^{A,a}	3.53 ^{A,a}	3.53 ^{A,a}	0.183 ^{A,a}	0.183 ^{A,a}	0.183 ^{A,a}	0.183 ^{A,a}
3	3.30 ^{A,ab}	3.43 ^{A,a}	2.63 ^{A,b}	3.10 ^{AB,ab}	0.170 ^{AB,a}	0.173 ^{A,a}	0.174 ^{A,a}	0.165 ^{A,a}
6	3.23 ^{A,a}	3.36 ^{A,a}	2.80 ^{A,a}	3.07 ^{AB,a}	0.160 ^{ABC,a}	0.165 ^{A,a}	0.168 ^{AB,a}	0.060 ^{B,b}
8	3.60 ^{A,a}	3.10 ^{AB,ab}	2.80 ^{A,b}	2.67 ^{B,b}	0.142 ^{BC,a}	0.053 ^{B,b}	0.153 ^{B,a}	0.056 ^{B,b}
10	3.50 ^{A,a}	2.53 ^{B,a}	-	-	0.127 ^{CD,a}	0.048 ^{B,b}	-	-
12	3.60 ^{A,a}	2.53 ^{B,b}	-	-	0.103 ^{D,a}	0.047 ^{B,b}	-	-

^{A,B} Para cada parámetro, medias en el mismo renglón con diferente letra mayúscula son significativamente diferentes ($p<0.05$); ^{a,b} Medias en la misma columna con diferente letra minúscula son significativamente diferentes ($p<0.05$).

DISCUSIÓN

Calidad Subjetiva

Uno de los parámetros más importantes en la decisión de compra de los consumidores es la calidad subjetiva que perciben del producto en el momento de adquirirlos. Bajo las condiciones del presente estudio, el material de empaque tuvo un efecto significativo sobre la calidad visual, la textura y la pudrición macroscópica de las flores de calabaza. Con las películas de PBO y PA/PS, el límite de comercialización fue en el día doce, mientras que con PA este fue en el día ocho y con PET/PE fue en el día seis. Los resultados de las películas PA y PET/PE son similares a los reportado por Villalta et al. (2004) quien indicó que la flor de calabaza (*Cucurbita pepo*) almacenada en contenedores de poliestireno a 2.5 y 5 °C, se mantuvo comercializable por un periodo de siete días.

TABLA 3. pH y acidez titulable en flor de calabaza almacenada a 5 °C y utilizando diferentes películas como material de empaque

Tiempo (días)	pH				Acidez titulable (g ácido cítrico·100 g ⁻¹)			
	BOPP	PA/PS	PA	PET	BOPP	PA/PS	PA	PET
0	4.20 ^{C,a}	4.20 ^{C,a}	4.20 ^{B,a}	4.20 ^{C,a}	0.108 ^{ABC,a}	0.108 ^{AB,a}	0.108 ^{A,a}	0.108 ^{A,a}
3	6.31 ^{B,a}	6.21 ^{B,a}	6.36 ^{A,a}	6.32 ^{B,a}	0.118 ^{AB,a}	0.103 ^{AB,a}	0.114 ^{A,a}	0.093 ^{A,a}
6	6.35 ^{B,a}	6.39 ^{AB,a}	6.46 ^{A,a}	6.75 ^{A,a}	0.133 ^{A,a}	0.116 ^{AB,a}	0.120 ^{A,a}	0.112 ^{A,a}
8	6.51 ^{AB,a}	6.52 ^{AB,a}	6.49 ^{A,a}	6.72 ^{AB,a}	0.120 ^{A,a}	0.129 ^{A,a}	0.105 ^{A,a}	0.104 ^{A,a}
10	6.62 ^{AB,a}	6.68 ^{AB,b}	-	-	0.090 ^{BC,b}	0.106 ^{AB,a}	-	-
12	6.77 ^{A,a}	6.88 ^{A,b}	-	-	0.085 ^{C,a}	0.085 ^{B,a}	-	-

^{A,B} Para cada parámetro, medias en el mismo renglón con diferente letra mayúscula son significativamente diferentes ($p<0.05$); ^{a,b} Medias en la misma columna con diferente letra minúscula son significativamente diferentes ($p<0.05$).

Calidad Objetiva

El contenido de azúcares en los vegetales de hojas y flores es generalmente bajo, los resultados del presente estudio muestran que la flor de calabaza presenta niveles aún más bajos que otras flores comestibles como brócoli (17 mg·g⁻¹) o coliflor (24 mg·g⁻¹) o al de otras hortalizas como lechuga (19.6 mg·g⁻¹), espinaca (22.7 mg·g⁻¹) y col (26.0 mg·g⁻¹) (Cano et al., 2005; Maness y Perkins-Veazie, 2003). El bajo contenido de azúcares en flor de calabaza puede ser un factor limitante en su vida de anaquel debido a que éstos compuestos son utilizados en las principales rutas de la respiración para proveer de energía al tejido después de la cosecha (Maness y Perkins-

Veazie, 2003). Villalta et al. (2004) reportó para la flor de calabaza una velocidad de respiración de $76 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ durante su almacenamiento a $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y de acuerdo a la clasificación realizada por Kader (2002), es extremadamente alta; el alto consumo de sustratos durante la respiración podría explicar la rápida disminución de los azúcares totales y reductores observados durante el almacenamiento de esta flor. La disminución de los azúcares totales y reductores esperaría que se relacionara con el contenido de $^{\circ}\text{B}$, sin embargo este parámetro mostró pocos cambios, estos resultados coinciden con lo señalado por McCombs et al. (1976) quienes indicaron que en los vegetales que contienen sólidos solubles totales $< 5\%$, los $^{\circ}\text{B}$ no representan adecuadamente el total de los azúcares; esta falta de relación pudiera explicarse por la presencia de los ácidos orgánicos, pectinas solubles y aminoácidos que están involucrados en la determinación de los sólidos solubles totales (Mitcham y Kader, 1998).

En la nutrición humana, la vitamina más importante suministrada por las frutas y hortalizas es la vitamina C, más del 90% de esta vitamina en la dieta humana proviene de estas fuentes (Lee y Kader, 2000). La flor de calabaza es una buena fuente de vitamina C (Kiple y Ornelas, 2000; Talavera, 1999), los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con estos autores ya que el contenido de ácido ascórbico (la principal forma activa de vitamina C) observado fue mayor al reportado para otras hortalizas como la alcachofa, el apio, el poro y la lechuga; sin embargo, sus niveles son menores al encontrado en el brocoli o la coliflor (Wang, 2003). El contenido de ácido ascórbico disminuyó rápidamente bajo los tratamientos de almacenamiento estudiados, solamente el tratamiento de PBO retuvo más del 50% de su contenido inicial. Si bien es cierto que el contenido de ácido ascórbico no representa una evaluación nutricional completa, este compuesto es muy lábil y podría utilizarse como un indicador de los cambios en la calidad nutricional (Perrin y Gaye, 1986).

La pérdida de turgencia del tejido, la aparición de zonas acuosas, la disminución rápida de azúcares totales y reductores y la pérdida de ácido ascórbico observados en la flor de calabaza durante su almacenamiento a $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ coinciden con los síntomas descritos para productos que han sufrido daño por frío (Hodges y Toivonen, 2008), por lo que podría sugerirse la incidencia de este desorden fisiológico en la flor de calabaza; sin embargo, se requieren estudios específicos a este respecto.

4. CONCLUSIONES

Durante su almacenamiento poscosecha, la flor de calabaza experimentó profundos cambios en su composición química y calidad subjetiva, confirmando su alta perecibilidad. No obstante, el uso de la atmósfera modificada de empaque y la película de empaque PBO retardaron notablemente la pérdida de la calidad en la flor de calabaza, manteniendo su condición de comercializable hasta por doce días.

BIBLIOGRAFÍA

1. T. Al-Ati, J.H. Hotchkiss, "Application of packaging and modified atmosphere to fresh-cut fruits and vegetables," in *Fresh-cut and vegetables*. Science, Technology and market" (CRC Press, Boca Raton, Fl, 2002). Chapter 10, pp 311-344
2. E.N. Aquino-Bolaños, T.A. Urrutia-Hernández, M. López del Castillo-Lozano, J. L.Chavéz-Servia, I. Verdalet-Guzmán, "Physicochemical parameters and antioxidant compounds in edible squash (Cucurbita pepo) flower stored under controlled atmospheres". *Journal of Food Quality*. Vol. 36, 2013, pp. 302-308. ISSN: 1745-4557

3. M.C. Bowyer, R.B.H. Wills, D. Badiyan, V.V.V. Ku. "Extending the postharvest life of carnations with nitric oxide-comparison of fumigation and *in vivo* delivery". *Postharvest Biol. Technol.* 30,2003, pp 281-286.
4. M.P. Cano, C. Sánchez-Moreno, S.P.T. Begoña, "Procesado mínimo y valor nutricional". En *Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados*. González-Aguilar GA (Ed.). CIAD. Jalisco, México. 2005. pp. 125.
5. M. Dubois, K.A. Guilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smit. "Colorimetric methods for determination of sugars and related substances". *Anal. Chem.* Vol.28,1956, pp.350-356.
6. D.M. Hodges, P.M.A. Toivonen. "Quality of fresh-cut fruits and vegetables as affected by exposure to abiotic stress". *Postharvest Biol. Technol.* Vol.48, 2008, pp. 155-162.
7. A.A. Kader "Postharvest biology and technology an overview", In *Postharvest technology of horticultural crops*. (University of California. Oakland, CA. 2002) pp 40.
8. K.M. Kelley, A.C. Cameron, J.A. Biernbaum, K.L. Poff. "Effect of storage temperature on the quality of edible flowers". *Postharvest Biol. Technol.* Vol. 27. 2003, pp. 341-344.
9. K.F. Kiple, K.C. Ornelas "*The Cambridge World History of Food*" (Cambridge University Press. England, 2000).
10. S.K. Lee, A.A. Kader. "Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops". *Postharvest Biol. Technol.* Vol. 20, 2000, pp. 207-220.
11. N. Maness, P. Perkins-Veazi. "Soluble and storage carbohydrates", In *Postharvest physiology and pathology of vegetables*. (Mercel Dekker, New York, 2003).
12. C.L. McCombs, H.N. Sox, R.L. Lower. "Sugar and dry matter content of cucumber fruits". *Hort. Sci.* Vol.11,1976, pp. 245-247.
13. D.D. Miller, "Química de alimentos. Manual de laboratorio". (Limusa Wiley, México, 2003), pp. 83 – 91.
14. B. Mitcham, A.A. Kader. "Methods for determining quality of fresh horticultural commodities", In *Fresh-Cut Products: Maintaining Quality and Safety*. (UC Davis Postharvest Hort Series No. 10, 1998).
15. N. Nelson. "A photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose". *J Biol. Chem.* Vol. 153, 1944, pp. 380 -395.
16. P.W. Perrin, M.M. Gaye. "Effect of simulated retail display and overnight storage treatment on quality maintenance in fresh broccoli". *J Food Sci.* Vol. 51,1986, pp. 146-149.
17. A. Sotelo, S. López-García, F. Basurto-Peña. "Content of nutrient and antinutrient in edible flowers of wild plants in Mexico". *Plant Foods Hum Nutr.* Vol. 62, 2007, pp. 133-138.
18. H. Talavera. "*El poder curativo de las flores mexicanas*". (Selector, México. 1999), pp. 27-29.
19. A.M. Villalta, M. Ergun, A.D. Berry, N. Shaw, S.A. Sangent. "Quality changes of yellow summer squash blossoms (*Curcubita pepo*) during storage". *Acta Hort.* Vol. 659, 2004, pp. 831-834.
20. C.Y. Wang. "Leafy, floral, and succulent vegetables". In *Postharvest physiology and pathology of vegetables* (Mercel Dekker, New York, 2003), Chapter 23, pp. 602-625.
21. F.H. Witham, D.F. Blaydes, R.M. Devlin. " " (Van Nostrand Reinhold, New York,1971).

ELABORACIÓN DE TORTILLAS DE HARINA EXTENDIDAS CON SORGO

Ortega-Ramírez, R.¹ Salazar-García M.G.¹, López Ahumada G.A.¹ y Morales-Ortega A.²

¹Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora. Rosales y Boulevard Luis Encinas S/N, colonia centro. ²Universidad Estatal de Sonora.

RESUMEN

El sorgo puede utilizarse para varios productos alimenticios utilizando métodos de elaboración adecuados y seleccionando variedades con una mejor calidad de molturación que haga competitivo su empleo. Puede utilizarse eficazmente la tecnología de molturación del trigo para moler sorgo. En este estudio el objetivo es evaluar el efecto sobre las propiedades químicas, físicas y reológicas en la harina de trigo al adicionarle harina de sorgo, así como evaluar la calidad de las tortillas elaboradas a partir de mezclas trigo - sorgo por medio de pruebas de textura y características generales de la tortilla como son grosor, diámetro y peso. El grano de sorgo fue molido en un molino Quadrumat Senior, para lo cual se acondicionó a 16% de humedad por un tiempo de 2 horas. La harina obtenida fue mezclada con la harina de trigo a un nivel de 0, 10, 15 y 20% para producir tortillas. A estas mezclas se le determinó, proteína, cenizas así como farinogramas, amilogramas y color. La calidad de las tortillas fue evaluada por su grosor, peso y diámetro, así como en la textura medida instrumentalmente. Se encontró que los parámetros evaluados en los farinogramas y amilogramas fueron afectados a ($P < 0.05$), por la adición de la harina de sorgo, así como el índice de color. Además se observó que al incrementar la adición de sorgo mayor del 15%, las características de las tortillas se vieron afectadas significativamente así como su textura. Se concluye que se pueden producir tortillas de harina extendidas con harina de sorgo hasta en un 15%.

1. INTRODUCCION

En los países desarrollados el grano de sorgo es importante como alimento para ganado, pero en países subdesarrollados con superficies semiáridas el principal uso de este grano es para consumo humano. Algunas variedades de sorgo también pueden ser aprovechadas para producir combustibles como el etanol y en algunos lugares se usa para producir bebidas alcohólicas. El sorgo es el quinto cereal en el mundo por su producción y superficie cosechada. En México, la producción de sorgo creció entre 2013 y 2014, con un incremento de 33.1 por ciento, con lo que se alcanzó un nivel máximo histórico superior a ocho millones de toneladas (FIRA, 2015)

El sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) de color blanco y blanco-cremoso es una alternativa viable para la alimentación humana (Rooney et al., 1986). Actualmente se ha promoviendo mucho la producción y utilización del sorgo en panaderías como sustituto parcial de la harina de trigo. La composición química del sorgo es muy similar a la de otros cereales sin embargo esta varía mucho debido a que influyen mucho los factores ambientales y genéticos. Los sorgos con endospermo corneo (duro) generalmente producen buena calidad de atoles, mientras que el endospermo intermedio y suave son utilizados para preparar panes como injera y roti o tortilla (Surco, 2010). Para la preparación de tortillas se requieren de sorgos que se muelan fácilmente o bien se remueva su pericarpio y su germen fácilmente. La harina de sorgo puede utilizarse como un extensor en la harina de trigo para producir tortillas. Existen varios estudios en donde se ha

utilizado el grano de sorgo para consumo humano y se ha encontrado que puede sustituir a la harina de trigo hasta en un 15 % para producir pan (Torres, 1993). En el norte de México, la tortilla de harina de trigo es muy popular por esta razón se utilizó este producto para agregarle harina de sorgo. La tortilla de harina se consume rellena de diferentes alimentos como queso, vegetales y carne (Serna-Saldívar, et.al. 1988 y Ramírez, et.al. 2007). Las tortillas de buena calidad deben ser suave, opacas, flexibles, sin quebrarse cuando se doblan y de color claro (Bello, et.al., 1991; Waniska, et.al. 2004). Por lo anterior el presente trabajo tiene como objetivos estudiar las propiedades químicas, físicas y reológicas de la harina de trigo al adicionarle harina de sorgo, así como evaluar la calidad de las tortillas elaboradas a partir de las mezclas de trigo-sorgo, por medio de pruebas de textura y evaluación sensorial.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima. Se utilizó sorgo blanco variedad PP-290 libre de taninos y harina de trigo comercial. Para la elaboración de las tortillas se utilizaron los ingredientes: manteca vegetal marca INCA. Bicarbonato de sodio (marca Royal) y sal.

Elaboración de Mezclas. El grano de sorgo se acondicionó a 16% de humedad con un tiempo de reposo de 2 horas. Después de este tiempo el grano fue molido en un molino Quadrumat Senior obteniéndose la harina con un 63 % de extracción. Esta harina se le adicionó a la harina de trigo utilizando los niveles de 10, 15 y 20% y como control 100% de harina de trigo. Una vez elaboradas las mezclas se les determinó el contenido de proteína (método 46-13 AACC 2001), cenizas (método 08-03 AACC 2001) y color utilizándose los espectros azul y verde de un espectrofotómetro Agtron M-500. Además se le hizo a la harina amilogramas (método 22-10 AACC 2001) utilizando un amilógrafo marca Brabender, farinogramas (método 54-21 AACC 2001) utilizando un farinógrafo marca Brabender.

La elaboración de las tortillas se llevó a cabo con 300 g de harina, 45 g de manteca, 6 g de sal, 3 g de bicarbonato de sodio y la cantidad de agua fue la obtenida en el farinógrafo. El proceso que se utilizó para la elaboración de la tortilla fue el de prensa caliente. Para evaluar la calidad de las tortillas se le determinó textura utilizando un texturómetro Instron modelo 4465, usando la celda de Kramer con una velocidad de cabezal de 100mm/m, además se midió, el diámetro, peso y grosor así como una evaluación sensorial en donde se utilizó una escala hedónica del 1 al 5, donde 1 significa me disgusta mucho, 3 ni me gusta ni me disgusta y 5 me gusta mucho. Se evaluó color, sabor, textura y aceptación.

3. RESULTADOS

Evaluación química, física y reológica. El contenido de cenizas y de proteínas disminuyó al ir incrementando la adición de sorgo (Tabla 1). Este cambio puede ser debido a que el sorgo tiene menor cantidad de cenizas y proteína que la harina de trigo, ocasionando una disminución de estos parámetros.

Color. De acuerdo al análisis de varianza mostró que el color medido en los espectros azul y verde fueron afectados significativamente ($P \leq 0.05$) al adicionar harina de sorgo (Tabla 1). Este cambio de color fue bueno ya que se obtuvieron harinas más blancas y de buenas características mejor que el control (100% harina de trigo).

Farinogramas. La absorción de agua, el tiempo de desarrollo y la estabilidad fueron afectados significativamente ($P \leq 0.05$), por la adición de la harina de sorgo a la harina de trigo (Tabla 2). La absorción de agua y la estabilidad disminuyeron al adicionar más de 15% de harina de sorgo en cambio el tiempo de desarrollo tuvo un aumento. La absorción de agua disminuyó debido a que la harina de sorgo tiene menos proteína y al adicionar más de 15% a la harina de trigo las proteínas del gluten disminuyeron ocasionando además una menor estabilidad al mezclado.

Tabla 1. Contenido de proteína, cenizas y color de las mezclas de harina de trigo-sorgo.¹

Harina de Sorgo (%)	Proteína (%)	Cenizas (%)	Color	
			Azul	Verde
0	11.70a	0.65a	79.0c	94.1c
10	11.50b	0.65a	82.0a	93.0d
15	11.20c	0.64b	81.3b	95.0b
20	11.02d	0.63c	81.1b	95.5a

¹Dentro de la misma columna, medias con la misma letra no son significativamente diferentes a ($P \leq 0.05$)

Amilogramas. En la Tabla 2 se muestran los resultados de la viscosidad máxima en cada una de las mezclas. Los gránulos de almidón se hidratan cuando se suspenden en agua fría; si la suspensión se calienta se produce un hinchamiento mayor que rompe el gránulo y provoca que la amilosa y la amilopectina salgan fuera produciendo una suspensión viscosa. El aumento de la viscosidad al incrementar la harina de sorgo se puede deber a que durante el proceso de molienda el almidón se daña mecánicamente y al tipo de almidón que tiene este cereal.

Tabla 2. Parámetros evaluados en los farinogramas y la viscosidad máxima medida en los amilogramas de las mezclas trigo-sorgo.¹

Harina de Sorgo (%)	Absorción de agua (%)	Tiempo de Desarrollo (m)	Estabilidad (m)	Viscosidad Máxima (UB) ²
0	65.0a	7.0c	8.3b	620c
10	65.0a	7.1bc	9.7a	780b
15	63.9b	7.4ba	7.8b	810a
20	63.4c	7.8a	6.2c	820a

¹Dentro de la misma columna, medias con la misma letra no son significativamente diferentes a ($P \leq 0.05$)

²Unidades Brabender

Evaluación de la calidad de la tortilla

Características generales de la tortilla. A la tortilla se le midió su grosor, diámetro y peso. El grosor de la tortilla fue de 2.8 a 3.1 mm, el diámetro de 15.3 a 16.3cm y el peso de 33.63 a 35.20 g, como se muestra en la Tabla 3.

Evaluación de textura en la tortilla. La fuerza necesaria para cortar la tortilla (textura), se vio afectada significativamente a ($P \leq 0.05$). La fuerza de corte disminuyó al incrementar el nivel de adición de sorgo (Tabla 3). Esto puede ser debido a la composición química del sorgo el cual no contiene gluten y hace que la tortilla sea menos dura.

Tabla 3. Evaluación de la Calidad de las Tortillas por Grosor, Diámetro, Peso y Textura.¹

Harina de Sorgo (%)	Grosor (mm)	Diámetro (cm)	Peso (g)	Textura (KN)
0	3.1a	16.1a	33.63b	0.32a
10	3.0a	15.9a	34.96ab	0.28a
15	3.0a	15.5b	35.20a	0.26ab
20	2.8b	15.3b	34.33a	0.23b

¹Dentro de la misma columna medias con la misma letra no son significativamente diferentes a ($P \leq 0.05$)

Evaluación Sensorial. Esta evaluación se hizo con 30 panelistas no entrenados. Las tortillas elaboradas hasta con 15% de harina de sorgo tuvieron mejor color, sabor, textura y aceptación que el control.

4. CONCLUSIONES

Se obtuvieron tortillas con buenos atributos de color, sabor y textura; por lo que es posible utilizar harina de sorgo hasta en un 15% como un extensor de la harina de trigo para la formulación de tortillas.

BIBLIOGRAFÍA

1. A.B. Bello, S.O. Serna-Saldívar, R.D. Waniska and L.W. Rooney. Methods to prepare and evaluate wheat tortillas. *Cereal Food World*. 1991, 36:315-322.
2. B. Ramírez, C.E. Walker, A.I. Ledesma, P. Torres, C.L. Medina, G.A. López, M.G. Salazar, R. Ortega, A.M. Johnson and R. Flores. Effect of Flour Extraction Rate on White and Red Winter Wheat Flour Compositions and Tortillas Texture. *Cereal Chem*. 2007. 84(3) 207-2013.
3. Fira, 2015. Panorama Agroalimentario Sorgo 2015. Dirección de Investigación Evaluación Económica y Sectorial.
4. J.C. Surco Almendras y J.A. Alvarado. Harinas compuestas de sorgo y trigo para panificación. *Revista Boliviana de Química*. Vol 27. No. 1, Bolivia; Agosto 2010. Pp 1-10.

5. P. Torres, B. Ramírez, S.O. Serna, and L.W. Rooney. Effect of Sorghum Addition on the Characteristics of Wheat flour Tortillas. *Cereal Chem.* 1993. 70:8-13.
6. R.D. Waniska, M. Cepeda, B. Sullims, J.L. Adams, L.I.W.Rooney and P. Torres. Effects of Flours Properties on Tortilla Qualities. *Cereal Food World.* 49(4). 2004, 237-244.
7. S.O. Serna-Saldívar, L.W. Rooney, and R.D. Waniska. Wheat Flour Tortilla Production. *Cereal Food World.* 1988. 33:855-863.
8. Y. Pomeranz. Chemical composition of kernel structures. In *Chemistry and Technology.* Vol.I. Y. Pomeranz, ed. AACC International, St. Paul MN. 1988. P. 97-158

NITRÓGENO FOLIAR EN CHILE CHILHUACLE POR EFECTO DE RADIACIÓN DE LA SEMILLA CON EL ISÓTOPO CO⁶⁰ Y DEL POTENCIAL OSMÓTICO DE LA SOLUCIÓN NUTRITIVA

Víctor García-Gaytán^a, Fernando C. Gómez-Merino^b, Gustavo A. Baca-Castillo^a, Libia I. Trejo-Téllez^a, Soledad García-Morales^a y Olga Tejeda-Sartorius^a

^aColegio de Postgraduados Campus Motecillo, Texcoco 56230, Estado de México. ^bColegio de Postgraduados Campus Córdoba, Amatlán de los Reyes 94946, Veracruz, México

RESUMEN

El chile chilhuacle tiene un gran potencial económico y es reconocido internacionalmente en la elaboración del mole negro oaxaqueño. Los paquetes tecnológicos del cultivo son nulos, su baja producción y su poca variación genética, hace que se encuentre en peligro de extinción, por lo que es necesario implementar técnicas modernas para asegurar su producción sustentable. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la irradiación de semillas con Co⁶⁰ y del potencial osmótico (PO) de la solución nutritiva en la concentración foliar de N. Los tratamientos se distribuyeron en un experimento factorial 4x4 (niveles de radiación gamma a semillas: 0, 10, 80 y 120 Gy, y niveles de PO -0.036, -0.072, -0.092 y -0.108 MPa). Después de 215 días del trasplante, en material seco y molido de hojas, se determinó la concentración de N. Se encontró que al irradiar la semilla con 120 Gy, existe un incremento en la concentración de N foliar (122.44 g kg⁻¹) superior al tratamiento testigo (88.03 g kg⁻¹). Sin embargo, no hubo diferencias significativas por efecto del PO. Por efecto de la interacción 120 Gy y -0.072 MPa, se incrementó en forma considerable la concentración foliar de N (175.46 g kg⁻¹). De acuerdo a lo anterior, la radiación gamma y el manejo del PO de la solución nutritiva inducen cambios significativos en la concentración foliar de N, lo que puede ser de utilidad para la generación de variabilidad y de paquetes tecnológicos.

1. INTRODUCCIÓN

El chile Chilhuacle es endémico de la región cañada del estado de Oaxaca, único lugar en el mundo donde se produce. Es el ingrediente esencial para la elaboración del mole negro oaxaqueño, un platillo típico distintivo de la gastronomía mexicana. El chile Chilhuacle fue reconocido como Patrimonio Biocultural de Oaxaca y el Mundo. Sin embargo, es nula la información sobre los paquetes tecnológicos de su cultivo, presenta poca variación genética, su cultivo es reducido y presenta una alta incidencia de plagas y enfermedades, esto hace que sea una especie en peligro de extinción.

De acuerdo con Octavio-Aguilar *et al.* (2013) la variabilidad genética es el verdadero potencial evolutivo de las especies, dado que a mayor variación, más escenarios adaptativos. Sin variación genética, no sería posible la evolución y por tanto la vida como la conocemos no existiría (Wagner, 2003). Durante el proceso de evolución existen factores que originan variación genética, como la radiación ionizante (radiación gamma) que puede tener aplicaciones prácticas en la agricultura (De Micco *et al.*, 2011). Una vez que la radiación gamma genera variación genética, es necesario establecer los materiales en condiciones de cultivo para probar su adaptabilidad. Maity *et al.* (2010) mencionan que la radiación ionizante, también puede repercutir en modificaciones en el metabolismo vegetal como la absorción, transporte y acumulación de nutrimentos. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la concentración de nitrógeno foliar en chile Chilhuacle

por efecto de la irradiación de semillas con Co^{60} y del potencial osmótico (PO) de la solución nutritiva.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en condiciones de laboratorio e invernadero tipo cenital cubierto con plástico blanco en las instalaciones del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, municipio de Texcoco, en el Estado de México. Las semillas de chile Chilhuacle provenientes de la región Cañada del estado de Oaxaca, fueron limpiadas y desinfestadas y posteriormente irradiadas con un irradiador Transelektro GLI-01 en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) a dosis de 10, 20 80 y 120 Gy en lotes de 100 semillas por tratamiento, más el lote testigo sin irradiar.

Una vez que las semillas fueron sometidas a radiación fueron germinadas en turba. Cuando las plántulas alcanzaron 10 cm de altura se establecieron en un sistema hidropónico, utilizando tezontle con diámetro de entre 3 y 10 cm como sustrato. La solución nutritiva base utilizada fue la Steiner (1984) con las siguientes concentraciones ($\text{mol}_{(+)}$ m^{-3}): 12 NO_3^- , 1 H_2PO_4^- , 7 SO_4^{2-} , 7 K^+ , 9 Ca^{2+} y 4 Mg^{2+} , complementada con micronutrientes del producto comercial Tradecorp AZTM. La CE (dS m^{-1}) de la solución nutritiva se midió diariamente, mientras que el pH fue ajustado cada tercer día a 5.8 con H_2SO_4 . El diseño experimental fue un factorial 4 x 4 (dosis de radiación y potencial osmótico) con 8 repeticiones, distribuidas completamente al azar. La unidad experimental consistió en una bolsa de polietileno calibre 600 con una planta. El potencial osmótico de la solución nutritiva tuvo cuatro niveles: -0.036, -0.072, -0.092 y -0.108 MPa. La determinación de N total fue en materia seca de hojas a los 215 días después del trasplante, empleando el método de semimicro-Kjeldhal (Bremner, 1965). Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza (GLM) y comparación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) con el programa SAS (SAS, 2011).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plantas con dosis de radiación 120 Gy presentaron las medias más altas en la concentración de nitrógeno foliar (122.44 g kg^{-1}) respecto al tratamiento testigo (88.03 g kg^{-1}) (**Figura 1**). En general la concentración de nitrógeno en las hojas de chile Chilhuacle es mayor conforme se incrementa la dosis de radiación gamma. Singh *et al.* (2013) observaron que con dosis de 5 Gy se incrementó el crecimiento en plantas de trigo y a una dosis de 100 Gy hubo reducción drástica de la actividad rubisco y nitrato reductasa, enzimas clave implicadas en la asimilación del dióxido de carbono atmosférico y nitrógeno del suelo. Los resultados anteriores opuestos a los aquí obtenidos, pueden atribuirse a la diferencia entre especies y a la sensibilidad que presentan cada una de ellas ante la radiación gamma.

Los potenciales osmóticos de la solución nutritiva entre los tratamientos no presentaron diferencias significativas en la concentración de nitrógeno foliar (**Figura 2**).

La interacción de la dosis de radiación gamma y el potencial osmótico de la solución nutritiva (120 Gy y -0.072 MPa) dio lugar a una mayor concentración de nitrógeno foliar (175.46 g kg^{-1}) (**Cuadro 1**). Investigaciones realizadas por Choudhary y Agrawal (2014) observaron que una elevada radiación UV-B en plantas de frijol desarrolladas en suelo, afecta negativamente la fijación y asimilación del nitrógeno, debido a la disminución en las actividades nitrogenasa, nitrato reductasa y nitrito reductasa.

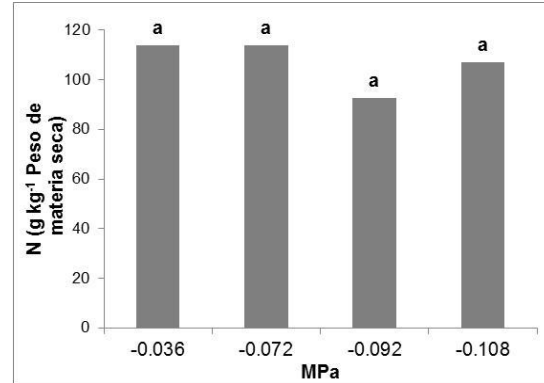
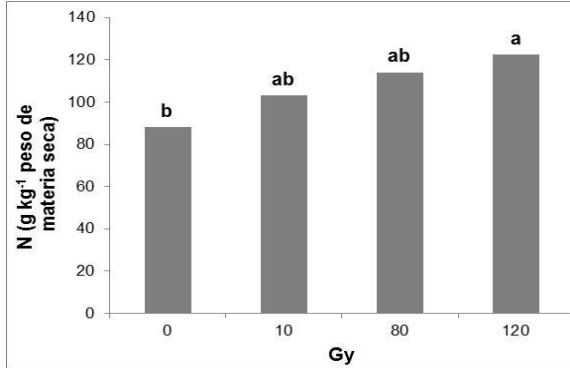


Figura 1. Concentración de nitrógeno en hojas de plantas de Chile Chilhuacle provenientes de semillas sometidas a diferentes dosis de radiación gamma en semillas. Medias con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$)

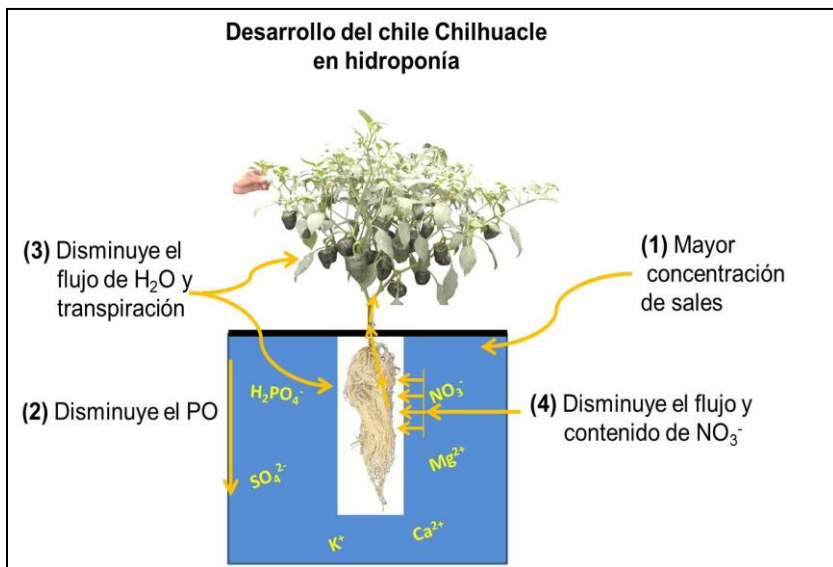
Figura 2. Concentración de nitrógeno en hojas de plantas de Chile Chilhuacle provenientes de semillas sometidas a diferentes potenciales osmóticos de la

Cuadro 1. Concentración de nitrógeno en hojas de Chile Chilhuacle, por efecto de la interacción dosis de radiación y potencial osmótico de la solución nutritiva.

Dosis (Gy)	PO (MPa)	N (g kg ⁻¹ peso de materia seca)
0	-0.036	33.13 ± 15.65 e
0	-0.072	66.03 ± 16.93 bcde
0	-0.090	109.90 ± 15.35 abcde
0	-0.108	143.03 ± 12.95 abcd
10	-0.036	151.66 ± 29.90 ab
10	-0.072	65.33 ± 34.53 bcde
10	-0.090	73.50 ± 15.25 bcde
10	-0.108	121.80 ± 17.66 abcde
80	-0.036	150.26 ± 15.35 ab
80	-0.072	148.16 ± 40.71 abc
80	-0.090	53.43 ± 28.74 de
80	-0.108	104.76 ± 29.86 abcde
120	-0.036	121.10 ± 30.24 abcde
120	-0.072	175.46 ± 37.09 a
120	-0.090	133.93 ± 52.62 abcd
120	-0.108	59.26 ± 45.45 cde

Medias con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$) entre tratamiento.

La mayor concentración de nitrógeno en hoja de chile Chilhuacle puede deberse a que un potencial osmótico de -0.072 MPa de la solución nutritiva coadyuvó a la absorción de agua y nutrimentos en las raíces de la planta (**Cuadro 1**). De acuerdo con Janes (1970) a medida que se reduce el potencial osmótico de la solución nutritiva existe una disminución del flujo de agua en las raíces, la



tasa de transpiración y un incremento en la resistencia estomática de *Capsicum annuum* L. Por su parte, Luque y Bingham (1981) mencionan que cuando los potenciales osmóticos de la solución nutritiva disminuyen existe una disminución de la concentración de NO₃⁻ en las raíces.

Por tanto a mayor concentración de sales en la zona radical del chile Chilhuacle se disminuye el potencial osmótico y por tanto se reduce el flujo de

Figura 3. El manejo adecuado del potencial osmótico de la solución nutritiva, favorece la concentración de nitrógeno foliar en chile Chilhuacle. (1) Una elevada concentración de sales en la solución nutritiva, (2) disminuye el potencial osmótico, (3) que afecta el flujo de agua, la transpiración y (4) la absorción de nutrimentos.

agua y la transpiración (Janes, 1970), que se traduce en la reducción del flujo y del contenido de nitrato (Luque y Bingham, 1981) (**Figura 3**).

4. CONCLUSIONES

Se concluye que la radiación gamma de las semillas a una dosis de 120 Gy y un potencial osmótico de -0.072 MPa de la solución nutritiva, inducen cambios significativos en la concentración de nitrógeno foliar del chile Chilhuacle, el cual puede ser de ayuda en la inducción de variabilidad genética y en el desarrollo de paquetes tecnológicos para la producción sustentable de este cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

1. J. M. Bremner, "Total nitrogen," In *Methods of soil analysis*. (Agronomy 9. Black C. A. (ed). American Society of Agronomy. Madison, WI, USA. 1965), Part 2, pp. 1149-1178.
2. K. K. Choudhary and S. B. Agrawal, "Cultivar specificity of tropical mung bean (*Vigna radiata* L.) to elevated ultraviolet-B: Changes in antioxidative defense system, nitrogen metabolism and accumulation of jasmonic and salicylic acids", *Environ. Exper. Bot.*, Vol. 99, 2014, pp. 122-132.
3. V. De Micco, C. Arena, D. Pignalosa and M. Durante, "Effects of sparsely and densely ionizing radiation on plants", *Radiat. Environ. Bioph.*, Vol. 50, 2, 2011, pp. 1-9.

4. B. E. Janes, "Effect of carbon dioxide, osmotic potential of nutrient solution, and light intensity on transpiration and resistance to flow of water in pepper plants", *Plant physiol.*, Vol. 45, 1, 1970, pp. 95-103.
5. J. P. Maity, S. Kar, A. Chakraborty, M. Sudershan and S. C. Santra, "Study on trace elements (using energy dispersive X-ray fluorescence technique) of edible seeds from *Cicer arietinum* L. plants developed from gamma irradiated seeds and variation of yielding capacity", *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, Vol. 283, 2010, pp. 225-230.
6. A. A. Luque and F. T. Bingham, "The effect of the osmotic potential and specific ion concentration of the nutrient solution on the uptake and reduction of nitrate by barley seedlings", *Plant Soil.*, Vol, 63, 2, 1981, pp. 227-237.
7. P. Octavio-Aguilar, L. G. Iglesias-Andreu, J. J. Bello-Bello and M. Luna-Rodríguez, "Efecto hormético de la radiación ionizante", *Ciencia y Desarrollo.*, Mayo-Junio, 2013, pp. 3-9. En línea:<http://www.cyd.conacyt.gob.mx/267/articulos/Efecto-hormetico-radiacion-ionizante.pdf>
8. SAS. SAS Institute Inc. 2011. SAS/STAT Users Guide. Version 9.3. SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA.
9. B. Singh, S. Ahuja, R. K. Singhal and P. V. Babu, "Effect of gamma radiation on wheat plant growth due to impact on gas exchange characteristics and mineral nutrient uptake and utilization", *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, Vol. 298, 1, 2013, pp. 249-257.
10. A. A. Steiner, "The universal nutrient solution," In *Sixth International Congress on Soilless Culture*. (Proceedings International Society for Soilless Culture. Lunteren, The Netherlands, 1984), pp: 633-650.
11. G. P. Wagner, "Evolutionary genetics: the nature of hidden genetic variation unveiled", *Curr. Biol.*, Vol. 13, 24, 2003, pp. R958-R960.

COMPORTAMIENTO DE PROTOZOARIOS SÉSILES PRESENTES EN UN SISTEMA SBR.

Victoria Enciso¹, M. Quezada^{1*}, E.M. Silva¹ L. V. Camargo¹.

¹Laboratorio de Biotecnología Ambiental, División de Biotecnología. Universidad Tecnológica de Tecámac, Tecámac, Edo. de México.

RESUMEN

Los métodos biológicos para el tratamiento de aguas residuales han tomado gran importancia, debido a la necesidad de reducir el impacto negativo del hombre, no tanto al agotamiento físico del agua, sino a su contaminación. Se ha encontrado que los protozoarios son microorganismos importantes para el equilibrio de los sistemas, los cuales cumplen el papel de pulidores de efluentes de tal modo que consumen el material particulado (suspendido) que se encuentra después de la degradación bacteriana. Los protozoarios son eficientes para purificar el agua residual, debido a su habilidad para alimentarse de bacterias dispersas (Akpór et al., 2008), es decir tienen actividad como predadores de bacterias, lo cual influye en la calidad del agua. En este trabajo se relacionó la eficiencia de remoción con el comportamiento de protozoarios pedunculados (sésiles) en un sistema SBR empacado con tezontle, alimentado con agua residual doméstica.

El sistema SBR funcionó; con un pH de 8-8.5, temperaturas de 20-23 °C, concentración de oxígeno disuelto superior a 2 mg/L y concentraciones menores a 1mg/L de Nitrógeno Amoniacal (N-NH₄). Se utilizó como inóculo los lodos activados de la planta de tratamiento de agua residual del parque Estatal Sierra Hermosa, municipio de Tecámac, Estado de México. Se determinó la eficiencia de remoción como Carbono Orgánico Total, relacionando las comunidades de protozoarios que predominaron en el sistema. Las concentraciones de Carbono Orgánico Total al inicio fueron inferiores al 70 %, y posteriormente a partir del día 90 en adelante fue de 93 %. Los protozoarios adaptados fueron Opercularia sp., Vorticella sp., Zothamnium sp. y Epistylis sp., y los rotíferos Philodina sp., Epiphanes sp. y Rotaria rotatoria sp. Además, se observaron Coleps sp., Aspidisca sp., suctores (Podophrya sp. y Tokophrya sp.), amebas testadas (Euglypha sp. y Centrophyxis sp.) y algas (Diatomeas, Nizschia y Navicula) en cantidades menores. Los resultados obtenidos mostraron que los protozoarios mejor adaptados al sistema SBR y al agua residual fueron los protozoarios sésiles (Opercularia sp., Vorticella sp. y Zothamnium sp.).

1. INTRODUCCIÓN

Las aguas residuales municipales afectan severamente la calidad de cuerpos de agua y suelos, pues generalmente se descargan sin tratamiento previo. Se sabe que entre el 90 y 95% del agua residual generada en el mundo se desecha en esta condición (Seghezzeo, 2004). Este tipo de aguas representan un riesgo para los cuerpos de agua superficiales, por el aporte de nutrientes (materia orgánica soluble y suspendida, amonio, nitrógeno orgánico, fosfatos, sulfatos, etc.), que se derivan de la materia orgánica en descomposición o de compuestos químicos de origen antropogénico como los detergentes; finalmente estos nutrientes contribuyen acelerando la eutrofización de los cuerpos receptores (CONAGUA, 2010).

El crecimiento acelerado de la población en las localidades urbanas ha implicado fuertes presiones sobre el medio ambiente y las instituciones, derivado a la demanda incrementada de servicios. En México hasta el año 2013, se tienen registradas aproximadamente 2 287 plantas de

tratamiento de aguas residuales municipales en operación, donde se trató el 50.2% de 211.1 m³/s recolectados en los sistemas de alcantarillado, los métodos biológicos más utilizados son los lodos activados (CONAGUA, 2014). Sin embargo, en la actualidad los SBR (Sequencing Batch Reactor) son utilizados exitosamente para tratar aguas residuales domésticas e industriales, debido a las ventajas que presentan tales como: el mínimo requerimiento de espacio, su fácil expansión o escalamiento, control y operación flexible, tiempo de reacción controlable, eliminación o regreso de los lodos por medio de bombeo y a la reducción potencial de los costos de operación por la eliminación de clarificadores y otros equipos (Mahvi, 2008).

Los sistemas de tratamiento biológicos de aguas residuales presentan microorganismos que incluyen principalmente bacterias, protozoarios, rotíferos y en algunos casos algas. Los protozoarios son organismos microscópicos unicelulares considerados como bioindicadores de aguas residuales, destacando en la detección y prevención de variaciones en la continuidad de los procesos. Por lo anterior, algunos estudios se han enfocado a la identificación y aspecto taxonómico de los protozoarios presentes en los sistemas de tratamiento, en especial de lodos activados, biodiscos, filtros percoladores y humedales (Péneles, 2007 y Papadimitriou *et al.*, 2010). Los grupos de protozoarios registrados comúnmente son los flagelados y ciliados de vida libre, caminadores y sésiles, que incluyen a los géneros *Paramecium* sp., *Colpidium* sp., *Peranema* sp., *Tetrahymena* sp., *Euplotes* sp., *Aspidisca* sp., *Trachelophyllum* sp., *Vorticella* sp., *Epistylis* sp., *Diffflugia* sp., *Arcella* sp., *Carchesium* sp., entre otros (Ogleni *et al.*, 2010).

Por tal motivo el objetivo del presente trabajo fue determinar la relación de las comunidades de protozoarios sésiles con la eficiencia de un sistema SBR empacado con tezontle a escala laboratorio.

2. TEORÍA

Debido al aumento en la población urbana e industrialización, el mundo se ve en la necesidad de estudiar diversas alternativas para la remediación de agua, aire y suelo. A lo largo de la historia se han realizado diversos estudios para retribuir un poco el daño, en materia de agua se ha realizado el tratamiento de aguas residuales mediante procesos biológicos. Donde se resalta la importancia de las comunidades de protozoos, debido a que juegan un papel muy importante en las cadenas tróficas microbianas, ya que sus principales presas son las bacterias, la actividad depredadora de los protozoos ha estado profundamente relacionada con la calidad del efluente (Lee *et al.*, 2004).

Los métodos biológicos más utilizados son los lodos activados, sin embargo se han encontrado varios estudios donde se utilizan nuevas tecnologías, una alternativa es la construcción de humedales, debido a la capacidad de remover sustancias orgánicas, sólidos suspendidos y algunos metales pesados. La investigación realizada por Papadimitriou *et al.*, 2010 se enfocó al papel que juegan las comunidades de protozoarios como indicadores de eficiencia, donde los protozoarios con mayor abundancia en la superficie agua/tierra fueron *Chilodonella* sp., *Colpidium* sp., *Tetrahymena* sp., *Uronema* sp. y ciliados de vida libre no identificados. Además, se observó una correlación entre la remoción de fósforo y coliformes totales, cuando hubo un crecimiento de la diversidad de protozoarios en la interface suelo-agua; existiendo una fuerte correlación con *Vorticella* sp. y *Euplotes* sp.

Una alternativa para el tratamiento de aguas residuales es el SBR, debido a las ventajas que presentan tales como el mínimo requerimiento de espacio y al aumento en el porcentaje en la eficiencia para la eliminación de materia orgánica y nutrientes. Además permite mayor control sobre el crecimiento de microorganismos a bajos costos. Algunos estudios se han referido a las comunidades de protozoarios como buenos indicadores en el rendimiento de los sistemas SBR como es el caso de Warren *et al.*, 210 y Pérez *et al.*, 2010. Ellos han obtenido resultados similares en la remoción del DQO y N-NH₄⁺ en presencia de ciliados pedunculados como *Vorticella* sp., *Epistylis* sp. y *Tocophyra* sp., así como de *Euglypha* sp., *Arcella* sp. y *Rotatoria* sp.

También se han determinado que los protozoarios tienen influencia como bioindicadores importantes en la calidad del efluente en el tratamiento de aguas residuales domésticas, como lo mencionan Krishnakumar *et al.*, 2011; Galindo *et al.*, 2011; Dubber *et al.*, 2011 y Tocchi *et al.*, 2012, donde se encontraron relación con las comunidades de *Carchesium* sp., *Epistylis* sp., *Vorticella* sp., *Opercularia* sp. y *Zoothamnium* sp.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Se utilizó un SBR automatizado empacado con tezontle a nivel laboratorio (Figura 1). El tamaño del empaque fue de 2 a 2.5 cm. El inóculo fue obtenido de la planta de tratamiento de lodos activados del parque Estatal Sierra Hermosa, municipio de Tecámac, Estado de México y fue alimentado cada 24hrs. con agua residual de la Universidad Tecnológica de Tecámac. El volumen útil fue de 1.8 litros. Se mantuvo en una temperatura de 22 a 26°C, un pH contante de 7 a 8.5. y una concentración de oxígeno disuelto superior a 2 mg/L.

Los análisis fisicoquímicos que se determinaron fueron: Oxígeno Disuelto, NH_4^+ , los cuales se realizaron de manera *in situ* por medio de un fotómetro multiparamétrico HANNA Instrument HI83200. La temperatura se midió con un termómetro SAMA de mercurio 6333M con un rango de -20 a 150 °C y el pH con un potenciómetro HANNA Instruments, pH 211, Microprocessor pH Meter. Se determinó carbón orgánico total por medio de un analizador SHIMADZU TOC-VSN modelo TOC-UVCSN.

Para la identificación y conteo de protozoarios, se observó con un microscópico de campo claro Carl Zeiss con objetivos de 40X y un microscopio Eclipse Ni-U con objetivos 20X y 40X, utilizando la técnica de Nomarski (tridimensionalidad). Las muestras se tomaron cada 10 días aproximadamente, antes de alimentar el reactor. La técnica para la toma de muestra fue tomar 3 tezontles y depositarlos en un frasco, se agitó 10 veces vigorosamente, se depositaron 20µL de la muestra en un portaobjetos y se colocó un cubreobjetos, se observó en el microscopio en forma de zig-zag en toda la superficie del cubreobjetos, lo cual se realizó por triplicado para la identificación y conteo de las comunidades de protozoarios presentes en el sistema SBR. Para poder identificar las comunidades de protozoarios se consultaron los trabajos de Martínez y Gutiérrez en 1985, Aladro *et al.*, 1990 y Luna 2006.



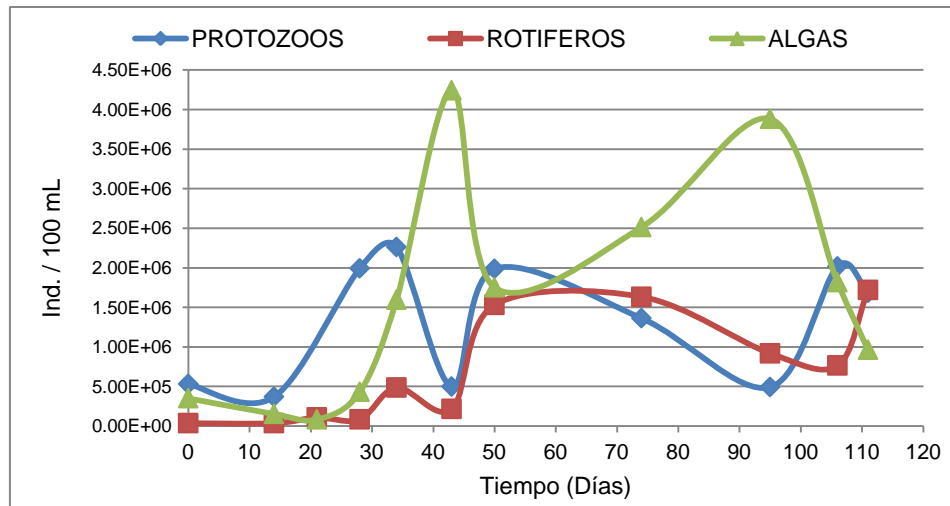
Figura 1. Reactor SBR empacado con tezontle (Enciso 2013)

Para obtener la diversidad de los microorganismos presentes en el SBR (Protozoarios, Rotíferos y Algas) se calculó el Índice de Shannon-Weaver (Shannon y Weaver, 1949). El cual se basa en la teoría de la información por individuo en muestras (mide el contenido de información por símbolo de un mensaje compuesto por S clases de símbolos discretos cuyas probabilidades de ocurrencia son $P_i \dots P_s$).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación y cuantificación de las especies presentes en el SBR empacado con tezontle

En la gráfica 1 se muestra el comportamiento de las diferentes comunidades de microorganismos en el SBR. El grupo de las algas fue la más abundante con una cantidad máxima de 4.24×10^6 ind./100mL (*Nitzschia* sp. y *Navicula* sp.) y con menor abundancia el grupo de los Suctores con 3.00×10^4 ind./100mL.



Gráfica 1. Comunidades de microorganismos presentes en el sistema SBR.

Se observaron rotíferos en cantidades de 1.08×10^5 ind./100mL hasta 1.72×10^6 ind./100mL (*Philodina* sp., *Epiphanes* sp. y *Rotaria rotatoria*), los cuales se consideran bioindicadores asociados a elevadas edades de lodos y su presencia indica buena calidad del agua tratada (Vymazal *et al.*, 2001) (Figura 2).

Los ciliados de vida libre presentes en el SBR fueron: *Paramecium* sp., *Coleps* sp. y *Aspidisca* sp. Además se encontraron amebas tecadas (*Euglypha* sp. y *Centrophyxis* sp.), y amebas desnudas (Figura 3). Las cuales están relacionadas con la eliminación de nitrógeno (Papadimitriou *et al.*, 2010 y Pérez *et al.*, 2010).

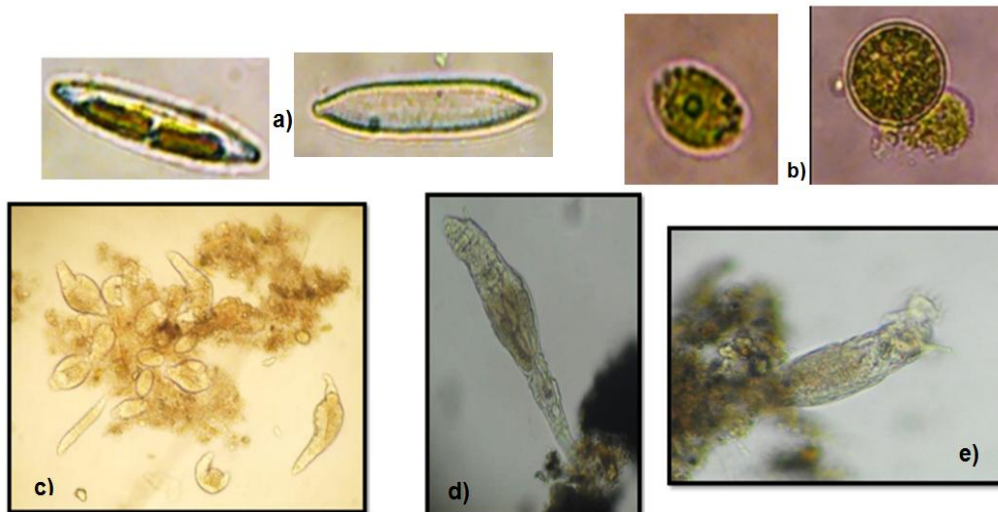


Figura 2. Algas (*Nitzschia* sp. y *Navicula* sp.)^{a,b} y Rotíferos (*Philodina* sp., *Epiphanes* sp.)^{c,d,e} presentes en el SBR. Observados en el microscopio de campo claro con objetivos de 20X y 40X (Enciso, 2013).

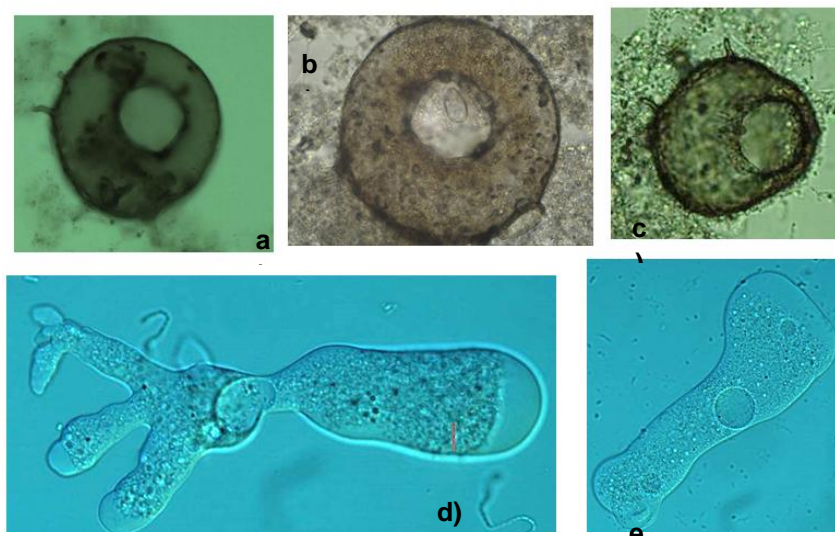


Figura 3. Amebas tecadas(a,b,c,) y desnudas (d,e) presentes en el SBR. Microscopio Eclipse Ni-U con objetivos 20X y 40X, utilizando la Técnica de Nomarski (Enciso, 2013).

En la Figura 4 se muestran los ciliados depredadores (*Podophrya* sp. y *Tokophrya* sp.) en el sistema SBR, los cuales se presentaron a partir del día 28 con una cantidad de 2.40×10^4 ind./100mL constante. Estos protozoarios se pueden encontrar con mayor frecuencia en aguas contaminadas con material biodegradable (Anaya, 1992).

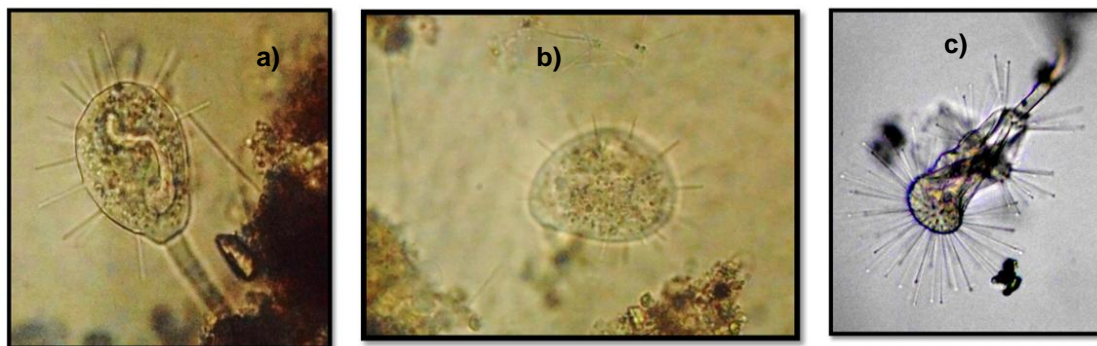


Figura 4. Ciliados Predadores detectados en el SBR (a,b,c.) Observados en el microscopio de campo claro con objetivos de 20X y 40X (Enciso, 2013).

Con respecto a los ciliados sésiles, se obtuvieron cantidades máxima de 1.69×10^6 y 2.02×10^6 ind./100mL en el día 28 y 34 respectivamente, la cantidad mínima fue de 1.71×10^5 y 1.38×10^5 ind./100mL en los días 0 y 95 respectivamente. Se encontraron con mayor abundancia las especies *Vorticella* sp. (9.00×10^4 Ind./100mL) y *Epistylis* sp. (1.92×10^6 ind./100mL) (Figura 3), las cuales se relacionadas con altos porcentajes de eficiencia de remoción (Papadimitriou *et. al.*, 2010; Pérez *et. al.*, 2010; Ogleni *et. al.*, 2010 y Dubber *et. al.*, 2011). Además a partir del día 100 se observó la presencia de Telotrocas, larvas pertenecientes a un ciclo de vida de los ciliados sésiles (Figura 5).

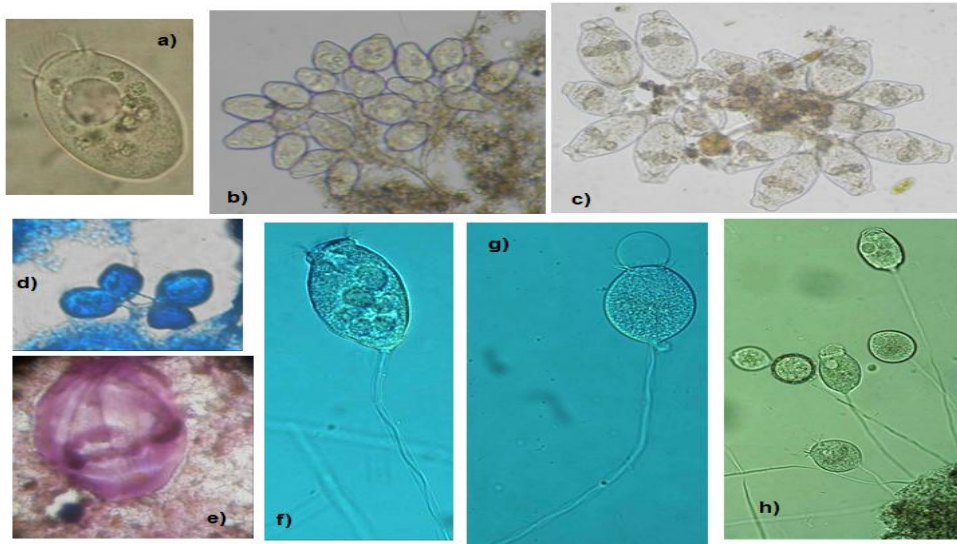
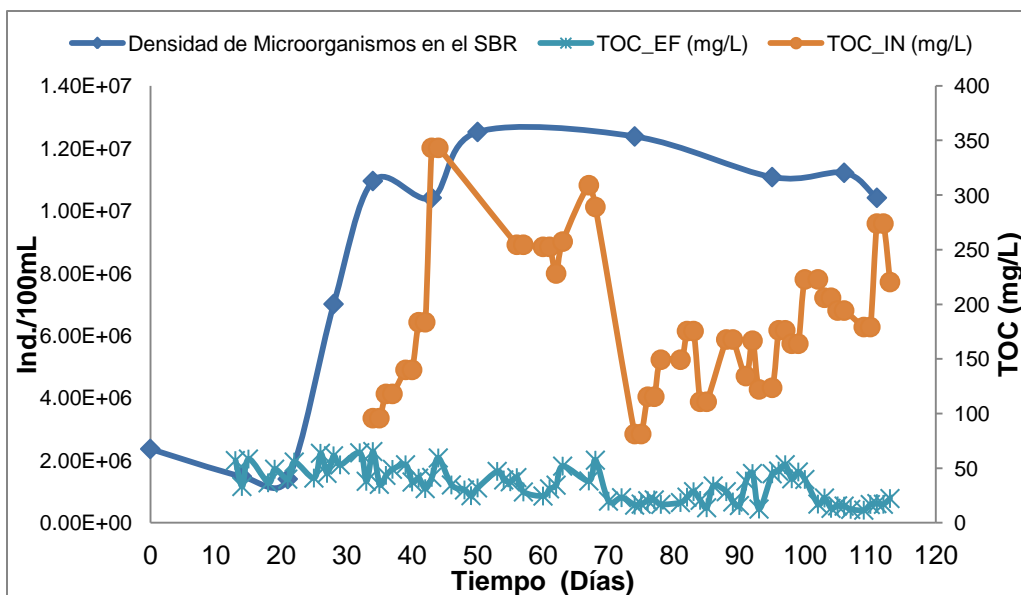


Figura 5. Ciliados sésiles. *Vorticella* sp. (f,g,h), *Epistylis* sp., (b,c) *Telotroca* (Larva)a, y Núcleos (Azul de Metileno y Hematoxilina de Harris) (d,e) presentes en el SBR. Observados en el microscopio de campo claro y Eclipse Ni-U con objetivos 20X y 40X (Enciso, 2013).

Relación de los protozoarios con la eficiencia del SBR

Las concentraciones que se obtuvieron de TOC en el influente fueron de 81.27 - 273.9 mg/L y en el efluente fueron de 11.57- 65.26 mg/L, lo cual nos indican un porcentaje de remoción de 70% hasta 93%. Por lo anterior la densidad total de las comunidades de microorganismos estuvo relacionada con la eficiencia de remoción como materia orgánica (Grafica 2).



Gráfica 2. Eficiencias de remoción TOC y densidad de los microorganismos presentes en el sistema SBR.

Se encontró una riqueza específica de 21 especies identificadas en el sistema SBR, al calcular el índice de Shannon-Weaver; se detectó que la comunidad de Protozoarios fue de 2.84, Rotíferos 2.79 y de algas 2.51, por lo anterior se concluyó que existe una riqueza mayor en la comunidad de los protozoarios. Se calculó de igual manera el índice en la totalidad de las comunidades microbianas presentes en el sistema y se obtuvo el 9.2, lo cual indica que existe una excelente biodiversidad de microorganismos, ya que el valor obtenido es mayor a 5 como lo reporta la literatura (Laura Pla, 2006).

En la literatura Papadimitriou *et al.*, 2010 encontró una fuerte relación de *Vorticella* sp. con la remoción de fósforo y coliformes totales. Algunos autores como Krishnakumar *et al.*, 2011; Galindo *et al.*, 2011; Dubber *et al.*, 2011 y Tocchi *et al.*, 2012, encontraron una fuerte relación de la calidad del efluente en los sistemas de tratamiento de aguas residuales con la presencia de *Epistylis* sp., *Vorticella* sp., *Opercularia* sp. y *Zoothamnium* sp. En el presente trabajo se obtuvieron resultados similares, es decir se encontró una buena relación entre la eficiencia de remoción con respecto a la presencia de *Vorticella* sp., *Epistylis* sp., y algunos suctores.

5. CONCLUSIONES

Se tiene una relación entre la remoción de materia orgánica con la presencia de ciliados sésiles (*Vorticella* sp., *Epistylis* sp. y algunos suctores).

El empaque (Tezontle) tuvo una buena influencia en la eficiencia del reactor, ya que es útil para la adaptación y estabilización de protozoarios sésiles, permitiendo que se fijen en los poros.

Las condiciones del SBR permitieron una excelente biodiversidad de microorganismos (protozoarios, rotíferos y algas) de acuerdo con el índice de Shannon-Weaver (9.2).

BIBLIOGRAFÍA

1. O. B. Akpor; *M. N. B. Momba; J. O. Okonkwo and M. A. Coetsee, (2008). Nutrient removal from activated sludge mixed liquor by wastewater protozoa in a laboratory scale batch reactor. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 5 (4):463-470.
2. Seghezzo, L. (2004). Anaerobic treatment of domestic wastewater in subtropical regions. Thesis Ph. D. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
3. CONAGUA (2010). Estadísticas del Agua en México, edición 2010. Comisión Nacional del Agua. www.conagua.gob.mx.
4. CONAGUA (2014). Estadísticas del Agua en México, edición 2014. Comisión Nacional del Agua. www.conagua.gob.mx.
5. Mahvi A. H., (2008). Sequencing reactor: A promising technology in wastewater treatment. *Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng.* 5(2): 79-90.
6. Soddell J. Foaming. En Seviour R. J. and Blackall L. L. (1999). *The microbiology of activated sludge*. Edit. Kluwer Academic Publishers. Londres.
7. Péneles, G. E., (2007). Los protozoos ciliados como bioindicadores en el tratamiento de las aguas residuales. Tesis doctoral del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense. Madrid, España: 280.
8. Papadimitriou C., Sakellaropoulos G. P. and Lazaridou M., (2010). Investigation of protozoa as indicators of wastewater treatment efficiency in constructed wetlands. *Desalination.* 250:378-382.
9. Vymazal J, Sladeczek V, Stach J. (2001). Biota participating in wastewater treatment in a horizontal flow constructed Wetland. *Water Sci. Tech.* 4:211-214.

10. Ogleni Nurtac, Duygu Topaloglu, Turgay Dere, (2010), Microbiological Investigation of activated sludge in Sequencing batch biorreactor for urban wastewater treatment. *Journal of Scientific and industrial Research*. 69: 643-646.
11. Pérez-Uz, B., Arregui, L., Calvo, P., Salvador, H., Fernández, N., Rodríguez, E., Zornoza, A., Serrano, S., (2010). Assessment of plausible bioindicators for plant performance in advanced wastewater treatment systems. *Water Res.* 44:5059-5069.
12. Dubber, D., Gray, N. (2011). The influence of fundamental design parameters on ciliates community structure in Irish activated sludge systems. *European Journal of Protistology*, (47):274-286.
13. Carlo Tocchi A.B., Ermanno Federici C., Laura Fidati C., Rodolfo Manzi B., Vittorio Vincigurerra A., Maurizio Petruccioli A. (2012). Aerobic treatment of dairy wastewater in an industrial three-reactor plant: Effect of aeration regime on performances and on protozoan and bacterial communities. *Watereserch* (46):3334 -3344.
14. José Antonio Martínez Pérez y Manuel Elías Gutiérrez, (1985). *Introducción a la Protozoología*. Editorial Trillas, Av. Rio Churubusco 385, Col. Pedro María Anaya, Del. Benito Juárez, 040, México D.F. 14-105.
15. Ma. Antonieta Aladron Lubel, Ma. Esther Martínez Mirillo y Rosaura Mayen Estrada. (1990). "Manual de los ciliados psamofilos marinos y salobres de Mexico", Laboratorio de Protozoología, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, UNAM, CP. 70-2, Mexico 04510, D.F.:11 -168. Dr. Víctor Manuel Luna Pabello, (2006). *Atlas de ciliados y otros microorganismos frecuentes en Sistemas de Tratamiento aerobio de Aguas Residuales*. Departamento de Biología, Laboratorio de Microbiología Experimental, Facultad de Química, UNAM 04510, México, D.F. 19-94.
16. Shannon, Claude E. & Warren Weaver (1949): *A Mathematical Model of Communication*. Urbana, IL: University of Illinois Press.

EXTRACTO DE HOJA DE GUAYABA (*Psidium guajava*) COMO INHIBIDOR DE LA MOTILIDAD DE *Escherichia coli* O157 H7 OBTENIDAS DE RUMIANTES LACTANTES CON SÍNDROME DIARREICO

Mónica Silva Vega¹; Rómulo Bañuelos Valenzuela¹, Carlos Meza López¹, Perla Ivonne Gallegos Flores², Lucía Delgadillo Ruiz², Edgar Esparza Ibarra²

1Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Zacatecas, Km 31.5 de la carretera panamericana tramo Zacatecas-Fresnillo. 2Unidad Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Zacatecas, Avenida preparatoria s/n colonia Hidráulica Zacatecas, Zac.

RESUMEN

Escherichia coli O157 H7 enterohemorrágica, es un patógeno de gran importancia en salud pública, puede causar graves infecciones como el síndrome urémico hemolítico y provocar la muerte en el hombre. Los rumiantes son reconocidos como el principal hospedero de *E. coli* O157H7. Actualmente se han buscado nuevas alternativas de origen natural "Extractos de plantas" para eliminar la colonización de bacterias patógenas en animales y prevenir la contaminación de carne. Se ha reportado que extracto de hoja de guayaba (*Psidium guajava*) tiene actividad antibacteriana de amplio espectro. El objetivo fue determinar el efecto de extractos de hojas de guayaba usados para la inhibición de motilidad en *Escherichia coli* O157H7 aislada e identificada a partir de rumiantes con síndrome diarreico. Se muestrearon rumiantes lactantes con síndrome diarreico, las muestras fueron transportadas en medio Stuart. Las bacterias se aislaron en medio Mac Conkey y posteriormente fueron sembradas en medio CHROMagar™ 0157 para la identificación de *E. coli* enterohemorrágica. Se realizaron pruebas de motilidad de *E. coli* O157 H7 en medio SIM, con extracto de hoja de guayaba concentrado y crudo y como referencia se utilizaron concentraciones de cavacrol de 0.05, 0.15 y 0.75mg/mL, quercetina 205, 102.5 y 51.25mg/dL. Resultando 54 *Escherichia coli* O157 H7, mostrando inhibición en la motilidad en concentración de carvacrol a 5mmol/L, 205mmol/L y 102.5mg/dL en quercetina y en el extracto crudo. Se concluye que el extracto como tal y su compuesto en mayor proporción (quercetina) son efectivos en la inhibición de motilidad de *E. coli* O157H7.

1. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es un patógeno importante en el ganado, la medicina y la salud pública (Kaper *et al.*, 2004), y productor de toxina Shiga (STEC). Los productos STEC han surgido transmitidos por los alimentos, especialmente el serotipo O157: H7. Las enfermedades humanas causadas por este serotipo que produce STEC va desde diarrea leve a colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SHU), por lo general, afecta a niños, pacientes de edad avanzada e inmunocomprometidos (CDC MMWR, 2001).

Los rumiantes domésticos como vacas, ovejas y cabras pueden portar STEC y *E. coli* O157 H7 en sus heces, por lo que se consideran reservorios naturales de estos patógenos (Blanco *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2009). La patogenicidad de STEC reside en diferentes factores de virulencia, incluyendo las toxinas Shiga (Stx1 y Stx2), intimina, enterohemolisina y el autoaglutinantes STEC adhesina (AEA) (Gyles, 2007).

En el mundo, una variedad de agentes antimicrobianos están disponibles para la terapéutica o como promotores del crecimiento de animales. Estudiosos del tema, han apoyado la afirmación de que con el aumento del uso de agentes antimicrobianos en animales y seres humanos ha aumentado la prevalencia de cepas resistentes (Donabedian *et al.*, 2003; Hershberger *et al.*, 2009). Los genes CTX-M β -lactamasas han sido reportados en *E. coli* a partir de ganado con fines alimenticios en todo el mundo levantando una amenaza potencial para la salud pública (Sasakit *et al.*, 2010; Wittum *et al.*, 2010).

Para eliminar la colonización de bacterias patógenas en animales y prevenir la contaminación de carne, se han buscado nuevas alternativas de origen natural como los "Extractos de plantas". Por ejemplo, el extracto de hoja de guayaba (*Psidium guajava*) tiene actividad antibacteriana de amplio espectro (Martínez *et al.*, 1997). Comparando los extractos acuosos, alcohólicos y cetónicos de las hojas de guayaba frente a veinte cepas de bacterias de interés clínico.

El extracto acuoso mostró actividad en el 35% de los casos, el alcohólico en un 65% y el cetónico en el 100% (Rattanachaisakson y Phumkhachorn, 2010). El extracto acuoso de las hojas de guayaba, disminuye la producción de toxinas lábiles de *E. coli* y del cólera (Birdi *et al.*, 2010). Echemendía y Morón (2004) en su ensayo clínico concluyeron que la tintura al 20% de hoja de *Psidium guajava* tiene efecto antidiarreico importante y Lozoya *et al.* (2002) evaluaron el polvo de las hojas secas, comprobándose este efecto.

El flavonoide quercetina es el principal compuesto activo en las hojas de Guayaba y se le ha atribuido el efecto antidiarreico (Germosen-Ribineaul, 2007). También han sido aislados diversos compuestos químicos, como son: un triterpenoide penta cíclico, el ácido guajanoico, así como, β -sitosterol, uvaol, ácido oleanólico y ácido ursólico (Begum *et al.*, 2004).

La motilidad es una de las características de *E. coli* que la hace una cepa altamente patógena por lo que contar con un compuesto que reduzca la motilidad es disminuir la patogenicidad de las cepas además de que se ha encontrado que el carvacrol y timol dañan la membrana exterior de las bacterias Gram negativas e incrementan la permeabilidad de la membrana citoplasmática que causa pérdidas de ATP, fuga de iones y lisis celular (Gill and Holley, 2006). Por lo que el objetivo fue determinar el efecto de extractos de hoja de guayaba usado para la inhibición de la motilidad en *Escherichia coli* O157 H7 aisladas e identificadas a partir de rumiantes con síndrome diarreico.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Se seleccionaron 54 cepas bacterianas identificadas como *E. coli* O157 H7 en CHROMagar™ aisladas, de heces de corderos con síndrome diarreico menores de 21 días.

Preparación en tubo del medio SIM con extracto.

Se preparó medio SIM para cada tipo de estándar y extracto. Para la preparación del medio SIM, se pesaron 30 gr de agar por cada litro de agua destilada. El agar fue esterilizado en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Se dejó enfriar el agar a una temperatura de 35 °C aproximadamente para adicionar el extracto correspondiente, posteriormente se adicionaron 4 mL del medio SIM con el extracto en tubos estériles de 10 mL.

Para cada bacteria se realizó una serie de tubos por triplicado como se describe a continuación:

1) Sin extracto, 2) carvacrol 0.3 mM, 3) carvacrol 1 mM, 4) carvacrol 5 mM, 5) extracto guayaba diluido, 6) extracto guayaba crudo, 7) quercetina 205 mg/L, quercetina 102.5 mg/L, 8) quercetina 51.25 mg/L y 9) control alcohol.

Pruebas de motilidad bacteriana

Cada una de las bacterias fue sembrada en agar base por estría, con el objetivo de obtener una sola colonia aislada para posteriormente realizar la siembra en tubo. La siembra en tubo se realizó mediante picadura; que consiste en tomar una colonia aislada de bacterias y hacer una picadura en el medio SIM atravesando el agar hasta el fondo del tubo. Una vez terminada la siembra por picadura, todas las muestras fueron incubadas a 37 °C en una incubadora Thermo ® durante un periodo de 24 h.

Las condiciones de siembra se hicieron con debida esterilidad para evitar contaminación, estas se realizaron en una campana de flujo laminar (Labtech ®). La motilidad bacteriana fue medida usando un método cualitativo; a) motilidad positiva (+): presencia de turbidez difusa o total en el medio. b) motilidad negativa (-): ausencia o presencia leve de crecimiento solo en el sitio de la picadura.

Análisis estadístico

El análisis estadístico realizado fue el de tablas de contingencia de dimensión 2x2, entre las variables extracto diluido y extracto crudo vs carvacrol 0.3 mM, carvacrol 1 mM, carvacrol 5 mM, quercetina 205 mg/L, quercetina 102.5 mg/L y quercetina 51.25 mg/L. Los criterios utilizados fueron las pruebas de independencia de χ^2 (prueba ji cuadrada), considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$ y un intervalo de confianza del 95% (Good, 2000, Cytel Software, 2010). Los datos fueron capturados en Excel y analizados en el programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS por sus siglas en inglés) versión 17 (Cytel Software, 2010).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se identificaron 54 cepas mediante CHROMagar™ selectivo para *E. coli* O157 H7. Estas se sembraron en medio SIM. Los resultados de la movilidad y motilidades de las bacterias se observan en la tabla 1.

La motilidad bacteriana *in vitro* de los estándares y extractos de hojas de guayaba vs las bacterias, se evaluó cualitativamente por la presencia o ausencia de turbidez en el tubo, los resultados mostraron que los estándares de carvacrol tienen amplia actividad antibacteriana frente a los 9 microorganismos, inhibiendo completamente el crecimiento bacteriano a una concentración de 5 mM (tabla 1); en relación con el extracto crudo de guayaba, presentó mayor efecto en la inhibición de la motilidad de 29 bacterias. Mientras que, la quercetina a una concentración de 102.5 mg/dL presenta mayor motilidad en 19 bacterias. La interacción carvacrol-quercetina que se encuentra presente en el extracto crudo de hojas de guayaba presenta una mayor inhibición en la motilidad de las bacterias, siempre y cuando, las concentraciones de carvacrol y quercetina sean las antes señaladas (tabla 2).

Tabla 1.- Resultados de motilidad bacteriana.

MO	CONTROL	C 0.3 Mm	C 1 Mm	C 5 Mm	EXT DILUIDO	EXT CRUDO	Q 205 mg/dL	Q 102.5 mg/dL	Q 51.25 mg/dl	OH
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
4	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

6	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
9	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
14	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
15	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
16	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
18	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
19	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
20	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
21	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
22	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
25	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
28	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
29	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
32	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
33	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
36	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
37	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
38	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
39	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
40	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
41	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
42	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
43	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
44	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

45	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
46	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
47	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
48	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
49	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
50	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
51	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
52	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
53	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
54	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

Tabla 2. Motilidad de bacterias en carvacrol, quercetina, carvacrol-extractos y quercetina-extractos.

	Concentración	Extracto Diluido				Extracto Crudo			
		+	-	χ^2	p	+	-	χ^2	p
Carvacrol (mM)	0.3	43	11	26.38	0.000**	25	29	5.81	0.016*
	1	43	11	26.38	0.000**	25	29	5.81	0.016*
	5	43	11	31.25	0.000**	25	29	0.73	0.313
Quercetina (mg/dL)	205	43	11	20.10	0.000**	25	29	1.56	0.210
	102.5	43	11	18.80	0.000**	25	29	3.35	0.067
	51.25	43	11	26.90	0.000**	25	29	0.196	0.658

χ^2 : valor de ji cuadrada calculada. *valor de p significativo al 95% de confianza. **valor de p significativo al 99% de confianza.

Burt *et al.* (2007) reportaron que el carvacrol a una concentración de 0.3 mM disminuye la motilidad de la cepa determinada con la técnica de Western Blot, en el que observaron disminución de la síntesis de flagelina, esta proteína se encuentra en un 8% de la proteína total celular. Estos resultados difieren de los reportados en la tabla 2, debido principalmente a que la concentración de 0.3 mM no representa la motilidad suficiente en las 54 bacterias *E. coli* O157 H7.

Desde el punto de vista de Burt *et al.* (2007), las células de *E. coli* crecen en presencia de carvacrol a una concentración de 5 mM sin síntesis de flagelos, provocando que el microorganismo crezca sin motilidad, es decir, cuando la célula bacteriana está sujeta a un estrés ocasionado por sustancias tóxicas y se encuentra en riesgo su supervivencia es capaz de suprimir la producción de la proteína flagelina y conservar energía para otras funciones celulares, que pueden por lo tanto, ser una táctica de supervivencia, sin embargo, a una concentración mayor de 5 mM la bacteria cesa inmediatamente la motilidad y ocurre muerte celular.

El hecho de que las bacterias Gram negativas flageladas en presencia de carvacrol no desarrollen flagelos, podría tener implicaciones para el uso de este compuesto como aditivo antibacteriano para productos alimenticios y/o para la generación de nuevos antibióticos; ya que si la célula bacteriana no presenta flagelos, esto disminuye o inhibe su mecanismo de patogenicidad al ser menos capaz de adherirse a las células epiteliales del huésped.

Finalmente, el efecto de quercetina sobre la *E. coli* O157 H7 a una concentración de 102.5 mg/dL resulta ser la óptima en la motilidad de las bacterias, teniendo el mismo efecto en la interacción quercetina-extracto crudo esto contribuye a que por un lado se disminuya la patogenicidad de la cepa de *E coli* O157H7 y por otro se obtenga efecto antidiarreico.

4. CONCLUSIÓN

Se concluye que el extracto crudo de hoja de guayaba y su compuesto en mayor proporción (quercetina) son efectivos en la inhibición de la motilidad de *Escherichia coli* O157H7.

BIBLIOGRAFÍA

1. Begum S, Hassan SI, Ali SN, Siddiqui BS. Chemical constituents from the leaves of *Psidium guajava*. *Nat Prod Res.* 2004;18(2):135-40.
2. Birdi T, Daswani P, Brijesh S, Tetali P, Natu A. Newer insights into the mechanism of action of *Psidium guajava* L. leaves in infectious diarrhoea. *BMC Complement Altern Med* 2010; 10: 33.
3. Blanco M, Padola NL, Krüger A, Sanz ME, Blanco JE, González EA. Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *Int Microbiol.* 2004;7:269–76.
4. Burt, S., Zee, R., Koets, A., van Knapen, F., Gastra, W., Haagsman, H y Veldhuizen, E. Carvacrol Induces Heat Shock Protein 60 and Inhibits Synthesis of Flagellin in *Escherichia coli* O157H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007;73 (14): 4484-4490.
5. CDC MMWR. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infections among children associated with farm visits—Pennsylvania and Washington, 2000. *MMWR.* 2001;50(15):293–7.
6. CYTEL SOFTWARE. Statxact 9 with Cytel studio. Statistical software for exact nonparametric inference. User manual. Cytel Software, New York, USA, pp. 1345 2010.
7. Donabedian SM, Thal LA, Hershberger E, Perri MB, Chow JW, Bartlett P, et al. Molecular characterization of gentamicin-resistant enterococci in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. *J Clin Microbiol.* 2003;41:1109–13.
8. Echemendía SCE y Morón RFJ. Tintura de hojas de *Psidium guajava* L. En pacientes con diarrea aguda simple. *Rev Cubana Plant Med* 2004; 9(3): 1-13. extract. *J Ethnopharmacol* 1999; 67 (2): 203-12.
9. Germosén-Robineau L, editor. *Université des Antilles et de la Guyane*, 2007
10. Gill, A. y Holley, R. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics *Journal Food and Microbiology*, 111:170-174.
11. GOOD P. Permutation tests. A practical guide to resampling methods for testing hypotheses. Second edition. Springer-Verlag, New York, 270 p. 2000
12. Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci.* 2007;85:E45–62.
13. Hershberger E, Donabedian S, Konstantinou K, Zervos MJ. Quinupristin–dalfopristin resistance in gram-positive bacteria: mechanism of resistance and epidemiology. *Clin Inf Dis.* 2009;38:92–8.
14. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2:123–40.
15. Lozoya X, Reyes MH, Chávez MA, Martínez GMC, Soto GY, Doubova SV. Intestinal antispasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava* folia in the treatment of acute diarrheic disease. *J Ethnopharmacol* 2002; 83(1-2): 19-24.
16. Martínez MJ, Molina N, Boucourt E. Evaluación de la actividad antimicrobiana de *Psidium guajava* L. (guayaba). *Rev Cubana de Plant Med* 1997; 2(1): 12-14.

17. Rattanachaikunsopon P y Phumkhachorn P. Contents and antibacterial activity of flavonoids extracted from leaves of *Psidium guajava*. *J Med Plant Res* 2010; 4 (5): 393-396.
18. Sánchez S, Martínez R, Rey J, García A, Blanco J, Blanco M, et al. Phenotypic characterization of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from domestic and wild ruminants. *Vet Microbiol.* 2009;142:445–9.
19. Sasaki T, Hirai I, Niki M, Nakamura T, Komalamisra C, Maipanich W, et al. High prevalence of CTX-M beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in stool specimens obtained from healthy individuals in Thailand. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65:666–8.
20. Wittum TE, Mollenkopf DF, Daniels JB, Parkinson AE, Mathews JL, Fry PR, et al. CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases present in *Escherichia coli* from the feces of cattle in Ohio, United States. *Foodborne Pathog Dis.* 2010;7:1575–9.

CAMBIOS EN LOS COMPUESTOS ANTIOXIDANTES PRESENTES EN BERENJENILLA (*Solanum betaceum*) DURANTE SU ALMACENAMIENTO POSCOSECHA A 5 °C

Elia Nora Aquino-Bolaños¹, Ángel Ramón Flores Sosa, José Luis Chávez Servia², Marco Antonio Romero Mendoza¹ e Iñigo Verdalet Guzmán¹

1 Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Veracruzana, Dr. Rafael Sánchez Altamirano S/N, Industrial Animas, Xalapa, 91192, Veracruz, México. 2 Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR Unidad Oaxaca, Hornos No. 1003, Santa Cruz Xoxocotlan, 71230 Oaxaca, México.

RESUMEN

La berenjenilla (*Solanum betaceum*), es un fruto que se explota a nivel comercial en diversos países; sin embargo, en México únicamente se produce de manera silvestre en los estados de Puebla y Veracruz. Este fruto presenta en su composición polifenoles, antocianinas, carotenoides y ácido ascórbico que le confieren una elevada actividad antioxidante; no obstante, su consumo sólo se limita a mercados cercanos a donde se cosecha. Por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar los cambios en los compuestos con actividad antioxidante en pulpa y mucílago gelatinoso (MG) durante 42 días a 5 °C y atmósferas modificadas de empaque AM1 y AM2; aire como control. En MG, independientemente de los días de almacenamiento, los tratamientos AM2 y control, presentaron el mayor contenido de polifenoles (12.9 mg EAG g⁻¹ bs), mientras que en el día 42, se registró la mayor concentración de estos compuestos. Por el contrario, en la pulpa este parámetro disminuyó. El contenido de antocianinas en MG (inicial=8.1 mg Cianidin-3-Glu g⁻¹ bs) se incrementó en el control, pero disminuyó en AM1 y AM2. En cuanto al licopeno, la mayor concentración en la pulpa se registró en el día 28, en promedio 2.85 mg 100 g⁻¹ ff. La actividad antioxidante inicial fue similar en pulpa y MG (69 µmol ETrolox g⁻¹ bs), pero se incrementó en mayor proporción en el control hasta 115 µmol ETrolox g⁻¹ bs. Con el almacenamiento en aire, la berenjenilla, mantiene o incrementa la concentración de compuestos con actividad antioxidante, lo que aporta beneficios a la salud de los consumidores. Adicionalmente la larga vida de anaquel de los frutos expone el alto potencial para su cultivo y distribución a nivel comercial en México.

1. INTRODUCCIÓN

La berenjenilla (*Solanum betaceum*), también conocida como tomate de árbol o tamarillo, es un fruto que se produce principalmente en Nueva Zelanda, Colombia y Ecuador (Schotsmans y Woolf, 2011); países donde usualmente se consume como fruta fresca, aunque también se utiliza la pulpa y/o el mucílago gelatinoso (MG) del fruto en la elaboración de diversos productos (mermelada, yogurt, salsa, etc.), lo que ha despertado el interés de la industria alimentaria para explotarlo comercialmente (Bohs, 1989; Torres, 2012; Espín-Mayorga y Brito-Grandes, 2014).

Este fruto presenta en su composición polifenoles, antocianinas, carotenoides y ácido ascórbico que le confieren una elevada actividad antioxidante (Torres, 2012). La presencia de estos compuestos ha sido asociada con la reducción en el riesgo de padecer diversas enfermedades como el Alzheimer, cáncer, enfermedades cardíacas, diabetes *mellitus*, arterosclerosis, entre otras, por tanto, la berenjenilla se considera como un alimento funcional (Ali-Hassan y Abu-Bakar, 2013; Ghosal *et al.*, 2013).

En México, existe desconocimiento por parte de la población acerca de las propiedades antioxidantes que posee este fruto, que se debe en gran medida a que la temporada de cosecha es relativamente corta (3 a 4 meses) y a que su venta suele ser en lugares cercanos de su colecta, lo que resulta ser una importante limitante si tomamos en cuenta que en el país únicamente se produce de manera silvestre en los estados de Puebla y Veracruz (Ruiz *et al.*, 2013). Lo cual conlleva a buscar una alternativa para conservar los frutos, en especial los compuestos que tienen actividad antioxidante, durante un periodo más largo.

Una de las tecnologías poscosecha utilizada para alargar la vida útil de las frutas y hortalizas, en fresco o mínimamente procesadas, son las atmósferas modificadas (AM), dicho término se refiere al uso de una atmósfera diferente al aire normal, generalmente bajas concentraciones de O₂ y altas concentraciones de CO₂, con la finalidad de retardar la maduración de un fruto, evitando el deterioro y procurando mantener la calidad nutritiva del alimento (Yahia, 2006). Las AM generalmente son complementarias a la refrigeración.

Bajo este contexto el objetivo del estudio fue evaluar el uso de las AM para conservar los polifenoles, antocianinas, licopeno y actividad antioxidante en pulpa y mucílago gelatinoso de frutos de berenjenilla durante su almacenamiento en refrigeración.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Material Biológico

Se analizaron frutos de berenjenilla (*Solanum betaceum*) cultivados en Tonayán, Veracruz, seleccionando aquéllos que presentaban color homogéneo y libres de daño mecánico.

Almacenamiento en atmósferas modificadas

Los frutos de berenjenilla se almacenaron en una cámara de refrigeración a temperatura de 5 ± 1 °C. Las atmósferas (tratamientos) en las que se almacenaron fueron las siguientes: AM1 (Vacío) se realizó con una selladora de vacío (XtraVac, modelo 300), la cual extrajo el aire de una bolsa de polietileno de baja densidad (RAMZ, Ciudad de México, México) y posteriormente se selló con calor. El tratamiento AM2 (atmósfera pasiva) se llevó a cabo con una bolsa con las mismas características que las utilizadas para AM1 pero sólo sellada sin hacer vacío. Para el control se colocaron los frutos dentro de una bolsa de papel estraza. Para todos los tratamientos se utilizaron cuatro berenjenillas con características físicas similares (tamaño, peso y color).

Preparación del extracto

Se tomaron 3.0 g de la pulpa (incluyendo la cáscara) o del mucílago gelatinoso y se homogenizaron (Nutribullet, NBR-12XX, E.U.A.) durante 15 s con 27 ml de metanol al 80% (v/v); posteriormente se centrifugó a 4000 rpm, T=10 °C y 20 min (Hettich zentrifuge, Universal 32R, Tuttlingen, Alemania). En el sobrenadante se midió la concentración de polifenoles totales, antocianinas y actividad antioxidante.

3. MÉTODOS

Polifenoles totales. El contenido de fenoles totales se determinó mediante el método espectrofotométrico de Singleton y Rossi (1965). Se tomaron 400 µl del extracto, se adicionó 1 ml de agua destilada y 200 µl de reactivo Folin-Ciocalteu 2 N, durante 5 a 8 min. Posteriormente se colocaron 2 ml de Na₂CO₃ al 7% (p/v) y se aforó con agua destilada, se agitó y se mantuvo en incubación por 1 h a temperatura ambiente. Terminando el tiempo de incubación se leyó a una absorbancia de 750 nm en un espectrofotómetro (Jenway, modelo 6305, Bibby Scientific Ltd, United King). La cuantificación se realizó con una curva estándar de ácido gálico (0.02 a 0.165 mg

ml⁻¹) y se reportó como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de berenjenilla en base seca (mg EAG g⁻¹ bs).

Actividad antioxidante. Se analizó realizó por el método propuesto por Brand-Williams *et al.* (1995). Se tomaron 100 µl de la muestra y se adicionaron 2.9 ml del reactivo DPPH (2,2-difenil-picril-hidracil) (6 mg 100 ml⁻¹ en metanol al 80% (v/v)), se agitó vigorosamente y se mantuvo en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posterior a esto se registró la absorbancia a 517 nm. Para la cuantificación se utilizó una curva estándar de Trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (0.13-0.79 µmol Eq Trolox ml⁻¹). El resultado fue expresado como µmol equivalentes de Trolox por gramo de berenjenilla en base seca (µmol Eq Trolox g⁻¹ bs).

Antocianinas monoméricas. La determinación de antocianinas monoméricas se llevó a cabo mediante el método de pH diferencial descrito por Giusti and Wrolstad (2001). Se utilizaron cloruro de potasio ajustado a un pH=1 y acetato de sodio a pH=4.5, los cuales fueron adicionados a 600 µl de la muestra, llevándolos a un volumen final de 3 ml. Posteriormente se leyó la absorbancia a 510 nm para cianidina como absorbancia máxima en el intervalo visible de 420-700 nm con un blanco de metanol al 80%. Para obtener el valor final de absorbancia se utilizó la siguiente fórmula: $A = (A_{max} - A_{700 \text{ nm}}) \text{ pH } 1 - (A_{max} - A_{700 \text{ nm}}) \text{ pH } 4.5$ Dónde: A_{max} es la máxima absorbancia, mientras que A_{700} es la lectura dada a esa absorbancia. La concentración de antocianinas se estimó con la ecuación: $\text{Antocianinas (mg l}^{-1}\text{)} = (A * PM * FD * 1000) / (\epsilon * 1)$, dónde A es la absorbancia a 510 nm; PM es el peso molecular para cianidín-3-O-glucósido (449.2 g mol⁻¹) FD es el factor de dilución, ϵ es el coeficiente de extinción molar (26900 g mol⁻¹cm⁻¹) y 1 es la longitud de la trayectoria de la celda (1 cm). El resultado fue reportado como mg de cianidín-3-O-glucósido por g de berenjenilla en base seca (mg Cyn-3-Glu g⁻¹ bs).

Licopeno. Para la determinación de licopeno se siguió el procedimiento descrito en Wrolstad *et al.* (2005). Se colocó en un tubo de ensaye cubierto de papel aluminio 1 g de pulpa de la muestra y se agregó 25 ml de una solución de hexano: acetona: etanol (2:1:1) y se homogenizó. En oscuridad el extracto se colocó en un embudo de separación y la fracción liposoluble se leyó con el espectrofotómetro a una absorbancia de 472 nm. La concentración de licopeno fue determinada con la siguiente fórmula: $\text{Licopeno (g } 100 \text{ g}^{-1}\text{)} = (A_{472} * PM * V * 100) / (m * \epsilon)$, dónde A_{472} es el valor de absorbancia a 472 nm, PM es el peso molecular del licopeno (537 g mol⁻¹), V es el volumen de la fase lipídica, m es la cantidad de berenjenilla utilizada en gramos y ϵ es el coeficiente de extinción molar del licopeno (17.2 x 10⁴ l mol⁻¹ cm⁻¹).

Concentración de gases. Se determinó el % de CO₂ y O₂ presente en las bolsas de los tratamientos AM1 y AM2 con un equipo analizador de gases (PIB Dansensor, modelo Checkpoint).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con un diseño completamente al azar. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias por el método de Tukey ($p \leq 0.05$), así como la determinación del coeficiente de correlación entre las diferentes variables de estudio. Los datos fueron analizados con el software Statistica 7.0.

4. RESULTADOS

El contenido de polifenoles en MG de berenjenilla en el tiempo inicial fue de 12.9 mg EAG g⁻¹ bs, valores superiores a lo reportado por Vasco *et al.* (2009) para berenjenillas de Ecuador. En el día 14 el tratamiento AM1 presentó la mayor concentración de estos compuestos (Figura 1, 1A), mientras que en los tratamientos AM2 y control, el mayor contenido se observó en el día 42. El incremento que se presentó en los tratamientos AM1 y AM2, podría atribuirse a la enzima fenilalanina amonio-liasa (PAL), la cual es responsable de la síntesis de polifenoles y cuya actividad aumenta como respuesta a diversos factores de estrés, como lo es las elevadas concentraciones de CO₂ atmosférico (Jones, 1984). Debido a que en ambos tratamientos se

observó el mayor contenido de polifenoles en el mismo periodo que presentaron los mayores niveles de CO₂ en su atmósfera (Cuadro 1), se atribuye el comportamiento mostrado al aumento de la actividad de dicha enzima. En el caso de las berenjenillas almacenadas en aire, el aumento observado es atribuido al comportamiento normal de madurez del fruto, debido al desarrollo de antocianinas (Kader, 1992).

En la pulpa se encontraron 16.4 mg EAG g⁻¹ bs de polifenoles, cantidad superior a lo reportado por Ali-Hassan y Abu-Bakar (2013) para berenjenillas de Malasia (2.61 mg EAG g⁻¹ bs). En el día 42 el contenido inicial descendió en los tres tratamientos (Figura 1, 2A). El descenso observado durante el almacenamiento podría ser atribuido a la enzima polifenol oxidasa (PPO). Esta enzima a nivel biológico oxida a los compuestos fenólicos (Jones, 2001) y emplea O₂ como aceptor de electrones para llevar a cabo dicha degradación (Kader y Barret, 2005). Debido a esto el tratamiento AM2 fue el que conservó la mayor cantidad de estos compuestos al finalizar el estudio, ya que en el día 42, en comparación con los otros tratamientos, presentó la menor concentración de O₂ (Cuadro 1).

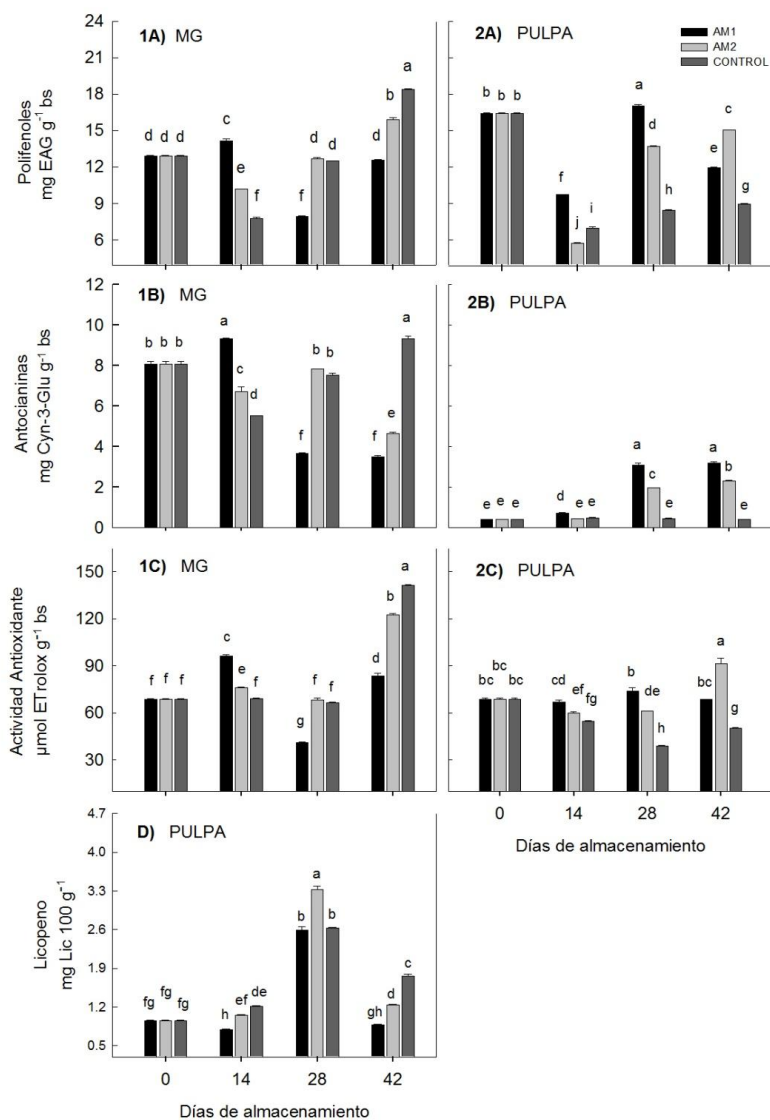
Cuadro 1. Concentración de gases durante el almacenamiento de berenjenilla en los tratamientos AM1 y AM2.

Dias	AM1 (%)		AM2 (%)	
	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂
14	0.66	50	0.2	36.6
28	1.4	18	0.01	35
42	5.3	3	0.05	23

El MG es la fracción de la berenjenilla que presentó el mayor contenido de antocianinas (8.1 mg Cyn-3-Glu g⁻¹ bs). AM1 y AM2, en el día 42, presentaron una drástica disminución respecto al día cero (3.5 y 4.7 mg Cyn-3-Glu g⁻¹ bs, respectivamente) (Figura 1, 1B). Los cambios observados pueden ser atribuidos a que la membrana que protege el contenido del MG se rompió, producto de los cambios internos ocurridos en la berenjenilla, provocando así que el contenido de antocianinas en el MG se dispersara en todo el fruto y por tanto disminuyera su concentración. En cambio las muestras control, en el mismo periodo, presentaron la mayor concentración de antocianinas (9.3 mg Cyn-3-Glu g⁻¹ bs), un comportamiento similar fue observado por Wrolstand y Heatherbell (1974), quienes reportaron que la concentración de antocianinas en MG alcanza su punto más alto con la sobremaduración. En pulpa (inicial = 0.42 mg Cyn-3-Glu g⁻¹ bs) ocurrió lo opuesto que en el MG.

AM1 y AM2 aumentaron el contenido en el día 42 (3.19 y 2.33 mg Cyn-3-Glu g⁻¹ bs) (Figura 1, 2B), mientras que en las berenjenillas control no se observaron cambios significativos a lo largo del estudio.

El contenido de licopeno fue determinado únicamente en la pulpa del fruto. La concentración inicial ($0.95 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) fue similar a lo reportado para berenjenillas de Venezuela ($1.22 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) (Torres, 2012). En cuanto al almacenamiento, los tres tratamientos mostraron un comportamiento ascendente hasta el día 28 (Figura D) lo cual se atribuye al proceso de maduración del fruto, que da lugar a la pérdida de clorofila y formación de carotenoides (Kader, 1992). De igual forma Mencarelli y Saltveit (1988) reportaron que las frutas pueden sintetizar carotenoides conforme transcurren los días de almacenamiento. Después del día 28 comenzó una drástica degradación de licopeno, esta pérdida de carotenoides se ha atribuido al ataque de radicales libres por la enzima lipoxigenasa (Jarén-Galán y Mínguez-Mosquera, 1997).



La actividad

Figura 1. Cambios en el contenido de polifenoles (A), antocianinas (B), actividad antioxidante (C) y licopeno (D) en MG y pulpa de berenjenillas almacenadas en atmósferas modificadas. Valores promedio con la misma letra son estadísticamente iguales.

antioxidante en MG, en los tres tratamientos, se observó incremento respecto al día cero (68.8 $\mu\text{mol ETrolox g}^{-1} \text{bs}$) (Figura 1, 1C), observándose los mayores valores en las muestras control (141.3 $\mu\text{mol ETrolox g}^{-1} \text{bs}$). Todos los tratamientos mostraron una elevada correlación con los polifenoles. El tratamiento AM2 y control tuvieron una correlación de $r= 0.76$ y 0.83 , respectivamente, mientras que el tratamiento AM1 fue el que presentó la mayor correlación entre ambas variables ($r=0.97$). En el caso de las antocianinas únicamente el tratamiento control presentó una elevada correlación con la actividad antioxidante ($r=0.70$). Por tanto, los cambios que se observaron en la actividad antioxidante pudieron ser atribuidos a los polifenoles.

En pulpa el tratamiento AM1 al finalizar el estudio presentó la misma actividad antioxidante que al inicio (Figura 1, 2C). Para este tratamiento dicha actividad está estrechamente relacionada con el licopeno ($r=0.97$). En el caso de AM2 la mayor correlación la obtuvo con respecto a las antocianinas ($r=0.58$), las cuales, a pesar de no ser los compuestos fenólicos mayoritarios en esta parte del fruto, su presencia, y por tanto su actividad antioxidante, se debe a la pérdida de la estructura interna de la berenjenilla. En el tratamiento control se observa un descenso progresivo de la actividad antioxidante hasta el día 28, después presentó un ligero incremento en este parámetro. El comportamiento de la actividad antioxidante en este tratamiento es atribuido al contenido de polifenoles, ya que es con el que presentó la mayor correlación ($r=0.77$).

5. CONCLUSIONES

Las muestras control mostraron el mejor comportamiento para la mayoría de los compuestos que se analizaron. Los polifenoles y antocianinas, en MG, aumentaron al finalizar el estudio, además en la pulpa, las antocianinas no registraron cambios durante 42 días de almacenamiento.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ali-Hassan, S. H., Abu-Bakar, M. F. 2013. Antioxidative and anticholinesterase activity of *Cyphomandra betacea* fruit. The Scientific World Journal 1-7.
2. Bohs, L. 1989. Ethnobotany of the genus *Cyphomandra* (*Solanaceae*). Economic Botany 43(2): 143-163.
3. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. L. W. T. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Science and Technology 28(1): 25-30.
4. Espín-Mayorga S., Brito-Grandes B. 2014. Tree tomato. *En: Iberian-American fruits rich in bioactive phytochemical for nutrition and health*. Gironés-Vilaplana A., Baenas N., Villaño D., Moreno D. (eds.). LIMENCOP S.L., Alicante, España pp. 187-192.
5. Ghosal M., Chhetri P.K., Ghosh M. K., Mandal P. 2013. Changes in antioxidant activity of *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. Fruits during maturation and senescence. International Journal of Food Properties 16(7): 1552-1564.
6. Giusti, M. M., Wrolstad, R. E. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. Current protocols in food analytical chemistry F1.2. 1-13.
7. Jarén-Galán, M., Mínguez-Mosquera, M. I. 1997. β -carotene and capsanthin co-oxidation by lipoxygenase. Kinetic and thermodynamic aspects of the reaction. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45(12): 4814-4820.
8. Jones A.M. 2001. Programmed cell death in development and defense. Plant Physiology 125(1): 94-97.
9. Jones H. 1984. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its and its role in plant development. Phytochemistry 23(7): 1349-1359.
10. Kader A.A. 1992. Biología y tecnología de poscosecha: una revisión general. Universidad de California 3311: 311-325.

11. Kader A.A., Barret D. 2005. Classification, composition of fruits and postharvest maintenance of quality. *En: Processing fruits*. Barret D., Somogyi L., Ramaswang H. (eds.) Senescence and Technology pp. 11.
12. Mencarelli, F., Saltveit, M. E. 1988. Ripening of mature-green tomato fruit slices. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 113(5): 742-745.
13. Odrizola-Serrano I., Soliva-Fortuny R., Martín-Belloso O. 2008. Effect of minimal processing on bioactive compounds and color attributes of fresh-cut tomatoes. *LWT-Food Science and Technology* 41: 217–226.
14. Ruíz, X. V., Armas, D. N. R., Beltrán, J. Á. G., Pozos, M. E. B. 2013. Estabilidad de un producto dulce de tamarillo (*Cyphomandra betacea*) conservado por métodos combinados. *Scientia Agropecuaria* 4(2): 89-100.
15. Schotsmans W.C., Woolf A. 2011. Tamarillo (*Solanum betaceum* (Cav.)). *En: Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits*. E.M. Yahia (ed.). Woodhead Publishing Limited, Padstow, Cornwall, UK pp 427-440.
16. Singleton V., Rossi J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybde-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.
17. Torres. A. 2012. Caracterización física, química y compuestos bioactivos de pulpa madura de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*) (Cav.) Sendtn. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 62(4): 381-384.
18. Vasco C., Avila J., Ruales J., Svanberg U., Kumal-Eldin A. 2009. Physical and chemical characteristics of golden-yellow and purple-red varieties of tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 60(7): 278-288.
19. Wrolstad, R. E., Acree, T. E., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Sporns, P. 2005. *Handbook of food analytical chemistry: pigments, colorants, flavors, texture, and bioactive food components*. John Wiley and Sons, Inc. New Jersey. Section F.F2 pp. 71-107.
20. Wrolstad R., Heatherbell D. 1974. Identification of anthocyanins and distribution of flavonoids in tamarillo fruit (*Cyphomandra betaceae* (Cav.) Sendt.). *Journal of the Science of Food and Agricultural* 25: 1221-1228.
21. Yahia E. 2006. Modified and controlled atmospheres for tropical fruits. *Stewart Postharvest Review* 2(5):1-10.

ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA, VISIBLE E INFRARROJA CERCANA DE UN MUCÍLAGO

Juan Carlos Ramírez-Granados, Blanca Estela Gómez Luna, Rafael Alejandro Veloz García, Israel Enrique Herrera Díaz, Laura Mejía Teniente, J. Antonio Zavala Vega y Daniela B. Ramos Cruz

Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías,
Universidad de Guanajuato, Campus Celaya-Salvatierra

RESUMEN

Los mucílagos son polisacáridos de origen vegetal que cuando son mezclados con agua forman una solución viscosa. Estas sustancias orgánicas pueden ser encontradas en algas, semillas, raíces, hongos y en muchos vegetales. Algunas de las propiedades más notables de los mucílagos son su inocuidad y su capacidad para retener humedad por ser hidrocoloides. Estas características son idóneas para la elaboración de protectores solares para la piel con ingredientes orgánicos que son menos tóxicos para las personas y menos contaminantes para el medio ambiente en comparación con los protectores solares de tipo químico que son ampliamente usados en la actualidad. Por esta razón, en este trabajo de investigación presentamos la caracterización espectral de un mucílago en el rango de 200 a 1000 nm. Dicha caracterización consiste en la extracción del mucílago y en la determinación de su transmitancia y absorbancia en las bandas ultravioleta, visible e infrarroja cercana del espectro electromagnético. En este estudio utilizamos plantas de *Opuntia* spp. para obtener los extractos. La extracción del mucílago consiste en una serie de procesos físicos y químicos que nos permiten obtener el mucílago purificado en polvo. Posteriormente, la transmitancia y absorbancia del mucílago en disolución es determinada mediante un espectrómetro de haz sencillo con rejilla de difracción. La finalidad de determinar la transmitancia y absorbancia de este mucílago es estudiar la factibilidad de usarlo como ingrediente activos de protectores solares orgánicos más saludables, ecológicos y sustentables.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad son ampliamente conocidos los efectos nocivos del exceso de radiación solar sobre la piel humana.[1-3] La radiación que emite el sol puede ser descrita a través de la Ley de Radiación de Planck, la cual establece que los objetos a temperatura (T) emiten radiación electromagnética en todas las longitudes de onda (λ). Además, esta ley establece que la magnitud de la radiación electromagnética emitida por los objetos varía con la temperatura y la longitud de onda.

Aunque el sol emite radiación en todas las longitudes de onda, no todos los rangos espectrales son de igual interés en el área de protección solar para la piel. La radiación ultravioleta (UV) con longitud de onda $\lambda < 200$ nm aunque es ionizante generalmente no es de gran interés en protección solar debido a que es fuertemente absorbida por la atmósfera terrestre y su intensidad es marginal. En protección solar se busca evitar que la radiación UV con longitud de onda entre 200 y 400 nm llegue hasta la piel ya que también es ionizante. La radiación UV se divide en varias sub-bandas que son: ultravioleta vacío (40 -190 nm), ultravioleta lejano (190- 220 nm), ultravioleta C (UVC: 220 - 290 nm), ultravioleta B (UVB: 290 - 320 nm) y ultravioleta A (UVA: 320 - 400 nm). Aunque la radiación UVC puede ser muy dañinas para la piel, ésta es casi absorbida en su totalidad por el ozono de la atmósfera terrestre. Aproximadamente el 90% de la radiación UVB

también es absorbida por la atmósfera, mientras que la radiación UVA se transmite casi íntegramente a través de la atmósfera.[4] Así pues, los esfuerzos en protección solar se concentran en el diseño y fabricación de productos capaces de bloquear o filtrar la radiación UVB y UVA. Los daños que la radiación UVB y UVA pueden causar a la piel incluyen enrojecimiento, quemaduras, hipersensibilidad, envejecimiento prematuro (que se manifiesta a través de flacidez, arrugas y manchas), inmunosupresión y algunos tipos de cáncer de piel.[5-9] Por otra parte, aunque la luz ($400 \text{ nm} \leq \lambda \leq 780 \text{ nm}$) generalmente es considerada segura, la exposición prolongada y reiterada a esta radiación también puede provocar daños en la piel, tales como, enrojecimiento, arrugas, manchas, urticaria, fotodermatosis, etc. y por lo tanto también es importante evitar que la piel sea expuesta de manera excesiva a la radiación visible.[10] Finalmente, la radiación con longitud de onda $\lambda > 780 \text{ nm}$ tampoco es de preocupación en este campo porque es menos energética que la radiación UV y visible (Vis).

Aunque existen diferentes tipos de protectores solares tales como los químicos y los físicos, en la actualidad son mayormente comercializados y usados los protectores solares de tipo químico que están hechos a base de compuestos aromáticos conjugados con un grupo carbonilo.[11] Sin embargo, existe controversia acerca del uso prolongado y reiterado de los protectores solares químicos ya que hay sospechas acerca de que estos compuestos químicos pueden ser absorbidos por el cuerpo humano causando una leve pero progresiva intoxicación. Además, hay indicios de que estos químicos pueden interferir con la actividad endócrina de los usuarios. También es dudosa la efectividad de los protectores solares químicos en contra de la inmunosupresión producida por los rayos UVA. Asimismo, el uso regular de protectores solares puede generar una disminución de la producción de vitamina D en personas mayores.[12-16]

Por lo anterior, es deseable contar con alternativas de protección solar para la piel que sean menos tóxicas para el cuerpo y más amigables con el ambiente durante su fabricación, uso y desecho. En este trabajo estudiamos la factibilidad de emplear materiales orgánicos inocuos como ingredientes activos de protectores solares con la finalidad de explorar la posibilidad de generar alternativas más saludables que los protectores de origen químico. Con este propósito, implementamos y adaptamos métodos de extracción reportados en la literatura para extraer el material orgánico de interés que en este caso es el mucílago de *Opuntia* spp. Este mucílago como muchos otros es un material orgánico que está constituido por polisacáridos y que es seguro incluso para el consumo humano. Otras de las características de este mucílago es que posee la capacidad de retener la humedad por ser un hidocoloide. Otras de las características importantes de este material es su abundancia, facilidad de extracción y bajo costo. Las características anteriores representan ventajas potenciales del mucílago de *Opuntia* para la elaboración de protectores solares por su origen orgánico, nula toxicidad, capacidad de humectación, alta disponibilidad y bajo costo.

Con la finalidad de evaluar la factibilidad de emplear el mucílago de *Opuntia* como ingrediente activo de protectores solares orgánicos determinamos la transmitancia y la absorbancia de soluciones de agua destilada con mucílago purificado. La determinación de la transmitancia y la absorbancia de dichas soluciones fue realizada en el rango espectral de 200 a 1000 nm, cubriendo las regiones UV lejano, UVC, UVB, UVA, visible y una porción del infrarrojo cercano. Estas mediciones nos proporcionan un amplio panorama acerca de las características de absorción óptica de este mucílago para determinar si es factible o no usarlo como ingrediente activo de protectores solares orgánicos.

A continuación presentamos aspectos teóricos acerca de la medición de la transmitancia y absorbancia del material orgánico que proponemos para la elaboración de protectores solares.

2. TEORÍA

Para este estudio seleccionamos al mucílago de *Opuntia* spp. como candidato para ser el ingrediente activo de protectores solares para la piel debido a sus características naturales. El

mucílago de nopal es un polímero lineal compuesto de varios polisacáridos como L-arabinosa en un 47%, D-xilosa en un 23%, D-galactosa en un 18%, L-ramnosa en un 7% y ácido D-galacturónico en un 5%. Este polímero es soluble en agua e insoluble en acetona y en alcohol etílico. Una de las características más interesantes del mucílago es su capacidad para retener la humedad, ya que puede contribuir a rehidratar la piel.

El mucílago de *Opuntia* es extraído de los cladodios de esta cactácea mediante diferentes métodos. Los métodos de extracción y purificación más eficientes generalmente incluyen la precipitación del mucílago y varias etapas de filtrado. Para extraer y purificar nuestro mucílago implementamos y adaptamos un método reportado previamente en la literatura.[17] El método consiste en cortar los cladodios en cuadros de aproximadamente 1 cm de lado. Luego el nopal cortado en cuadros es molido para obtener una alícuota. La alícuota se pasa por un proceso de escaldado a 80 C durante 5 min, y después es filtrada con la ayuda de una bomba de vacío para eliminar los tejidos vegetales. Posteriormente agregamos etanol o acetona en una proporción 3:1 al sobrenadante para precipitar el mucílago. A continuación se filtra el mucílago precipitado y se elimina la fase acuosa. El mucílago extraído es colocado en un horno a 70 C con la finalidad de eliminar la humedad restante. Finalmente, el mucílago seco es molido en un mortero hasta obtener un polvo fino.

Después de obtener el mucílago de *Opuntia* en la forma de un polvo fino y seco procedimos a preparar una solución de agua doblemente destilada con mucílago para medir determinar sus espectros de absorbancia y de transmitancia en el rango de 200 nm a 1000 nm.

La transmitancia de los materiales es el cociente de la intensidad de salida (I_s) entre la intensidad de entrada (I_0). La transmitancia es un cociente adimensional cuyo rango va de cero a uno o de cero a 100 cuando es expresado en forma de porcentaje. La transmitancia es un valor que nos indica la proporción de radiación con longitud de onda λ que logra atravesar una muestra y es calculada como

$$\%T = \frac{I_s}{I_0} 100. \quad \text{Ec. (1)}$$

Por otra parte, la absorbancia de un material es una medida de la cantidad de radiación con longitud de onda λ que absorbe el analito que en este caso es el mucílago de *Opuntia*. Sin embargo, la absorbancia no depende linealmente de la intensidad de salida como la transmitancia, sino que su dependencia es logarítmica y puede ser descrita a través de la Ley de Beer

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I_s}\right) = -\log(T) = \epsilon c L, \quad \text{Ec. (2)}$$

donde ϵ es la absorptividad molar, c la concentración molar y L el ancho de la muestra. La absorbancia es adimensional y se mide en unidades de absorbancia (u.a.). La Ley de Beer también nos permite determinar propiedades del mucílago como su absorptividad molar si se conoce la molaridad, para lo cual es necesario estimar la masa de la muestra, el volumen y el peso molecular del mucílago que es aproximadamente de 3×10^6 g/mol.

Con las ecuaciones anteriores es posible determinar de manera teórica el porcentaje de transmitancia y absorbancia del mucílago en una cierta longitud de onda. Para determinar los espectros de transmitancia y de absorbancia en el rango de longitudes de onda deseado es necesario repetir las mediciones de manera manual o automática dependiendo del tipo de espectrómetro disponible.

En las siguientes secciones presentamos detalles acerca de la configuración experimental del espectrómetro que empleamos para realizar las mediciones, y de la preparación de las soluciones con mucílago que empleamos como muestra.

3. CONFIGURACIÓN EXPERIMENTAL

Medimos la transmitancia y la absorbancia de soluciones acuosas con mucílago de Opuntia en el rango de 200 a 1000 nm. Para preparar estas soluciones colocamos 100 ml de agua doblemente destilada en un vaso de precipitados. Luego añadimos el mucílago purificado y seco al agua destilada mientras agitábamos la mezcla para acelerar el proceso de disolución. Continuamos añadiendo mucílago a la solución hasta obtener la concentración requerida.

Para caracterizar una muestra de solución acuosa con mucílago empleamos un espectrómetro Jenway modelo 7305. Este dispositivo óptico es un espectrómetro de haz sencillo con rejilla de difracción que nos permite analizar la energía radiante que atraviesa la muestra en una longitud de onda a la vez dentro del rango de 200 a 1000 nm y con resolución de 10 nm. En la figura 1 presentamos el arreglo experimental empleado para realizar las mediciones de transmitancia y absorbancia del mucílago.

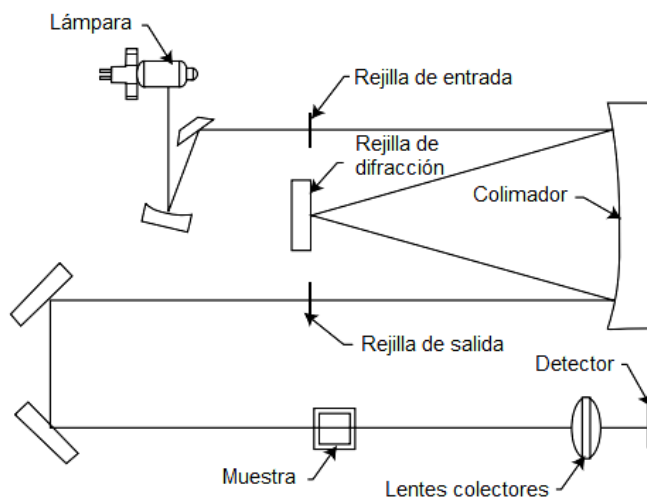


Figura 1. Configuración experimental del espectrómetro empleado para la caracterización del mucílago. Esta es una configuración de haz sencillo con rejilla de difracción. Adaptada de Espectrómetros Jenway por Bibby Scientific.[18]

El arreglo experimental que utilizamos para la medición de transmitancia y absorbancia de una solución acuosa con mucílago incluye una fuente de iluminación, un espejo colimador, una rejilla de difracción, un soporte para celda, una celda de cuarzo, lentes colectoras y un detector. La fuente de luz es una lámpara de xenón que proporciona energía radiante de amplio espectro. Esta radiación es filtrada espacialmente por la rejilla de entrada y luego es enfocada sobre la rejilla de difracción mediante el espejo colimador. Esta rejilla difracta el haz de luz y lo separa en diferentes longitudes de onda. La radiación casi-monocromática se filtra nuevamente y luego se hace incidir perpendicularmente sobre la superficie de la muestra. La energía radiante que logra atravesar la muestra es recolectada por un sistema óptico y luego es enfocada sobre el detector que transforma la señal óptica en una señal eléctrica que posteriormente es digitalizada, procesada y analizada en una computadora. Para obtener la transmitancia primero medimos la intensidad de entrada I_0 usando una celda con agua destilada, luego reemplazamos el agua destilada por la muestra con

mucílago y medimos la intensidad de salida I_s . Este procedimiento fue repetido para cada longitud de onda en que se necesitaba una medición. Finalmente, con las ecs. (1) y (2) obtuvimos la transmitancia y la absorbancia de las soluciones con mucílago en cada longitud de onda. La transmitancia y absorbancia como función de la longitud de onda son presentadas en forma de gráficas o espectros. En la siguiente sección presentamos los espectros de transmitancia y de absorbancia que obtuvimos y también discutimos los resultados.

4. RESULTADOS

A través de la configuración experimental descrita en la sección anterior medimos los espectros de transmitancia y de absorbancia del mucílago de *Opuntia* spp. Para estudiar detalladamente tales propiedades espectrales del mucílago preparamos y caracterizamos dos disoluciones. La primera disolución consistió en una mezcla de agua destilada y mucílago al 50% de la saturación, mientras que la segunda fue una mezcla de agua destilada con mucílago al 6.25%. La primera disolución fue analizada en el rango de 200 a 1000 nm y nos permitió obtener un panorama general acerca del comportamiento de la transmitancia y absorbancia del mucílago en el rango ultravioleta, visible y parte del infrarrojo cercano. La segunda disolución fue preparada con un grado de dilución mayor con la finalidad de estudiar minuciosamente la transmitancia y absorbancia del mucílago en la región UV de 200 a 300 nm debido a su alta absorción en esta región. Los espectros de transmitancia y de absorbancia de ambas disoluciones son presentados en las figuras 2 y 3.

En la figura 2 mostramos los espectros de transmitancia (a) y de absorbancia (b) del mucílago de *Opuntia* en disolución acuosa al 50% del punto de saturación. En este caso observamos que la transmitancia es menor que el 3% en el rango UV de 200 a 400 nm; mientras que para las regiones visible e infrarroja cercana la transmitancia se incrementa casi de manera lineal hasta alcanzar el 35% a 1000 nm. El espectro de absorbancia de la misma disolución nos confirma que el mucílago presenta una fuerte absorción de radiación UV, la cual disminuye conforme se incrementa la longitud de onda. De hecho, para esta disolución no fue posible calcular la absorbancia en el rango de 200 a 300 nm debido a que la absorción de radiación en esta banda es casi total. Por esta razón preparamos y caracterizamos una segunda disolución acuosa con menor concentración de mucílago que nos permitiera estudiar con mayor detalle sus propiedades espectrales en la banda UV antes mencionada. Los espectros de transmitancia y absorbancia resultantes son mostrados en la Fig. 3.

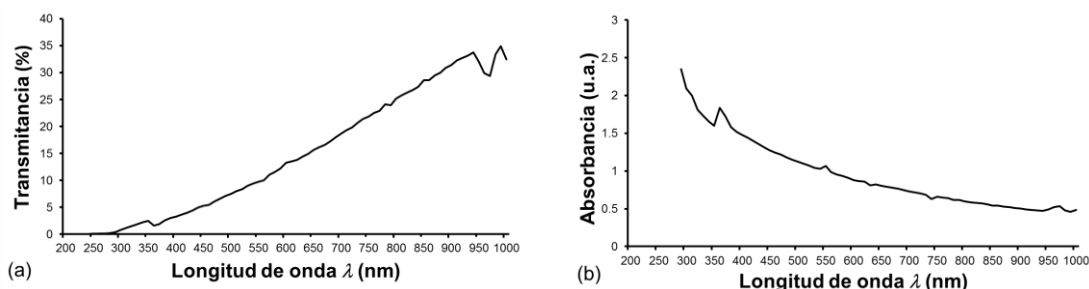


Figura 2. Espectros de transmitancia (parte a) y de absorbancia (parte b) del mucílago de *Opuntia* en solución acuosa al 50% del punto de saturación.

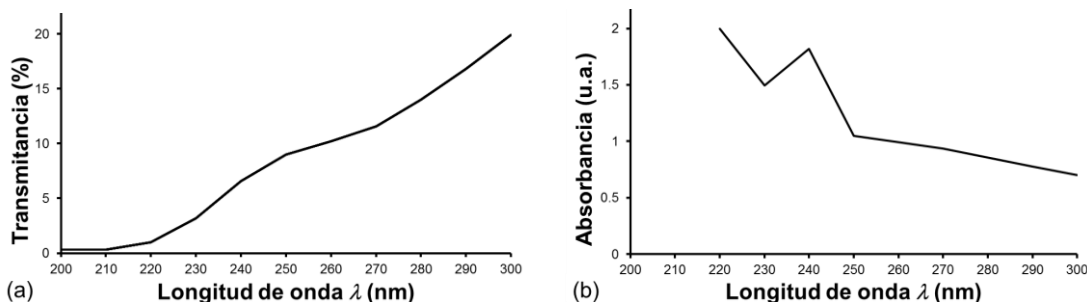


Figura 3. Espectros de transmitancia (parte a) y de absorbancia (parte b) del mucílago de *Opuntia* en solución acuosa al 6.25%.

En la figura 3 presentamos los espectros de transmitancia (a) y de absorbancia del mucílago en disolución acuosa en 6.25% para el intervalo de longitudes de onda de 200 a 300 nm que corresponden a la región UV del espectro electromagnético. En la parte (a) de la figura 3 notamos que el porcentaje de transmitancia se incrementa con la longitud de onda, tal y como podría ser inferido a partir de la tendencia del espectro mostrado en la figura 2a. La parte (b) de la misma figura nos confirma que la absorbancia del mucílago se incrementa para longitudes de onda cortas.

Estos resultados indican que el mucílago de *Opuntia* spp. en solución acuosa efectivamente presenta una fuerte absorbancia en la región UV del espectro electromagnético. Este rango de longitudes de onda es justamente la banda espectral que debe absorber o reflejar cualquier ingrediente activo de un protector solar a fin de proteger a la piel de los efectos nocivos de este tipo de energía radiante. Más aún, en el rango de 200 a 1000 nm la absorbancia del mucílago se incrementa conforme disminuye la longitud de onda, lo cual implica que el mucílago absorbe de manera más eficiente a los fotones con longitud de onda corta que son más energéticos y potencialmente dañinos para la piel. Por lo tanto, podemos decir que corroboramos nuestra hipótesis la cual establece que el mucílago de *Opuntia* es un material orgánico e inócuo que podría ser empleado como ingrediente activo de protectores solares para la piel.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo determinamos algunas propiedades espectrales del mucílago de *Opuntia* spp. en disolución acuosa para evaluar la factibilidad de usarlo como ingrediente activo de protectores solares orgánicos para la piel. Medimos el porcentaje de transmitancia y la absorbancia de dos disoluciones acuosas con mucílago: una al 50% del punto de saturación y otra al 6.25%. La primera disolución fue analizada en el rango de 200 a 1000 nm y nos proporcionó el comportamiento general de la transmitancia y de la absorbancia en el ultravioleta, el visible y parte de infrarrojo cercano. La segunda disolución fue elaborada para estudiar con mayor detalle la banda UV de 200 a 300 nm. Nuestros resultados indican que el mucílago de *Opuntia* en disolución acuosa al 50% tiene una transmitancia menor al 3% y una fuerte banda de absorción en el UV de 200 a 400 nm. Los resultados también demuestran que la absorbancia del mucílago se incrementa a medida que disminuye la longitud de onda de la radiación. Esto implica que el mucílago absorbe eficientemente la radiación ultravioleta y puede evitar que esta energía ionizante llegue hasta la piel. Concluimos que el mucílago de *Opuntia* spp. podría ser usado como ingrediente activo de protectores solares para la piel debido a que este material orgánico posee una alta absorbancia de radiación UV; además de ser un material inócuo y de retener la humedad. Más estudios son necesarios para evaluar los aspectos cosméticos, la estabilidad foto-química y la substantividad de este mucílago.

AGRADECIMIENTOS: Este trabajo fue realizado con el apoyo de la Universidad de Guanajuato, la Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (DAIP), y el Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP).

BIBLIOGRAFÍA

1. R. Stevanato, M. Bertelle, y S. Fabris, "Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols", *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 69, 1, 2014, p. 71.
2. N. Saewan, y A. Jimtaisong, "Photoprotection of natural flavonoids", *J. Appl. Pharmaceutical Sci.* Vol. 3, 9, 2013, pp. 129–141.
3. O. Debska, G. Kamińska-Winciorek, y R. Śpiewak, "Does sunscreen use influence the level of vitamin D in the body?", *Polski Merkuriusz Lekarski*, Vol. 34, 204, 2013, 368–370.
4. S. C. Rai Shanmuga, C. R. Srinivas. "Update on photoprotection", *Indian J. Dermatol.* Vol. 57, 5, 2012, pp. 335-342.
5. H. V. DeBuys, S. B. Levy, J. C. Murray, et al. "Modern approaches to photoprotection", *Dermatol. Clin.* Vol. 18, 2000, pp. 577–590.
6. B. Ortel, A. Tanew, K. Wolff, y H. Hönigsmann, "Polymorphous light eruption: action spectrum and photoprotection", *J. Am. Acad. Dermatol.* Vol. 14, 1986, pp. 748–753.
7. C. Miyamoto, "Polymorphous light eruption: successful reproduction of skin lesions, including papulovesicular light eruption, with ultraviolet B", *Photodermatol.* Vol. 6, 1989, pp. 69–79.
8. P. E. Stoebner, R. Poosti, K. Djoukelfit, J. Martinez, y L. Meunier, "Decreased human epidermal antigen-presenting cell activity after ultraviolet A exposure: dose-response effects and protection by sunscreens", *Br. J. Dermatol.* Vol 156, 2007, pp.1315–1320.
9. S. Q. Wang, R. Setlow, et al. "Ultraviolet A and melanoma: a review", *J. Am. Acad. Dermatol.* Vol. 1, 2001, pp. 837–846.
10. S. Ryckaert, y R. Roelandts, "Solar urticaria. A report of 25 cases and difficulties in phototesting", *Arch. Dermatol.* Vol 134, 1998, pp. 71–74.
11. M. S. Latha, J. Martis, V. Shobha, R. Sham Shinde, S. Bangera, B. Krishnankutty, S. Bellary, S. Varughese, P. Rao, B. R. Naveen Kumar, "Sunscreening Agents: A Review", *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* Vol 6, 1, 2013; pp. 16-26.
12. M. Schlumpf, P. Schmid, S. Durrer, M. Conscience, K. Maerkel, M. Henseler, et al. "Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters: an update", *Toxicology*, Vol. 205, 2004, pp. 113–22.
13. C. Schmutzler, A. Bacinski, I. Gotthardt, K. Huhne, P. Ambrugger, H. Klammer, et al. "The ultraviolet filter benzophenone 2 interferes with the thyroid hormone axis in rats and is a potent *in vitro* inhibitor of human recombinant thyroid peroxidase", *Endocrinology*, Vol. 148, 2007, pp. 2835–2844.
14. S. E. Whitmore, y W. L. Morison, "Prevention of UVB-induced immunosuppression in humans by a high sun protection factor sunscreen", *Arch. Dermatol.* Vol. 131, 1995, pp. 1128–1133.
15. H. C. Wulf, T. Poulsen, H. Brodthagen, y K. Hou-Jensen, "Sunscreens for delay of ultraviolet induction of skin tumors", *J. Am. Acad. Dermatol.* Vol. 7, 1982, pp. 194–202.
16. S. C. Thompson, D. Jolley, R. Marks, "Reduction of solar keratoses by regular sunscreen use", *N. Engl. J. Med.* Vol. 329, 1993, pp. 1147–1151.
17. M. A. Abraján Villaseñor, "Efecto del método de extracción en las características químicas y físicas del mucílago del nopal (*opuntia ficus-indica*) y estudio de su aplicación como recubrimiento comestible", Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, 2008, p. 244.
18. Manual de Operación, *Espectrómetros Jenway 7300 & 7305*, Bibby Scientific USA, 2010, p. 52.

EFFECTO DE DOS DIETAS SOBRE EL CRECIMIENTO DE PAVOS EN UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN URBANO.

¹Demetrio Ambriz García, ¹Alfredo Trejo Córdova y ¹María del Carmen Navarro Maldonado

¹Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

RESUMEN

La agricultura urbana tiene varias finalidades, una de ellas es la producción de alimentos, otra, la terapia de ocupación así como la disminución de enfermedades emocionales de habitantes de las grandes ciudades. El consumo de carne de pavo se realiza preferentemente en época decembrina y su mejora genética ha permitido tener en poco tiempo ganancias de peso corporal considerables. En el presente trabajo en pavos de 3 semanas de edad, se evaluaron dos dietas durante 10 semanas de crecimiento. La dieta balanceada consistió en una ración con granos básicos, probióticos y hierbas aromáticas aportando 22% de Proteína cruda (PC) (n=15 pavos). La dieta mixta consideró un balanceado comercial (Pavo Inicia con 27% de PC y Pavo Crece con 23% de PC, Alimentos Tepexpan) adicionado al 50% con maíz quebrado y residuos vegetales a discreción (n=10). Los cuidados y vacunación de ambos grupos fueron similares. Durante las primeras 6 semanas de engorde los parámetros de crecimiento fueron similares entre grupos (5.5 kg vs 4.8 kg, $P>0.05$), sin embargo posteriormente hubo una mejor condición de ganancia de peso (6.8 kg vs 7.8 kg $P<0.05$), de condición corporal y de salud de los de dieta mixta. Esto además permitió un ahorro económico en los costos de engorde. Se concluye que la inclusión de maíz al 50% así como residuos vegetales favorece el sistema de producción de pavo en pequeña escala en un medio urbano, reflejándose en mejores ganancias de peso y de condición corporal.

1. INTRODUCCIÓN

Se ha reconocido por la Organización Mundial de la Salud que los principales problemas de salud que aquejan a la población humana dentro de las grandes urbes están relacionados con las emociones (Angustia, Depresión, Ansiedad), todas ellas relacionadas en alguna medida con el estrés propio del estilo de vida (Méndez et al., 2005). Por otro lado la Organización para alimentos y alimentación (FAO) considera conveniente que la práctica de la agricultura y la producción pecuaria urbana, sustenten especialmente en lo relativo a este rubro, a familias que ostentan alguna carencia alimenticia. La FAO ha calculado que en las zonas precarias colindantes a las grandes urbes la producción propia de alimentos para las familias puede abastecerles hasta de un 30% de sus requerimientos de alimentos, pero además ayuda sustancialmente a reducir los problemas emocionales en el entendido que la dedicación a la producción de plantas o animales conlleva a los que a ella se dedican, una situación de terapia de ocupación y de relajación (Hernández, 2006). Así la producción de pavos en un medio urbano además de proveer un alimento de consumo estacional (festividades navideñas) además provee durante el tiempo de la producción de elementos valiosos para la salud emocional.

Desde luego que la premisa de la producción urbana está basada en el respeto al vecindario, pues la cercana colindancia demanda una dedicación importante a ,medidas preventivas tales como evitar malos olores, proliferación de vectores molestos (moscas, cucarachas y roedores), así como ruidos o manejos indeseables que perturben o tensen al vecindario. Por otro lado la producción

urbana demanda una dedicación plena para la conservación del bienestar animal, en especial cuando en diversas urbes existe legislación que protege los derechos de los animales y hay un seguimiento puntual para que se cumpla. En la ciudad de México incluso existe un área policial especializada en la conservación del bienestar animal que si bien sus sanciones son en primer lugar conciliatorias, no deja de presionar para que los poseedores de animales consideren esta norma. Por otro lado la producción de alimentos y mas aun cando los propios productores serán los consumidores, debe hacerse bajo normas sanitarias, para protección de los animales y de la salud de los consumidores.

En la Ciudad de México (antes Distrito Federal) y en especial en la zona Oriente (Delegación Iztapalapa) existe colonias habitacionales de características muy diversas, algunas con industria mezclada, otras con uso habitacional residencial y las mas de uso habitacional popular. La mayor parte de los pobladores son personas de segunda o tercera generación, cuyos ancestros procedieron de estados del interior del país, por ejemplo de Oaxaca, Guerrero y Puebla. Estos pobladores originales, hacia el año de 1960, no solo llegaron a colonizar esta zona sino que además trajeron su cultura y como parte de ella la producción de plantas y animales que en varios hogares de esta demarcación ha subsistido hasta a la fecha. Pero además con la problemática del calentamiento global y el daño ecológico al planeta, se han puesto de moda muchas ecotecnias que se han difundido ampliamente así como la concientización de que debemos, en la medida de las posibilidades familiares, incorporar la producción de plantas o alimentos como forma de acercarnos a la naturaleza y recobrar la sensibilidad en especial en grandes urbes de alta densidad poblacional y problemas sociales asociados.

La crianza de pavo de temporada es una opción interesante porque además de lo anteriormente mencionado permite el aprovechamiento de los residuos de la cocina para la alimentación así como el aprovechamiento de las excretas para uso en la jardinería o en la producción de plantas para consumo.

Sirva también comentar que la agricultura urbana puede contribuir de manera importante a la mejora paisajística de las zonas, así como a la mejora de la tierra, agua y en especial del aire (Moreno, 2007), esto resulta muy trascendente par la Ciudad de México porque en fechas recientes la problemática generada por los altos índices de contaminación ambiental han derivado en una nueva sección de los medios informativos llamada Alerta Ambiental, donde es necesario atender para saber cuáles vehículos automotores pueden o no transitar en el dia en cuestión so pena de ser detenido y multado.

En el presente trabajo, se compara los parámetros de producción en dos parvadas de pavo, una en condiciones de hogar y la otra en condiciones de granja, pero ambas dentro de la misma demarcación de Iztapalapa. Para la primera producción se siguió una dieta ya establecida en parvadas anteriores con la inclusión de residuos vegetales y para la segunda solo recibieron una dieta balanceada.

2. MÉTODO

Los animales (25 pavos de línea comercial de 3 semanas de edad) fueron comprados en la Granja Chihuahua, ubicada en el fraccionamiento las Delicias en el municipio de Amecameca, en octubre de 2015. Se dividieron en dos grupo: Parvada Granja (15 pavos) y parvada Casa (10 pavos).La primera de ellas permaneció en la granja de la Licenciatura en Producción Animal de la UAM Iztapalapa en una corraleta de 18m² con acceso a una parcela de 15m². La parvada Casa estuvo en un sistema de producción urbano en la azotea en una corraleta de 6m² y con acceso por la mañana y tarde a un área libre de 60m². En la granja Chihuahua se compró alimento balanceado de 40kg (Pavo inicia (27% Proteína Cruda) y Pavo Crece (23% PC), Tepexpan). Este alimento fue para introducir a los animales a sus nuevos ambientes. En el caso de la parvada Granja, recibieron a las dos semanas, una dieta balanceada al 22% de PC (Maíz, Ajonjolí, Trigo, Soya, CaCO₃,

Lisina, Sal, CaHCO₃, Minerales, Vitaminas, Levadura, Orégano y Canela. Se agradece la preparación y balanceado de la dieta al Mtro Carlos Romero Ramírez) y se dejó esta dieta durante el resto del experimento. En el caso de la Parvada de Casa se dio el alimento Pavo Inicia por dos semanas, y posteriormente el Pavo Crece (23% PC), con maíz quebrado en proporción al 50%, además se les dio residuos de la cocina y forraje tierno de maíz (de 3 semanas de crecimiento).

Los pavos fueron vacunados contra viruela (100 dosis, Viruela, Maver) y triple aviar (Newcastle, Colibacilosis y Cólera, Traicova, Maver). La vacuna de viruela fue fraccionada en condiciones de esterilidad obteniendo 3 porciones de liofilizado y 3 de diluyente, para dar a los animales una vacunación y dos refuerzos.

Cada día se lavaron los contenedores de agua y se llenaron con agua limpia y fresca, cabe mencionar que a los 15 días de estancia, se amplió el espacio asignado a los animales, además se cambiaron los envases plásticos de capacidad de 1 litro por los de 4 litros, tanto para alimento como para agua, estos últimos fueron colocados en la parte cercana al drenaje a manera que el escurrimiento y el acumulamiento de humedad fuera en la menor parte del corral. Cabe señalar que el uso de botes en lugar de comederos tipo tolva comerciales o en línea, permite un mejor control del alimento y un notorio menor desperdicio.

La cama cercana a los comederos y bebederos se removió cada día colocando la húmeda en un lugar alejado para secarse y se cambió por cama seca, este sistema de remoción de cama en sentido rotatorio permitió evitar humedad excesiva y por ende proliferación de microorganismos. A partir de las 3 semanas de recibidos, los animales salieron todos los días, por lo menos durante 30 minutos a la parcela del corral. A partir de 15 días de estancia, se colgaron botes de PET (600 ml) en distintos puntos que sirvieron como distractores, además se colocaron botes cortados por la mitad en la parcela para que jugaran. Se abrió la cortina para aumentar ventilación en el día y se cerró por la noche para disminuir la entrada de moscos cuya población durante todo el proceso de engorda fue elevada especialmente por la presencia de árboles cercanos, jardines y un cárcamo abierto. A partir del día 24 de engorda se colocaron en el interior perchas que no fueron utilizadas a pesar de que la parvada era mayoritariamente machos (85%) A los 34 días de engorda se amplió el corral de 9m² a 12m² y así permaneció hasta el final de la de 62 días. Los animales fueron pesados en ambas parvadas (Granja y Casa) con una báscula digital de capacidad de 45 kg. El promedio de los pesos fue comparado cada quincena y analizados a través de la prueba estadística de ANOVA de una vía.

3. RESULTADO

El cambio de alimento de Pavo inicia a la dieta balanceada, a pesar de que se hizo de manera gradual durante 5 días, en la parvada de Granja, generó la producción de heces muy blandas, por lo que durante tres días fue necesario apoyarles con agua de arroz. Cuando los pavos de esta parvada salieron a la parcela, mostraron gran gusto por el consumo de tierra, lo que se interpretó como carencia de minerales en la dieta, ante lo cual se recomendó colocar cloruro de sodio directo al alimento sobre el comedero, sin embargo siguieron consumiendo tierra habitualmente.

La conducta anteriormente descrita no fue observada en la parvada Casa, a pesar de que la primera tuvo acceso a caminar sobre parcelas y comer pastos naturales. La segunda de las parvadas (Casa) solo tuvo acceso a la azotea, durante la mañana y tarde y el resto del tiempo estuvieron confinados, aunque con la dieta variada.

Los parámetros de aumento de peso fueron similares para ambas parvadas durante las primeras dos quincenas. A partir de la tercera, aumentó ligeramente la ganancia de peso de la parvada Granja sin alcanzar diferencias significativas ($p > 0.05$) A partir de esta quincena y en las subsecuentes hubo una sensible reducción en el ritmo de crecimiento de la parvada Granja, siendo mejor el crecimiento de la parvada Casa, cabe hacer mención que a pesar de la vacunación

y revacunación en dos ocasiones de la parvada Granja, la población de moscos y la transmisión de viruela fue muy intensa, de manera que cuando se suspendió la revacunación, al poco tiempo se presentó el brote, lo cual probablemente hizo que no se mantuviera el ritmo de crecimiento mostrado con anterioridad. El grupo de Casa recibió la vacunación de viruela y una sola revacunación y al término del experimento también mostró afectación por la viruela, pero no de la magnitud como alcanzaron los de la parvada Granja. La población de moscos en la parvada Casa fue bastante menor que en Granja y quizá se deba a esto la menor incidencia del padecimiento. Sin embargo durante el experimento no se tuvo ningún deceso.

Es importante mencionar que en ambos grupos se tuvieron crecimientos adecuados al compararlos con los reportes en la literatura para pavos criados en condiciones intensivas de las mismas edades a las aquí mostradas, sin embargo la propuesta de la crianza de pavos en el medio urbano fue adecuada tanto para los de dieta balanceada como para los de dieta variada. Es importante mencionar que en el medio urbano en ocasiones no es simple conseguir el total de los ingredientes para formular una dieta, o quizá no se cuente con el conocimiento de cómo hacerlo. Se considera entonces que la alternativa de comprar el alimento comercial ya balanceado (Pavo inicia y Pavo crece), pudiera ser una alternativa de interés porque con la inclusión de un ingrediente adicional (maíz quebrado) ayuda a la reducción de costos, pero además la inclusión de residuos de cocina permite darles a éstos últimos un uso en el hogar y evitar su destino al camión recolector. En cuanto a la producción de plántulas de rápido crecimiento (maíz en micro invernadero) es una alternativa simple de fácil realización.

Se sabe que las aves prefieren para su consumo un tamaño de partícula diverso, así como colores y texturas. Los alimentos balanceados comerciales no procuran este requerimiento por facilidad y por asuntos comerciales, sin embargo si en pequeña escala los pavos tienen esta opción, los ritmos de crecimientos serán muy satisfactorios y muy cercanos a lo conseguido en granjas comerciales.



Fig 1. Parvada Granja en corraleta. El espacio vital fue abierto conforme el crecimiento de los animales lo requería.

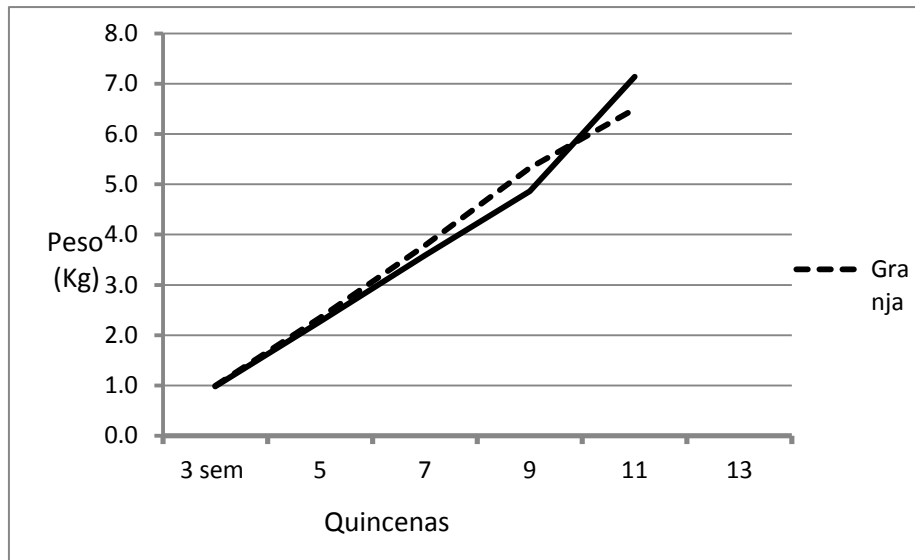


Fig 2. Pesos promedio (kg) de las Parvadas Granja y Casa, desde la quincena 3 (recepción) hasta la quincena 11 (salida).

4. CONCLUSIÓN

La agricultura urbana es un remanente cultural de los pobladores originarios, que con esta actividad encuentran una forma de manifestación a su conocimiento e inquietud. Además les permite generar y aprovechar los satisfactores producidos en beneficio propio o intercambiarlos. El medio urbano permite estos acercamientos naturales con el irrestricto respeto a la comunidad, a al ambiente y el bienestar animal. Los pavos pueden ser criados con resultados adecuados a partir de dietas debidamente balanceadas, pero además con la inclusión de otros ingredientes como el maíz quebrado (50% en proporción con un balanceado comercial) residuos de la cocina, así como de un cultivo accesible y sencillo de plántulas de maíz. El cuidado de enfermedades de los animales producidos es fundamental, utilizando herramientas como la vacunación y el tratamiento idóneo, pues requisito es el bienestar de los animales y respeto al entorno y vecinos.

BIBLIOGRAFÍA

1. L. Hernández. "La agricultura urbana y su caracterización de sistemas productivos y sociales, como vías de seguridad alimentaria en nuestras ciudades". Cultivos Tropicales. Vol 27, 2. 2006 pp 13-25.
2. O. Moreno. "Agricultura urbana: nueva estrategia de integración social y recuperación ambiental en la ciudad" Rev Electrónica Diseño Urbano y Paisaje. Vol 4, 11. 2007, pp 1-14
3. M. Méndez, Luz Ramírez, y Alzate A. "La práctica de la agricultura urbana como expresión de emergencia de nuevas ruralidades: reflexión en torno a la evidencia empírica" Cuadernos de desarrollo rural, 55 2005. pp 51-70

4. G Gordillo de Anda. "Seguridad alimentaria y agricultura familiar" Revista de CEPAL 83. 2004, pp 71-83
5. N Morán,. "Agricultura urbana: un aporte a la rehabilitación integral". Papeles de relaciones ecosociales y cambio global Vol 111. 2010, pp 99-111

PRODUCCION DE BIODIESEL A PARTIR DE ACEITE VEGETAL RESIDUAL UTILIZANDO TRANSESTERIFICACION ALCALINA Y SU COMPARACION CON UN METODO DE CATALISIS BIOLOGICA UTILIZANDO UN EXTRACTO BACTERIANO CRUDO CON ACTIVIDAD LIPOLITICA

Ortiz Lechuga, Eugenia Guadalupe; Quintero Zapata, Isela; Arévalo Niño Katiushka.

Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

RESUMEN

El biodiesel es un combustible que se puede utilizar directamente en los vehículos de combustión interna, es biodegradable y no tóxico, sin embargo; carece de competitividad frente al diésel de petróleo principalmente por el alto costo de los aceites usados para su elaboración, alcanzando hasta en un 95% los costos de producción. Fue nuestro objetivo con la realización de este trabajo el realizar un análisis de las condiciones óptimas para la producción de biodiesel mediante transesterificación alcalina con aceite vegetal usado (AVU) como materia prima y compararlo con una transesterificación biológica utilizando extractos crudos de microorganismos productores de enzimas lipolíticas. Para la transesterificación alcalina se consideró un diseño experimental de 72 reacciones, en las cuales se obtuvo un rendimiento final de biodiesel de hasta 85.53%. Adicionalmente se obtuvieron de suelo contaminado por aceites vegetales residuales, 100 aislados correspondientes a 38 cepas bacterianas y 14 cepas fúngicas positivas para producción de lipasas. Se seleccionó una cepa bacteriana identificada como *Staphylococcus* sp. la cual presentó una actividad extracelular de 480 UI/L, dicha cepa fue inmovilizada en esferas de alginato de sodio al 3% de 0.5 a 2 mm de diámetro presentando tolerancia a la presencia de metanol. Las esferas de alginato se utilizaron para transesterificación enzimática de AVU obteniendo un rendimiento final de 62% de producción de metil ésteres.

1. INTRODUCCIÓN

Dada la situación energética que impera en el mundo numerosos países han adoptado políticas de sustentabilidad favoreciendo estrategias con enfoque ecológico y de igual manera apoyando de forma cada vez más frecuente políticas de apertura energética. Por definición, los biocombustibles son alcoholes, éteres, ésteres y compuestos orgánicos (Stratta, 2000) producidos a partir de cultivos tanto herbáceos como leñosos, residuos de la agricultura, de la actividad forestal y en menor medida de desechos industriales; siendo los principales el etanol, biogás y biodiesel.

El biodiesel, propuesto originalmente por Rudolf Diesel desde el año 1895 para su prototipo de motor y desplazado por los derivados del petróleo, se considera un combustible limpio por lo que en la actualidad ha renacido el interés general en su producción ya que es un combustible que cumple con las características que la situación actual requiere (García y García, 2006). En el caso particular del etanol así como del biodiesel, su producción proviene en su mayoría de una variedad de cultivos como la caña de azúcar, maíz, betabel, colza, soja y palma de aceite, entre otros; sin embargo, por el destino primario de éstos cultivos, se enfrentan al debate ético acerca de la uso de cultivos alimenticios para producción de combustibles, proyectando que en un futuro próximo las fuentes principales de obtención de biocombustibles provendrán no solo de éstos cultivos, sino en su mayoría de residuos orgánicos, incluyendo residuos agroindustriales de material lignocelulósico

provenientes de plantaciones forestales energéticas, de cultivos de microalgas y de aceite vegetal usado (AVU) (Islas y Jiménez, 2009)

2. TEORÍA

Transesterificación química

La vía para la obtención de biodiesel es la transesterificación de aceites y grasas con un alcohol de bajo peso molecular, en presencia de un catalizador adecuado (Crespo et al. 2001). Cuando los triglicéridos reaccionan con el alcohol, las tres cadenas de ácidos grasos son liberadas del esqueleto de la glicerina y se combina con el alcohol para dar como resultado un éster de alquilo (Zhang et al. 2003).

Transesterificación enzimática

Por medio de esta técnica se presenta la habilidad de esterificar ácidos grasos libres y triglicéridos de forma simplificada utilizando enzimas (lipasas), no requiere lavados, no existe formación de jabón, permite obtener glicerol de mejor calidad lo que facilita su comercialización, permite trabajar con materia prima de calidad variable como aceite vegetal usado (AVU) y grasas animales sin importar que presenten un nivel de acidez elevado y contenido de agua (Shimada et al. 2002; Narasimharao et al. 2007; Tamalampudi et al. 2008; Fjerbaek et al. 2009).

Fuentes de obtención de lipasas

Las lipasas pueden ser encontradas tanto en plantas como en animales, hongos o bacterias, siendo aquellas de origen microbiano las que presentan una amplia variedad de actividades catalíticas, son fácilmente manipulables genéticamente y los microorganismos que las producen tienen un rápido crecimiento en medios poco costosos, siendo adicionalmente a esto, estables a las fluctuaciones estacionales (Schmidt-Dannert 1999; Aysun, 2009).

Para el caso particular de la producción de biodiesel, la utilización de enzimas como biocatalizadores por medio de la inmovilización en soportes poliméricos permiten la interacción con la interfase lípido/agua y permiten su recuperación y posterior reúso lo que presenta importantes ventajas ya que por la plasticidad de la actividad lipolítica y la protección que le brinda el soporte, permite la utilización de muestras dentro de un rango de calidad más amplio (contenido mayor a 1% de ácidos grasos libres).

Ventajas del aceite vegetal usado como fuente de obtención de biodiesel

Grandes cantidades de aceite vegetal usado están disponibles en el mundo, sin embargo el manejo de ellos ostenta un gran desafío ya que su desecho presenta una posible contaminación de agua y recursos terrestres (Chhetri et al. 2008). En países miembros de la Unión Europea, la producción de AVU ronda en el rango de las 700,000-1,000,000 toneladas/año (Kulkarni y Dalai, 2006). Mientras que en Estados Unidos se estima que aproximadamente 100 millones de galones de AVR son producidos diariamente (Radich, 2006).

El AVU puede provenir de diversas fuentes; domésticas, comerciales e industriales (Refaat, 2010), si bien, la utilización de estos residuos no presenta competencia con los cultivos alimentarios (Hossain y Mazen, 2010), y tampoco es viable para continuar con la función para la cual fue destinado (Refaat, 2010), actualmente es considerado como una opción factible para la producción de biodiesel, cumpliendo 3 objetivos principales: 1) la posibilidad del desarrollo de un biocombustible que cumple con los estándares de calidad internacionales; 2) la eliminación de una fuente de contaminación de agua, considerando su disposición por cañerías (Szmigielski et al. 2008), y a su vez el abaratamiento del tratamiento de las misma, y 3) la reducción de los costos de producción del biocombustible.

Como parte de los objetivos principales de este trabajo nos centramos en probar diversas estrategias para la producción de este biocarburoante enfocándonos en puntos clave que mejoraran el rendimiento y permitieran obtener una reacción más amigable al ambiente. Se determinaron 2 estrategias: la optimización de parámetros de transesterificación química a través del ensayo con variables de importancia y la utilización de enzimas (lipasas) para los procesos de transesterificación enzimática con la finalidad de eliminar el proceso de lavado y obtener un bio-catalizador estable a las condiciones de producción.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Estrategia general

Transesterificación alcalina

Se tomaron muestras de AVU una vez al mes por un periodo de 6-8 meses de 3 sucursales de empresas de giro restaurantero ((E1, E2; E3). Se procesaron las muestras determinando índice de acidez y composición de ácidos grasos mediante cromatografía de gases. Se estableció un diseño experimental tomando en cuenta las variables de mayor importancia para la optimización de la transesterificación química (Fig. 1).

Catalizador	CC	Rel. Molar	Temperatura °C	Tiempo (minutos)
KOH	0.5%	6:1	60	60
		10:1		
		15:1		90
		20:1		
NaOH	0.5%	6:1	60	60
		10:1		
		15:1		90
		20:1		

Fig. 1 Diseño experimental

Se realizó el análisis de las muestras utilizando un espectrómetro de infrarrojo Nicolet™ iS 10 FTIR con un rango de 400 a 4000 cm^{-1} para evaluar la determinación de picos de los grupos característicos presentes en muestras de biodiesel. Finalmente se determinaron parámetros de calidad de las muestras de biocombustible obtenidas.

Transesterificación enzimática

Se determinó la actividad enzimática (lipasas) mediante ensayo en placa utilizando Rodamina B y cuantificación espectrofotométrica con nitrofenil palmitato, a aislados obtenidos de muestras de suelo impactadas con aceites vegetales residuales.

Una vez seleccionada la cepa bacteriana que presentó las características con mayor potencial para producción de biodiesel se realizó su identificación molecular mediante el gen 16S.

Posteriormente se inmovilizaron los sobrenadantes crudos de la cepa seleccionada utilizando alginato de sodio al 3%.

Se determinó un diseño experimental para llevar a cabo la transesterificación enzimática considerando temperatura, porcentaje de inoculación de sobrenadante, adición de agua y metanol.

4. RESULTADOS

Para la transesterificación química se obtuvieron los mayores rendimientos a partir de muestras de la empresa E2 utilizando KOH como catalizador (Fig. 2) obteniendo un combustible de tono ámbar que presentó características de calidad dentro de los límites establecidos en normas internacionales (Fig. 3).

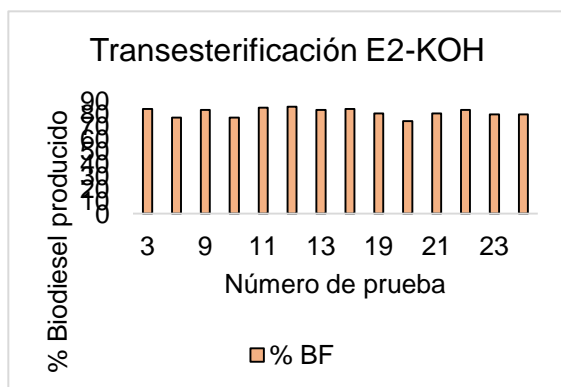


Fig. 2 Rendimientos de biodiesel obtenidos utilizando KOH como catalizador



Fig. 3 Biodiesel E2

En la tabla 1 se muestran las 5 reacciones con los rendimientos más elevados utilizando KOH como catalizador, se observa un rendimiento inicial de 96.7% del cual se obtuvo un rendimiento final de 85.6% debido al exhaustivo proceso de lavado y purificación al cual se somete a las muestras con la finalidad de asegurar su calidad.

Tabla 1. Muestras E2-KOH

# Prueba	BI (mL)	Glicerol	%Inicial	BF (mL)	Pérdida lavados (mL)	%Final
3	101.3	20.7	89.0	87.3±8.2	14.0	77.3
4	99.3	18.0	87.9	83.7±4.0	15.7	74.0
11	106.0	26.3	93.8	94.7±0.5	11.3	83.8
12	106.0	25.7	95.6	96.7±0.9	9.3	85.6
13	107.3	37.3	95.0	93.0±2.2	14.3	82.3

Transesterificación enzimática

Se obtuvieron 52 aislados positivos para actividad lipolítica utilizando Rodamina B, de los cuales 38 fueron bacterianos y 14 fúngicos (Fig. 4).

Se seleccionó al aislado bacteriano 12, el cual mediante identificación molecular fue determinado como *Staphylococcus sp.* presentando una actividad lipolítica de 480 UI/L (Fig. 5), tolerancia al metanol y estabilidad térmica por 4 horas a 60 °C.

Sobrenadante del aislado 12 fue inmovilizado en esferas de alginato de 0.5 a 2 mm de diámetro utilizadas para ser presentadas a la reacción de transesterificación enzimática obteniendo un rendimiento final de 62% bajo condiciones de 40 °C, relación molar 10:1 metanol:aceite con adición

escalonada y 15% de agua. El análisis de espectrofotometría de IR presenta las señales características para el grupo carbonilo a los 1744 y 1436 cm^{-1} para metil ésteres (Fig. 6).

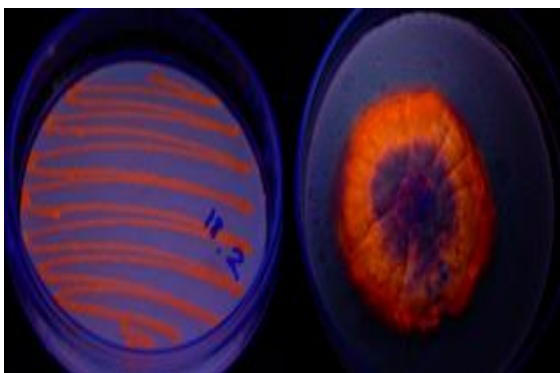


Fig. 4 Muestras positivas para actividad lipolítica mediante ensayo con rodamina B.

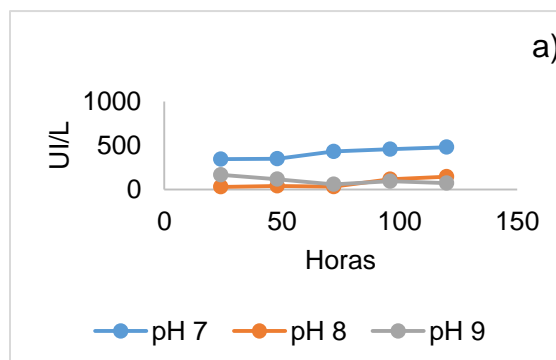


Fig. 5 Actividad lipolítica extracelular *Staphylococcus* sp. (aislado 12).

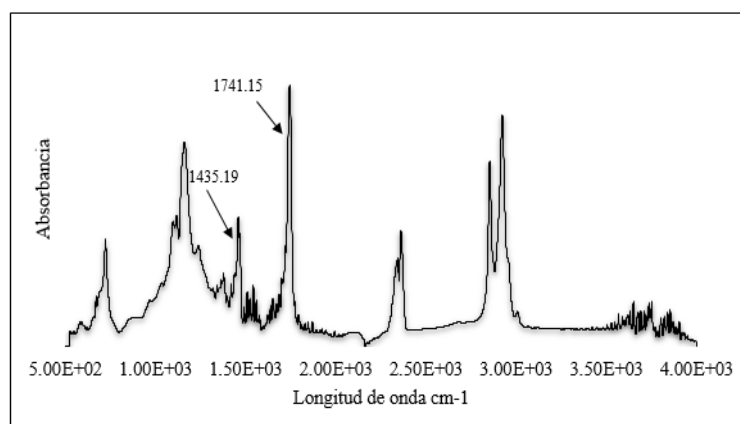


Fig. 6 Espectro de infrarrojo de las muestras obtenidas de biodiesel mediante transesterificación enzimática

5. CONCLUSIONES

Se logró la obtención de biodiesel por medio de transesterificación alcalina. Se determinaron las condiciones óptimas para la muestra E2 con rendimientos de 85.53%. Las características de calidad de las muestras obtenidas se encontraron dentro de los límites establecidos en las normas internacionales.

Se obtuvieron un total de 38 cepas bacterianas y 14 cepas fúngicas positivas para actividad lipolítica. Se determinó la actividad lipolítica de extractos crudos obteniendo la mayor actividad (480 UI/L) del extracto crudo bacteriano obtenido a partir del aislado 12.

Se identificó molecularmente al aislado 12 mediante secuenciación de gen 16S rRNA como el género *Staphylococcus* sp.

Se logró inmovilizar el extracto crudo en alginato al 3% y realizar la transesterificación enzimática obteniendo un rendimiento final de 62% a 40 °C, con una relación molar de 10:1, 15% de agua y 96 horas de reacción.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. Aysun "Isolation and identification of a lipase producing psychrotrophic bacteria from soil: cloning and partial characterization of its lipase". 2009. [Thesis]
2. B. A. Chhetri, C. K., Watts, M. Rafiqul Islam, "Waste cooking oil as an alternative feedstock for biodiesel production", *Energies*, 1:3-18. DOI: 10.3390/en1010003
3. G. Crespo, M. Martínez, J. Aracil. "Biodiesel: una alternativa real al gasóleo mineral. Ingeniería Química", Marzo, 2001, pp. 135-145.
4. L. Fjerbaek, K. V. Christensen, B. Norddahl, "A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification". *Biotechnology and Bioengineering*. 102(5), 2009, pp. 1298-315.
5. J. M. García Camús, J. A. García Laborda, "Biocarburantes líquidos: biodiesel y bioetanol" CEIM, Dirección General de Universidades e Investigación, 2006, Pág. 32.
6. A. B. M. S. Hossain y M. A. Mazen, "Effects of catalyst types and concentrations on biodiesel production from waste soybean oil biomass as renewable energy and environmental recycling process", *Australian Journal of Crop Science*. 4(7), 2010, pp. 550-555.
7. J. Islas Sampiero y A. Jiménez Martínez, "La bioenergía: oportunidades y retos tecnológicos" *Ide@s CONCYTEG*, Año 4(54), 2009, pp. 1185-1197
8. M. G. Kulkarni y A. K. Dalai, "Waste cooking oil-an economical source for biodiesel: A review" *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 45(9), 2006, pp. 2901-2913.
9. K. Narasimharao, A. Lee y K. Wilson, "Catalysts in production of biodiesel: A review. *J. Biobased Mater*". *Bioenergy*, 1, 2007, pp. 19-30. DOI: 10.1016/jbmb.2007.002
10. A. Radich, "Biodiesel performance, costs, and use. US Energy Information Administration", 2006. Disponible en: <http://www.eia.doe.gov/oiaf/analysispaper/biodiesel/index.html>
11. A. A. Refaat, "Different techniques for the production of biodiesel from waste vegetable oil" *International Journal of Environmental Science and Technology*. 7(1), 2010, pp. 183-213.
12. C. Schmidt-Dannert, "Recombinant microbial lipases for biotechnological applications" *Bioorganic and medical chemistry*. 7(10), 1999, pp. 2123-2130. DOI: 10.1016/S0968-0896(99)00141-8
13. Y. Shimada, H. Watanabe, A. Sugihara y Y. Tominaga, "Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing" *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 17(3-5), 2002, pp. 133- 142. doi:10.1016/S1381-1177(02)00020-6.
14. J. Stratta, "Biocombustibles: los aceites vegetales como constituyentes principales del biodiesel", *Investigación y Desarrollo – Departamento de Capacitación y Desarrollo de Mercado*, 2000.
15. M. Szmigielski, B. Maniak y W. Piekarski, "Evaluation of chosen quality parameters of used fryngrape oil as fuel biocomponent", *International Agrophysics*. 22(4), 2008, pp. 361-364.
16. S. Tamalampudi, R. M. Talukder, S. Hamad, T. Numatab y A. Kondo et al, "Enzymatic production of biodiesel from Jatropha oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst", *Biochemical Engineering Journal* 39(1), 2008, pp. 185-189. DOI: 10.1016/j.bej.2007.09.002
17. Y. Zhang, M. A. Dubé, D. D. McLean y M. Kates, "Biodiesel production from waste cooking oil: 2. Economic assessment and sensitivity analysis". *Bioresource Technology*, 90(3), 2003, pp. 229-240.

EVALUACIÓN DEL EFECTO TÓXICO DE METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN EL EXTRACTO METANÓLICO DE *Callisia fragrans* (L Woodson), SOBRE LÍNEA CELULAR MDCK

Sánchez-Roque Y¹, Pérez-Luna Y¹, Saldaña-Trinidad S¹ & Berrones-Hernández R¹

¹ Universidad Politécnica de Chiapas, Eduardo J. Selvas s. n. Col. Magisterial. C.P. 29080. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

RESUMEN

La industria farmacéutica actual se ha basado en los conocimientos tradicionales herbolarios para la síntesis de fármacos y el proceso de verificación científica continúa, hoy en día, descubriendo constantemente nuevas aplicaciones a favor de la salud; es por ello que la presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de los metabolitos secundarios contenidos en los extractos metanólicos de las hojas de *Callisia fragrans* sobre la línea celular de epitelio de riñón canino Madin-Darby. Para ello, de las hojas del material vegetal *C. fragrans* se obtuvo un extracto metanólico, del cual se identificaron metabolitos secundarios por medio de cromatografía de placa fina y cuantificados por espectrofotometría, así también se determinó la viabilidad celular sobre células MDCK. De esta forma en una primera etapa los análisis fitoquímicos revelan la presencia de cumarinas, taninos, saponinas y flavonoides en esta commelinacea, durante la cuantificación el contenido de fenoles totales, flavonoides y saponinas fueron de 0.482mg/g, 0.7131mg/g, 8.3103mg/g de materia seca respectivamente, mientras que la concentración de taninos y cumarinas fueron de 0.8962 mg/g, 0.5124mg/g de materia seca respectivamente, se observó altas concentraciones de saponinas y baja concentración de cumarinas. Durante la evaluación de citotoxicidad relacionada a viabilidad celular en un 50% con respecto a los extractos se identificó a una concentración de 6.3761 µg/mL, ensayos realizados en placas de 96 pozos por lo que los resultados muestran que el extracto metanólico de *C. fragrans* no presentó toxicidad a ninguna de las concentraciones evaluadas. De esta manera podemos decir que la planta medicinal *C. fragrans* no es tóxica para su consumo y además es considerada por su potencial antioxidante debido a la presencia de metabolitos secundarios.

1. INTRODUCCIÓN

El incremento en el uso de la medicina tradicional o de las medicinas complementarias alternativas o no convencionales, se atribuye a la búsqueda constante del hombre por tener una vida más sana y en armonía con lo natural. Aun cuando la medicina tradicional se emplea con mayor frecuencia, su evaluación es muy compleja y el conocimiento sobre sus posibles efectos secundarios está muy limitado. La valoración de los productos herbolarios empleados en la medicina tradicional es muy difícil y costosa, ya que se requiere de la búsqueda, colecta e identificación de la planta empleada, del aislamiento y definición de la estructura química de los ingredientes activos, siendo este último muy complejo, además una planta puede contener cientos de compuestos y cada uno de ellos en diferentes concentraciones y presentan diferentes efectos, por lo que se requiere de la evaluación biológica, toxicológica, farmacológica y clínica de las plantas medicinales que se emplean en la medicina tradicional (Giovannini et al., 2011)

Las plantas medicinales son aquellos vegetales que poseen principios activos con una acción farmacológica a favor de la salud (Del Carmen et al., 2013), el uso de estas plantas con fines terapéuticos obliga a la urgente necesidad de realizar estudios científicos con el objetivo de descubrir los compuestos contenidos en las especies y que puedan tener aplicación farmacéutica (Juárez et al., 2013), dentro de este amplio grupo de plantas medicinales se encuentra la familia commelinaceae la cual comprende un grupo de 44 géneros y 600 especies que se caracterizan por contener metabolitos secundarios tales como flavonoides dentro de los cuales se incluyen las flavonas y los flavonoles así también cumarinas, taninos condensados y saponinas, estos son investigados por presentar importantes aplicaciones medicinales, como antiinflamatorios e infecciones del aparato digestivo, antirradicales, antioxidantes, antimicrobianas y antiviral. Es por esto que la familia commelinaceae especialmente *Callisia fragrans* L. representan una alternativa debido a su amplia aplicación medicinal para ser evaluadas y determinar su actividad a favor de la salud. Por lo que hay muchos metabolitos secundarios responsables de dicha actividad a favor de la salud, sin embargo no todos tienen un efecto positivo, pues hay muchos metabolitos que pueden ser tóxicos para el organismo de quien lo consume, es por ello que previo a una evaluación *in vivo* es importante establecer una evaluación *in vitro* que determine la citotoxicidad de los principios activos de las plantas medicinales (Chang et al., 2002; Olennikov et al., 2008; Chacón et al., 2013)

Analizando lo anterior el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar los extractos metanólicos de *Callisia fragrans* para determinar la presencia de metabolitos secundarios y toxicidad de los mismos.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal

Se colectaron las hojas de *Callisia fragrans* durante los primeros 5 días de floración en el municipio de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Esta planta fue depositada en el herbario 'MEXU (Herbario Nacional de México de la Universidad Nacional Autónoma de México) "con el número de depósito PVsn16584, por tanto. La ubicación geográfica es latitud 16 ° 45 '11 "Norte y longitud 93 ° 06' 56", que corresponden a las regiones tropicales, con más de 1.100 mm anuales de lluvia. Las hojas se secaron al aire y se molió en un molino de laboratorio. Las muestras secas se almacenaron a temperatura ambiente en recipientes cerrados en la oscuridad hasta su uso.

Preparación de extractos metanólicos de *Callisia fragrans*

20 g de hojas secas de *C. fragrans* se añadieron a 450 ml de metanol (Sigma-Aldrich) al 100%; a continuación, esta mezcla se sometió a ultrasonidos utilizando un Bandelin SONOREX™ Digital, a temperatura ambiente durante 2 h. Después, la mezcla obtenida se filtró y centrifugó (Thermo científica, SHKA® 200) a 3000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se evaporó a vacío en un evaporador rotatorio (Rotavapor R-215) a una temperatura de 45 °C y luego el residuo se suspendió en 5 ml de metanol y se almacenó a -20 °C. (Chang et al., 2002; Xie et al., 2006; Fowler et al., 2013).

El análisis fitoquímico

El análisis cualitativo se realizó a través de un análisis químico para detectar la presencia de las principales clases de metabolitos secundarios; se determinó usando cromatografía de gel de sílice de capa fina (TLC) descrito por Harbone, 1998. La cámara se saturó con hexano como fase móvil (HYCEL): acetato de etilo (HYCEL): ácido acético (Avantor) (31: 14: 5). Después, las placas que forman la fase estacionaria de gel de sílice 60 F₂₅₄ 10X20 cm con base de aluminio (Merck) se colocaron en la cámara. A continuación se indica metabolito: reactivo revelador: necesarios para la identificación de los metabolitos secundarios (flavonoides quercetina: Reactivo: citrobórico; cumarínicos: umbeliferona: 5% de KOH en etano; saponina: diosgenina: 5% de H₂SO₄ en metanol, Taninos: proantocianidinas: vainillina HCl al 5%). Por lo tanto, los componentes se eludieron

durante 20 minutos y se observaron a través de una cámara de UV, 245 a 365 nm (cromatográficas Vue® C-75).

El análisis cuantitativo se realizó utilizando un espectrofotómetro de luz visible (DR5000-03 HACH-EE.UU.) (Harborne et al., 1998). Contenido de fenoles totales se estimó como equivalentes de ácido gálico (Singleton et al., 1999); el contenido de saponinas se calcula como equivalentes de diosgenina (Sim et al 2012.); flavonas y flavonoles fueron estimados como equivalentes de quercetina (Chang et al., 2002), y el contenido total de flavonoides se estimó como equivalentes de rutina (Robertson et al., 1989). El contenido de taninos se estimó como equivalente a proantocianidina (Maksimović et al., 2005); Finalmente el contenido de cumarina se estimó como equivalente a umbeliferona (Wagner, 1996).

3. RESULTADOS

Obtención de fracciones a partir del extracto metanólico de Callisia fragrans y cuantificación de metabolitos secundarios presentes

Estos resultados fueron obtenidos por cromatografía en capa fina, empleando como fase estacionaria placas de gel de sílice 60 F₂₅₄ de 10X20cm, y como fase móvil un sistema de solventes formado por cloroformo: metanol: hidróxido de amonio (85:14:1) (Prueba colorimétrica).

Cuadro 1. Identificación de la presencia de metabolitos secundarios

Metabolitos secundarios	Reveladores	Callisia fragrans
Cumarinas	KOH al 5% en etanol	P
Flavonoides	Reactivo citrobórico	P
Taninos	Vainillina al 5% en HCl	P
Saponinas	H ₂ SO ₄ al 5% en metanol	P
Terpenos	1% de vainillina en H ₂ SO ₄ a 0.1N	A
Alcaloides	Reactivo de Dragendorff	A

P= presencia; A= ausencia

Las pruebas colorimétricas establecidas para el extracto metanólico de *Callisia fragrans* fueron positivas para flavonoides, cumarinas, taninos, y saponinas, sin embargo se observó la ausencia de terpenos y alcaloides.

Cuadro 2. Composición fitoquímica de las hojas de *Callisia fragrans*

Composición seca	(mg/g materia Callisia fragrans)
Fenoles totales	3.0482 (0.0454)
Flavonoides	0.7131 (0.0263)
Saponinas	8.3103 (0.0441)
Taninos	0.8962 (0.0176)
Cumarinas	0.5124 (0.0106)

^a Los valores son promedio de tres réplicas (n=3), ^b Los valores entre paréntesis representan las desviaciones estándar.

La composición fitoquímica de las hojas de la planta *Callisia fragrans* se presenta en el **Cuadro 2**. El contenido de fenoles totales, flavonoides y saponinas fueron de 0482mg/g, 0.7131mg/g, 8.3103mg/g de materia seca respectivamente, mientras que la concentración de taninos y cumarinas fueron de 0.8962 mg/g, 0.5124mg/g de materia seca respectivamente. Los resultados expresados en el **Cuadro 2**.

Evaluación del efecto citotóxico del extracto crudo de las hojas de la planta Callisia fragrans en células MDCK

El segundo objetivo de esta investigación fue evaluar si el extracto metanólico de las hojas de *Callisia fragrans* tienen algún efecto sobre la viabilidad de las células MDCK, por lo que fue necesario realizar el ensayo de citotoxicidad del extracto, para tal efecto las concentraciones evaluadas fueron determinadas a partir de la concentración de fenoles totales del extracto, es importante mencionar que dichas concentraciones fueron ajustadas al 1% en contenido de metanol con la finalidad de no afectar la integridad celular y poder observar el efecto de los compuestos presentes en los extractos.

De tal forma se obtienen las concentraciones con una viabilidad celular del 50% (**Cuadro 3**) que permitan observar con detalle la citotoxicidad.

Cuadro 3. Efecto citotóxico de las fracciones y extracto crudo de las hojas de la planta *Callisia fragrans*

Extracto crudo o fracción	MDCK CC ₅₀ (µg/mL)
Extracto crudo	6.3761 ± 0.068
CF1	0.9071 ± 0.012
CF2	0.8072 ± 0.055
CF3	0.7214 ± 0.103
CF4	0.7643 ± 0.045
CF5	0.7785 ± 0.056

CC₅₀: Concentración citotóxica media. Los valores son la media ± SD de los resultados analizados de cada experimento por cuadruplicado ($p \leq 0.05$).

Como se observa en el **Cuadro 3** las fracciones y los extractos crudos de las hojas de la planta *Callisia fragrans* evaluados obtuvieron valores de CC₅₀, para el caso de las fracciones de un intervalo de 0.7 a 0.9 µg/mL y en el extracto crudo por debajo de 10 µg/mL, está relacionado con la investigación que realizó Yarmolinsky et al. (2010) al evaluar la actividad anti herpes del extracto etanólico y sus respectivas fracciones de la planta antes mencionadas en células MDCK y Vero, fueron tratadas a diferentes concentraciones (<100µg/mL) para el extracto crudo y (<10µg/mL) para las fracciones durante 72 horas. Los resultados muestran que tanto el extracto etanólico y las fracciones de *C. fragrans* no mostraron ninguna toxicidad a las concentraciones evaluadas.

4. CONCLUSIONES

1. Los análisis fitoquímicos revelan la presencia de metabolitos secundarios tales como flavonoides, cumarinas, saponinas y taninos en el extracto crudo de *C. fragrans*.

2. Los valores de CC50 de las fracciones de *Callisia fragrans* fueron identificados a una concentración de 0.5 a 1 µg/mL y del extracto crudo de 4 a 7 µg/mL.

REFERENCIAS

1. Chang, Y.S., Deng, J.S., Ku, Y.R., 2002. Determination of Aristolochic acid in Traditional Chinese medicinal prescriptions, containing Radix Aristolochiae fangchi, by HPLC. *J liq chromatogr Relat. Technol.* 25, 961-975.
- 2.
3. Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3).
4. Chacón, I. D. L. C., Riley-Saldaña, C. A., & González-Esquinca, A. R. (2013). Secondary metabolites during early development in plants. *Phytochemistry reviews*, 12(1), 47-64.
5. Del Carmen Juárez-Vázquez, M., Carranza-Álvarez, C., Alonso-Castro, A. J., González-Alcaraz, V. F., Bravo-Acevedo, E., Chamarro-Tinajero, F. J., & Solano, E. (2013). Ethnobotany of medicinal plants used in Xalpatlahuac, Guerrero, Mexico. *Journal of ethnopharmacology*, 148(2), 521-527.
6. Fowler, S.V., Barreto, R., Dodd, S., Macedo, D.M., Paynter, Q., 2013. *Tradescantia fluminensis*, an exotic weed affecting native forest regeneration in New Zealand: Ecological surveys, safety tests and releases of four biocontrol agents from Brazil. *Biol. Control* 64, 323-329.
7. Giovannini, P., Reyes-García, V., Waldstein, A., & Heinrich, M. (2011). Do pharmaceuticals displace local knowledge and use of medicinal plants? Estimates from a cross-sectional study in a rural indigenous community, Mexico. *Social science & medicine*, 72(6), 928-936.
8. Harborne, J.B., 1998. *Phytochemical Methods, A guide to modern Techniques of plant analysis*. Science 278.
9. Juárez-Rosete, C. R., Aguilar-Castillo, J. A., Juárez-Rosete, M. E., Bugarín-Montoya, R., Juárez-López, P., & Cruz-Crespo, E. (2013). Hierbas aromáticas y medicinales en México: Tradición e innovación. *Revista Bio Ciencias*, 2(3).
10. Maksimović, Z., Malenčić, Đ., Kovačević, N., 2005. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresour. Technol.* 96, 873-877.
11. Robertson, A., Hall, M.N., 1989. A critical investigation into the flavognot method for theaflavin analysis in black tea. *Food Chem.* 34, 57-70.
12. Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152-178.
13. Sim, E.W., Lai, S.Y., Chang, Y.P., 2012. Antioxidant capacity, nutritional and phytochemical content of peanut (*Arachis hypogaea* L.) shells and roots. *Afr. J. Biotechnol.* 11, 11547-11551.
14. Olennikov, D. N., Ibragimov, T. A., Zilfikarov, I. N., & Chelombit' ko, V. A. (2008). Chemical composition of *Callisia fragrans* juice 1. Phenolic compounds. *Chemistry of natural compounds*, 44(6), 776-777.
15. Wagner, H., 1996. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Springer 2, 4-5.
16. Xie, P., Chen, S., Liang, Y.Z., Wang, X., Tian, R., 2006. Chromatographic fingerprint analysis—a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine. *J. Chromatogr.* 1112, 171-180.
17. Yarmolinsky, L., Zaccari, M., Ben-Shabat, S., & Huleihel, M. (2010). Anti-herpetic activity of *Callisia fragrans* and *Simmondsia chinensis* leaf extracts in vitro. *The open virology journal*, 4, 57.

DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS EN TRACTO VAGINAL DE YEGUAS EN ETAPA REPRODUCTIVA EN LOS MUNICIPIOS DE APOZOL Y JUCHIPILA, ZACATECAS.

Miriam Haro Esparza, Rómulo Bañuelos Valenzuela, Carlos Meza López, Zimri Cortez Vidauri
Braulio Lozano Carbajal Juan Ignacio Davila Felix, Monica Silva Vega

Universidad Autónoma de Zacatecas. Unidad Académica de Medicina Veterinaria Y Zootecnia

RESUMEN

El objetivo de este trabajo, fue determinar cualitativamente agentes microbianos, presentes en los cultivos microbiológicos de muestras vaginales de yeguas en etapa reproductiva (>3 años de edad), en cualquier estado fisiológico, en 2 temporadas diferentes (Mayo 2013-Junio 2014). El estudio se realizó en los municipios de Apózol y Juchipila, Zacatecas, se obtuvo exudado vaginal de 75 yeguas, mediante hisopos estériles y fueron conservadas en medios de transporte STUART hasta llevarlo al Laboratorio de Bacteriología y Micología Veterinaria de la UAMVZ-UAZ, posteriormente se realizó la siembra de los microorganismos sobre diversos medios de cultivo como: agar Chapman y agar Mac Conkey, después de 48 horas se hizo el conteo de colonias y se identificaron los agentes microbiológico por morfología, tinción Gram, mediante el equipo Phoenix (BDBD ®), en el Laboratorio de Bacteriología del Hospital General de Fresnillo, Zacatecas. Los microorganismos que se identificaron fueron los siguientes: E. coli 20%, Streptococcus spp 12.5%, Staphylococcus aureus 5%, Klebsiella spp 7.5%, Pseudomona spp 5%, muestras negativas 47.5%. Se concluye que, la ausencia de agentes patógenos en el tracto vaginal, de las hembras equinas, son indicadores de buena salud reproductiva. El E. coli es el principal patógeno identificado con mayor prevalencia, esta bacteria se puede aislar de cultivos microbiológicos obtenidos del tracto reproductor de las yeguas, siendo esta la principal causante de problemas de endometritis bacteriana en estas, por lo tanto disminuye notablemente la fertilidad.

1. INTRODUCCIÓN

El caballo (*Equus caballus*) es un mamífero herbívoro, perisodáctilo, que pertenece a la familia de los équidos.

El proceso de domesticación del caballo se inició en el Sudoeste de Rusia alrededor del año 3000 a.C inicialmente se utilizó como animal de carga y de trabajo, pues se le hacía tirar de pesadas carretas, luego, con el desarrollo de las antiguas civilizaciones, tiraría de ligeros carros de combate, no fue hasta el año de 1500 a. C que el hombre empezó a montar, y por ende a tener mayor movilización, pues transportaba sobre el lomo de sus caballos sus posesiones más preciadas, esto no solo le permitió la expansión hacia nuevos territorios, incluso para innumerables pueblos nómadas el mismo caballo cubría sus necesidades (carne, leche, pieles, transporte y estiércol para alimentar el fuego (Chenevix, 1970).

De acuerdo con las estadísticas de la FAO, México es el tercer país con mayor existencia de ganado caballar en el mundo, con alrededor de 6.4 millones de cabezas de equinos (asnos, mulas y caballos). Solo por debajo de Estados Unidos y China, que mantienen cerca de 9.5 y 6.8 millones de cabezas, respectivamente (FIRA, 2012).

2. TEORÍA

La yegua es de naturaleza reproductiva estacional, apareciendo la actividad sexual y la reproducción resulta de la suma de múltiples variables fisiológicas, psicológicas y ambientales (Boeta *et al.*, 2006).

En los órganos genitales, existe microflora normal que se compone de especies inofensivas y organismos oportunistas que pueden ser patógenos en animales susceptibles. El número de bacterias disminuye desde la vagina hasta el útero y los pocos microorganismos que se encuentran en el cuello uterino probablemente son transitorios. (Scott *et al.*, 1971).

Las bacterias que se aíslan en el útero de la yegua son los *Streptococcus* β -hemolíticos (*Streptococcus equi*, *zoepidemicus* y *Streptococcus equisimilis*), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*. En menor cantidad, bacterias aerobias aisladas en el tracto reproductor de la yegua son los *estreptococos* α -hemolíticos, especies de *Corynebacterium*, especies de *Staphylococcus*, especies de *Enterobacter*, *Actinobacter*, y especies de *Proteus*.

Las especies de *Candida spp* y *Aspergillus spp* son los microorganismos que más se asocian a endometritis fúngicas. (Freeman, 2009).

Estos microorganismos penetran al útero al ascender de la vagina durante el apareamiento y el parto, estos son eventos que se repiten anualmente en las yeguas de cría, siendo las formas principales de introducir bacterias al útero. Algunos procedimientos veterinarios pueden también llevar bacterias al útero, tales como la inseminación artificial, transferencia de embriones, biopsias e hisopados uterinos y/o la infusión de medicamentos. (Hinrichs *et al.*, 1992). Las anomalías en la conformación como la pneumovagina, urovagina y lesiones cervicales hacen al útero propenso para la entrada de bacterias. (Van Camp, 1986).

Algunos microorganismos como *E. coli*, se adhieren con fuerza a las superficies epiteliales, evitando la eliminación física. Los *Streptococcus spp*, estimulan la producción de un exudado inflamatorio que interfiere en el proceso fagocitario de los neutrófilos. Por otro lado, las *Pseudomonas aeruginosa*, algunas levaduras y hongos secretan una matriz adhesiva que tiene como función el crecimiento y mantenimiento de las colonias, esta matriz proporciona una resistencia a los antibióticos y a las defensas inmunológicas celulares o humorales, lo que da como resultado una infección crónica persistente. (Corterton *et al.*, 1999).

Las bacterias cuentan con factores de virulencia diferentes y tienen métodos de evadir la respuesta inmunitaria, lo que da origen a muchos síntomas clínicos, hallazgos al ultrasonido y en los resultados de laboratorio.

El útero de una yegua fértil, está diseñado para ser un ambiente estéril, a pesar de que el tracto reproductivo está contaminado con bacterias, este responde a contaminantes bacterianos con la rápida migración de neutrófilos. Los organismos patógenos que se introducen al útero es una respuesta a la insuficiencia de las barreras físicas a la infección.

La endometritis, es considerada como la causa más común de infertilidad en la yegua, se genera por contaminantes externos (bacterias, espermatozoides), provocando la inflamación del endometrio. El útero normal de la yegua, está protegido de la contaminación externa por: la vulva, vestíbulo vaginal, vagina, cervix, que funcionan como barreras físicas que bloquean el paso de materia extraña. Las lesiones, anomalías anatómicas o pérdida de la estructura y función (por ejemplo, después del parto) pueden permitir el ingreso de microorganismos en el útero, resultando esta complicación. Tiene graves efectos en la fertilidad de las yeguas. Una inflamación persistente

provoca una luteólisis prematura y pérdida embrionaria debido al aumento de PGF2 α . Esta inflamación infliere directamente con la sobrevivencia e implantación del embrión. (Neely, 1979).

Las yeguas reproductivamente normales, responden a la contaminación uterina mediante una respuesta inflamatoria transitoria, que incluye la activación de mecanismos de defensa humoral o mediada por anticuerpos, reclutamiento de células polimorfonucleares, para la fagocitosis bacteriana y el aumento de la contractilidad uterina para eliminar el contenido uterino. (Blanchard *et al.*, 2003).

Como se menciona antes, el depósito de espermatozoides provoca una inflamación transitoria del endometrio teniendo como propósito eliminar las bacterias y el exceso de espermatozoides del útero. Esta respuesta inflamatoria, es acompañada por acumulación de fluido intrauterino, las yeguas reproductivamente normales, son capaces de eliminar la endometritis en 12 o 48 horas. (Nikolakopoulos *et al.*, 2000).

Cuando el semental desequilibra la flora normal este libera bacterias patógenas sin presentar ningún signo, convirtiéndose en portadores asintomáticos, dando como resultado una endometritis infecciosa en las yeguas susceptibles, reduciendo los índices de fertilidad. (Samper *et al.*, 2006). Dentro de las bacterias oportunistas encontramos con mayor incidencia *Streptococcus zooepidemicus*, que se relaciona con la mayoría de los casos de endometritis aguda (Muller, 2005). *Escherichia coli*, se cataloga como la segunda causa de infección uterina, por ser una bacteria oportunista y forma parte de la microflora normal de la región perianal, labios de la vulva, vestíbulo vaginal y el recto. La respuesta uterina al patógeno también contribuye a que la infección se establezca y cronifique. Durante la fase aguda y subaguda de la endometritis, la producción de moco por parte de las células epiteliales del endometrio se aumenta. (Causey *et al.*, 2000). Es una patología multifactorial y se puede clasificar en la etiología y patofisiología diferente en cada categoría.

3. PARTE EXPERIMENTAL

El trabajo se realizó en los municipios de Apozol y Juchipila, Zacatecas.

Apozol, se localiza en la parte sur del Estado, coordenada 103° 05' longitud oeste y 21° 28' latitud norte, a una altura de 1300 MSNS. El clima está clasificado como cálido semi-húmedo, con lluvias escasas en invierno y muy lluvioso en verano, con una precipitación pluvial de 600 a 700 milímetros anuales, con una temperatura promedio anual de 22° C máxima de 40° C y mínima de 21° C.

Juchipila, se encuentra en la zona sur del estado de Zacatecas. Se ubica entre las coordenadas geográficas de 21° 19' y 21° 22' latitud norte del trópico de cáncer y entre 103° 10' longitud oeste, del meridiano de Greenwich, a una altura de 1270 M.S.N.M. El clima está considerado como subtropical, el cual varía con las estaciones del año: templado al principio de primavera, cálido al terminar la estación; caluroso en verano, templado en otoño y frío en invierno. Tiene una temperatura promedio de 21.9 o C. Y la precipitación pluvial anual promedio es de 704.3 mm.

El material biológico se obtuvo de 75 hembras equinas en edad reproductiva, en diferentes comunidades de Apozol y Juchipila, tras tomar exudado vaginal mediante hisopos estériles, las muestras fueron colocadas en tubos de cristal con medio de transporte STUART, manteniendo una temperatura constante de aproximadamente 5o C, y protegidas de los rayos solares.

El estudio de las muestras obtenidas se llevó a cabo en el Laboratorio de Bacteriología y Micología Veterinaria de la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Zacatecas, ubicada en El Cordovel, Enrique Estrada, Zacatecas en el km. 31.5 de la Carretera Panamericana Zacatecas-Fresnillo. Con Latitud norte 22o 58' y Longitud oeste 103o 30', a una altitud de 2,153 msnm.

El cultivo bacteriológico se hizo sobre dos medios de cultivo, CHAPMAN® y MACKONKEY®, por estrías y se incubó por 48 horas a 36° C.

Se realizó de las colonias cultivadas a partir de un frotis que fue fijado con bicarbonato de Sodio, una vez fija la colonia, se aplicó cristal violeta durante 1 minuto, al término se lavó con agua destilada. Posteriormente, se agregó Lugol por 1 minuto, y nuevamente se lavó y decoloró con alcohol cetona por no más de 15 segundos, finalmente se tiñe con safranina por 1 minuto y enjuagar en agua destilada. Una vez seco el frotis, se observó al microscopio con aceite de inmersión a 1000x, para determinar la morfología de las bacterias presentes en la muestra. Así como la diferenciación de bacterias Gram-negativas o Gram-positivas.

La identificación se realizó en el equipo, Phoenix (BDBD ®) Becton Dickinson and Company Maryland 21152 USA, por medio de paneles de identificación y sensibilidad para microorganismos Gram-negativos NMIC-101. Preparando un inóculo en el diluyente ID Phoenix broth ajustando a 0.45-0.55 grados MacFarland midiendo turbidez en el nefelómetro Phoenix Spec, se adicionaron 25 µl de suspensión bacteriana a AST broth SP usado para las pruebas de sensibilidad a antibióticos, se adicionó una gota del indicador AST Phoenix azul Alamar. Los resultados de identificación y sensibilidad se obtuvieron a las 24 hrs de introducir los paneles al equipo.

5. RESULTADOS

Los resultados señalan los cultivos vaginales fueron realizados en 2 épocas diferentes, mayo y junio 2014. En mayo 2015 se realizaron 25 cultivos vaginales, de los cuales 13 fueron negativos y 12 positivos. La frecuencia de aparición de las bacterias durante este muestreo evidenció que *E. coli* (Figura 1) Se presentó en 4 cultivos, *Staphylococcus spp* en 1 cultivo, *Streptococcus spp* en 5 cultivos y *Klebsiella spp* 2 cultivos (Figura, 2). En Junio del 2014, el microorganismo con mayor incidencia es *E. Coli* presentándose en 5 cultivos vaginales, en 2 cultivos se presenta *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona spp* solo creció en 2 medios de cultivo el total de muestras negativas 9.

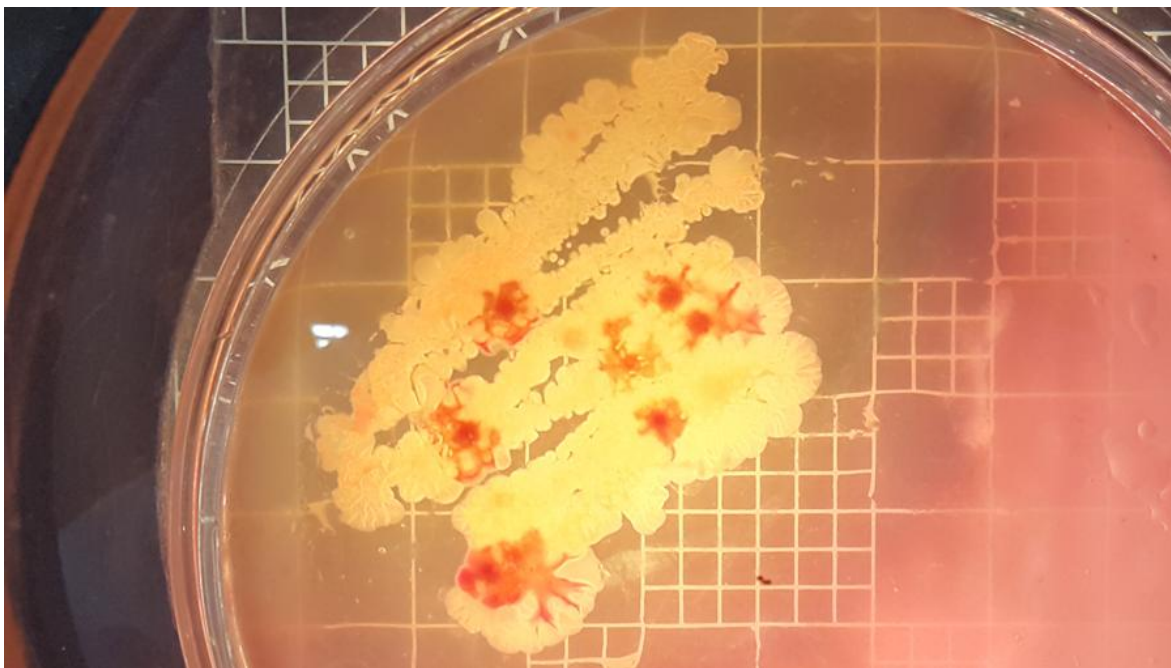


Figura 1

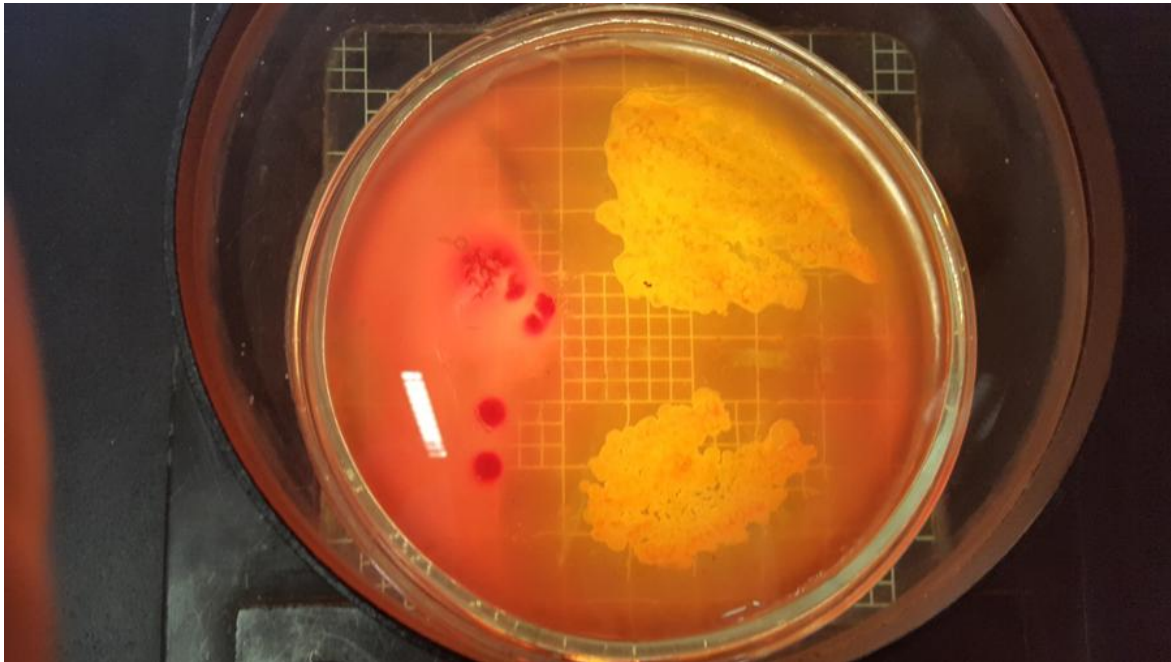


Figura 2

6. CONCLUSIONES

Se concluye que con técnicas simples como es el uso de hisopo uterino y vaginal, es una forma rápida, segura y económica, que se debería de realizar como examen rutinario en las yeguas para determinar la etiología de procesos infecciosos en tracto reproductor y establecer tratamientos adecuados, evitar la resistencia antimicrobiana y consecuentemente incrementar el índice de gestaciones en las yeguas.

Los agentes como el *E. coli* es el principal patógeno identificado con mayor prevalencia, esta bacteria se puede aislar de cultivos microbiológicos obtenidos del tracto reproductor de las yeguas, siendo esta la principal causante de problemas de endometritis bacteriana en las yegua, por lo tanto disminuye notablemente la fertilidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chenevix-Trench, C. A History of Horsemanship: The story of man's ways and means of riding horses from ancient times to the present. New York: Doubleday & Company. 1970
2. Scott, P., Daley, P., Gidley Baird, G., Sturgess, S. & Frost, A.J. The aerobic bacterial flora of the reproductive tract of the mare. Vet. Rec. 88, 1971: 58-61.
3. Boeta M., Porras A., Zarco L., Aguirre H. R. Ovarian activity of the mare during winter and spring at a latitude of 19°21' North. J Equine Vet Sci 2006;26:55-58.
4. FIRA. Monografía del Ganado equino. Septiembre, 2012.
5. 26. Freeman W, David. Reproductive Management of the Mare. Oklahoma Cooperative Extension Service. 2009. Disponible en: <http://pods.dasnr.okstate.edu/docushare/dsweb/View/Collection-245>.

6. Hinrichs, K., Spensley, M.S. & McDonough, P.L. Evaluation of progesterone treatment to create a model for equine endometritis. *Equine Vet. J.* 23, 1992: 457-461.
7. Van Camp, S.D. Breeding soundness examination of the mare and common genital abnormalities encountered. In: Morrow, D.A. (ed.) *Current therapy in theriogenology 2*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA 1986. p. 654-661.
8. Corterton JW, Stewart PS; Greeberg EP, 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.
9. Neely DP, Kindahl II, Stabenfeldt GH, Edquist, LE, Hughes JP. Prostaglandin release patterns in the mare: Physiological, pathophysiological, and therapeutic responses. *J Reprod Fert* 1979; 27(Suppl):181-189.
10. Blanchard, T., Dickson, D. Varner, C. *Manual of equine reproduction*. 2a Edición, Editorial Mosby. 6-8 pp. 2003.
11. Nikolakopoulos E, Kindahl H, Watson, ED. 2000. Oxytocin and PGF₂ α release in mares resistant and susceptible to persistent mating-induced endometritis. *Journal Reprod Fertil Suppl* 56:363-372.
12. Muller, J. (2005). Endometritis in the Mares: A diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. *Theriogenology*, 64, (510 – 518).
13. Causey RC, Ginn P, Katz B, Hall B, Anderson KJ, LeBlanc MM, 2000 Mucus production by endometrium of reproductively healthy mares and mares with delayed uterine clearance. *J Reprod Fertil Suppl* 56: 333-339.

PRODUCCIÓN DE PLANTAS AROMÁTICAS, MEDICINALES Y DE CONDIMENTO EN ZONAS URBANAS: PARA ENRIQUECER LA ALIMENTACIÓN Y FOMENTAR LA ETNOBOTÁNICA LOCAL.

Carlos Nahin Castro Jose¹, Ana Lid del Angel Pérez¹, María Clementina Romero Colorado,²
Edwin Cristino Bello²

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. ²Universidad Interserrana del Estado de Puebla-Chilchotla.

RESUMEN

El cultivo y uso de las plantas aromáticas, medicinales y de condimento ha estado presente a lo largo de la historia en México, ya sea para aliviar malestares físicos, dolencias y lesiones o como complemento de la alimentación, donde han dado un toque de aroma y sabor que caracteriza los diferentes platillos de nuestro país. Solas o combinadas con otras especies, forman parte de un conocimiento etnobotánico único. El crecimiento urbano, la migración del campo a la ciudad y los cambios de patrones alimentarios, permitieron que la utilización de estas especies decreciera, y con ello los saberes locales. Se desarrolló un modelo de agricultura urbana con tubos de PVC de 4" de diámetro para cultivar seis especies de plantas aromáticas y medicinales de uso común en la costa central veracruzana utilizando tres fuentes de nutrición, lombricomposta, solución nutritiva y un testigo en suelo. El análisis de varianza señaló diferencia significativa ($P < 0.05$) en el tratamiento con lombricomposta respecto al de solución nutritiva y testigo, con mayor producción de materia fresca para cuatro especies (orégano, zacate limón, hierbabuena, ruda), no así para albahaca y testigo ($P > 0.05$), mientras que el epazote, por cuestiones de sanidad presentó menor producción que el testigo. Los resultados mostraron que la producción de plantas aromáticas, medicinales y de condimento con lombricomposta, en un modelo elaborado con tubos de PVC, como una alternativa viable para el autoabastecimiento familiar urbanos, pues fomenta el consumo y utilización de especies locales, así como la continuidad del conocimiento etnobotánico.

1. INTRODUCCIÓN

El contacto del hombre con las plantas tiene su origen en los albores de la agricultura, ya que la recolección permitió que los habitantes del neolítico observaran que cuando dejaban los restos de alimentos incluidas las semillas, al poco tiempo emergían pequeñas plántulas que posteriormente se convertirían en individuos capaces de producir frutos. Si bien, inicialmente los productos obtenidos de estas plantas no eran de buena calidad o con las características ideales para cubrir los requerimientos alimenticios de los individuos, fueron el esbozo de lo que posteriormente se convertiría en la agricultura, lo que hizo que estos primeros agricultores dieran por terminado su estilo de vida errante para establecerse de forma sedentaria (Cedeño, 2015). Con el paso del tiempo, diferentes especies vegetales en su estado natural fueron progresivamente domesticadas de tal forma que pudieron ser utilizadas de forma cíclica para abastecer de frutos, granos y materias primas a los agricultores (Chocarro *et al.*, 2015). Así como en determinado momento se identificaron las especies con potencial para formar parte de la dieta diaria, durante este proceso de domesticación se tuvo contacto con especies que mostraban ciertas características, aromas y sabores, que también ayudaron a mejorar la palatabilidad de otros alimentos. En este mismo proceso se identificaron, en ocasiones de forma un tanto trágica, especies que resultaban ser

altamente tóxicas y cuyos efectos podían poner en riesgo la vida de aquel que las consumía.; dentro de este contexto de exploración de la vegetación útil para el hombre, se identificaron especies que podían aliviar malestares físicos, aplicados y utilizados de múltiples maneras ya sea en forma de cataplasmas, maceración de tallos y hojas, infusiones, o consumidas directamente, solas o en combinación con otras especies, los principios activos, inicialmente desconocidos, podían mejorar el estado de salud de las personas que las utilizaban. Si bien, este proceso de domesticación de especies vegetales y posterior identificación de plantas útiles para aliviar algunos padecimientos, se dio alrededor del mundo en diferentes periodos de tiempo y por diferentes culturas, tuvieron en común la difusión del conocimiento a través de la *tradición oral*, al no tener aun algún método para registrar la información relativa a los usos y aplicaciones de los principios activos provenientes de las plantas, posteriormente, con el surgimiento de diversas formas de escritura, se pudo registrar la evidencia de las bondades de la diversidad vegetal en determinadas regiones, estos registros no incluían solo información botánica, si no que se plasmaban gráficamente escenas comunes de la vida diaria (Luna-Morales, 2015).

Para el caso particular de México, este conocimiento era plasmado principalmente en estelas, códices y por supuesto a través de las enseñanzas verbales (Gómez-Pompa, 1993), documentos muy famosos como el *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* también conocido como Códice de la Cruz- Badiano, hacen referencia a una gran variedad de plantas y combinaciones de estas con ingredientes de origen animal e incluso minerales, que podían ayudar a aliviar una gran variedad de malestares. Dicho conocimiento ha perdurado a través del tiempo, siendo el resultado de una larga historia en la que se vincula la medicina étnica, la naturaleza local así como el cultivo y recolección de plantas del bosque, y lo que actualmente podemos emplear para aliviar algunos malestares a partir de las plantas, es derivado de una disciplina taxonómica sistematizada sobre el carácter y las propiedades de cada una de estas especies así como de la herencia cultural etnobotánica transmitida de generación en generación (Del Angel *et al.*, 2015), actualmente, es muy común, sobre todo en las comunidades rurales que las plantas sean usadas por curanderos, yerbateros, parteras, médicos tradicionales y amas de casa (Magaña *et al.*, 2010) quienes continúan utilizando las diferentes especies vegetales de la región para el tratamiento de distintos padecimientos. Pese a que México cuenta con una gran diversidad ambiental y cultural, el constante crecimiento de las zonas urbanas y la presión que esta ejerce sobre las rurales junto a la inminente destrucción de los ecosistemas, la expansión de la frontera agropecuaria y los procesos migratorios, provocan que el conocimiento tradicional esté en riesgo de perderse (Monroy *et al.*, 2003, Cortés *et al.*, 2011). Con el objetivo de fomentar el cultivo, así como mantener el conocimiento referente a los usos y aplicaciones de las diferentes especies aromáticas, medicinales y de condimento entre los habitantes de los núcleos urbanos de la zona costera central de Veracruz, se evaluó el rendimiento de materia fresca de seis especies de uso común en un modelo de agricultura urbana con tubos de PVC de 4", utilizando mezclas de sustratos con diferentes fuentes de nutrición.

2. TEORÍA

La agricultura urbana tiene como objetivo principal, poner al alcance de los habitantes de las ciudades, así como de los que se encuentran en las periferias, alimentos para autoconsumo, los cuales pueden ir desde hortalizas, frutas, verduras, huevo de gallina y en algunos casos leche y pescado derivado de actividades pecuarias y acuícolas que permitan su producción. A diferencia de los sistemas de producción a gran escala, la agricultura urbana se desarrolla en áreas con espacios limitados, en los que se busca un máximo aprovechamiento de estos, así como de los recursos materiales y humanos con los que se cuenta. Este tipo de agricultura, de ser desarrollada de forma adecuada a través de una producción escalonada, para el caso de los cultivos, puede contribuir a la seguridad alimentaria de las familias y de la comunidad en general, la producción reduce los gastos destinados a la adquisición de alimentos en los mercados locales, fomenta el trabajo familiar y en equipo de los participantes, a la vez que fortalece las habilidades de los pequeños productores al capacitarse continuamente sobre los diferentes aspectos técnicos que

demandan los cultivos establecidos. Además de las hortalizas y los productos derivados de las actividades agropecuarias, la agricultura urbana considera también la producción de hierbas aromáticas, medicinales y de condimento dentro de sus actividades. Si bien, las prácticas de agricultura urbana en México aun no se desarrollan como en otros países, por ejemplo, Cuba, donde hoy en día es una actividad fuertemente consolidada y apoyada por los diferentes sectores de gobierno e incluso por organizaciones internacionales como la FAO, el cultivo de este tipo de especies vegetales se ha realizado desde varios siglos atrás, si bien, no como un cultivo, si ha formado parte de los huertos familiares, considerados como un tipo de agroecosistema (Juan *et al.*, 2005) en donde, junto con árboles frutales y plantas de ornato tienen un alto valor económico, cultural y social. La continuidad de todos los conocimientos referentes al manejo de este tipo de huertos así como las especies establecidas al interior son vulnerables a fenómenos sociales tales como la migración, la cual pone en riesgo los recursos genéticos domesticados por siglos, junto con la herencia conservada por cientos de generaciones, el movimiento de las personas hacia los núcleos urbanos en busca de oportunidades de trabajo diferentes a las actividades agrícolas genera, por ejemplo, que niños y jóvenes puedan no adquirir el conocimiento sobre el manejo por parte de sus padres (Rosas, 2008). A diferencia de las zonas rurales, en las ciudades la adquisición de alimentos está condicionada a la disponibilidad y al ingreso de los consumidores, así como a la continua variación de su precio, lo que provoca que en ocasiones no sea posible cubrir los requerimientos nutricionales mínimos. Ante este panorama de situaciones que acelera el acercamiento a un estado de inseguridad alimentaria entre la población Shamah *et al.*, 2014 sugieren que se requiere de acciones inmediatas y grandes esfuerzos intersectoriales y de participación de la sociedad civil para el establecimiento de políticas públicas en función del bienestar de los hogares y familias mexicanas. Como se mencionó anteriormente, la agricultura urbana busca poner al alcance alimentos que contribuyan a mejorar la diversidad alimentaria de las personas, ante esta situación, instancias y programas de gobierno, en sus tres niveles, han realizado la promoción de actividades relacionadas al cultivo de diferentes especies hortícolas, plantas aromáticas, medicinales y de condimento, a través de acciones de capacitación que van desde el establecimiento de cultivos, hasta métodos de conservación, comercialización e incorporación de valor agregado que pueden contribuir a una mejora de la economía familiar. Algunos autores como Del Angel *et al.* 2011 sugieren que para las actividades agrícolas de tipo urbano en la zona tropical de Veracruz, es posible cosechar hasta siete especies hortícolas en contenedores de 1x1 m² y una profundidad de 15 a 20 cm, las especies aromáticas, medicinales y de condimento se pueden cultivar en espacios aún más pequeños, debido a sus características, tales como tolerancia al desarrollo radicular compacto y a las podas constantes, mínimos requerimientos nutricionales, principalmente de nitrógeno, así como facilidad en la propagación vegetativa a través de esquejes e hijuelos. A continuación se presenta el desarrollo de un trabajo que busca identificar el mejor método para cultivar especies aromáticas, medicinales y de condimento a partir de diferentes mezclas de sustratos en tubos de PVC, con ello se pretende que habitantes de zonas urbanas y periurbanas puedan establecerlas en sus hogares y con ello, además de promover su uso y consumo al interior de la familia y entre los miembros de la comunidad, fomentar el conocimiento etnobotánico referente a las múltiples aplicaciones que tienen, a fin de darle continuidad y evitar su pérdida.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Se desarrolló un modelo de agricultura urbana basado en tubos de PVC de 4" de diámetro, en el que se establecieron seis especies de plantas que son consideradas en la región como aromáticas, medicinales y de condimento., estas fueron albahaca (*Ocimum basiliscum*), epazote (*Chenopodium ambrosioides*), hierbabuena (*Mentha sativa* L.), orégano orejón (*Plectranthus amboinicus*), ruda (*Ruta graveolens*) y zacate limón (*Cymbopogon citratus*), estas plantas se obtuvieron a partir de esquejes e hijuelos enraizados previamente. La longitud de los tubos fue de 1.33 m y se les realizaron seis perforaciones de 5.5 cm de diámetro, en cada orificio se estableció una planta diferente. Se manejaron tres tratamientos con cuatro repeticiones cada uno, los dos primeros, cuya fuente de nutrición fue solución nutritiva y lombricomposta se establecieron en

tubos de PVC el tercer tratamiento se realizo en el suelo como testigo considerando que esta es la forma más común en la que se cultivan este tipo de especies en la región, los tratamientos se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Descripción de los tratamientos utilizados en el cultivo de especies aromáticas, medicinales y de condimento en tubos de PVC.

	Tierra local	Lombricomposta	Peat moss
Tratamiento 1	75 % (7.8 kg)	-	25 % (0.5 kg)
Tratamiento 2	60 % (6.3 kg)	30 % (2.1 kg)	10 % (0.2 kg)
Tratamiento 3	100 %	-	-

Los porcentajes de cada uno de los diferentes sustratos que integran la mezcla están basados en el volumen total que ocupan en los tubos llenos al 100%.

La fuente de nutrición para el tratamiento 1 fue a partir de una solución nutritiva comercial, se aplicaron 25 ml a cada planta de forma semanal. La nutrición del tratamiento 2 se baso en la lombricomposta, y se incorporo a la mezcla de sustratos al momento de establecer el modelo en campo. El tratamiento 3 o testigo, consistió en una cama de siembra a nivel de suelo, en esta se establecieron las mismas especies que en los tubos de PVC, con una separación igual.

La primer cosecha de follaje, parte útil de estas plantas, se realizo al mes de haber establecido el experimento, tomando en cuenta que las características de desarrollo son diferentes para cada especie, se considero un valor de altura mínimo para el momento de realizar la cosecha del follaje (tabla 2), lo anterior para que las podas no afectaran el desarrollo de las plantas. La materia fresca cosechada en cada corte se coloco en bolsas plásticas y fueron pesadas con una balanza digital Los datos de cosecha se capturaron en una hoja de Microsoft Excel y fueron analizados con el programa Statistica 7, con el que se realizó un análisis de varianza utilizando la prueba HSD Tukey considerando una significancia de 0.05

Tabla 2. Altura mínima a considerar al momento de realizar la cosecha de follaje en especies aromáticas, medicinales y de condimento.

Especie	Altura de cosecha (cm)
Albahaca	20
Epazote	30
Hierbabuena	15
Orégano	30
Ruda	25
Zacate limón	30

4. RESULTADOS

Producción de materia fresca

De forma preliminar se observa que el tratamiento que utiliza lombricomposta como fuente de nutrientes mostro los mayores rendimientos en cuanto a producción total de biomasa en fresco (figura 1), con excepción del epazote y el albahaca, cuya producción fue mayor en el tratamiento testigo debido a factores que se explican más adelante.

Si bien las especies manejadas en el presente trabajo son diferentes, los resultados de producción apoyan y reafirman las ventajas que tienen los cultivos orgánicos.

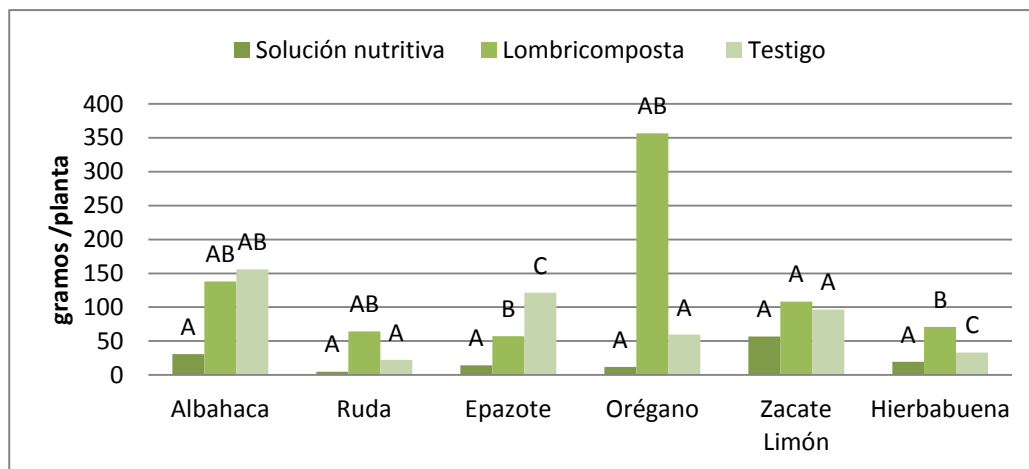


Figura 1. Producción total de biomasa fresca de plantas aromáticas, medicinales y de condimento después de cinco meses de cultivo.

Considerando los valores de producción se tiene que el orégano (*Plectranthus amboinicus*) fue la especie que registro mayor producción de biomasa en fresco, 89.12 gr/planta en promedio realizando cuatro cortes, teniendo así una producción total de 356.48 gr de materia fresca por planta durante los 5 meses que duro el experimento, observándose diferencia significativa respecto a los tratamientos de solución nutritiva y testigo ($P < 0.05$). Jesikha (2013) señala que la producción de orégano con una proporción de 75 % de lombricomposta incorporada en la mezcla de sustratos mostro los mayores valores para la producción de follaje fresco (25.5 gr), valores inferiores a lo reportado en el presente, indicando que la utilización de proporciones del 75 y 100 % de lombricomposta retardan el crecimiento y reducen la producción debido a la alta cantidad de minerales disponibles en el medio. Los valores de producción de orégano obtenidos a partir de un sustrato con 30 % de lombricomposta en un tubo de PVC fueron ligeramente superiores a los reportados por *Del Angel et al., 2011* quienes en modelos de agricultura urbana denominados “Maceta Vertical y Mangas Colgantes” obtuvieron 0.250 y 0.310 g por planta respectivamente, sin embargo, la producción total en los modelos antes mencionados puede triplicarse ya que en estos se pueden establecer hasta tres plantas de orégano en cada modelo. La proporción de lombricomposta utilizada en este trabajo fue de 30 % con lo cual es posible sugerir que con dicha cantidad de biofertilizante se obtiene mayor producción de materia fresca, por otra parte, las características botánicas de orégano, hierba perenne, suculenta, de hojas anchamente aovadas y bordes dentados con peciolo gruesos, es capaz de retener una gran cantidad de agua, lo que explica su mayor producción de follaje fresco (Menéndez y Pavón, 1999). Aunque la utilización del orégano en la zona de estudio se ha señalado como condimento en la cocina y como remedio para el dolor de oído, en la medicina tradicional cubana se emplea la decocción de las hojas frescas como broncodilatador, expectorante en ronqueras y catarrros en general (Menéndez y Pavón, 1999), beneficio que puede ser recomendado a las personas que cultivan y utilizan esta especie.

El albahaca (*Ocimum basilicum* L.) es una especie de uso común en las zonas tropicales y subtropicales de México y Veracruz, su uso se enfoca principalmente mediante la utilización de ramas frescas en rituales conocidos como “limpias” o para curar “el mal de ojo” en los niños, y en

menor medida como condimento, donde básicamente se usan solo las hojas que pueden ser frescas o secas. Aunque es ampliamente demandada, es poco cultivada en ambientes urbanos y se le encuentra frecuentemente dentro de huertos familiares en las periferias de las ciudades, creciendo de forma esporádica sin un manejo agronómico específico, llegando a encontrarse plantas senectas y leñosas, de más de un metro de altura, ampliamente ramificadas y con escaso follaje. La producción de biomasa fresca de albahaca no presentó diferencia significativa entre los tratamientos de lombricomposta y testigo ($P > 0.05$) con una producción de 34.5 y 39.02 gr respectivamente en cada corte, los dos tratamientos anteriores mostraron diferencia significativa ($P < 0.05$) en relación al tratamiento con solución nutritiva el cual tuvo una producción promedio de 7.73 gr por corte. La producción total de materia fresca por planta durante la duración del experimento fue de 156.1, 138 y 30.92 g para cada tratamiento (testigo, lombricomposta y solución nutritiva). Moncayo *et al.*, 2015 evaluaron el rendimiento en fresco de plantas de albahaca cultivadas con diferentes tipos de nutrición, encontrando que las fuentes orgánicas de nutrientes generaron los mejores rendimientos, si bien estos valores no difirieron significativamente entre ellos, los más altos fueron con el lixiviado de lombricomposta lo que indica que el uso de este tipo de productos favorece una mayor producción de follaje fresco, que es la parte más utilizada de la planta.

Utilizando soluciones nutritivas químicas los mismos autores generaron un rendimiento promedio de hasta 100.7 gr, muy superior a lo que se obtuvo en el presente trabajo (7.73 gr), los valores obtenidos son mayores en todos los tratamientos empleados, lo cual puede atribuirse a las dimensiones del espacio en el que se desarrollaron lo que puede haber influido en la producción de biomasa fresca, ya que los contenedores utilizados contaban con una capacidad total de 5 kg de sustrato, con lo que se promueve un desarrollo radicular más amplio y permite una absorción eficiente de los nutrientes, a diferencia de los tratamientos en tubos de PVC en los que la cantidad de sustrato fue de 1.3 kg/planta y el espacio es muy reducido. Otros estudios como el de El Sayed *et al.*, 2015 indican que la aplicación de fertilizantes orgánicos como abono de gallina en combinación con ácidos húmicos, componentes presentes en la lombricomposta, promueven una mayor producción de follaje de hasta 308.9 gr, en el trabajo anterior las macetas en las que se desarrollaron las plantas de albahaca fueron de 25 cm de diámetro, por lo que este factor contribuyó de igual forma a que los valores de producción de materia fresca fueran mayores que los obtenidos en tubos.

La producción de biomasa fresca para el zacate limón (*Cymbopogon citratus*) no presentó diferencias significativas entre los tres tratamientos ($P > 0.05$) sin embargo el valor más alto se presentó en las plantas cultivadas con lombricomposta con 27.07 gr/planta en promedio en cada corte, teniendo una producción total de 108.3 g por planta al final del experimento. Aunque la producción de follaje fue similar en todos los tratamientos Serrato y Moreno en 2003 sugirieron que la producción de zacate limón alcanza mayores rendimientos de materia fresca así como de concentración de aceites esenciales, principalmente citral (Soto *et al.*, 2002), utilizando fertilización orgánica, bajo las condiciones de cultivo manejadas podría optarse por la utilización de cualquiera de los tratamientos, con tendencia a utilizar el que requiera menos insumos, en este caso el cultivo directo en el suelo, sin embargo, considerando que la parte que más se consume de la planta es el follaje cuyo atractivo es el aroma, se sugiere emplear el tratamiento con lombricomposta, el cual es capaz de producir follaje en mayor cantidad y más aromático. Linares *et al.*, 2005 mencionan que la aplicación de fertilizantes de origen químico u orgánico permiten una buena producción de follaje así como de una buena cantidad de aceite esencial de buena calidad, lo anterior apoya la utilización de fuentes orgánicas de nutrición, que en el caso de sistemas de producción urbanos permitirán la obtención de productos más saludables y libres de agroquímicos. El cultivo de esta especie es viable a establecerse a nivel de suelo, pero se debe considerar que uno de los objetivos de la agricultura urbana es realizar la producción de especies de uso común en áreas en las que no se cuenta con espacios disponibles o con suelo de calidad.

La hierbabuena (*Mentha sativa* L.) planta herbácea de porte bajo muy ramificada, hojas opuestas, ovaladas de bordes aserrados y muy aromática, aunque en aspectos botánicos es más pequeña que la ruda (*Ruta graveolens*) y el epazote (*Chenopodium ambrosioides*), presento valores más altos de producción de materia fresca que las últimas dos. La hierbabuena tuvo una producción promedio por planta de 17.66 g en cada corte teniendo diferencia significativa respecto al tratamiento con solución nutritiva y el testigo ($P < 0.05$), y una producción final de 70.6 g por planta. La hierbabuena requiere de suficientes cantidades de nitrógeno para producir follaje y aceite esencial, a niveles comerciales se recomienda aplicar de 225 a 280 kg de N/ ha de lenta liberación que permitirán un crecimiento óptimo que se verá reflejado en un activo crecimiento vegetativo y desarrollo de hojas nuevas (Brown *et al* 2003), los fertilizantes orgánicos pueden ser una alternativa viable para este proceso, ya que mejoran la capacidad de retención de agua del suelo así como la conductividad eléctrica, por lo que los nutrientes son liberados lentamente al mismo tiempo que se mejoran las características físicas del suelo y se incrementa la humedad (Prabakaran *et al.*, 2014), a diferencia de lo que sucede durante la aplicación de fertilizantes químicos, en donde la liberación de los nutrientes se da de forma rápida, provocando que las plantas no lo asimilan en su totalidad, existiendo un déficit nutricional así como un ingreso de compuestos nitrogenados al subsuelo que generan diversos efectos nocivos en el ecosistema, Brown *et al* 2003 señala que, el uso de diferentes fertilizantes orgánicos en la producción de hierbabuena, como las bacterias mejoradoras de suelo, entre ellas *Azospirillum*, la lombricomposta, el abono proveniente de granjas, así como combinaciones de estos muestran valores más altos en cuanto a rendimiento y variables de crecimiento que la sola aplicación de fertilizantes químicos, esto se debe a que el proceso de mineralización permite que los micronutrientes permanezcan en el suelo por un periodo de tiempo más largo. La eficiente absorción de nutrientes así como el crecimiento mostrado en las plantas de hierbabuena se hizo notar en su aspecto general debido a que las plantas del tratamiento con lombricomposta mostraron además de una mayor producción de biomasa fresca, una mayor ramificación y una coloración verde brillante, a diferencia de los individuos en los otros tratamientos, cuyo crecimiento fue menor y en los cuales la clorosis del follaje fue más evidente.

Una de las características que identifican la producción de especies aromáticas en sistemas de producción urbanos es la facilidad de propagación de las especies cultivadas, ya sea a través de semillas, el método menos utilizado por los principiantes, o la multiplicación a través de esquejes, si bien, la mayoría de las especies manejadas en la costa central de Veracruz se reproducen a través de este método, para el caso de la ruda (*Ruta graveolens*) se han presentado algunos inconvenientes en cuanto a la multiplicación vegetativa debido al bajo porcentaje de enraizamiento, situación que ha fue mencionada por Rodríguez y Lemes en 2005, en un estudio referente a la propagación vegetativa de ruda, los autores sugieren que ramas apicales a las que se les retira una sección de corteza por encima del corte y plantadas durante la temporada invernal pueden alcanzar un 100 % de enraizamiento debido a que la generación de raíces se da entre la zona de corte situada entre el xilema y el floema, lo que favorece una mayor cantidad de esquejes con posibilidad de ser trasplantados a campo. La reproducción de esquejes de ruda se realizó durante el ciclo primavera-verano, a partir de esquejes apicales de plantas sanas, colocándolas en pequeños contenedores hasta su enraizamiento, se obtuvieron las plantas necesarias para el experimento, sin embargo es probable que el método utilizado, además de la temporada, caracterizada por altas temperaturas hayan sido factores que no permitieron un desarrollo suficiente de raíces y por consiguiente una baja producción de biomasa fresca. Aun así, el promedio de producción de biomasa fresca fue superior en las plantas cuyo sustrato fue enriquecido con lombricomposta., debido al lento crecimiento que se da en esta especie, durante la duración del experimento solo se realizaron tres cortes, obteniendo en cada corte 16.1 gr /planta, y una producción final de 64.4 g/planta, dicho tratamiento tuvo diferencia significativa respecto a los de solución nutritiva y testigo ($P < 0.05$), cuya producción fue de 1.20 y 5.57 gr/planta por corte respectivamente. La producción fue baja para todos los tratamientos, pero se observan valores superiores en los obtenidos con lombricomposta, trabajos como los de Cruz *et al.*, 2008 y Ortega *et al.*, 2010 en la producción de plantas ornamentales y plántulas de tomate respectivamente indican

que los valores más altos de las variables de desarrollo registradas se obtuvieron cuando utilizaron lombricomposta como fuente de nutrición. Es probable que de haber tenido un desarrollo radicular más extenso, las plantas de ruda pudieron haber generado una mayor cantidad de biomasa en fresco, siguiendo el patrón de producción superior que han tenido todas las especies manejadas de forma orgánica.

La descripción botánica del epazote (*Chenopodium ambrosioides*) señala plantas de hasta 40 cm de altura con hojas de 4 cm de longitud y 1cm de ancho (Gómez *et al.*, 2008), características que difieren de las plantas cultivadas debido al manejo agronómico dado. Se obtuvieron en promedio 30.30 gr/ planta en cada corte, producción generada por el tratamiento testigo, y una producción final de 121.22 g/planta mostrando diferencia significativa ($P < 0.05$) respecto al tratamiento de solución nutritiva y lombricomposta cuyos valores fueron de 3.58 y 14.33 gr/planta respectivamente. La mayor producción obtenida con el tratamiento testigo es la mitad de lo reportado por (García y Magaña, 2014) que señalan que en condiciones de huertos urbanos y plantas situadas en camas de siembra se pueden obtener hasta 60 gr/planta. El epazote no es susceptible a presentar plagas y enfermedades ya que sus elevados contenidos de aceites esenciales, cuyo principio activo es el ascaridol le proporcionan una eficaz protección (Gómez *et al.*, 2008), sin embargo, condiciones como elevados niveles de humedad pueden favorecer la aparición de enfermedades de origen fúngico cuyo principal síntoma es la coloración amarilla del follaje, que antecede a la caída de un gran número de hojas, lo que puede mermar la producción, esta situación se presentó en el presente trabajo, aquí el epazote tuvo un buen desarrollo en sus primeras etapas, sin embargo, las condiciones ambientales propiciadas por la temporada de lluvias que se dieron a partir del mes de junio, aunado a la corta distancia que había entre cada planta, generaron las condiciones ideales para la aparición de este tipo de patologías. Como una manera de reducir las condiciones que propicien la aparición de plagas y enfermedades, en el caso de que se desarrolle un follaje abundante se recomienda realizar podas de aclareo que permitan la circulación del aire entre las plantas, a fin de que no se presenten las condiciones microclimáticas para la presencia de las enfermedades, además de aplicar el riego al pie de la planta sin mojar el follaje. La mayor producción de epazote se dio el tratamiento testigo, cultivadas directamente en el suelo, en donde al tener un espacio más amplio se dio un mayor crecimiento del sistema radicular y por consiguiente una mayor absorción de nutrientes, se debe considerar que dentro del contexto de la producción a escala familiar con métodos de agricultura urbana como los contenedores de PVC aquí manejados, son una opción ampliamente viable para zonas en las que en ocasiones no se cuenta con suelo disponible, por lo que, aunque los rendimientos fueron más altos en el tratamiento testigo, como lo sucedido durante la producción de albahaca, se continúa recomendando el sistema de producción en contenedores ya que permite tener acceso a la producción de epazote a personas que no cuentan con suelo de calidad disponible.

5. CONCLUSIONES

Los valores de producción de biomasa fresca fueron superiores en las plantas cultivadas en la mezcla de sustratos con lombricomposta, con excepción del epazote, sin embargo, acciones como podas de aclareo entre plantas y control del riego para reducir la incidencia de enfermedades fúngicas, pueden incrementar su producción.

Si bien, en el cultivo de la albahaca y epazote, el tratamiento testigo mostró mayor rendimiento en biomasa fresca, sin que existiera diferencia estadística para la primera respecto al tratamiento de solución nutritiva y lombricomposta, y aunque la producción de epazote fue superior cuando se cultivó directo en el suelo, se sugiere adoptar un método de cultivo en tubos de PVC utilizando lombricomposta como fuente de nutrición.

A pesar de que existen modelos de agricultura urbana que han sido diseñados para el cultivo de especies aromáticas, medicinales y de condimento, los cuales han probado su eficacia en cuanto a producción se refiere y actualmente son usados por habitantes de la zona, el cultivo en tubos de

PVC puede ser considerado como una alternativa adicional que reduzca el gasto por la adquisición de este tipo de plantas y que además acerque los conocimientos técnicos y de manejo de las especies cultivadas a habitantes de zonas urbanas y periurbanas que carecen de suelo disponible, fomentando la utilización de especies que han sido empleadas a lo largo de la historia y así dar continuidad a los conocimientos etnobotánicos locales.

Los datos de producción de follaje fresco en el presente trabajo se obtuvieron durante cinco meses de cultivo, sin embargo es posible mantener una producción constante hasta por un año.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aranda, A., C. Viesca, G. Sánchez, G. Sánchez, M. Ramos, J. Sanfilippo. 2003. La materia médica en el Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis. Revista de la Facultad de Medicina UNAM. Vol. 46 (1): 12-17
2. Brown, B; J. Hart, P. Wescot, N. Christensen. 2003. The critical role of nutriente managemente in mint production. Better Crops. Vol. 87 (4) 9-11.
3. Chocarro, L. P., Jordà, G. P., Mateos, J. M., Alonso, M. R., Vallejo, M. D. S., & Sánchez, M. C. (2015). Orígenes de la agricultura en la provincia de Málaga: datos arqueobotánicos. In 5º Congresso do Neolítico Peninsular: Actas: Faculdade de Letras da Universidade de Lisboa, 7-9 abril 2011 (pp. 36-43).
4. Cedeño, M. S. D. M. R. (2015). De la agricultura arcaica al agronegocio y los modelos asociativos. Su impacto social. Journal of Agriculture and Environmental Sciences, 4(2), 137-145.
5. Cortés, E., F. Venegas. 2011. Conocimiento tradicional y la conservación de la flora medicinal en la comunidad indígena de Santa Catarina B.C. México. Ra Ximbai. Vol. 7 (1) 117-122.
6. Cruz, J., P. Torres, M. Alfaro, M. Albores, J. Murguía. 2008. Lombricompostas y apertura de la espata en poscosecha del alcatraz "Green Goddess" (*Zantedeschia aethiopica* (L) K. Spreng) en condiciones tropicales. Revista Chapingo Serie Horticultura. Vol.14 (2) 207-212.
7. Del Angel, A., J. Nataren, L. Rebolledo, A. Rebolledo. 2011. Agricultura urbana y periurbana. Alternativa para la autonomía alimentaria familiar. Centro de Investigación Regional Golfo- Centro. Campo Experimental Cotaxtla, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP, Libro Técnico núm. 26, Veracruz, Ver. 102 pp.
8. Del Angel, A., M. Ventura, J. Nataren, C. Hernández, J. Adame, M. Villarruel, J. Salazar, M. Toral. 2015 Paisajes de Veracruz Central: Biodiversidad, educación y búsqueda de la sostenibilidad. Centro de Investigación Regional Golfo- Centro. Campo Experimental Cotaxtla, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP, Libro Técnico núm. 37, Veracruz, Ver. 289 pp.
9. El- Sayed, A; S. El Hanafy, R. El-Ziat. 2015. Effect of chicken manure anf humic acido n herb an essential oil production of *Ocimum* sp. American-Eurasian Journal of Agriculture and Enviromental Sciences Vol 15 (3): 367-379
10. Garcia,A., N. Magaña. 2014. Programa Integral de Desarrollo Rural. Componente de Agricultura Familiar, Periurbana y de Traspatio. Disponible en <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/Documents/AgriculturaF/EPAZOTE.pdf> [consultado el 11 de diciembre de 2016]
11. Gómez, A., 1993. Las raíces de la etnobotánica Mexicana. Acta Biológica Panamensis. Vol. 1. 87-100.
12. Gómez, J., 2008. Epazote (*Chenopodium ambrosioides*). Revisión de sus características morfológicas, actividad farmacológica, y biogénesis de su principal principio activo,

- ascaridol. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. Vol. 7 (1): 3-9.
13. Jesikha, M. 2013. Growth of medicinal and economical plants in vermicompost for sustainable development. Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences. Vol 1 (3) 1-6.
 14. Juan, J., D. Madrigal. 2005. Huertos, diversidad y alimentación en una zona de transición ecológica del estado de México. Ciencia Ergo Sum. Vol.12 (1): 54-63
 15. Juan; J., D. Madrigal. 2005. Huertos, diversidad y alimentación en una zona de transición ecológica del estado de México. Ciencia Ergo Sum. Vol 12 (1) 54-63
 16. Kinares, S; N. González, E. Gómez, A. Usubillaga, E. Darghan. 2005. Efecto de la fertilización, densidad de siembra y tiempo de corte sobre el rendimiento y calidad del aceite esencial extraído de *Cymbopogon citratus* Stapf. Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia. Volumen 22 (3): 250-263.
 17. Luna-Morales, C. D. C. (2015). Ciencia, conocimiento tradicional y etnobotánica. Etnobiología, 2(1), 120-136.
 18. Magaña, M., L. Gama, R. Mariaca. 2010. El uso de plantas medicinales en las comunidades Maya- Chontales de Nacajuca, Tabasco, México. Polibotánica. (29): 213-262.
 19. Menéndez, R; V. Pavón.1999. *Plecthranthus amboinicus* (LOUR) SPRENG. Revista Cubana de Plantas Medicinales. Vol. 3 (3): 110-115.
 20. Moncayo, M; V. Álvarez, G. González, L. Salas, J. Chávez. 2015. Producción orgánica de albahaca en invernadero en la Comarca Lagunera. Terra Latinoamericana. Vol 33(1): 69-77
 21. Monroy, R., I. Ayala. 2003. Importancia del conocimiento etnobotánico frente al proceso de urbanización. Etnobiología. 3: 79-92
 22. Ortega, L., J. Sánchez, R. Díaz, J. Ocampo. 2010. Efecto de diferentes sustratos en el crecimiento de plántulas de tomate (*Lycopersicum esculentum* MILL). Revista Ra Ximbai. Vol. 6 (3): 365-372
 23. Prabakaran, G., D. Anadakumar. 2014. Effect of organic and chemical fertilizers on growth of *Mentha spicata* on roof top garden method. International Journal of Advances in Interdisciplinary Research. Vol. 1 (7): 27-30
 24. Rodríguez, C., C. Lemes. 2000. Estudio de la propagación vegetativa de la ruda RUTA GRAVEOLENS. Revista Cubana de Plantas Medicinales. Vol. 5 (2) 56-58.
 25. Rosas, J. L. B. (2008). La milpa zoque-popoluca y la globalización: un agroecosistema complejo en las rutas NEOLIBERALES DE MÉXICO. Nuevas rutas para el desarrollo en América Latina: experiencias globales y locales, 367. Disponible en https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=7naHcSZBV5gC&oi=fnd&pg=PA367&dq=hierbas+aromaticas+mexico+cultivo+historia+&ots=zWRwcpZzN4&sig=dJMizLwL7vJpneGQasYvv1_hy-w&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
 26. Serrato, A; A. Moreno. 2003. Efecto del abono orgánico y de la edad en el inio del corte en la producción de biomasa y de aceite esencial de limoncillo CENICAFE. 54 (4): 273-277
 27. Shamah, T., V. Mundo, J. Rivera. 2014. La magnitud de la inseguridad alimentaria en México: su relación con el estado de nutrición y con factores socioeconómicos. Salud Pública de México. Vol. 56. Supl. 1. S79-S85.
 28. Soto, R; G. Vega, A. Tamajon. 2002. Instructivo tecnico para el cultivo de *Cymbopogin citratus* (D.C.) Stapf (CAÑA SANTA). Revista Cubana de Plantas Medicinales. Volumen 7 (2): 89-95.
 29. StatSoft. Statistica 7. [Programa de computo] 2015.

CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN FRIJOL

Yatzil Denih García-Díaz¹, Elia Nora Aquino-Bolaños¹, Arelly Capistrán-Carabarin¹, José Luis Chávez-Servia²

¹Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Veracruzana, Dr. Rafael Sánchez Altamirano S/N, Industrial Animas, Xalapa, 91192, Veracruz, México. ²Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR Unidad Oaxaca, Hornos No. 1003, Santa Cruz Xoxocotlan, 71230 Oaxaca, México

RESUMEN

El frijol forma parte importante dentro de la dieta, por ser rico en carbohidratos, proteínas, lípidos, minerales y compuestos fenólicos; diversos estudios han demostrado el poder anti-inflamatorio, anticancerígeno y antioxidante del grano. El objetivo fue evaluar el contenido de compuestos fenólicos, actividad antioxidante y una descripción biofísica de grano, en muestras poblacionales pertenecientes a Oaxaca. Se hizo una separación de grano y testa para determinar en ambas fracciones contenidos de polifenoles totales, flavonoides, antocianinas monoméricas y actividad antioxidante. Se detectaron diferencias significativas en el análisis de varianza para todas las variables evaluadas donde las poblaciones Gordo-Ver y Sta. Lucía-02, registraron mayor tamaño de grano. La población Zaachila-01 sobresalió en peso y volumen de 100 granos, todas de (*Phaseolus coccineus* L.). En testa los polifenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante destacaron las poblaciones de frijol de tamaño grande como San Miguel de color negro (*P. coccineus* L.) por el contrario se observó en menor concentración las poblaciones Sta. Lucía-01 (tamaño grande) y Zaachila-02 (tamaño normal) de color negro. En composición de grano las poblaciones Zaachila-03, Santo Domingo y Sn. Miguel, presentaron mayor contenido de fenoles y actividad antioxidante. En menor concentración las poblaciones Sildefonso y Zaachila-02 las cuales son frijoles de tamaño normal. En antocianinas monoméricas destaca con mayor concentración el frijol SnSebas-02 de color negro (*P. vulgaris* L.). Como conclusión en general, no hubo una relación de tamaño de grano y concentración de compuestos fenólicos, por lo tanto, la morfometría y la de fenoles en grano de frijol depende de la variedad, región y condiciones de cultivo.

1. INTRODUCCIÓN

El frijol común, *Phaseolus vulgaris*, es una fuente rica y relativamente barata de proteínas, fibra dietética, hierro, hidratos de carbono complejos, minerales, vitaminas y ácidos grasos poliinsaturados; se caracteriza por estar libre de colesterol y tener un contenido marginal de sodio y grasa (Shahidi, 1997; Valdés *et al.*, 2011). Además de estos componentes nutricionales, contiene una amplia variedad de fitoquímicos, tales como compuestos fenólicos, principalmente flavonoides, que incluyen antocianinas, proantocianidinas, flavonoles, ácidos fenólicos, e isoflavonas; los cuales le confieren beneficios potenciales para la salud, tales como reducción de riesgo a enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus, obesidad, cáncer y enfermedades del tracto digestivo (Mejía *et al.*, 1999; Beninger y Hosfield, 2003; Choung *et al.*, 2003; Aparicio-Fernández *et al.*, 2005; Granito *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2008).

La variabilidad genética desarrollada en las formas silvestres y cultivadas de *Phaseolus* así como la recombinación entre genotipos locales e introducidos han ampliado la base genética del frijol común. Aunque el color de la testa de las variedades silvestres se debe a la selección natural

causada por el mimetismo de la semilla con el suelo para ser menos visible a los depredadores durante la domesticación el hombre seleccionó genotipos de frijol adaptados a sus sistemas de producción y con color de grano preferente para satisfacer las necesidades de su consumo. (Vargas-Vázquez *et al.*, 2008)

La diversidad genética de las variedades locales es la parte más valiosa de la biodiversidad global y se considera de vital importancia para el futuro de la producción mundial. Las variedades tradicionales (variedades locales) son utilizadas directamente por los agricultores de subsistencia como un componente clave de sus sistemas de cultivo. (Wood *et al.*, 1997). Las variedades locales tienen rasgos valiosos en términos de adaptación agroecológica, la calidad de cocción, preferencia del consumidor y la resistencia a enfermedades o estrés abiótico (Zhang *et al.*, 2008). El objetivo de este trabajo fue evaluar el contenido de compuestos fenólicos, actividad antioxidante y la descripción biofísica de grano, en muestras poblacionales pertenecientes a Oaxaca

2. PARTE EXPERIMENTAL:

Se evaluaron 13 poblaciones de frijol nativo, proporcionado por el Instituto Politécnico Nacional-CIIDIR, unidad Oaxaca, colectadas directamente con agricultores de ocho diferentes municipios del estado de Oaxaca, también se analizó una población de frijol gordo, obtenida del municipio de Coatepec, Veracruz. Las muestras fueron trasladadas y analizadas en el laboratorio del Instituto de Ciencias Básicas, de la Universidad Veracruzana, ubicado en Xalapa, Veracruz. La Tabla 1 muestra los datos de las poblaciones de frijol analizadas.

TABLA 1. Descripción de las poblaciones de frijol analizadas

ID	Descripción de las poblaciones, tipo de frijol	ID-colecta	Grano	Color
F-1	Villa de Zaachila 3, frijolon	Zaachila-03	Normal	Negro
F-2	Villa de Zaachila 2, frijolon	Zaachila-02	Normal	Negro
F-3	Santa Lucía Miahuatlán 2, frijolon	Stalucia-02	Grande	Negro
F-4	San José del Peñasco, frijol	SnJose	Normal	Negro
F-5	Villa de Zaachila 4, frijolon	Zaachila-04	Grande	Gris
F-6	San Sebastián Abasolo 1, frijol	SnSebas-01	Normal	Negro
F-7	Santo Domingo Amatlan, San Isidro Amatlán, frijol común	SDomingo	Normal	Negro
F-8	San Miguel Tlanichico, Trinidad Zaachila, frijolon	SnMiguel	Grande	Negro
F-9	San Idelfonso Amatlán, frijol	SIdelfonso	Normal	Negro
F-10	Villa de Zaachila, 1, frijolon	Zaachila-01	Grande	Rojo
F-11	San Bartolomé Quialana, frijol	Bartolome	Normal	Negro
F-12	Santa Lucía Miahuatlán 1, frijolon	Stalucia-01	Grande	Negro
F-13	San Sebastián Abasolo 2, frijol	SnSebas-02	Normal	Negro
F-14	Coatepec, Veracruz, frijol gordo	Gordo-Ver	Grande	Bayo

Pruebas biofísicas

Tamaño de la semilla. Las variables evaluadas fueron largo (mm), ancho (mm) y grosor (mm); para lo cual se tomaron 20 semillas de cada población, y utilizando un vernier digital, se midieron y registraron dichas variables morfológicas (Espinosa-Pérez et al., 2015).

Peso y volumen de 100 granos. El peso se determinó con una balanza analítica (± 0.001 g tomando cuatro muestras representativas de 100 semillas por cada población,). Para el volumen se utilizó el método de desplazamiento de agua; descrito por Solano-Cervantes et al. (2009).

Peso específico. El peso específico es la relación que existe entre el peso y el volumen de 100 semillas, y es expresado como g/cm³ (Allende et al., 2006; Solano-Cervantes et al., 2009).

Compuestos fenólicos y actividad antioxidante

Preparación de los extractos. Después de someter a remojo las muestras de 60 g de frijol en 70 mL de agua destilada, se separó manualmente la testa del grano. Por separado, las dos fracciones (testa y grano) se trituraron utilizando un Nutribullet y posterior a esto se homogenizaron 3 g de cada fracción con 25 mL de acetona/agua/ácido acético (70:29.5:0.5, v/v/v) (Xu y Chang, 2007). Los extractos se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 min a 10 °C. Se separó el sobrenadante, y el residuo se extrajo una vez más bajo las condiciones antes descritas.

Polifenoles totales. La concentración de polifenoles totales se determinó mediante el método espectrofotométrico modificado de Singleton y Rossi (1965). El resultado se expresó en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra en base seca (mg EAG g⁻¹ bs).

Flavonoides. El contenido de flavonoides se determinó de acuerdo al método descrito por Zhishen et al. (1999). Los valores se expresaron como mg equivalentes de catequina por gramo de muestra en base seca (mg EC g⁻¹ bs).

Antocianinas monoméricas. La cuantificación de antocianinas se llevó a cabo mediante el método de pH diferencial descrito por Giusti y Wrolstad (2001), y se reportó como mg cianidina-3-glucosido g⁻¹ bs.

Actividad antioxidante. Se midió tomando como referencia el método de Brand-Williams et al. (1995). El resultado fue expresado como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra en base seca ($\mu\text{mol Eq Trolox g}^{-1}$ bs).

Análisis de datos

Se realizó un diseño unifactorial completamente aleatorio, tomándose cuatro repeticiones para los parámetros físicos y compuestos con actividad antioxidante, donde el factor población se integró por catorce niveles. Las variables de respuesta fueron analizadas utilizando un modelo lineal generalizado (GLM). Los resultados se expresaron como valores medios y error estándar (ES). Se realizó la comparación múltiple de los valores promedio por el método de Tukey ($p < 0.05$). Los análisis fueron procesados en el paquete estadístico Statistica ver. 7.0.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas biofísicas

El largo del grano de frijol se registró en un intervalo de 9.10 a 18.22 mm, el ancho con valores desde 5.29 a 12.95 mm y el grosor en un intervalo de 3.86 a 8.52 mm, (Tabla 2) de acuerdo a estos valores las poblaciones Gordo-ver y StaLucia-02 presentaron mayor el tamaño de frijol, las dimensiones son similares a lo reportado por Espinosa-Perez et al (2015) para poblaciones de frijol

nativo del centro-sur de México. Para el peso de 100 granos, la población SnMiguel y Zaachila-01, no mostraron diferencias significativas, en el volumen de 100 granos, la población Zaachila-01 mostró diferencia significativa, respecto al peso específico, no se encontró diferencia significativa. Las diferentes características de estas poblaciones pudieran estar relacionadas con la raza y variedad a la que pertenecen y de acuerdo a la altitud en la que son cultivada, como lo señaló Singh et al. (1989).

Compuestos fenólicos y actividad antioxidante en testa

En la testa los polifenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante, destacaron en el frijol de tamaño grande como la población SnMiguel de color negro (*P. coccineus* L.) la menor concentración de estos compuestos se encontró en la población Sta. Lucía-01 (grande) y Zaachila-02 (normal) las cuales corresponden a un frijol color negro. Cabe destacar la población Gordo-Ver de color bayo, presentó altas concentraciones de estos compuestos y actividad antioxidante siendo un frijol de color claro además de ser de un tamaño grande (Figura 1)

Para la concentración en polifenoles totales se obtuvo un intervalo de 78.29 a 218 mg EAG g⁻¹ bs. (Figura 1A). Los valores obtenidos son mayores a lo reportado por Sutivisedsak et al. (2010), quienes evaluaron ocho muestras de frijol común con diferentes colores de testa, encontrando valores desde 1.16 a 9.61 mg EAG g⁻¹ (tf) siendo la concentración más baja para un frijol pinto y la mayor en frijol pequeño de color rojo; esta gran variación podría ser debida a que ellos obtuvieron sus extractos empleando agua destilada. Mientras que Guajardo-Flores et al. (2013) reportaron para frijol negro "San Luis" un intervalo de 27 a 61 mg EAG g⁻¹ (tf), valores que también son menores a los encontrados en el presente trabajo.

Para flavonoides se obtuvieron valores desde 6.35 a 26.3 mg EAG g⁻¹ bs (Figura 1B), esto es superior a lo reportado por Akillioglu et al. (2010) con 0.14 a 1.27 mg ECat/g para frijol negro y pinto cultivado en Turquía y Lomas-Soria et al. (2015) entre 1.56 a 1.99 mg ECat/g en harina de frijol Flor de Mayo, peruano y negro.

En cuanto a la actividad antioxidante se obtuvieron valores en un intervalo de 813 a 1789.2 µmol ETrolox g⁻¹ bs (Figura 1C). Oomah et al. (2005) reportaron que el frijol de color oscuro posee elevada actividad antioxidante, debido a la presencia de altas cantidades de compuestos fenólicos, principalmente antocianos y taninos condensados; mientras que los frijoles claros muestran actividad antioxidante más baja. Aquino-Bolaños et al. (2016) reportan para poblaciones de frijol nativo un intervalo de 132.5 a 1021.7 µmol ETrolox g⁻¹ bs para la testa.

Antocianinas monoméricas en testa: Los valores promedio de antocianinas en testa de frijol nativo mostraron importantes diferencias entre las poblaciones. Las concentraciones se obtuvieron en un intervalo de 0.14 y 9.66 mg Cianidina-3-Glucosido g⁻¹ bs (Figura 1D). Las poblaciones que presentaron mayor contenido de antocianinas fueron SnSebas-02, StoDomingo y SnJosé (9.66, 8.24 y 6.48 mg Cianidina-3-Glu g⁻¹, respectivamente), seguidos por SnSebas-01, SnBartolomé y SnIdelfonso, y son frijoles de color negro, de tamaño normal. Por otra parte, las poblaciones con concentraciones más bajas fueron Gordo-Ver, StaLucia-02 y SnMiguel (0.14, 0.31 y 0.37 mg Cianidina-3-Glu g⁻¹, respectivamente), seguidas por Zaachila-01, Zaachila-04, Zaachila-03, StaLucia-01 y Zaachila-02, todas ellas frijoles de gran tamaño (frijolones), con colores desde bayo, café, rojo, gris y negro.

Esto es superior a lo reportado por Oomah et al. (2010) 0.01 a 7.55 mg C3G/g para frijol pinto y rojo cultivado en Canadá, Dzomba et al. (2013) 0.28 a 0.59 mg C3G/g para frijol negro, café y moteado originario de Zimbabwe y Akond et al. (2011) 0.06 a 0.47 mg C3G/g para frijol de Colombia, Brasil y la india.

TABLA 2. Pruebas biofísicas de diferentes poblaciones de frijol

Población	Largo (mm)	Ancho (mm)	Grosor (mm)	Peso de 100 granos (g)	Volumen (ml)	Peso específico (g/cm ³)
Gordo-Ver	18.22 ± 0.44 ^a	12.95 ± 0.22 ^a	8.52 ± 0.24 ^a	62.68 ± 1.02 ^b	58.75 ± 1.11 ^d	1.07 ± 0.00 ^a
SnBartolomé	9.33 ± 0.07 ^d	5.55 ± 0.09 ^e	4.01 ± 0.05 ^f	14.20 ± 0.08 ^c	12.50 ± 0.29 ^e	1.14 ± 0.02 ^a
Snldelfonso	10.21 ± 0.07 ^d	5.73 ± 0.06 ^e	3.86 ± 0.11 ^f	13.90 ± 0.17 ^c	12.50 ± 0.29 ^e	1.11 ± 0.02 ^a
SnJosé	9.10 ± 0.12 ^d	5.62 ± 0.08 ^e	4.08 ± 0.08 ^f	13.84 ± 0.10 ^c	11.50 ± 0.29 ^e	1.20 ± 0.02 ^a
SnMiguel	17.36 ± 0.20 ^{abc}	10.20 ± 0.17 ^c	6.62 ± 0.09 ^{de}	89.59 ± 1.05 ^a	79.00 ± 2.38 ^{abc}	1.14 ± 0.04 ^a
SnSebas-01	9.50 ± 0.14 ^d	5.62 ± 0.07 ^e	4.18 ± 0.07 ^f	13.81 ± 0.05 ^c	11.50 ± 0.29 ^e	1.20 ± 0.03 ^a
SnSebas-02	9.29 ± 0.18 ^d	5.29 ± 0.08 ^e	3.96 ± 0.03 ^f	12.92 ± 0.09 ^c	11.00 ± 0.00 ^e	1.17 ± 0.01 ^a
StaLucia-01	17.98 ± 0.19 ^a	11.46 ± 0.15 ^b	7.91 ± 0.15 ^{abc}	87.52 ± 0.70 ^{ab}	80.50 ± 0.87 ^{abc}	1.09 ± 0.01 ^a
StaLucia-02	18.11 ± 0.25 ^a	11.48 ± 0.08 ^b	8.21 ± 0.18 ^{ab}	88.32 ± 0.58 ^{ab}	80.50 ± 0.50 ^{abc}	1.10 ± 0.01 ^a
StoDomingo	9.65 ± 0.34 ^d	5.58 ± 0.08 ^e	4.23 ± 0.06 ^f	14.83 ± 0.10 ^c	12.25 ± 0.25 ^e	1.21 ± 0.02 ^a
Zaachila-01	16.54 ± 0.64 ^{bc}	10.84 ± 0.16 ^{bc}	7.20 ± 0.33 ^{cde}	91.98 ± 1.62 ^a	83.50 ± 2.87 ^a	1.11 ± 0.06 ^a
Zaachila-02	17.32 ± 0.24 ^{abc}	10.94 ± 0.13 ^{bc}	7.57 ± 0.20 ^{bcd}	85.20 ± 0.75 ^{ab}	74.50 ± 0.50 ^c	1.14 ± 0.01 ^a
Zaachila-03	17.70 ± 0.39 ^{ab}	10.27 ± 0.31 ^c	6.81 ± 0.13 ^{de}	83.45 ± 1.05 ^{ab}	75.50 ± 1.26 ^{bc}	1.10 ± 0.01 ^a
Zaachila-04	16.15 ± 0.39 ^c	9.34 ± 0.19 ^d	6.37 ± 0.41 ^e	85.44 ± 0.93 ^{ab}	81.50 ± 2.22 ^{ab}	1.05 ± 0.02 ^a

Valores promedio ± error estándar de 20 mediciones, excepto el peso y volumen de 100 semillas que corresponden a cuatro repeticiones. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias ($p < 0.05$).

Compuestos fenólicos y actividad antioxidante en grano

Las concentraciones de polifenoles totales en grano de las 14 poblaciones de frijol nativo, también mostraron diferencias entre sí; los valores oscilaron entre 1.81 y 2.53 mg EAG g⁻¹ bs. (Figura 2 A) La población que mostró menor contenido fue Snldelfonso (frijol pequeño de color negro); mientras que las de mayor concentración fueron SnMiguel y Zaachila-03, correspondientes a frijol de gran tamaño de colores negro/bayo y negro, respectivamente. En la literatura se han reportado valores de polifenoles, evaluados en harina de frijol entero. Tal es el caso de Espinosa-Alonso et al. (2006) que observaron un intervalo de 0.90 a 2.11 mg EAG g⁻¹ en poblaciones de frijol de colores. También Xu y Chang (2007, 2008) reportaron un valor de 9.70 mg EAG g⁻¹ bs para frijol negro y 5.90 a 6.89 mg EAG g⁻¹ bs para frijol rojo.

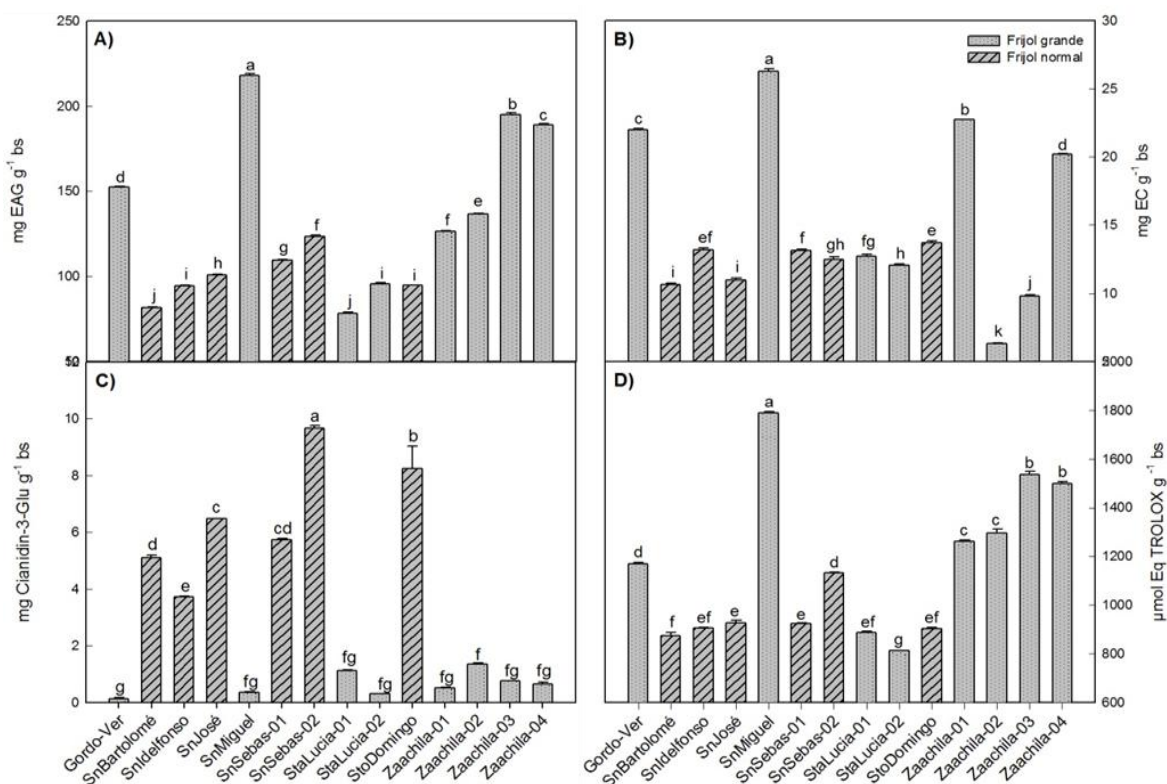


Figura 1. Contenido de polifenoles totales (A), flavonoides (B) actividad antioxidante (C) y antocianinas monoméricas (D) en testa de frijol nativo (*Phaseolus* sp.). Las barras representan el promedio \pm error estándar de 4 repeticiones, barras con diferente letra minúscula son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En cuanto al contenido de flavonoides en el grano de frijol, se obtuvieron valores de 0.21 a 0.45 mg EC g⁻¹ bs. La población con menor contenido fue Zaachila-02 (frijolón negro) y la de mayor contenido fue StoDomingo, la cual representa un frijol de color negro. Estos valores fueron inferiores a lo reportado por Boateng et al. (2008), quienes presentaron un intervalo de 0.61 a 0.85 mg EC g⁻¹ bs en frijol pinto de Estados Unidos; pero mayores a lo reportado por Oomah et al. (2005) para frijol de Canadá de colores pinto y rojo, respectivamente (0.24 a 0.26 mg EC g⁻¹ bs).

Los valores obtenidos para la actividad antioxidante son diferentes entre poblaciones, encontrándose en un intervalo de 6 a 13.52 μmol Eq. Trolox g⁻¹ bs La población SnDelfonso fue la de más baja actividad antioxidante, y la población Zaachila-03 la más alta, representando frijol y frijolón de color negro respectivamente. Ranilla et al. (2009) reportaron 2.2 a 6.4 μmol Eq. Trolox g⁻¹ de muestra en peso seco, para harinas de frijol completo, valores inferiores a los obtenidos. Mientras que Xu y Chang (2008) reportaron 18.95 μmol Eq. Trolox g⁻¹ para frijol negro.

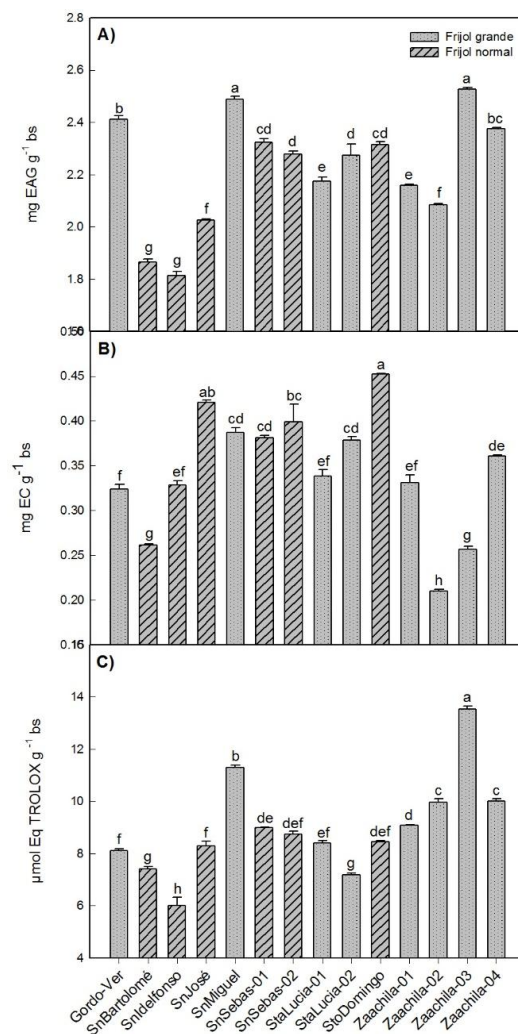


Figura 2. Contenido de polifenoles totales (A), flavonoides (B) y actividad antioxidante (C) en grano de frijol nativo (*Phaseolus* sp.). Las barras representan el promedio \pm error estándar de 4 repeticiones, barras con diferente letra minúscula son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

4. CONCLUSIONES

De acuerdo a los datos obtenidos, no hubo una relación de tamaño de grano y concentración de compuestos fenólicos, por lo tanto, la composición de fenoles y la morfometría de los granos depende de la variedad, región y condiciones de cultivo.

Además, se obtuvieron mayores concentraciones de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en testa que en el grano de frijol.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aquino-Bolaños, E. N., García-Díaz, Y. D., Chavez-Servia, J. L., Carrillo-Rodríguez, J. C., Vera-Guzman, A. M., & Heredia-García, E. 2016. Anthocyanins, polyphenols, flavonoids and antioxidant activity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces. *Emirates Journal of Food and Agriculture*.

2. Akillioglu, H. G., & Karakaya, S. 2010. Changes in total phenols, total flavonoids, and antioxidant activities of common beans and pinto beans after soaking, cooking, and in vitro digestion process. *Food Science and Biotechnology*, 19(3), 633-639.
3. Akond, A. S. M. G. M., Khandaker, L., Berthold, J., Gates, L., Peters, K., Delong, H., Hossain, K. 2011. Anthocyanin, total polyphenols and antioxidant activity of common bean. *American Journal of Food Technology* 6, 385-394
4. Allende, G., Rivera, M. G., Rosales, R., Acero, M. G., Mayek, N. 2006. Calidad bioquímica del frijol cultivado en distintas condiciones de humedad del suelo. *Investigación y Ciencia* 34, 12-18.
5. Aparicio-Fernández, X., Manzo-Bonilla, L., Loarca-Piña, G. F. 2005. Comparison of antimutagenic activity of phenolic compounds in newly harvested and stored common beans *Phaseolus vulgaris* against aflatoxin B1. *Journal of Food Science* 70, S73-S78
6. Beninger, C. W., Hosfield, G. L. 2003. Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions, and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. seed coat color genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 7879-7883.
7. Boateng, J., Verghese, M., Walker, L. T., Ogotu, S. 2008. Effect of processing on antioxidant contents in selected dry beans (*Phaseolus* spp. L.). *LWT-Food Science and Technology* 41, 1541-1547.
8. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. L. W. T. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology* 28, 25-30.
9. Choung, M. G., Choi, B. R., An, Y. N., Chu, Y. H., Cho, Y. S. 2003. Anthocyanin profile of Korean cultivated kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 7040-7043.
10. Dzomba P., Togarepi E. & Mupa M. (2013). Anthocyanin content and antioxidant activities of common bean species (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in Mashonaland Central, Zimbabwe. *African Journal of agricultural Research*, 25, 3330-3333.
11. Espinosa-Alonso, L. G., Lygin, A., Widholm, J. M., Valverde, M. E., Paredes-López, O. 2006. Polyphenols in wild and weedy Mexican common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 4436-4444.
12. Espinosa-Pérez E. N., Ramírez-Vallejo P., Crosby-Galván M. M., Estrada-Gómez J. A., Lucas-Florentino B., Chávez-Servía J. L. 2015. Clasificación de poblaciones nativas de frijol común del centro-sur de México por morfología de semilla Rev. Fitotec. Mex. Vol. 29 (1): 29–38.
13. Giusti, M. M., Wrolstad, R. E. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*.
14. Granito, M., Paolini, M., Pérez, S. 2008. Polyphenols and antioxidant capacity of *Phaseolus vulgaris* stored under extreme conditions and processed. *LWT-Food Science and Technology* 41, 994-999.
15. Guajardo-Flores, D., Serna-Saldívar, S. O., Gutiérrez-Urbe, J. A. 2013. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative activities of extracted saponins and flavonols from germinated black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry* 141, 1497-1503.
16. Lin, L. Z., Harnly, J. M., Pastor-Corrales, M. S., Luthria, D. L. 2008. The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry* 107, 399-410.
17. Mejía, E. G., Castaño-Tostado, E., & Loarca-Piña, G. 1999. Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 441, 1-9.
18. Ranilla, L. G., Genovese, M. I., Lajolo, F. M. 2009. Effect of different cooking conditions on phenolic compounds and antioxidant capacity of some selected Brazilian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 5734-5742.
19. Oomah, B. D., Cardador-Martínez, A., Loarca-Piña, G. 2005. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85, 935-942.

20. Oomah B.D., Corbé A., Balasubramanian P., 2010. Antioxidant Anti-inflammatory Activities of Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Hulls. *Journal of agricultural and Food Chem.* 58, 8225–8230.
21. Shahidi, F. 1997. *Antinutrients and phytochemicals in food*. 1st ed. Washington, DC, USA
22. Singleton, V. L., Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158.
23. Solano-Cervantes, F., Díaz-Ruiz, R., Jacinto-Hernández, C., AguirreÁlvarez, L., Huerta-de-la-Peña, A. 2009. Prácticas agrícolas, descripción morfológica, proteínica y culinaria del grano de cultivares de frijol sembrados en la región de Tlaxala, Guerrero. *Ra Ximhai* 5, 187-199.
24. Sutivisedsak, N., Cheng, H. N., Willett, J. L., Lesch, W. C., Tangsrud, R. R., Biswas, A. 2010. Microwave-assisted extraction of phenolics from bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Research International* 43, 516-519.
25. Valdés, S. T., Coelho, C. M. M., Michelluti, D. J., Tramonte, V. L. C. G. 2011. Association of genotype and preparation methods on the antioxidant activity, and antinutrients in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *LWT-Food Science and Technology* 44, 2104-2111.
26. Vargas-Vázquez, M. L. P., Muruaga-Martínez, J. S., Pérez-Herrera, P., Gill-Langarica, H. R., Esquivel-Esquivel, G., Martínez-Damián, M. Á., . . . Mayek-Pérez, N. (2008). Caracterización morfoagronómica de la colección núcleo de la forma cultivada de frijol común del INIFAP. *Agrociencia*, 42(7), 787-797.
27. Wood, D., & Lenne, J. M. (1997). The conservation of agrobiodiversity on-farm: questioning the emerging paradigm. *Biodiversity & Conservation*, 6(1), 109-129.
28. Xu, B. J., Yuan, S. H., Chang, S. K. C. 2007. Comparative analyses of phenolic composition, antioxidant capacity, and color of cool season legumes and other selected food legumes. *Journal of Food Science* 72, S167-S177.
29. Xu, B. J., Chang, S. K. C. 2008. Total phenolic content and antioxidant properties of eclipse black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by processing methods. *Journal of Food Science* 73, H19-H27.
30. Zhang, X., Blair, M. W., & Wang, S. (2008). Genetic diversity of Chinese common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces assessed with simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 117(4), 629-640.
31. Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals.

ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE MACROMICETOS LIGNÍCOLAS DE CUATRO CIÉNEGAS COAHUILA

Josefina Neri-Yáñez¹, José Gerardo Gaona-Lozano², Yolanda Garza-García², Erika Yanneth Acosta-Cruz², Dafne Hebe Ramírez-Lozano¹, y Odilon Gayosso-Barragán³

1 Maestría en Ciencias en Biotecnología, Departamento de Biotecnología, 2 Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Saltillo, Coahuila, CP 25280. 3 Doctorado en Ciencias Agrarias, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro UL, Torreón, Coahuila, CP 27059.

RESUMEN

La región de Cuatro Ciénegas Coahuila como componente del ecosistema del Desierto de Chihuahua, forma parte del complejo de grandes desiertos de Norteamérica. El estudio micológico de la zona es muy limitado, ya que solo corresponden a taxones fúngicos entre el 1 al 2.5 % de los filotipos identificados en los sustratos terrestres y acuosos estudiados. La degradación microbiana de la lignina permite utilizar directamente plantas lignocelulósicas para la producción de biocombustibles y productos químicos renovables. El objetivo de este trabajo fue detectar cualitativamente las actividades enzimáticas de lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa en siete cepas de hongos filamentosos aisladas de Cuatro Ciénegas Coahuila. La reactivación de las cepas se realizó en cajas Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA) y Agar Dextrosa Saboreaud (SDA). Se realizó la identificación taxonómica del material fúngico de acuerdo a las características morfológicas, para lo cual se consultaron claves y literatura especializada. Para la determinación de la actividad lignocelulolítica de las enzimas LiP, MnP y lacasa, se utilizó un medio de cultivo sólido y colorante Rojo fenol, ABTS y Azure B. Se observó mayor crecimiento de micelio en el medio de cultivo SDA y se identificaron hongos correspondientes a los géneros *Penicillium chrysogenum*, *Phaosphaeria* sp, *Alternaria* sp. Hasta el momento todos los aislamientos dieron positivo al menos a algún tipo de actividad enzimática, en todas las cepas se detectó la presencia de manganeso peroxidasa (MnP), mientras que para lacasa y lignina peroxidasa (LiP) únicamente se han encontrado 1 y 2 cepas respectivamente.

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con el Instituto Internacional de Lignina, actualmente, en el mundo, se generan entre 40 y 50 millones de toneladas de lignina por año, tratándose la mayoría como un residuo no comercializable. Una posible vía de aprovechamiento es su uso como materia prima, cuyo interés tecnológico radica en su abundancia natural, gran producción y en que tiene un elevado contenido en carbono (Bedia et al., 2009). Los hongos ligninolíticos son de fundamental importancia en los procesos naturales para la eficiente biodegradación de los residuos vegetales, son los únicos que poseen la habilidad para degradar completamente los compuestos lignocelulósicos, gracias a su capacidad para sintetizar enzimas como lacasa, manganeso peroxidasa (MnP) y lignina peroxidasa (LiP) (Elisashvili y Kachlishvili, 2009). Así mismo, son de importancia económica por sus aplicaciones biotecnológicas en el Bio-blanqueo del papel, la decoloración de efluentes, en la industria de textiles, cosmetológica, de bioquímica analítica, de biosensores, de alimentos y en aplicaciones agrícolas (Morozova et al., 2007). En las últimas décadas se ha demostrado el potencial de los hongos ligninolíticos para ser empleados en procesos biotecnológicos (Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006). Un número considerable de investigaciones se han dirigido hacia la

búsqueda y estudio de especies nuevas de hongos Basidiomycetos con capacidad alta de producir enzimas ligninolíticas (Hernández-Luna et al., 2008; Elisashvili y Kachlishvili, 2009; Saparrat et al. 2002).

Kumar y Arya (2013) evaluaron e identificaron a los hongos *Phoma multirostrata*, *Fusarium palidoroseum*, *Alternaria alternata* y *Chaetomium globosum* con potencial para la producción de enzimas ligninolíticas. Por su parte Fukasawa et al. (2011) evaluaron la capacidad de desintegración de 28 aislamientos de especies fúngicas lignícolas, utilizando polvo de madera en diferentes condiciones de humedad y etapas de desintegración como sustratos. Encontraron que *Bjerkandera adusta*, *Mycena haematopus*, *Omphalotus guepiniformis*, *Trametes hirsuta*, *Trametes versicolor* causaron grandes pérdidas de peso en madera. Por otro lado en un estudio sobre la participación de LiP, MnP y lacasa en la degradación y la degradación de la lignina en paja de trigo, Arora et al. (2002) encontraron que una cepa de *Daedalea flavida* y dos de *Phlebia spp* fueron capaces de degradar la lignina de forma selectiva, *Phlebia radiata* y *P. floridensis* fueron los mejores productores de MnP y lacasa, respectivamente, mientras que *P. chrysosporium* fue mejor para la producción de LiP. Por su parte Laura y Castellanos, (2009) aislaron cepas de hongos con actividad ligninolítica de la planta forrajera *Calamagrostis nitidula* Pilg, y las identificaron según sus características macroscópicas y microscópicas como: *Alternaria*, *Ulocladium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Helicomycetes*, y *Aspergillus*.

El presente estudio se plantea con el objetivo de detectar cualitativamente las actividades enzimáticas de lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa en siete cepas de hongos filamentosos aisladas de Cuatro Ciénegas Coahuila.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivación e identificación morfológica de cepas. Se usaron siete cepas fúngicas (1RA, 3RA, 6A, 7A, 3B, 1RA 7714 y 3B 7714) de muestras ambientales de Cuatro Ciénegas Coahuila, las cuales fueron aisladas y mantenidas en el Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma de Coahuila. La reactivación de estas se realizó en cajas Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA) y Agar Sabouraud Dextrosa (ASD), colocando en el centro de cada caja discos de 8 mm de diámetro con micelio de ocho días de crecimiento. Se usó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con tres repeticiones; las siete cepas fueron colocadas en una cámara de incubación a 25°C, se tomaron medidas del crecimiento radial del hongo durante diez días, tiempo en que el micelio cubrió por completo la caja. Se observaron características macroscópicas de las colonias describiendo detalles de textura, aspecto, superficie, color en un estereoscopio. También se realizó la observación microscópica mediante la técnica de microcultivo en lámina para observar las estructuras vegetativas y reproductivas. En la identificación de género y especie se utilizó el manual de identificación de hongos según Egorova (1983).

Pruebas cualitativas para la detección de la actividad enzimática Manganeso Peroxidasa (MnP). Para la evaluación cualitativa de la actividad enzimática se usó el medio de cultivo sólido Rubilar, (2007). Para la detección de Manganeso peroxidasa (MnP) se empleó Rojo fenol, la oxidación de este por la acción de la enzima MnP produce una reacción colorida, el medio de cultivo cambia de amarillo a naranja (Castillo, 2010). Las cajas con este medio fueron inoculadas con discos de micelio de 5 mm de diámetro de un cultivo previamente reactivado en Agar Dextrosa Saboreaud (SDA) durante 7 días e incubadas a 25°C por un periodo de diez días. Como testigo positivo se empleó una cepa con producción enzimática conocida. Se usó un diseño Completamente al Azar con tres repeticiones. Para la detección de la actividad oxidante extracelular tipo lacasa se empleó ABTS que produce un cambio de coloración de incoloro a verde esmeralda y para detectar la actividad de LiP se usó como colorante del medio Azure B (Metileno Azur B trimethyltionina clorido) que al ser oxidado por LiP, produce una decoloración de azul violeta a incoloro.

3. RESULTADOS

Se observaron diferencias altamente significativas para la variable tamaño, color y diámetro de la cepa, lo cual indica que dichas cepas son diferentes y que se podría tratar de géneros distintos. Respecto al color de las cepas 1RA, 3RA, 6A, 3B y 1RA7714 inicialmente se observaron de un color blanco de textura algodonosa y luego cambiaron a verde azuladas, el reverso de la colonia presentó un color pálido amarillento, hifas septadas hialinas, con conidióforos simples características típicas de *Penicillium sp.* En la cepa 3B 7714 se observó una coloración oscura, microscópicamente se observaron conidióforos simples, tabicados, de forma alargada. En el extremo del conidióforo unos conidios de color pardo, con septos transversales y verticales de disposición irregular. Un color pálido grisáceo se observó en la cepa 7A.

Morfológicamente se logró corroborar la identificación de los géneros *Penicillium chrysogenum*, *Phaosphaeria sp*, *Alternaria sp* (Cuadro 1), mismos que en un trabajo previo se tenían ya identificados.

Cuadro 1. Identificación morfológica de cepas fúngicas aisladas de muestras ambientales de Cuatro Ciénegas Coahuila.

Identificación cepa	*Diámetro (mm)	Color	Identificación
1RA	50	Gris-verdoso	<i>Penicillium chrysogenum</i>
3RA	53	Gris-verdoso	<i>Penicillium chrysogenum</i>
6A	56	Gris-verdoso	<i>Penicillium sp.</i>
7A	65	Pálido-grisáceo	<i>Phaosphaeria sp.</i>
3B	55	Gris-verdoso	<i>Penicillium sp.</i>
1RA 7714	53	Gris-verdoso	<i>Penicillium sp.</i>
3B 7714	47	Gris-oscuro	<i>Alternaria sp.</i>

*Diez días después de la siembra

Todos los aislamientos dieron positivo al menos a algún tipo de actividad enzimática, en todas las cepas se detectó la presencia de manganeso peroxidasa (MnP), mientras que para lacasa y lignina peroxidasa (LiP) únicamente se encontraron 1 y 2 cepas respectivamente.

4. CONCLUSIONES

Los resultados positivos de la enzima Manganeso Peroxidasa (MnP), Lignina Peroxidasa (LiP) y lacasa en algunas de las cepas utilizadas evidencia su potencial lignícola, mismas que pueden ser utilizadas en trabajos posteriores para degradación de lignina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arora, D. S., Chander, M., Gill P. K. 2002. Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. *International Biodeterioration & Biodegradation* 50 (2):115–120.
2. Bedía, J., Rosas, J., Márquez, M., Guerrero, M., Ruiz, R., Cotoruelo, L., Rodríguez, J., & Cordero, T. (2009). Materiales de carbono a partir de lignina. *Boletín del Grupo Español del Carbón (GEC)* (12): 2-8.
3. Castillo, A. G. M. 2010. Aislamiento de hongos lignocelulolíticos a partir de residuos agroindustriales de plátano. Tesis de Maestría. Centro de investigaciones científicas de Yucatán. 108 pp

4. Dávila, G. y R. Vázquez-Duhalt. 2006. Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. Mensaje Bioquímico 30: 29-55.
5. Egorova, L.1983. Hongos del suelo. Instituto de biología del suelo de la Academia de Ciencias. URSS. Editorial "Ciencia", División de Leningrado. 207pp. (En Ruso)
6. Elisashvili, V. y E. Kachlishvili. 2009. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot basidiomycetes. Journal of Biotechnology 144:37-42.
7. Fukasawa, Y., Osono T. and Takeda H. 2011. Wood decomposing abilities of diverse lignicolous fungi on nondecayed and decayed beech wood. Mycologia, 103(3):474-482.
8. Hernández-Luna, C. E., G. Gutiérrez-Soto y S. M. Salcedo-Martínez. 2008. Screening for decolorizing basidiomycetes in Mexico. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24: 465-473.
9. Laura J. y Castellanos P. 2009. Hongos filamentosos con actividades ligninolíticas aislados de *Calamagrostis nitidula* Pilg. Rev. Peru. Biol.16 (1):125-128.
10. Kumar P. N. Arya A. 2013. Enzymatic combustion by ligninolytic enzymes of Lignicolous fungi. Kathmandu university journal of science, engineering and technology. 9 (I): 60-67.
11. Morozova, O. V., G. P. Shumakovich, M. A. Gorbacheva, S. V. Shleev y A. I. Yaropolov. 2007. "Blue" laccases. Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences 72(10): 1136-1150.
12. Rubilar, A. O. 2007. Biorremediación de suelos contaminados con pentaclorofenol (PCF) por hongos de pudrición blanca. Tesis doctoral, Universidad de la Frontera, Temuco Chile. 148 pp.
13. Saparrat, N. M. C., M. J. Martínez, M.N. Cabello y A.M. Arambarri. 2002. Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. Revista Iberoamericana de Micología 19: 181-185.

PROCESO DE VERMICOMPOSTEO DE LODOS RESIDUALES DE UNA INDUSTRIA PAPELERA Y RESIDUOS SÓLIDOS ORGÁNICOS

Rodríguez-Meléndez I. J.¹, Franco-Hernández M.O.¹, Robles-Martínez F.¹

¹Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional.

RESUMEN

Actualmente la inadecuada gestión de los residuos de manejo especial en México supone un derroche de energía y recursos; produce contaminación de las aguas subterráneas, emisión de gases de efecto invernadero, malos olores, etc. El composteo con lombrices tienen efectos benéficos, físicos, químicos y biológicos sobre los suelos, además de incrementar el crecimiento de la planta y el rendimiento al aplicarlo en cultivos¹. El propósito del presente trabajo fue establecer un proceso para la producción de un fertilizante orgánico mediante lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) realizando cinco pilas de 150 kg con mezclas de cuatro sustratos: lodos residuales del reciclado de papel, residuos sólidos orgánicos (naranja, papaya, plátano, piña, lechuga y jitomate), estiércol de vaca y mulch a diferentes proporciones. Se precompostearon las mezclas por 24 días, monitoreando el proceso a fin de tener la temperatura, pH y Humedad adecuados para garantizar la sobrevivencia y reproducción de la lombriz. Posteriormente se incorporaron 200 anélidos adultos de entre 5 y 7 cm con clitelo en cada pila. Después de 74 días se evaluó la producción y calidad fisicoquímica del fertilizante de acuerdo a algunos parámetros de la NOM-004-SEMARNAT-2002. Se concluyó que es factible el uso de los 4 sustratos para la obtención del humus.

1. INTRODUCCIÓN

Las problemáticas relacionadas a la generación de residuos de manejo especial en México son diversas. Los residuos sólidos orgánicos generados en las centrales de abasto del país, no son la excepción, en la actualidad, en las centrales de abasto del país se producen diariamente miles de toneladas de desechos orgánicos y alrededor de 80 por ciento de estos desperdicios son productos hortícolas (Robles, 2003). En la mayoría de los casos, estos desechos no reciben tratamiento alguno y su destino final es un sitio de disposición final, donde su degradación anaerobia ocasiona problemas de contaminación.

Aunque la aplicación de RSO, lodos de aguas negras, residuos agrícolas e industriales, a la tierra puede beneficiar la calidad del suelo debido a la incorporación de elementos nutritivos y materia orgánica (MO), éstos pueden contener productos tóxicos, incluyendo metales pesados, compuestos orgánicos y organismos patógenos, los cuales son nocivos para la calidad del suelo y pueden persistir durante largos períodos de tiempo.

El agua en la fábrica de papel contiene pasta y aditivos entre ellos la arcilla, talco, y yeso. Los cuatro principales tipos de pasta son mecánica, a la sosa, Kraft (al sulfato) y al sulfito. Las principales fuentes de vertimientos en las fábricas de pasta son los líquidos de los digestores, y en las fábricas de papel los de las batidoras y las máquinas de papel. El tratamiento físico-químico de estos residuos puede constituir una única etapa dentro del tratamiento del agua residual y es sometido a las distintas fases de depuración físico-químicas como la coagulación y la floculación.

En el caso del estiércol vacuno, México no cuenta con la reglamentación o control adecuado en el almacenamiento, transporte o aplicación en terrenos de cultivo. Además se da una emisión de gases de efecto invernadero y contaminación de cuerpos de agua superficiales y subterráneos.

Hoy en día existen diversas evidencias de que las lombrices de tierra provocan diferentes efectos benéficos, físicos, químicos y biológicos, sobre los suelos y diversos investigadores han demostrado que estos efectos pueden incrementar el crecimiento de la planta y el rendimiento de los cultivos tanto en ecosistemas naturales como en los ecosistemas manejados (Atiyeh *et al.*, 2002). Ésta avanza excavando en el terreno a medida que come, depositando sus deyecciones y convirtiendo este terreno en uno mucho más fértil, ya que los excrementos de la lombriz contienen 5 veces más nitrógeno, 7 veces más fósforo, 5 veces más potasio y 2 veces más calcio, que una composta estándar.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Se realizaron cinco tratamientos (pilas de 150 kg) con mezclas porcentuales de cuatro sustratos: lodos residuales del reciclado de papel, estiércol de vaca, residuos sólidos orgánicos (naranja, papaya, plátano, piña, lechuga y jitomate) y mulch a diferentes proporciones. Ver Tabla 1.

Tabla 1. Composición de mezclas propuestas para los experimentos

	LODOS RESIDUALES (%)	ESTIÉRCOL DE VACA (%)	RESIDUOS ORGÁNICOS (%)	MATERIAL ESTRUCTURANTE (MULCH) (%)
PILA 1	70	5	10	15
PILA 2	50	10	25	15
PILA 3	30	15	40	15
PILA 4	10	20	55	15
PILA 5	0	25	60	15

Ya definidas las proporciones de cada tratamiento se procedió a la recolección de cada sustrato para la conformación de las 5 pilas (Ver figura 1).



Figura 1. Conformación de pilas de precomposteo

Se compostaron las mezclas durante 24 días, monitoreando el proceso a fin de mantener la temperatura, pH y humedad. En esta primera etapa de acondicionamiento se redujo la actividad proteolítica de los Residuos Sólidos Orgánicos (RSO) para garantizar la sobrevivencia y reproducción de la lombriz (Ver figura 2).



Figura 2. Monitoreo de pilas de precomposteo

Al finalizar la etapa de precomposteo se inocularon 200 lombrices adultas con clitelo de entre 5 y 7 cm de longitud, registrándose el peso de la biomasa inicial agregada (Ver figura 3).

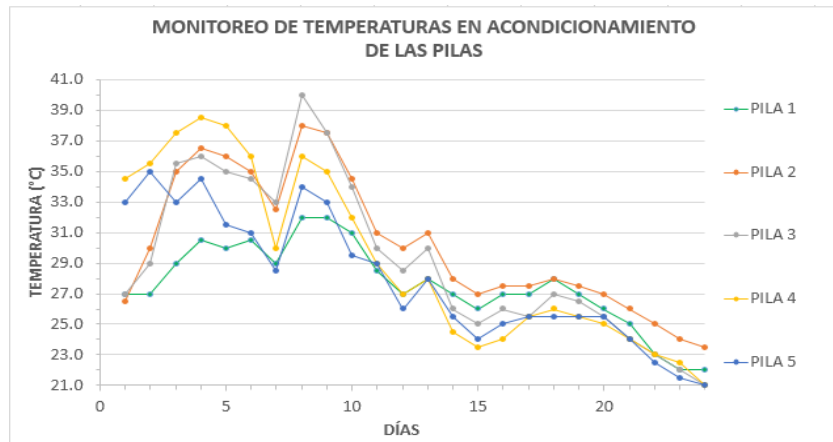


Figura 3. Elección y pesaje de lombrices a incorporar en pilas

Después de 98 días de proceso en total, se evaluó el aporte de carbono (C), nitrógeno total (N_T), relación C/N y producción de fertilizante en cada pila.

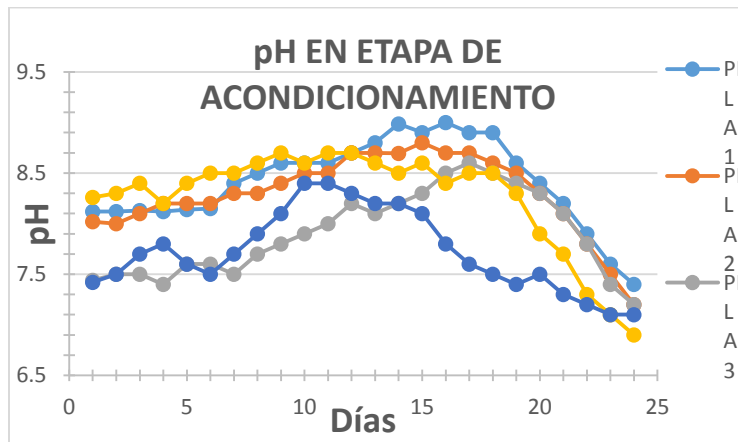
3. RESULTADOS

Se monitoreó el proceso de precomposteo en las cinco pilas, así se acondicionó la temperatura para la posterior inoculación de las lombrices. Se obtuvo la siguiente gráfica 1.



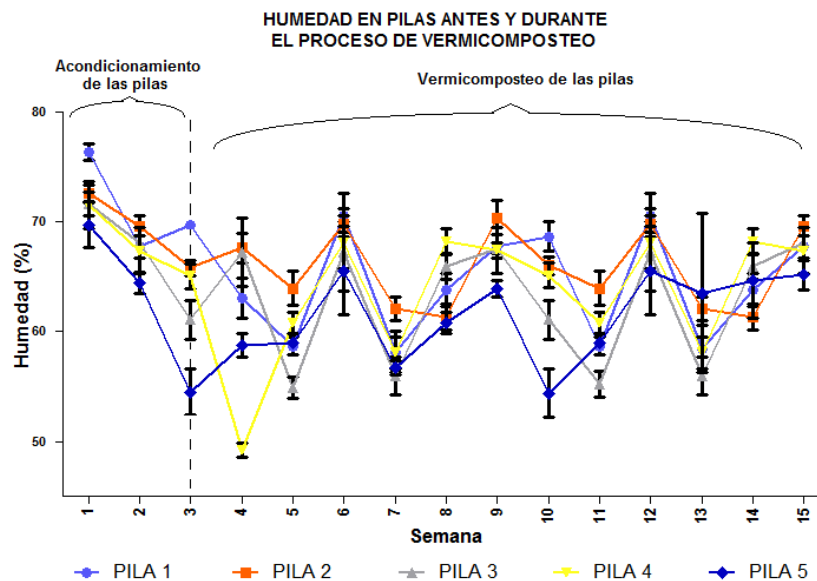
Gráfica 1. Monitoreo de temperaturas en el precomposteo

Además se monitoreó el pH de las pilas cada semana para verificar que tuviera las condiciones adecuadas para las lombrices antes de iniciar el proceso de vermicomposteo (Gráfica 2).



Gráfica 2. Monitoreo de pH en el precomposteo

En la Gráfica 3 se presenta la Humedad (%) de cada pila durante las 15 semanas del proceso. Cabe mencionar que las primeras 3 semanas corresponden al acondicionamiento de éstas y las consecutivas son la humedad de las semanas del proceso de vermicomposteo después de la inclusión de las lombrices en cada tratamiento.



Gráfica 3. Humedad (%) controlada en pilas de acondicionamiento y vermicomposteo

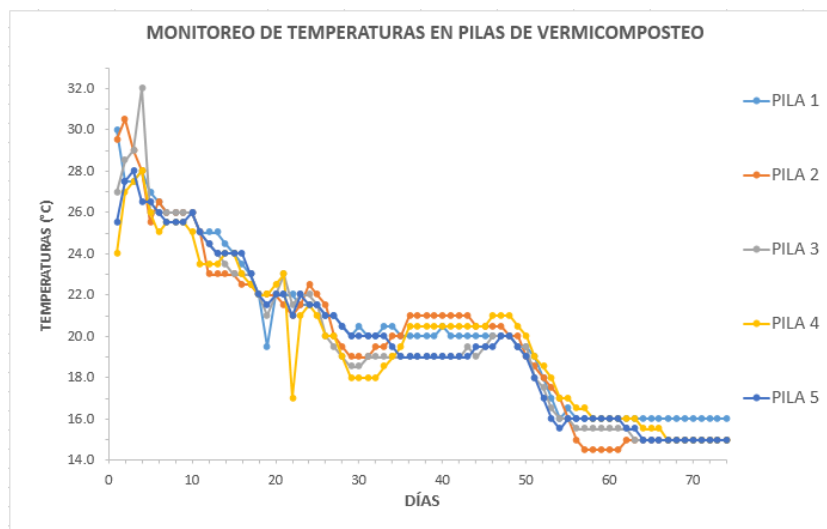
Se observa en las tres gráficas anteriores como transcurrió el proceso de acondicionamiento de las pilas, mismo que tiene por objetivo el estabilizar la temperatura, pH y Humedad para garantizar las condiciones adecuadas de sobrevivencia de las lombrices.

En el caso de la temperatura se observó que en el día 7 y 12 del acondicionamiento hubo una baja de temperatura; esto se debe a los volteos que se realizaron en estos días para la aireación de las pilas y así proveer de oxígeno a los microorganismos mesófilos, provocando la degradación y disminución de las enzimas proteolíticas que podían afectar a las lombrices. En el día 24 se obtuvo una temperatura de entre 21 y 24°C, que es adecuada para que la lombriz lleve a cabo sus funciones básicas en el proceso.

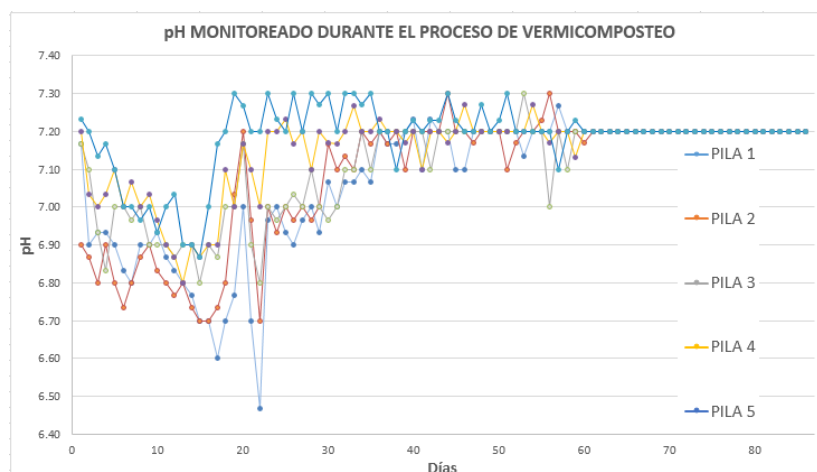
El pH tuvo una disminución dentro de los primeros 4 días, ya que cuando se presenta un proceso de composteo los microorganismos generan ácidos orgánicos que disminuyen el pH, mismo que de forma general se elevó gradualmente hasta el día 15. De ahí en adelante fue decayendo hasta el día 24, llegando a un rango de entre 6.9 y 7.4 en las pilas 4 y 1 respectivamente, teniendo valores adecuados reportados entre 5 y 8 de pH en todos los tratamientos.

La humedad se mantuvo de forma adecuada entre 50% y 70% durante el proceso de acondicionamiento en las primeras tres semanas y hasta el final del proceso de vermicompostaje en la semana 15.

Terminado el proceso de acondicionamiento y al haberse agregado las lombrices, Se llevó a cabo el proceso de vermicomposteo, que duró 74 días. También se monitoreó la temperatura, pH (Gráfica 4 y 5 respectivamente) y Humedad (Gráfica 3).



Gráfica 4. Monitoreo de temperatura durante el vermicomposteo



Gráfica 5. Monitoreo del pH durante el vermicomposteo

En las últimas gráficas se puede constatar el comportamiento normal de la temperatura y el pH en el proceso de compostaje, que aunque realmente es un proceso de vermicompostaje, tiene características semejantes. Mientras la temperatura disminuye y se estabiliza, el pH aumenta de igual forma para estabilizarse, encontrando esto a una temperatura de entre 15 °C y 16 °C en las cinco pilas y un pH de 7.2 en todos los casos.

Al término del proceso se analizaron el Carbono Orgánico Total (%) por el método titulométrico, el contenido de Nitrógeno total (%) mediante el método micro kjeldhal, y la relación de estas dos variables al final del proceso de vermicompostaje (Figura 4), obteniendo los siguientes datos presentados en la tabla 2.



Figura 4. Determinación de Nitrógeno total y Carbono Orgánico Total

Tabla 2. Resultados de Carbono, Nitrógeno, Relación Carbono-Nitrógeno, Biomasa y Producción de fertilizante en las cinco pilas de vermicomposta.

PILA	C (%)	N (%)	RELACIÓN C/N	BIOMASA (g)	PRODUCCIÓN DE FERTILIZANTE (kg)
1	27.67±1.53	3.31±0.03	8.35±0.39	278.61	21.899
2	30.09±3.67	3.87±0.10	7.76±0.73	379.00	28.478
3	21.27±1.09	5.12±0.12	4.15±0.22	283.95	12.858
4	29.5±2.84	6.56±0.37	4.49±0.36	186.35	20.458
5	19.89±1.75	10.69±0.53	1.86±0.18	121.43	15.000

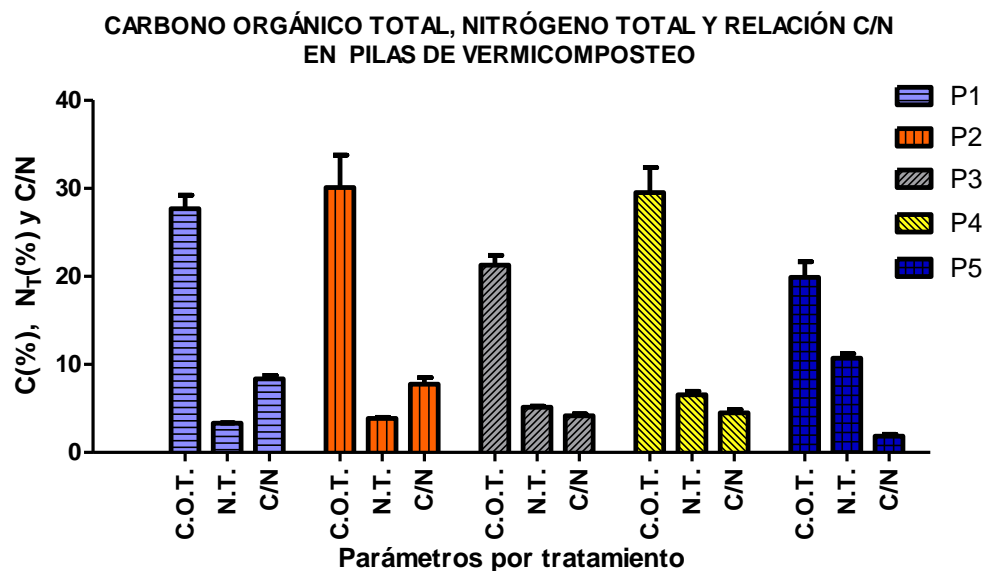
La tabla anterior resume las características presentadas por la vermicomposta en cada pila. Se observó que la cantidad de carbono presentada en la pila 2 fue mayor, y aunque la concentración de nitrógeno no era alta en la misma pila, debido a que ésta no contenía de las mayores proporciones de estiércol, la mineralización de los nutrientes se presentó de forma adecuada al convertir el nitrógeno en nitrógeno amoniacal, dando como resultado que la pila mencionada fue en la que más cantidad de fertilizante (28.478 kg) y biomasa (379.00 g) se produjo.

En general se observa una alta cantidad de carbono total en todas las pilas de vermicomposteo, no de esta manera en el caso del nitrógeno total (Ver Gráfica 6), lo que demuestra que se tiene alta cantidad de materia orgánica en los residuos de manejo especial. Esto confirma la factibilidad de realizar el proceso de degradación con *Eisenia foetida* para la obtención de un fertilizante de calidad. En el caso de la relación C/N, se observa una disminución gradual de la pila 1 a la pila 5, no habiendo diferencia significativa entre la pila 1 y 2, que son los tratamientos en donde se generó la mayor cantidad de biomasa y fertilizante, resultando idóneo el uso de estos sustratos a las proporciones mencionadas en la tabla 1 para el vermicomposteo.

Esto demuestra que debe haber un equilibrio entre el Carbono y el Nitrógeno en el proceso de vermicompostaje. Mismo que debería ser monitoreado para garantizar que las lombrices llevan a cabo el proceso de degradación de la materia orgánica en forma adecuada, y por consiguiente una mayor tasa de crecimiento, que es proporcional a la producción de fertilizante.

También se demostró que el lodo residual del reciclado de papel tiene las características fisicoquímicas adecuadas para llevar a cabo la reproducción y alimentación necesaria de la

lombriz, además de que retiene los lixiviados generados no permitiendo pérdidas de nutrientes, además de que no permite la eliminación de la humedad manteniendo condiciones óptimas para el anélido, redundando en mayor proliferación y rendimiento del proceso de vermicomposteo.



Gráfica 6. Carbono, Nitrógeno y Relación Carbono-Nitrógeno en pilas

Esto demuestra que debe haber un equilibrio entre el Carbono y el Nitrógeno en el proceso de vermicompostaje. Mismo que debería ser monitoreado para garantizar que las lombrices llevan a cabo el proceso de degradación de la materia orgánica en forma adecuada, y por consiguiente una mayor tasa de crecimiento, que es proporcional a la producción de fertilizante.

También se demostró que el lodo residual del reciclado de papel tiene las características fisicoquímicas adecuadas para llevar a cabo la reproducción y alimentación necesaria de la lombriz, además de que retiene los lixiviados generados no permitiendo pérdidas de nutrientes, además de que no permite la eliminación de la humedad manteniendo condiciones óptimas para el anélido, redundando en mayor proliferación y rendimiento del proceso de vermicomposteo.

4. CONCLUSIONES

Se estableció un proceso de vermicomposteo de residuos de manejo especial, determinando las mejores proporciones de éstos para la producción del fertilizante orgánico, mismas que fueron los tratamientos 1 y 2, ya que tuvieron la mayor relación C/N, y mejores rendimientos de producción de fertilizante y biomasa.

El lodo residual del proceso de reciclado de papel puede ser utilizado para la obtención de un fertilizante de calidad que puede ser aplicado como mejorador de suelo y usado en los cultivos vegetales para mejorar las características nutrimentales de los mismos.

Es necesario tener un material estructurante adecuado como el mulch (madera triturada) para garantizar la aireación de las pilas y presencia de oxígeno en el proceso de vermicomposteo y así llevar a cabo la degradación de los residuos de manera óptima.

Se espera en un futuro aplicar el mejorador de suelos obtenido para verificar el aporte nutrimental a un cultivo vegetal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Atiyeh, R. M., Lee, S., Edwards, C. A., Arancon, N. Q. and Metzger, J. D. (2002). The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. *Biores. Technol.* 84: 7-14.
2. Robles-Martínez, F., Durán-Páramo E., Sánchez-Núñez J.M., (2003) *Como aprovechar desechos sólidos en centrales de abasto*. *Revista Industrial del campo 2000 AGRO.* 21, 86-88.

ANÁLISIS MULTIVARIABLE POR NMR-H DE MIELES DE AGAVE

Velázquez Ríos I.O.¹, González García G.², Mellado Mojica E.³, López Pérez M.G.⁴, Pérez Luna Y.¹
Veloz-García R.A.⁵, Díaz Pérez C.⁵, y García Vieyra M.I.⁵

¹Departamento de Ingeniería Agroindustrial-Universidad Politécnica de Chiapas, ²Departamento de Química- Campus Guanajuato-Universidad de Guanajuato, ³Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de plantas- CICY-Mérida Yucatán, ⁴Departamento de Biotecnología y Bioquímica-CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato, ⁵Departamento de Ingeniería Agroindustrial-Universidad de Guanajuato.

RESUMEN

El jarabe de agave es la sustancia de sabor dulce natural producida cuando las piñas de agave se cuecen. El jarabe de agave ha incrementado su popularidad gracias a su capacidad prebiótica y su bajo índice glucémico. Por lo que, es importante establecer un método que permita clasificar el jarabe de agave de otros edulcorantes naturales pudiendo asegurar su autenticidad. En el presente estudio se obtuvieron los perfiles de jarabes de agave por medio de RMN-H y se realizó un análisis multivariable con el fin de clasificar y discriminar a los jarabes de agave de otros edulcorantes naturales y establecer su autenticidad. Un total de 48 edulcorantes naturales fueron obtenidos aleatoriamente de diferentes ciudades del centro de México, de las cuales 28 fueron de jarabe de *Agave tequilana* (ATS1-ATS28), 3 muestras de *Agave Salmiana*, (ASS1- ASS3), 2 muestras de jarabe de maíz (CS1 CS2), 12 muestras de miel (HB1-HB13), y 3 muestras de jarabe de caña de azúcar (SC1-SC3) como comparativo. Los espectros de RMN-H de la región de carbohidratos (3.2 ppm- 5.4 ppm), muestran características diferenciales entre las distintas muestras de jarabes y miel analizadas; incluso entre los jarabes de agave de las dos fuentes analizadas. El análisis multivariable logró una clasificación de las cinco diferentes fuentes de edulcorantes. El análisis de los componentes CP1 y CP3 mostró la mejor separación. La resonancia magnética nuclear en conjunto con el análisis multivariable resultaron ser herramientas útiles para la clasificación de mieles de agave y con potencial de uso en autenticidad de este producto.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Agave* incluye a plantas suculentas que conforman una gran familia denominada Agavaceae donde se encuentran varias especies de agave. El agave es una planta monocotiledónea. Algunas especies son económicamente muy importantes. México es considerado centro de origen y biodiversidad ya que el 75% de las especies de agave se localizan en nuestro país. Algunas de ellas eran consumidas desde tiempos ancestrales por los antiguos habitantes de México siendo apetecibles por su alto contenido de azúcar (Bautista et al., 2011).

El uso, consumo y explotación del agave en México comenzó cuando los primeros grupos de humanos se establecieron en Mesoamérica. Desde entonces diferentes especies de agave han sido empleadas para diferentes usos como son bebidas, medicinales, combustibles, ornamento, fertilizantes y como fuente de fibras. El uso del agave se remonta desde la época prehispánica, cuando los pueblos indígenas del centro y norte del país encontraron en esta planta una fuente de materia prima para elaborar una gran cantidad de productos como es el jarabe de agave (García et al., 2010). Uno de los principales usos del agave es la obtención de jarabe de agave, mismo que contiene mayor contenido de fructosa que glucosa, destacando que la glucosa es prohibida en

grandes cantidades para el diabético, pero en el caso de la fructosa es el azúcar que más se recomienda para este tipo de pacientes (López, 2013). El agave y derivados como el jarabe han sido objeto de muchas investigaciones en años recientes, debido al carácter funcional de sus compuestos principalmente los fructanos.

Los jarabes de agave actualmente presentan alta demanda como sustitutos del azúcar debido a su bajo índice glucémico, capacidad antioxidante y propiedades antibacterianas lo que se ve reflejado en el gran número de marcas de miel en el mercado. Por ello el objetivo de este trabajo fue establecer un método quimiométrico mediante un análisis multivariable por RMN-H permitiendo identificar, clasificar y discriminar al jarabe de agave de otros edulcorantes naturales logrando establecer su autenticidad.

2. TEORÍA

El jarabe de agave es la sustancia de sabor dulce natural como resultado de la hidrólisis de fructanos, producida cuando las piñas de agave son sometidas a un proceso de cocción, procedimiento, químico térmico, enzimático o la combinación de ambos, con el propósito de desdoblar los carbohidratos principalmente la inulina presentes en el agave, mismos que están almacenadas en la planta de maguey siendo estos su componente principal (Mellado & López, 2013; NMX-FF-110-SCFI-2008). La norma NMX-FF-110-SCFI-2008 define al jarabe 100% de agave como la sustancia dulce natural producida por hidrólisis a partir de los oligosacáridos del agave.

Los constituyentes principales en especies de agave son los fructanos, representando más del 60% de carbohidratos solubles en especies de agave, estos son polímeros constituidos principalmente por moléculas de fructosa en un contenido que va del 80 al 86% (la cual es liberada mediante una hidrolisis) y de 10 a 15% de glucosa (Escaramilla, 2011).

El uso de aditivos alimentarios para la adulteración o mezclar jarabe de agave con almidón, melaza, glucosa, dextrina, fructosa, u otros azúcares procedentes de fuentes distintas plantas de agave no está permitido en la producción de jarabe de agave comercial (Mellado & López 2015).

Debido a sus componentes naturales los jarabes de agave son ricos en fructosa y pueden ser una fuente esencial de fitoquímicos y productos con actividad funcional, en los últimos años se han popularizado por su capacidad prebiótica y bajo índice glucémico, respecto a otros jarabes y mieles naturales, representando una demanda alta como aditivos en la industria de alimentos debido a las atribuciones funcionales que han tenido en años recientes (Peshev & Van den Ende, 2014; Mellado & López 2013).

Los azúcares reductores glucosa y fructosa son los principales constituyentes de la mieles y jarabes, disacáridos, trisacáridos y otros oligosacáridos están presentes en menores cantidades. En el mercado se han encontrado mieles de abeja adulteradas adicionadas con jarabes de sacarosa o de los azúcares de los cuales se alimentan las abejas. En este contexto la determinación del contenido de glucosa, fructosa y sacarosa se ha convertido en un método para la determinación de la calidad de la miel (Rizelio et al., 2012).

La determinación de carbohidratos en miel se lleva a cabo principalmente para determinar la presencia de los mismos en una muestra, o bien para identificar adulteraciones en el alimento (Mellado & López, 2014; Downey et al., 1997).

Dentro de los principales métodos para la determinación de carbohidratos se encuentran la Cromatografía Líquida de Alta resolución (HPLC), Cromatografía de Gases con Ionización de Flama, Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas, Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier, Métodos enzimáticos y la Resonancia Magnética Nuclear.

Para el análisis de mezclas complejas, técnicas de alta resolución como la resonancia magnética de hidrógeno (NMR-H) se ha establecido como una herramienta poderosa la cual permite obtener información cualitativa y cuantitativa de muestras complejas en composición química, esto en un solo experimento, permitiendo una rápida cuantificación en un solo análisis de la mayoría de los azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos y compuestos fenólicos. Los resultados de resonancia magnética nuclear representados en un espectro de NMR son obtenidos rápidamente y usualmente las muestras requieren una mínima preparación. Esta tecnología ha sido ampliamente aplicada en la determinación de perfiles metabólicos de plantas o diversos extractos de una determinada muestra definido como la identificación y cuantificación de un número predefinido de metabolitos en una muestra. Permite, además, simultáneamente la detección del contenido de protones en una muestra compleja (Belton, P. et al., 1997).

La espectroscopia de NMR-H asociada a métodos multivariable como el análisis de componentes principales se ha definido como un método quimiométrico, el cual aplica herramientas matemáticas, principalmente estadística a procesos químicos, extrayendo de datos experimentales la mayor cantidad de información posible, extendiendo el conocimiento acerca del sistema químico de estudio (Mongay, 2005).

En la ciencia de los alimentos esta técnica se ha empleado principalmente para la determinación de perfiles metabólicos en frutas, jugos de frutas, papa, aceite de oliva, té, cerveza y vino (Pereira, G.E., 2006 & Ward, J. L., et al., 2003). El análisis de componentes principales es un método multivariable mayormente usado para reducir la dimensionalidad de los datos de estudios que poseen un número elevado de variables, las cuales son transformadas en un número inferior de variables denominados componentes principales, mismos que contienen la información principal del sistema, eliminando la información redundante o reduciendo la contribución del ruido (Ali, K. et al., 2011).

3. PARTE EXPERIMENTAL

Muestras de edulcorantes

Un total de 48 edulcorantes naturales fueron obtenidos aleatoriamente de diferentes supermercados y tiendas convencionales de las ciudades de Arandas, Jalisco; Celaya, Guanajuato; Distrito Federal; Guadalajara, Jalisco; Irapuato, Guanajuato; Morelia, Michoacán; Oaxaca, Oaxaca; Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; Veracruz, Veracruz; y Zacatecas, Zacatecas. 31 muestras de jarabe de agave fueron colectadas de las cuales 28 son de jarabe de Agave tequilana Weber variedad azul (ATS1-ATS30), 3 muestras de Agave Salmiana, etiquetadas como (ASS1-ASS3), se obtuvieron también 2 muestras de jarabe de maíz (CS1 CS2), 12 muestras de miel (HB1-HB13), y 3 muestras de jarabe de caña de azúcar (SC1-SC3) como comparativo.

Resonancia Magnética Nuclear (NMR-H)

Los espectros de ^1H se obtuvieron a $25\text{ }^\circ\text{C}$ con una frecuencia de 599.77 MHz en un espectrómetro Varian/Agilent 600 MHz AR Premium COMPACTTM. Se usó D_2O como disolvente y como referencia interna se usó la señal residual de HOD a 4.9 ppm. El pulso de $\pi/2$ empleado fue de 8.7 μs , tiempo de relajación de 15 s con 16 repeticiones.

Análisis de Componentes Principales

Se realizó el análisis de componentes principales de los espectros obtenidos por RMN-H, analizando la región de carbohidratos en el software MestreNova 10.0.2, midiendo el área de las señales emitidas en los picos de la región de carbohidratos, basándose también en literatura reportada acerca de identificación de carbohidratos por RMN-H. Se analizaron 30 muestras de Jarabe de Agave (A. tequilana), 3 de jarabe de agave (A. salmiana), 13 de miel, 5 de jarabe de caña de azúcar y 3 de jarabe de maíz. Una vez recolectado los datos se sometió al análisis de

componentes principales en el software estadístico STATGRAPHICS Plus 5.1, analizando por edulcorante y posteriormente todos los datos juntos.

4. RESULTADOS

Resonancia Magnética Nuclear (NMR-H)

La tendencia de los espectros obtenidos por RNM-N muestra la diferencia existente en los cinco diferentes edulcorantes, sin embargo también se observan picos en común. En este trabajo únicamente se obtuvieron espectros por RMN-H de los diferentes edulcorantes (figura 1), no se identificaron posiciones de azúcares. Sin embargo, se han reportado perfiles y tendencia de azúcares en estos edulcorante (Mellado, 2015), así también se han llevado a cabo estudios de diferentes muestras donde se pueden observar perfiles de carbohidratos por la técnica de RMN-H como en jugos de manzana, en plantas y cultivos (Ward et al, 2003; Belton et al., 2003; Pereira et al., 2006).

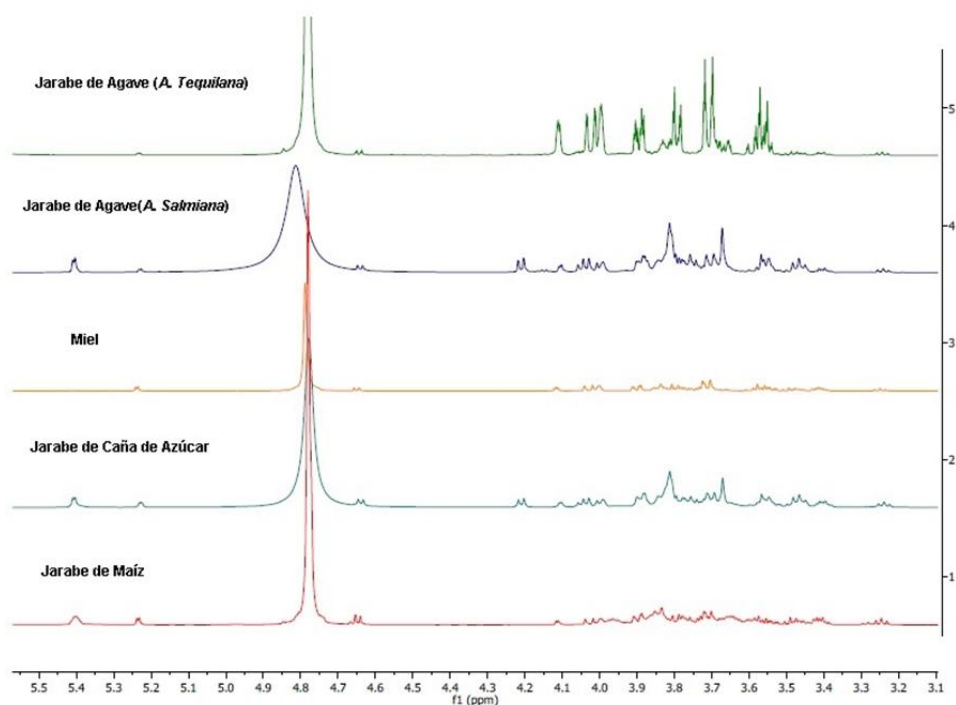


Figura 1. Región de carbohidratos de espectros obtenidos por RMN-H de los cinco diferentes edulcorantes.

Se observa, además entre los jarabes de agave de las dos fuentes analizadas existen picos diferenciales entre una muestra y otra en distintas regiones a lo largo del espectro (Figura 2), revelando que aun entre especies de agave existen diferencias de acuerdo al perfil de carbohidratos obtenidos por NMR-H.

Jarabe de agave (*A. tequilana*) en general, presenta con mayor intensidad la señal emitida por los picos, 4.0 ppm, 3.8 ppm, 3.7 ppm que de acuerdo a lo reportado por Cazor et al. (2006) quien obtuvo porciones de espectros por RMN-H de un stock de zanahoria para identificación y posición

de resonancias, los picos corresponden a fructosa, y los dos restantes a sacarosa. Jarabe de agave (*A. salmiana*) presenta la misma tendencia, sin embargo se destaca por presentar una señal adicional respecto a *A. tequilana* emitida por el pico 5.4 ppm, correspondiente a sacarosa. El jarabe de caña de azúcar presenta mayor intensidad a la señal que emite la resonancia de los picos 3.8 ppm, 3.7 ppm, 5.4 ppm, 3.8 ppm y 3.9 ppm correspondientes todos a sacarosa. Jarabe de maíz presenta mayor intensidad en los picos 3.8 ppm, 4.7 ppm, 3.4 ppm, 3.7 ppm correspondientes a sacarosa, glucosa, glucosa y sacarosa de acuerdo a Cazor, et al. La presencia de a señal de resonancia magnética emitida en los picos en la posición 5.2 ppm y 3.2 ppm es común en los diferentes edulcorantes, que de acuerdo a la literatura citada corresponden a glucosa.

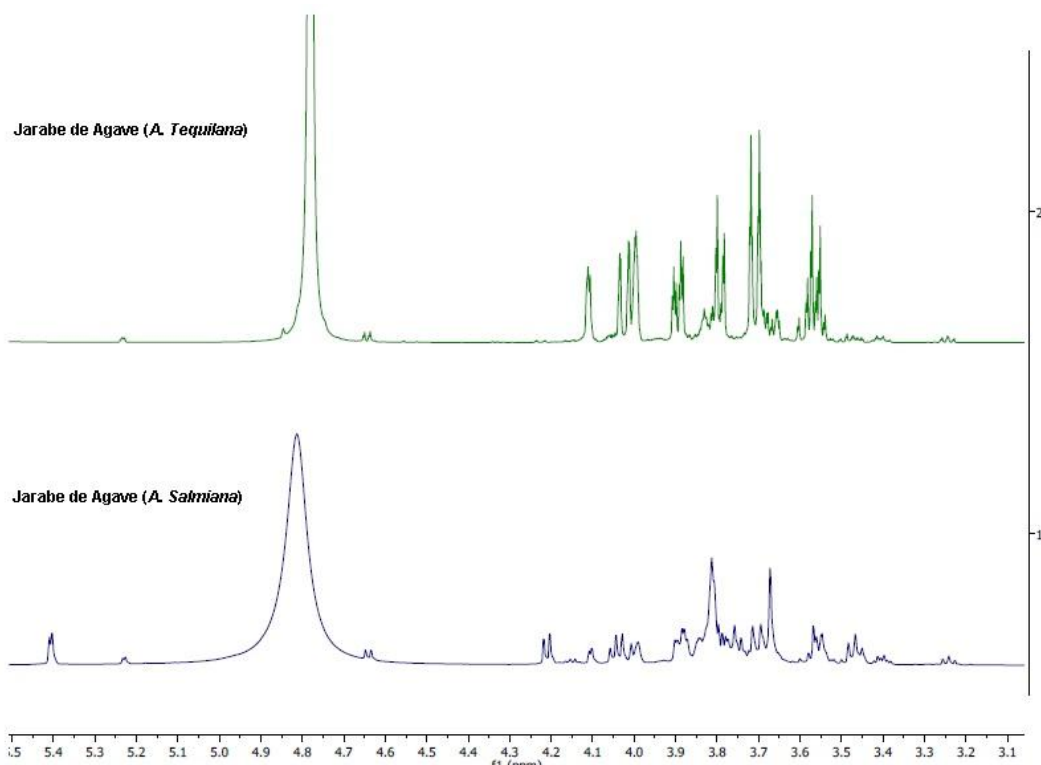


Figura 2. Región de carbohidratos de espectros obtenidos por RMN-H de jarabe de agave.

Por su parte Mellado (2014) realizó identificación de carbohidratos por Cromatografía en Capa Fina (TLC) de los cinco tipos edulcorantes utilizados en el presente trabajo. Encontró que el jarabe de agave (*A. tequilana*) tiene un alto contenido en fructosa, así también unas muestras del mismo edulcorante contienen trazas de fructooligosacáridos (kestosa y nistosa), los cuales menciona que son formados en la hidrólisis de los fructanos como consecuencia del proceso de elaboración. El jarabe de maíz y caña presentaron glucosa y maltooligosacáridos, destacando el jarabe de caña de azúcar la presencia de sacarosa. Por su parte en la miel se identificó la presencia de glucosa, fructosa, maltosa, maltotriosa. También realizó un análisis por cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución acoplada a un detector de pulso, el cual reveló que los carbohidratos glucosa, fructosa y sacarosa son los azúcares que presentan en común y los más abundantes en los cinco diferentes edulcorantes.

El comportamiento en general, es similar en los diferentes edulcorantes, destacando la intensidad de señales en diferentes posiciones del espectro, esto se debe al contenido de carbohidratos propios de cada miel. Cabe mencionar que es posible identificar un edulcorante de otro debido al comportamiento de los espectros de RMN-H sin embargo no es posible identificar a los edulcorantes por su contenido de carbohidratos específicos, por ello es necesario el apoyo de métodos multivariantes como el análisis de componentes principales que permita agruparlos de acuerdo a sus características generales.

Análisis de Componentes Principales

Los espectros de RMN-H de la región de carbohidratos (3.2 ppm- 5.4 ppm) presentados en la figura 1, muestran características diferentes entre las distintas muestras analizadas de miel y jarabes, incluso entre los jarabes de agave de las dos fuentes analizadas, donde claramente puede apreciarse que hay picos diferenciales entre una muestra y otra en distintas regiones a lo largo del espectro. El propósito del análisis es obtener un pequeño número de combinaciones lineales de los 48 picos obtenidos por RMN-H de la región de carbohidratos que explican la mayoría de la variabilidad en los datos. En este caso, se han extraído 5 componentes, ya que los -487816047 componentes tenían autovalores mayores o iguales a 1.0. Juntos explican el 86.23% de la variabilidad en los datos originales. El análisis de componentes principales permitió identificar, agrupar y clasificar a cada uno de los diferentes edulcorantes de la región de carbohidratos obtenidos por RMN-H (Figura 3).

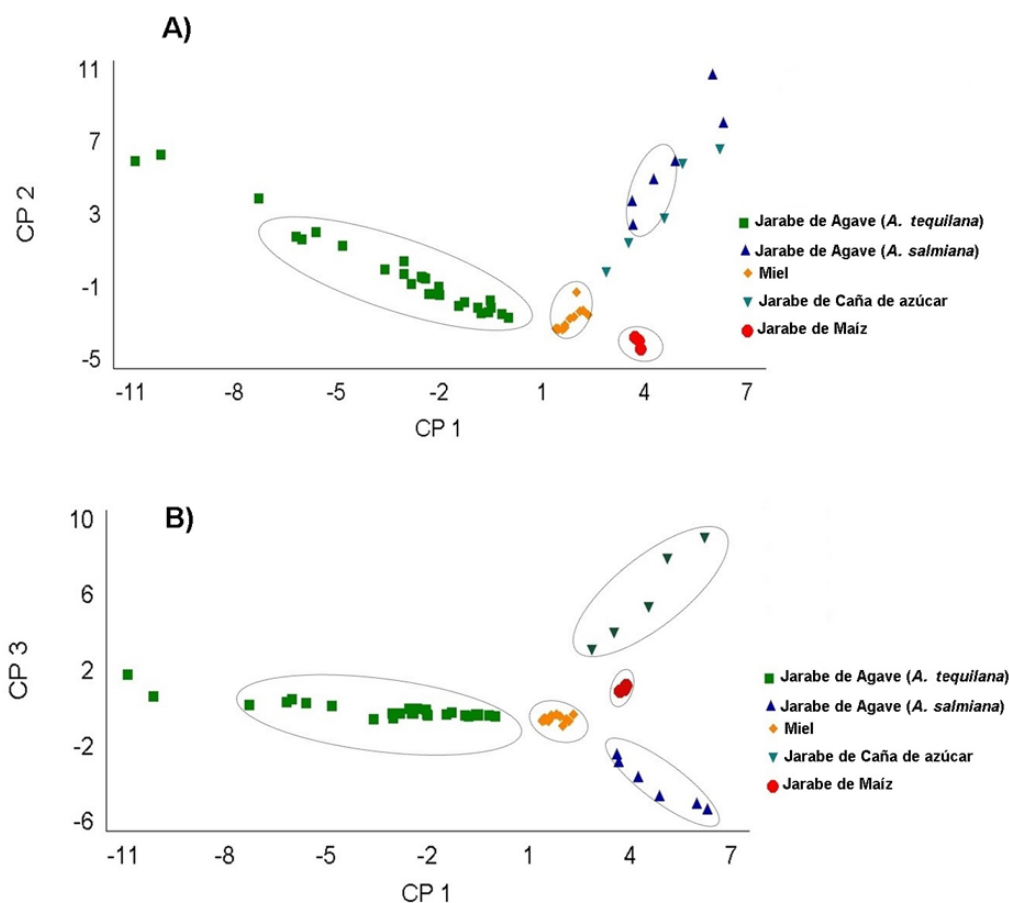


Figura 3. Análisis de Componentes Principales de los espectros obtenidos por RMN-H de la región de carbohidratos (3.2ppm -5.5ppm) de los diferentes edulcorantes. A): Componente principal 1 frente a componente principal 2; B): Componente principal 1 frente a componente principal 3.

El edulcorante objeto de estudio en este trabajo, jarabe de Agave fue agrupado sin ningún problema, identificándose de los demás edulcorantes, el jarabe de agave (*A. salmiana*), también se permitió separar de los demás edulcorantes, incluso de *A. tequilana*, observando que aún en jarabes de agave existe diferencias en cuanto a composición y/o contenido de carbohidratos.

A. tequilana presentó una ligera variación entre las diferentes muestras del mismo al no quedar totalmente agrupado respecto a los demás edulcorantes, mismo comportamiento presentado por jarabe de caña de azúcar, cabe mencionar que al graficar CP 1 frente a CP2 (figura 3A) ambos edulcorantes quedaron muy cerca incluso traslapados, lo que supone que comparten perfil de carbohidratos similares, principalmente similitudes en el contenido de sacaros (Mellado, 2015).

Los espectros obtenidos por RMN-H sometidos al análisis de componentes principales revela que existe una diferencia en la composición de perfiles de carbohidratos de jarabe de agave respecto a los demás edulcorantes, incluso existe diferencia en entre jarabe de agave de acuerdo a la especie.

5. CONCLUSIONES

Se obtuvieron los espectros por RMN-H de jarabe de agave y edulcorantes comparativos permitiendo la clasificación del jarabe de agave de los otros edulcorantes. La NMR-H aunado a métodos multivariables como el análisis de componentes principales, permite identificar y clasificar al jarabe de agave y establecer diferencias respecto a otros edulcorantes. El jarabe de agave es diferente en composición de carbohidratos respecto a los demás edulcorantes empleados en este trabajo, incluso entre especies de agave existe diferencias, diferencia que se debe probablemente a los tiempos en el proceso de cocción de las piñas de agave, además las muestras estudiadas provenían de diversos lugares de país.

BIBLIOGRAFÍA

3. Ali, K., Maltese, F., Fortes, A. M., Pais, M. S., Choi, Y. H. & Verpoorte, R. (2010). Monitoring biochemical changes during grape berry development in Portuguese cultivars by NMR spectroscopy. *Food Chemistry*, 124 (2011), 1760–1769.
4. Bautista, M., García, L., Barboza, J. E., Parra, L. A. (2011). El Agave tequilana Weber y la producción de tequila *Acta Universitaria*, 11(2), 26-34.
5. Belton, P. S., Colquhoun, I. J., Kemsley, E. K., Delgadillo, I., Roma, P., Dennis, M. J., Sharman, M., Holmes, E., Nicholson J. K. & Spraul, M. (1997). Application of chemometrics to the ¹H NMR spectra of apple juices: discrimination between apple varieties. *Food Chemistry*, 61(1/2), 207-213.
6. Downey, G., Briand, R., Wilson, R. H. & Kemsley, E. K. (1997). Near- and Mid-Infrared Spectroscopies in Food Authentication: Coffee Varietal Identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(1997), 4357-4361.
7. Escaramilla, L. L. (2011). Potential of Plants from the Genus Agave as Bioenergy Crops. *BioEnergy Research*, 5 (2012), 1-9.
8. García, E. J., Méndez, S. J. & Talavera, J. (2010). El género Agave spp. en México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *Revista Salud Pública y Nutrición, Edición Especial No. 5*, 109- 129.
9. López, L. (2013). "Elaboración, control de calidad y evaluación de la actividad antidiabética de la miel de agave (*Agave americana* L.)". Tesis de grado previa la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia.
10. Mellado, E. & López, M.G. (2013). Análisis comparativo entre jarabe de agave azul (*Agave tequilana* Weber var. azul) y otros jarabes naturales. *Agrociencia*, 47(3), 233-244.
11. Mellado, E. & López, M. G. (2014). Identification, classification, and discrimination of agave syrups from natural sweeteners by infrared spectroscopy and HPAEC-PAD. *Food Chemistry*, 167 (2015), 349–357.
12. Mongay, C., (2005). *Quimiometría*. PUV: Valencia.
13. NMX-FF-110-SCFI-2008. Alimentos- jarabe de agave 100%- Especificaciones y métodos de prueba. *Foods- Agave syrup 100 % agave - Specifications and test methods*.
14. Pereira G. E., Gaudillere J. P., van Leeuwen, C., Hilbert G., Maucourt M., Deborde, C., Moing, A. & Rolin, D. (2005). ¹H NMR metabolite fingerprints of grape berry: Comparison of vintage and soil effects in Bordeaux grapevine growing areas. *Analytica Chimica Acta*, 563 (2006), 346–352.
15. Peshev, D. & Van den Ende, W. (2014). Fructans: Prebiotics and immunomodulators. *Journal of Functional Foods* 8 (2014) 348–357.

16. Rizelio, V. M., Tenfen, L., Da Silveira, R., Gonzaga, L. V., Oliveira, A. C. & Fett, R. (2012). Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of carbohydrates in honey samples. *Talanta*, 93 (2012), 62–66.
17. Ward, J. L., Harris, C., Lewis, J. & Beale M. H. (2002). Assessment of ¹H NMR spectroscopy and multivariate analysis as a technique for metabolite fingerprinting of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 62 (2003), 949–957.

MODIFICACION HIDRICA DEL TEZONTLE PARA SU APLICACIÓN COMO SUSTRATO EN LA AGRICULTURA PROTEGIDA. I CONDICIONES DE ABSORCIÓN DE POLÍMERO.

Ma, Elena Calixto-Olalde¹; Sonia Hernández Gutiérrez¹, Ávila Ramírez Brenda Berenice¹, María Susana Acosta Navarrete²; Everardo Vargas Espinoza², Acosta Ayala Laura²

¹Instituto Tecnológico Superior de Irapuato. ²Universidad Tecnológica del Suroeste

RESUMEN

El incremento en la agricultura protegida en condiciones de invernadero, ha registrado un crecimiento considerable en los últimos años, lo cual ha originado un gran interés en el estudio de sustratos, factor preponderante en el crecimiento de la planta. En México la roca volcánica conocida como tezontle, es ampliamente utilizada como sustrato por su costo, disponibilidad, propiedades químicas y propiedades físicas, siendo estas últimas una función del tamaño de partícula. Dentro de los estudios realizados se ha encontrado que se requiere que un sustrato presenta una porosidad del 70% y una capacidad hídrica mayor al 30%. Considerando que el tezontle posee una capacidad hídrica del 16% y cumple con las otras características adecuadamente este trabajo tiene como objetivo modificar la propiedad hídrica del tezontle mediante la incorporación de hidrogeles en su estructura porosa. Esta modificación se realizó mediante la absorción de quitosano y entrecruzamiento posterior del polímero absorbido. La absorción se determinó por cambio de peso. El cambio de peso fue evaluado cada cierto tiempo y después de una hora el tezontle ha incrementado su peso en un 30%. Los resultados preliminares indican que es viable la absorción de polímero en el tezontle y con ello la modificación de su capacidad hídrica.

1. INTRODUCCIÓN

La producción de cultivos bajo invernadero es una opción que ha tomado auge en los últimos años (Velasco, 2006), entre ellos el jitomate el cual de su producción total el 70% se realizan mediante agricultura protegida. Como consecuencia, existe una creciente demanda de sustratos, los cuales son un componente fundamental en la producción de horticultura protegida. El uso de sustratos puede dar como resultado el menor control de plagas y enfermedades de la raíz de diversidad de plantas hortícolas, las cuales son comunes cuando se utiliza el suelo como medio de crecimiento. Debido a su gran importancia se han utilizado una gran variedad de sustratos los cuales permitan obtener un buen crecimiento de las plantas.

Algunos de los materiales utilizados como sustratos son; fibra de coco, yeso, aserrín, vermicomposta, tezontle, entre otros. El tezontle es un material de interés para este trabajo, el cual es una roca volcánica ampliamente utilizada como sustrato por su costo, disponibilidad y propiedades físicas (densidad aparente, aireación, retención a la humedad y porosidad total), las cuales están en función del tamaño de partícula. Es considerado como inerte desde el punto de vista químico el cual tiene pH neutro, generalmente están libres de sustancias tóxicas y tiene buena estabilidad física. (Alonso R. 2013). Sin embargo, la capacidad hídrica de éste material está por debajo de la requerida y es una limitante en su eficiencia como sustrato. Por lo cual, este trabajo tiene como objetivo modificar la capacidad hídrica del tezontle negro mediante la absorción de quitosano o polyalcohol vinílico, polímeros hidrofílicos e inocuos, por lo cual en este trabajo se realizó un estudio de absorción de éstos polímeros.

2. TEORÍA

Un sustrato es un sistema formado por tres fases: sólida constituida por partículas, líquida conformada por el agua que contienen las sustancias disueltas y gaseosa que es el aire del sustrato. Los sustratos pueden ser clasificados de acuerdo con su origen en orgánicos e inorgánicos; la mayoría de los materiales orgánicos deben experimentar un compostaje para su adecuación. Los sustratos usados en la horticultura se clasifican de acuerdo con sus propiedades en: Sustratos químicamente inertes como son; arena granítica o silicea, grava, roca volcánica, perlita, arcilla expandible y lana de roca. Sustratos químicamente activos como son; turbas rubias y negras, corteza de pino, vermiculita y materiales lignocelulósicos.

Los criterios para la selección de sustratos que permita obtener un buen crecimiento de plantas son los siguientes: a) que posea propiedades físicas, químicas y biológicas adecuadas para el crecimiento, b) Se debe considerar la relación beneficio/costo, c) disponibilidad en la región o zona y d) factibilidad de manejo o compatibilidad, en el caso de realizar mezclas de materiales [Fernández, *et al* 2006]. Así mismo, en la selección del sustrato se debe también considerar los siguientes factores; f) que presenten supresividad respecto a patógenos, g) que sean reciclables, h) que eviten el lavado de nutrientes, i) que optimicen el consumo de agua, j) evitar que causen daño al ambiente y k) que estén libres de patógenos. Estudios realizados demuestran que las propiedades físicas más importantes son aquellas relacionadas con los poros internos de las partículas y el espacio poroso entre ellas; es decir, la granulometría, la porosidad y el reparto de las fases sólida y gaseosa Vargas *et al.* (200). La gran diversidad de criterios que se han establecido para la selección de un sustrato ha permitido que se hayan propuesto una gran cantidad de materiales. En este contexto se ha encontrado que el tezontle es uno de los materiales minerales del tipo natural ampliamente utilizados como sustrato en diversos cultivos de hortalizas y flores, debido principalmente a su disponibilidad y bajo costo.

El tezontle es una roca roja o negra de origen volcánico (ígneas) que se ubica en las laderas de los cerros, volcanes y depresiones. Es rico en minerales como calcio y zinc. Entre sus propiedades se encuentra la de guardar el calor, pero no es permeable ni aislante, es un material considerado inerte, con valores de pH cercanos a la neutralidad, baja capacidad de intercambio catiónico (CIC), buena aireación, y con capacidad de retención de humedad que es dependiente del diámetro de la partícula; adicionalmente no contiene sustancias tóxicas y tiene estabilidad física (Bastida, 1999). Éste material, presenta una proporción variable de porosidad interna, que incluye al volumen de poros externos cerrados, que no están conectados con los poros externos y son los espacios que no pueden ser ocupados por el agua, y por lo tanto no intervienen en la relación agua-aire del sustrato (Vargas *et al*, 2008). La ventaja de esta porosidad es que facilita su manejo con respecto al traslado, cribado, y llenado de contenedores al disminuir la densidad aparente del tezontle. En el caso de las partículas de tezontle, los poros son de empaquetamiento simple y vesículas, al estar ocluidos no tienen intercambio de fluidos (Lemaire, 1995). Sin embargo, los poros vesícula retienen entre 55 y 70% de humedad gravimétrica, lo que significa que tienen interconexión (Handreck, 1983). Algunos autores manifiestan que el tamaño de las partículas está relacionado con las propiedades físicas y químicas de los sustratos. Según Ansorena (1994), el tamaño óptimo de partículas para sustratos hortícolas se ubica entre 0.25 y 2.5 mm. Las partículas de tamaño uniforme mejoran el suministro de oxígeno a las raíces, comparado con mezclas de partículas de diferentes tamaños (Steiner, 1968; Biran y Eliassaf, 1980; Gislerod *et al.*, 1997). Por lo antes mencionado, se propone que la incorporación mediante absorción de polímeros hidrofílicos; como el quitosano y polialcohol vinílico, incrementará la capacidad hídrica del tezontle.

El quitosano es un polímero natural biodegradable con gran potencial para su uso en aplicaciones amigables con el medio ambiente debido a su biocompatibilidad y baja toxicidad. Así mismo, se ha encontrado que presenta una actividad fungicida relacionada con; 1) concentración utilizada, 2) naturaleza policationica del quitosano; se cree que esta es la clave de su naturaleza antifúngica ya que en la mayoría de los hongos la pared celular se encuentra cargada negativamente, 3) longitud

de la cadena de este polímero; aumentando la superficie catiónica en contacto con el hongo, 4) efecto inhibitorio en la síntesis de enzimas macerantes producida por los hongos (Freepons, 1991; El Ghaouth, et al., 1994, 1997; Benhamou et al., 1994; Bhaskara Reddy et al. 2000a). Esta propiedad en particular aportaría al tezontle la capacidad de supresividad respecto a patógenos.

Con respecto al Polialcohol vinílico (PVA), éste es un polímero sintético, hidrofílico, biocompatible, no tóxico y semicristalino, el cual contiene una gran cantidad de grupos hidroxilo, los cuales pueden formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua, haciéndolo soluble en esta. Sus propiedades físicas y sus aplicaciones dependen de su grado de polimerización y grado de hidrólisis (Părpărită et al., 2014)

3. PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos

Se utilizó quitosano obtenido de exoesqueletos de camarón, en el laboratorio de materiales, del INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE IRAPUATO. El peso molecular fue medio y el grado de hidrólisis del 88%. El tezontle negro fue proporcionado por la Universidad Tecnológica del Suroeste de Guanajuato, en Valle de Santiago, Gto. El tamaño de partícula utilizado fue 2-5 mm. El Polialcohol vinílico fue obtenido de Sigma Aldrich, con grado de hidrólisis del 99% y Mw de 89.000-98000 g/mol. Ácido acético grado reactivo de Sigma Aldrich. El agua utilizada fue el agua de pozo de la UTSOE con un pH de 8.3, conductividad eléctrica de 0.9 dS/m

Absorción de polímero

Los polímeros utilizados fueron quitosano en una concentración de 2%, y una mezcla de quitosanoa con PVA en una relación 1:1. El quitosano fue disuelto en una solución de ácido acético al 2%. La solución del PVA fue preparado disolviendo la cantidad requerida para preparar una solución al 1% y llevando hasta una temperatura de 80°C para su completa disolución. Se utilizó una relación de 5 g de tezontle por cada 10 mL de solución de polímero. La suspensión tezontle/solución polimérica fue agitada a 100 rpm y se determinó el cambio de peso a los 5 min, 10 min, 30 min, una hora y 2 horas. El grado de absorción de polímero se determinó mediante la siguiente fórmula

$$E_{sw} = [(W_{sw} - W_0) / W_0] \times 100$$

Donde:

E_{sw} porcentaje de masa absorbida de polímero

W_{sw} es el peso del tezontle húmedo

W_0 es el peso inicial del tezontle

Capacidad hídrica

La determinación de éste parámetro fue realizada con las muestras bajo las siguientes condiciones: a) secadas a temperatura ambiente, b) húmedas, c) entrecruzado el PVA por criogelación.

4. RESULTADOS

La determinación del grado de absorción de polímero se realizó por diferencia de peso. Fue necesario utilizar filtros para eliminar el exceso de la solución polimérica y con ello eliminar el exceso de polímero. La estructura porosa del tezontle permite obtener una buena difusión del polímero en el tezontle. Los porcentajes obtenidos a una y dos horas son mostrados en la Tabla 1, la cual muestra que la incorporación del PVA favorece una mayor capacidad de absorción del polímero.

Tabla 1: Modificación de la capacidad hídrica del tezontle por la incorporación de soluciones poliméricas.

Muestra	Tiempo (minutos)	Porcentaje de capacidad hídrica
QT	60	27
QT/PVA		34
QT	120	33.7
QT/PVA		44

Solución de 2% de quitosano con 2% de ácido acético en agua de pozo.

Los resultados obtenidos indican que el PVA favorece una mayor difusión del polímero hacia el tezontle. Al incrementar su capacidad hídrica de un 16% del tezontle sin polímero hasta 34% con quitosano solo y de 44% con la mezcla de quitosano y PVA. Estos valores permiten considerar al tezontle modificado con el polímero como un potencial sustrato. Estos resultados preliminares permitirán en la siguiente etapa de este proyecto poder evaluar su capacidad como sustrato al ser utilizado para el cultivo de jitomate. En la Figura 1, se muestran las fotos del material absorbido, seco y entrecruzado para el caso de PVA. Es importante señalar que los aumentos fueron hasta 35X, por lo cual la resolución es baja, sin embargo, se puede observar la formación de una membrana sobre los poros del tezontle (B; C; D) respecto del tezontle natural (A).

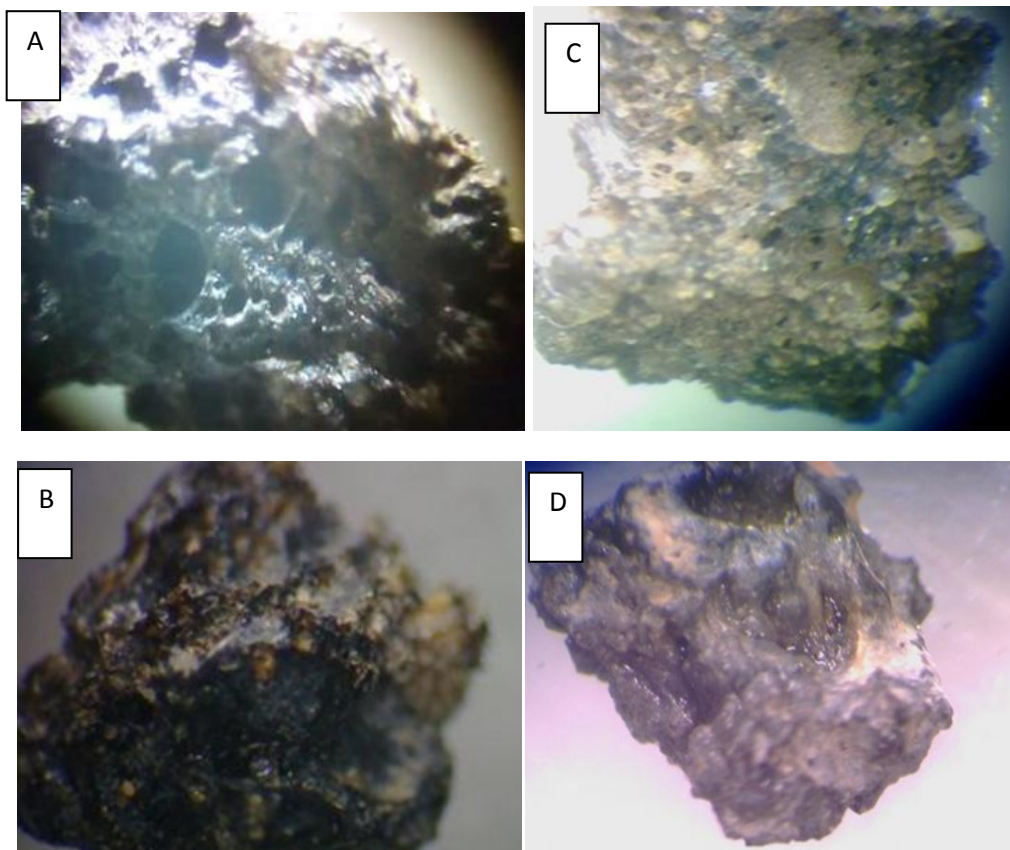


Figura 1. Fotos obtenidas en un estetoscopio Leyca EZ4 a 35X. A) Tezontle natural, B) Tezontle seco con quitosano:PVA la muestra fue sometida al proceso de criogelación, C) Tezontle seco después de absorción con quitosano, D) Tezontle después de absorción

Después de que el tezontle fue absorbido, el material se sumergió en agua de pozo para evaluar su capacidad hídrica a diferentes tiempos en función de el tiempo que se absorbió cada muestra en la solución polimérica, los resultados muestran que después de 30 minutos de estar en el medio acuoso el polímero se drena y hay una disminución de la capacidad hídrica en el equilibrio. En la Figura 2 se muestra que cuando se utiliza PVA, se favorece una mayor capacidad hídrica y que el entrecruzamiento del PVA por criogelación da como resultado mayor estabilidad del polímero en el tezontle.

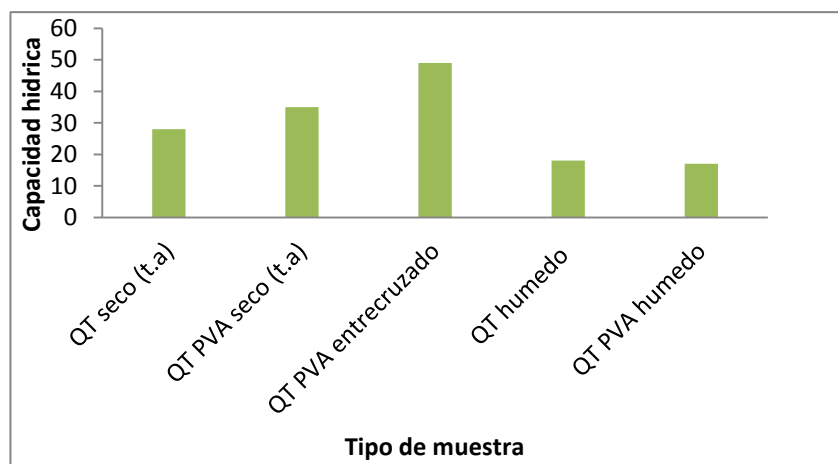


Figura 2. Capacidad Hídrica de los diferentes tratamientos del tezontle

4. CONCLUSIONES

El quitosano en solución de ácido acético del 2% proporciona una capacidad hídrica al tezontle después de 2 horas del 34% y cuando la mezcla se realiza entre PVA y QT en una proporción 1:1 la capacidad se incrementa de manera significativa hasta un 44%. Estos resultados indican que la incorporación del PVA favorece una mayor absorción de polímero. Esto permitiría por lo tanto su utilización como sustrato además de retener una mayor cantidad de agua por más tiempo y con ellos hacer riegos más eficientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ansorena, J. 1994. Sustratos. Propiedades y Caracterización. Mundi-Prensa. Madrid, España. 172 p
2. Baca, C. G. A.; Alcalde B., S.; Martínez G., A.; Laird, J. y Barrera I., D. 1990. Efecto de la solución nutritiva, el riego, el sustrato y la densidad de siembra en tres cultivos hortícolas en hidroponía al aire libre. I pepino. Agrocienza, Serie Agua-Suelo-Clima. 1:51-76
3. Blake, G. R. and Hartge K. H. 1986. Particle density. p. 377-382. *In*: Methods of soil analysis. Part I. Physical and mineralogical methods. A. Klute (ed). 2d ed. Agronomy Monography no. 9. ASA., SSSA. Madison WI, USA.
4. Burés, S.; Gago, M. C. and Martínez, F. X. 1997. Water characterization in granular materials (referred). Acta Horticulturae. 450:389-396.

5. Cruz-Crespo, E. Can-Chulim A., Sandoval-Villa M., Bugarín-Montoya R., Robles-Bermúdez A., Juárez-López P. (2012). "Sustratos en la Horticultura". *Bio Ciencias*, 2(12): 17-26.
6. Carmona, E.; Ordovás, J.; Moreno, M. T.; Avilés, M.; Aguado, M. T. and Ortega, M. C. 2003. Granulometric characterization and alteration during composting of industrial cork residue for use as a growing media. *Hortscience*. 38:1242–1246.
7. Handreck, K. A.; 1983. Particle size and the physical properties of growing media for containers. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 14:209–222
8. Lemaire, F.; Fatigues, A.; Revère, L. M.; Charpentier, S. and Morel, P. 2003. *Cultures en pot et conteneurs, principes agronomiques et applications*. 2^a ed. INRA. Paris. 210 p.
9. Martínez, F. X.; 1993. Propuesta de metodología para la determinación de las propiedades físicas de los sustratos. *Actas de Horticultura*. 11:55–66.

ADAPTACIÓN MESOFÍLICA DE CONSORCIOS MICROBIANOS CON LACTOSUERO POR DIGESTIÓN ANAEROBIA

Gabriela Sánchez-Olguín¹ Margarita Islas-Pelcastre¹ Nadia Isabel López-Escamilla²

1, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 2
Universidad Tecnológica de Tulancingo

RESUMEN

La industria láctea en el Valle de Tulancingo, estado de Hidalgo, genera en promedio 700,000 L/d de lactosuero y más de 70% son vertidos a embalses, provocando altas cargas orgánicas de contaminación, debido principalmente al contenido de lactosa. El proceso de digestión anaerobia es una alternativa de tratamiento sustentable para este subproducto, al generar biogás que puede ser utilizado como combustible y un efluente con menor impacto ambiental. El objetivo del trabajo fue adaptar un consorcio microbiano con lactosuero como sustrato por digestión anaerobia en condiciones mesofílicas (35 °C) donde se determinó el contenido de grasa y materia orgánica requerido al alimentar dicho sustrato en el sistema. Se trabajó un reactor serológico de 3 L de operación, por lote secuenciado con agitación y 24 horas de retención hidráulica (THR). Se plantearon cuatro concentraciones de alimentación de grasa: 4.8, 3.6, 2.4 y 1.2 g/L, con carga orgánica volumétrica (COV) de 5,000 mg/L DQO/día. Siendo el de 2.4 g/L el que brindó mejores resultados, al producir 372 mL/día de biogás y 78.9% de remoción de DQO. Posteriormente, se incrementó gradualmente la COV hasta 29,800 mg/L DQO/día, que generó 4,000 mL de biogás con 99% en remoción de DQO. Bajo una operación mesofílica con 2.4 g/L de contenido de grasa y una carga orgánica de 29,800 mg/L DQO, se obtuvo una producción de 10,000 mL de biogás (44% metano) y 77% de remoción de DQO con un TRH de 6 h con. Los consorcios microbianos bien adaptados pueden generar biogás a partir del lactosuero y podría incorporarse a los servicios térmicos de queseras, permitiendo su aprovechamiento energético y económico.

1. INTRODUCCIÓN

La región del Valle de Tulancingo, tiene un número notable de empresas queseras que vierten alrededor de 500,000 L de lactosuero a cuerpos de agua generando una carga orgánica contaminante con una demanda química de oxígeno en la región es de 27,448 mg/L (Campos-Montiel, R. G., 2007). Se estima que la relación DBO/DQO en una empresa quesera es de 0.6 (Danalewich et. al., 1998), por lo que la descarga promedio en demanda bioquímica de oxígeno (DBO) sería de 16,469 mg/L, que supera más de 100 veces la NOM-001-ECOL-1996 (150 mg/L) (Diario oficial de la federación (1997, enero 6)).

Esta problemática particular de la región, es un tema que involucra a la sociedad, autoridades, iniciativa privada e instituciones educativas para la búsqueda de una solución. La digestión anaerobia resulta una alternativa competente para la reutilización de este tipo de subproducto alimenticio, teniendo como objetivos ofrecer sustentabilidad al poder aprovechar biogás, biosólidos y efluente tratado (Donoso et. al., 2009 y Montero et. al., 2008). Ante esta alternativa surge la vinculación entre la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y la empresa EKOCHAIN Agencia de Sustentabilidad S. A. de C. V., bajo el financiamiento de la Fundación Educación

Superior Empresa (FESE), para aplicar dicha tecnología con un enfoque sustentable y convertir el lactosuero residual en un recurso energético.

La presente investigación consiste en la adaptación mesofílica de consorcios microbianos con lactosuero para la producción de biogás bajo parámetros de operación que mejoren el rendimiento del sistema anaerobio, lo cual se llevó a cabo, bajo ciertos parámetros de contenido de grasa, y carga orgánica del sustrato a nivel serológico. La investigación se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo en el municipio de Tulancingo de Bravo que es uno de los municipios donde se encuentra el problema de contaminación de lactosuero y el objeto de estudio es el residuo producido de planta Productora Universitaria de Lácteos S. A. de C. V. (PROUNILAC). El reactor fue inoculado con un consorcio microbiano proveniente de la planta de tratamiento de aguas residuales de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.

2. TEORÍA

La digestión anaerobia es un proceso de descomposición de la materia orgánica mediante microorganismos en ausencia de aire. El oxígeno necesario para su desarrollo lo obtienen del propio alimento. De acuerdo a la microbiología y bioquímica de la digestión anaerobia la conversión biológica del sustrato complejo, en el que se encuentra materia orgánica en suspensión o disuelta, se realiza a través de una serie de reacciones que transcurren tanto consecutiva como simultáneamente, y cuyo proceso se puede dividir en tres etapas (Cuervo, 1995): 1. Fase de hidrólisis y acidogénesis, 2. Fase acetanogénesis (fermentación acetogénica) y 3. Metanogénica.

El lactosuero se genera de la elaboración de queso y se varía en su composición de acuerdo al tipo de leche que lo genera, y del proceso de elaboración de los productos lácteos. Por ello se ha clasificado al suero en ácido y dulce, ambos contienen agua (en mayor concentración), lactosa, proteínas, sales minerales, grasas entre otros, pero en diferentes concentraciones (Gillies, 1974; Scottt, 1981; Yang y Silva, 1995; Torres, 1999; Luquet, 1993).

De acuerdo a Metcalf y Eddy (2003), la digestión anaerobia es aplicable a toda materia orgánica que este disuelta o suspendida en un medio líquido; por lo tanto el lactosuero es residuo líquido en cuya composición encontramos concentraciones de lactosa, proteínas, grasas y sales y puede realizar estas tres etapas de la digestión anaerobia. De los microorganismos responsables de la degradación de lactosa, específicamente se ha encontrado a las bacterias ácido lácticas (BAL) que poseen un tiempo de duplicación que oscila entre 30-90 min., en condiciones óptimas de crecimiento y toleran medios ácidos hasta de pH 4.0 y algunas son anaerobios facultativos. La mayoría de bacterias hidrolíticas son responsables de la hidrólisis son resistentes a cambios bruscos de temperatura y pH, su cinéticas de crecimiento es rápida (del orden de horas) y la temperatura no es un factor de extremo decisivo (Hernández, 2001). Este mismo autor, describe que las bacterias metánicas, son un tipo especial por diversas razones, en primer lugar se desarrollan en ausencia total de oxígeno molecular, es decir son estrictamente anaerobias, la cinética de crecimiento es muy lenta (mayor a 4 días), está en función de la temperatura que oscila a los 35° C, son sensibles al pH y su zona de tolerancia está comprendida entre pH 6.5-7.6, aproximadamente.

Regularmente los procesos de inestabilidad en sistemas anaerobios de efluentes de la industria láctea han reportado algunos problemas operacionales, sobre todo incidentes en la flotación de los lodos por toxicidad e inhibición del inóculo atribuido a la presencia de grasa. Además de ser responsable de restringir las actividades de velocidades de carga orgánica en reactores anaerobios; por ejemplo revelan que en concentraciones de 0.5g/L de grasa en lodos hubo un descenso entre el 10-25% de actividad metanogénica (Nieuwenhof, 1994; Clark, 1998 Samson *et al.*, 1984; Harper y Blaisdell, 1971; Cammarota *et al.*, 2001 y Demirel *et al.*, 2005).

Perle et al., (1994) reportan que los procesos de inhibición fueron ocasionados por la lipólisis de la grasa de leche obteniéndose ácidos grasos de cadena larga. Vidal et al., (2000) ilustraron que la biodegradación se puede sintetizar en dos vertientes, la primera cuando son ricos en grasa, en una relación: grasa/proteínas/ carbohidratos 1.7/0.57/1 (g/L) y segundo cuando es una concentración de grasa baja (relación de DQO; grasa/ proteína/ carbohidratos: 0.05/0.54/1 (g/L).

En valores con un rango de DQOt entre 0.4-20g/l, no se tuvieron problemas de flotación de lodos y se obtuvo una máxima biodegradación y metanización cuando se operó con rangos de 3-5 g DQO/L (Rinzema et al., 1993; Alves et al., 1997; 2001).

La flotación de lodos se atribuye principalmente a las características físicas de los lodos debido a la presencia de grasa (Perle et al., (1995); Cammarota et al., (2001); Demirel et al., (2005). Rinzema et al., (1993) reportan que la flotación de lodos en un reactor UASB se debió a que se alcanzó una velocidad de carga orgánica de lípidos excedido de 2-3 g DQO/L d. En otro estudio operaron dos reactores combinados para tratar aguas residuales con una velocidad de carga orgánica arriba de 9 g DQO/Ld uno de ellos mostró un alto contenido de grasa lo cual afectó la eficiencia global al adherirse a una fracción de la biomasa (Alves et al., 1997).

3. PARTE EXPERIMENTAL

Descripción del sistema.

La producción de biogás, se llevó a cabo por digestión anaerobia en un sistema mesófilo a nivel serológico, que conlleva tres etapas principalmente: establecimiento del contenido de grasa, de materia orgánica y tiempo de retención hidráulica, previa caracterización de materia prima.

Arreglo del sistema serológico

El sistema se conformó por frascos serológicos de 3 L, en operación por lotes con agitación continua, los cuales contenían el inóculo (lodos anaerobios) y el lactosuero como sustrato. Los serológicos estaban perfectamente sellados y una sola salida para el desplazamiento del biogás en la parte superior, a la cual se le adaptó una manguera a un dispositivo de medición que consta de un depósito de agua acidulada (0.05 M de H₂SO₄) y una probeta invertida para conocer la cantidad de biogás generado. En su interior el reactor se empacó con empaque esférico ranurado de plástico como medio de soporte. El sistema fue aislado térmicamente y se registró su temperatura mediante termómetro de mercurio.

Metodología

Caracterización de la materia prima: La materia prima a caracterizar fue el lactosuero como sustrato y los lodos o consorcio bacteriano.

Adaptación consorcio microbiano: Cada sistema anaerobio mesofílico (35 °C) se configuró de acuerdo a los parámetros a determinar. El tipo de sustrato utilizado fue una mezcla 1:1, lactosuero dulce:lactosuero ácido. El Cuadro1 muestra el arreglo para los diferentes ensayos para las condiciones de operación del sistema anaerobio mesófilo.

Metódos analíticos

Los métodos analíticos para la caracterización de la materia prima son los que establece la APHA/AWWA/WPCF, 1998, para el lactosuero, lodos, influente y efluente, además de los control y monitoreo de los reactores serológicos.

Cuadro 1. Condiciones del experimento			
Parámetro	Determinación de grasa	Determinación de DQO	Determinación de TRH
Carga orgánica	5% de carga orgánica (5,000 mg/L DQO).	----	Incrementos dosificados de DQO hasta 29,800 mg/L (25% DQO)
Contenido de grasa	-----	50% (0.24%, 2.4 g/L)	50% (0.24%, 2.4 g/L)
Puntos de referencia	Contenido de grasa: 100%: 4.8 g/L 75%: 3.6 g/L 50%: 2.4 g/L 25%: 1.2 g/L	Incrementos dosificados de DQO: 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% 40%, 45%, 50%, 55% y 60%.	Tiempos definidos: 4, 8, 20, 24 y 30 h.

4. RESULTADOS

Caracterización de materia prima

Sustrato: La caracterización fisicoquímica del sustrato permitió estimar la cantidad de masa global susceptible a ser transformada por digestión anaerobia para la formación de biogás (Cuadro 2).

Cuadro 2. Caracterización fisicoquímica de lactosuero				
Parámetro	Mezcla 1:1 100% grasa	Mezcla 1:1 75% grasa	Mezcla 1:1 50% grasa	Mezcla 1:1 25% grasa
Grasa, %	0.48	0.36	0.24	0.12
SNF (sólidos no grasos), %	5.74	5.82	5.74	6.19
Densidad, g/mL	1.021	21.06	20.81	1.022
Azúcares totales (lactosa), %	3.06	3.1	3.06	3.29
Sólidos, %	0.52	0.53	0.52	0.56
Proteína, %	2.14	2.17	2.13	1.2
Agua añadida, %	34.8	34.03	35	29.4
Temperatura, °C	9.1	14.6	11.4	3.5
Punto de congelación, °C	-0.339	-0.34	-0.34	0.37
pH	4.95	4.76	5.5	3.8
Conductividad, µS	3.61	3.62	3.6	3.63
DQO, mg/L	102,333	83,925	119,224	11,700

Inóculo: La caracterización fisicoquímica del consorcio bacteriano permitió estimar la cantidad de biomasa que convierte el sustrato en biogás por digestión anaerobia (Cuadro 3).

Adaptación mesofílica del consorcio

Los parámetros que determinan la adaptación mesofílica del consorcio se definieron en base a las variables de respuesta: producción de biogás, eficiencia de remoción y DQO.

Determinación del contenido de grasa: El Cuadro 4 muestra los resultados de los diferentes procesos de tratabilidad de la digestión anaerobia del lactosuero bajo diferentes contenidos de grasa. El experimento se realizó con cinco repeticiones por ensayo.

Cuadro 3. Caracterización fisicoquímica de lodos

Parámetro	Resultado
T, °C	25
pH	6.95
Sólidos totales, mg/L	84,608
Sólidos volátiles totales, mg/L	47,872
Sólidos suspendidos totales, mg/L	2,200
Sólidos suspendidos volátiles, mg/L	30,650
DQO, mg/L	167,023

Se determinó que la mezcla 1:1 con 50% de grasa en sustrato es la indicada, por que se tiene mayor eficiencia de remoción de DQO, aunque que no existe diferencia significativa en producción de biogás.

Cuadro 4. Caracterización de digestor anaerobio mesofílico

Parámetro	Mezcla 1:1	Mezcla 1:1	Mezcla 1:1	Mezcla 1:1
	100% grasa	75% grasa	50% grasa	25% grasa
Producción promedio de biogás, mL	500	678	372	552
T °C	32	30	31	40
pHi	3.58	4.28	4.52	4.1
pHf	3.41	4.22	4.23	3.6
DQOi, mg/L	881	1038	298	731
DQOf, mg/L	576	998	63	1077
DQOrem, mg/L	305	40	235	--
Eficiencia DQO, %	34.6	3.85	78.9	--

Determinación de la carga orgánica: El cuadro 5 presenta muestra los resultados de los diferentes procesos de tratabilidad de la digestión anaerobia del lactosuero bajo diferentes contenidos de materia orgánica y un contenido de grasa del 50% (2.4 g/L grasa).

El sistema mesófilo se alimentó con cargas dosificadas hasta 59,600 mg/L (50% DQO), donde se generó 2.6 L de biogás, y se obtuvo una remoción del 75 al 92% de lactosa y 63% de DQO. También se observó que con una carga de 29,800 mg/L (25% DQO), se obtuvo mayor producción

de biogás y mejor remoción de DQO, 4 L y 99% respectivamente. Por lo tanto, se determinó una carga del 25% de carga orgánica.

% DQO inicial	25	50
DQO inicial, mg/L	29,800	59,600
DQO total (lactosuero y lodos), mg/L	85,000	115,000
Azúcares reductores totales i, mg/L	7,650	15,300
Sólidos totales i, mg/L	1,300	2,350
Producción de biogás, mL	4,000	2,600
T, °C	30 - 40	30 - 40
pH	7.41	5.2
Alcalinidad total, mg/L CaCO ₃	-----	1,000
Azúcares reductores totales f, mg/L	1,200 – 2900	1,200 – 2900
Remoción de ART, %	75 -92	75 -92
DQOf, mg/L	115	65,000
Eficiencia de remoción DQO,%	99	63

Determinación del tiempo de retención hidráulica, TRH: El Cuadro 6, presenta la producción de biogás durante 30 h para la determinación del tiempo de retención hidráulica bajo los parámetros de contenido de grasa y carga orgánica determinados.

% DQO inicial		25
DQO inicial, mg/L		29,800
DQO total (lactosuero y lodos), mg/L		85,000
Azúcares reductores totales i, mg/L		7,650
Sólidos totales i, mg/L		1,300
Producción de biogás, mL		10,000
	4 h	6,000
	8 h	6,000
	20 h	9,100
	24 h	10,000
	30 h	10,000
T, °C		35
pH		4.7
Alcalinidad total, mg/L CaCO ₃		7800
Azúcares reductores totales f, mg/L		-----
Remoción de ART, %		77
DQOf, mg/L		20,000
Eficiencia de remoción DQO,%		77

De esta manera, se obtuvo un TRH de 6 h el cual es el tiempo de retención hidráulica donde se obtuvo el 60% de producción de biogás mientras que el otro 40% se produjo en las 24 horas restantes. La producción de biogás con los parámetros determinados fue de 10,000 mL con una eficiencia de remoción de DQO de 77%.

En relación a la calidad del biogás generado, se determinó una relación de 44% de metano y 56% de dióxido de carbono por cromatografía de gases reportado por el Laboratorio de Investigación de Procesos Avanzados en Tratamiento de Aguas, UNAM, Unidad Juriquilla, Querétaro.

5. CONCLUSIONES

El proceso de producción de biogás por digestión anaerobia requiere de la adaptación del consorcio microbiano para minimizar los efectos inhibitorios. Es necesario controlar un rango de pH al realizar la mezcla de los dos tipos de lactosuero ya que las bacterias no sobreviven a pHs muy bajos, así mismo, el contenido de grasa puede tener efecto en el flujo hidráulico en el equipo al no digerirse completamente en el proceso. También es importante el control de una alimentación dosificada de carga orgánica ya que podría resultar un ambiente tóxico para el consorcio. Por otro lado, la determinación de un tiempo de retención hidráulica delimita la operación de un reactor para su operación. Por lo que se definen las condiciones de operación con los parámetros de mejor eficiencia y menor gasto de operación.

Durante la experimentación, los resultados obtenidos muestran que el consorcio puede resistir a efectos inhibitorios, pero las variables de respuesta van disminuyendo, en este caso, sin colapsar el proceso. El consorcio microbiano bajo régimen mesofílico, se adaptó con un sustrato de lactosuero bajo un contenido de grasa de 2.4 g/L, carga orgánica de 29,800 mg/L DQO y un TRH de 6 h.

En cuanto a los rendimientos obtenidos en producción de biogás, puede decirse que son modestos, pero se puede disminuir el impacto negativo en el ambiente ya que es un proceso sustentable, por la generación de biogás, agua tratada y biosólidos que se pueden recuperar y aprovechar. Se verificó la presencia de metano en el biogás producido, con una proporción moderada, respuesta de los valores bajos de pH, pero se infiere que existe viabilidad para su utilización como combustible en procesos térmicos. La adaptación del consorcio define entonces el tratamiento primario previo a la digestión anaerobia. Cabe señalar que el control del contenido de grasa puede realizarse también de manera biológica y así estaría incluido en el tratamiento secundario, lo cual, se recomendará en próximas investigaciones.

Respecto a la microbiología del consorcio se observó una disminución en la cantidad de bacterias lácticas, lo cual explica por qué la eficiencia del sistema disminuyó en el reactor termofílico. En cuanto a bacterias lipolíticas, en ambos reactores presentaron ausencia del este tipo de bacterias lo que indica que la degradación de grasa es limitada y esto puede ocasionar saturación de grasa en el sistema, por lo que su control es importante.

El proceso de digestión anaerobia, es un trabajo arduo, pero necesario por las ventajas que ofrece a los procesos térmicos o de energía eléctrica que demanda la industria, por lo que no se puede ver como opción, sino como parte relevante e integral ya que es económica y tecnológicamente viable, socialmente aceptable y ambientalmente sustentable.

BIBLIOGRAFÍA

1. R. G., Campos-Montiel, "Alternativas para el tratamiento de lactosuero para un desarrollo sostenible en el Valle de Tulancingo, Hidalgo". Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos CICYTA-ICAP, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 2007.
2. J. R. Danalewich, T. G. Papagiannis, R. L. Belyea, M. E. Tublenson, L. Raskin, "Characterization of dairy waste streams, current treatment practices, and potential for biological nutrient removal", *Water Research*, Vol. 32, 12, 1998, pp. 3555-3568.
3. Diario oficial de la federación, "NOM-001-ECOL-1996. Establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de agua residuales en aguas y Bienes Nacionales". DOF, 1997. Recuperado el 22 de junio del 2015 desde: <http://www.agua.org.mx/index.php/biblioteca-tematica/marco-juridico-del-agua/1186-normas-oficiales-mexicanas/27369-normas-oficiales-mexicanas-nom-001-semarnat-1996-nom-002-semarnat-1996-nom-003-semarnat-1997>nutrient removal
4. Donoso, M. Carballa, G. Ruiz-Filippi, R. Chamy, "Treatment of low strength sewage with high suspended organic matter content in an anaerobic sequencing batch reactor and modelling application", *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol. 1, 3, 2009, pp. 1-10.
5. B. Montero, J. L. Garcia-Morales, D. Sales, R. Solera, "Evolution of microorganisms in thermophilic-dry anaerobic digestion", *Bioresource Technology*, Vol. 34, 6, 2008, pp. 1803-1816.
6. L. F. M. Cuervo, "Digestión anaerobia de lactosa: efecto del potencial de amortiguamiento y comparación con un modelo cinético", Universidad Autónoma Metropolitana –Iztapalapa, 1995.
7. M. T. Gillies, "Whey processing and utilization, economic and technical aspects", Noyes Data Corporation, 1974.
8. R. Scott, "Cheesemaking Practice", Applied science publishers, 1981.
9. B. A. Torres, "Definición del suero de queso tipo Oaxaca en la región de Tulancingo y establecimiento del proceso óptimo para obtención de proteínas", Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 1999, pp. 6, 8, 10 y 35.
10. E. Metcalf, "Wastewater Engineering: Treatment and Reuse", 4th ed., McGraw-Hill, 2003.
11. M. A. Hernández, "Depuración y Desinfección de aguas residuales", 5ta ed., (Ruhrverband, Madrid, España, 2001), cap. 10, pp. 932-1028.
12. S. T. Yang, E. M. Silva, "Novel products and new technologies for use of a similar carbohydrate, milk lactose", *J. Dairy Sci.*, Vol. 78, 11, 1995, pp. 2541-2562.
13. F. F. J. Nieuwenhof, "Anaerobic treatment of dairy wastewater", *Int. Dairy Federation Bull. Document 184*, 1994, pp. 132-133.
14. R. Samson, B. Van den Berg, R. Peters, C. Hade, "Dairy Waste treatment Using Industrial scale Fixed-Film and Upflow Sludge-bed Anaerobic Digesters: Design and start-up Experience", 40th Purdue industrial waste conference, West Lafayette, 1985, pp. 235-241.
15. W. J. Harper, J. L. Blaisdell, J. Grosshopf, "Dairy Food Plant Wastes and Waste Treatment Practices", (Environmental Protection Agency, U.S. Washington DC, 1971).
16. M. C. Cammarota, G. A. Teixeira, D. M. G. Freire, "Enzymatic pre-hydrolysis and anaerobic degradation of wastewater with high fat contents", *Biotechnol Lett.* Vol. 23, 19, 2001, pp.1591-1595.
17. B. Demirel, O. Yenigun, T. T. Onay, "Anaerobic treatment of dairy wastewater: a Review", *Technol Biotechnol.* Vol. 40, 8, 2005, pp. 2583-2595.
18. G. Vidal, A. Carvalho, R. Mendez, J. M. Lema, "Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters", *Bioresour Technol.* Vol. 74, 3, 2000, pp. 231-239.
19. A. Rinzema, A. Alphenaar, G. Lettinga, "Anaerobic digestion of long-chain fatty acids in UASB and expanded granular sludge bed reactors", *Process Biochem.* Vol. 28, 8, 1993, pp. 527-537.

20. M. M. Alves, P. R. M. Alvares, V. J. A. Mota, M. Mota, "Effect of lipids on biomass development in anaerobic fixed-bed reactors treating a synthetic dairy waste", in *Proceedings of the international symposium of environmental technology*, 1997, pp. 521–524.
21. M. M. Alves, P. R. M. Alvares, V. J. A. Mota, M. Mota, "Effect of lipids and oleic acid on biomass development in anaerobic fixed-bed reactors. Part 1. Biofilm growth and activity", *Water Res.* Vol. 35, 1, 2001, pp. 255– 263.
22. M. Perle, S. Kimchie, G. Shelef, "Some Biochemical Aspects of the Anaerobic Degradation of Dairy Wastewater", *Wat. Res.*, Vol. 29, 6, 1995, pp. 505-509.

EFFECTO DE LAS FRACCIONES DE EXTRACTOS DE *Ibervillea sonora* EN EL TRANSPORTE DE GLUCOSA EN MODELOS IN VITRO

Luis Ángel Montes Ortega¹, Agustín Ignacio Cabrera Llanos¹, Arturo Ortega Soto¹, María Guadalupe Ramírez Sotelo²

¹Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, ²Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

RESUMEN

En México la Diabetes Mellitus (DM) es comúnmente tratada con extractos de hierbas. Un total de 306 especies tienen registros de uso popular para el tratamiento de este síndrome en nuestro país. De este total, 133 plantas cuentan con información fitoquímica acerca de sus metabolitos secundarios y sólo 30 tienen algún estudio científico de actividad farmacológica; una de ellas es la curcubitacea *Ibervillea sonora*^{1,2}. El 90% de los estudios realizados con estas plantas ha sido a nivel experimental, toxicológico y pero a nivel clínico se ha evaluado sólo el 10%. Algunos otros compuestos aislados del tubérculo de *Ibervillea sonora* como componentes principales, son los glucósidos del tipo cucurbitano, y como componentes menores se tiene a las agliconas cucurbitacinas; kinoínas A, B y C³. En el extracto acuoso del wereke se han encontrado alcaloides, cumarinas, flavonoides, saponinas y quinonas en diferente concentración, lo cual indica un gran potencial de esta planta para fines medicinales, además de que los compuestos activos presentes tienen un bajo perfil toxicológico⁴. A pesar de que existen resultados que validan las propiedades hipoglucemiantes de esta planta medicinal en el control de la DM, aún siguen faltando estudios de caracterización dirigidos a la obtención de los principios activos en cantidad suficiente para poder dilucidar su estructura química, lo cual ayudará a determinar la dosis exacta del o los principios activos, así como la mejor vía de administración. El extracto fue purificado por cromatografía en columna y las fracciones obtenidas se evaluaron *in vitro* mediante un modelo de transporte de glucosa en Células Gliales de Bergmann (BGC), en donde se determinó el efecto del extracto en el transporte de glucosa en BGC a concentraciones de 1, 0.1, 0.01, 0.001% y se realizó el estudio de del efecto de las fracciones del extracto en el transporte de glucosa.

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes es una enfermedad caracterizada por un grupo de desórdenes metabólicos crónicos y aparece cuando el páncreas no puede producir insulina, hay defectos en la producción de esta hormona o ambos padecimientos. La insulina permite que la glucosa de los alimentos se introduzca en las células del cuerpo para convertirla en la energía necesaria para que los tejidos y músculos funcionen. La afección hiperglucemiante implica que la persona no puede absorber la glucosa y por tanto está sigue circulando por el torrente sanguíneo, causando daño en los tejidos del cuerpo que pueden terminar en una discapacidad o complicaciones de salud que pueden ser mortales. Las complicaciones de esta enfermedad la hacen una de las principales causas de muerte a mediano y largo plazo. Entre estas alteraciones están la posible pérdida de la visión, riesgo de ulceraciones en los pies, amputaciones, neuropatías con síntomas de afección gastrointestinal, genitourinaria y cardiovascular.

La diabetes tipo 1 es caracterizada por una reacción autoinmune, en donde el mismo sistema de defensa ataca a las células beta en el páncreas y en consecuencia ya no se produce la insulina que se necesita. Por lo que las personas con esta enfermedad con objeto de controlar los niveles de azúcar en sangre, requieren de la insulina todos los días, así como una dieta saludable y ejercicio físico regular.

En el caso de la diabetes tipo 2, objeto de estudio del presente trabajo, se produce insulina, pero el cuerpo no responde a sus efectos o no es suficiente. Este tipo de enfermedad es la más común en la población representando entre un 85% y 95% de prevalencia, sus síntomas tardan en aparecer pero durante este tiempo el exceso de glucosa en sangre va dañando paulatinamente el cuerpo. La diabetes gestacional se desarrolla en las mujeres con resistencia a insulina durante el embarazo, debido a que esta puede ser bloqueada por las hormonas producidas por la placenta, trayendo consecuencias principalmente para la madre.

Esta enfermedad es uno de los problemas más graves de salud en nuestro país y en el mundo actualmente, ya que el tratamiento con fármacos implica un alto costo para el paciente, además de que podría presentarse una resistencia al fármaco a largo plazo, de esta manera la dosis sería incrementada paulatinamente, conjuntamente con los efectos adversos de estos tratamientos, ha llevado a recurrir a alternativas terapéuticas como lo son las plantas medicinales.

2. TEORÍA

Todas las personas con diabetes tipo 1 y tipo 2 necesitan de medicación para reducir los niveles de glucosa en sangre. Las personas con diabetes tipo 1 requieren de la insulina para sobrevivir, ya que al no producir esta hormona sin ella habría graves consecuencias. Entre otros medicamentos importantes para el control de la diabetes están la glibenclamida y la metformina, que son hipoglucemiantes.

También se utilizan agentes antidiabéticos como las sulfonilurias, biguanidas, inhibidores de la alfa-glucosidasa y glinidas, muchos de los cuales se pueden combinar para ayudar al control de la enfermedad. Sin embargo, como todo medicamento, estos presentan efectos adversos y durante un episodio crónico de la enfermedad pierden su efectividad. Por lo que la búsqueda de alternativas terapéutica más efectivas, ha tenido como objetivo evitar en gran medida los efectos adversos y ha sido un amplio campo de investigación.

Se han registrado más de 400 tratamientos naturales para la diabetes mellitus, pero solo algunas han sido investigadas para aprobar su eficacia, generalmente se estudian las plantas medicinales más utilizadas por la población, sus efectos farmacológicos y toxicidades. En 1985 la OMS estructuró el Programa de Medicina Tradicional Herbolaria, reconociendo a 119 potenciales fármacos de origen vegetal.

Los extractos totales de plantas, ejercen en varios casos un efecto más beneficioso sobre el cuerpo humano que el compuesto aislado y producen menos efectos secundarios adversos. La OMS está de acuerdo en que las plantas medicinales juegan un papel importante en el sistema de salud, pero dicha aplicación debe ser respaldada por investigaciones científicas, que evalúen su toxicidad, efectividad, calidad y dosificación en personas.

Ibervillea sonora es una planta endémica comúnmente llamada “wareke”, “guareque” o wereke, y es originaria de la parte norte de México y Sur de Estados Unidos, posee un largo tallo, amplias hojas, su fruto es ovalado y su raíz es ancha, dura y de color amarillo, que se compone por un 87.1% de agua y un 12.9% de sólidos de los cuáles el 11.48% son materia orgánica y el 1.4 materia inorgánica. Tiene un olor y sabor amargo que puede provocar irritación de nariz y garganta. Esta planta es utilizada tradicionalmente como tratamiento para la diabetes mellitus en decocción, aunque también es tomada en forma de cápsulas conteniendo la raíz seca y pulverizada dentro de la misma; así como en infusiones. El amplio consumo de esta planta ha

impulsado la realización de diferentes investigaciones que han resultado en el aislamiento de 20 moléculas distintas tales como fenoles, esteroides, glucopiranosas, agliconas, ácidos grasos y mono-acilglicéridos. Puntualmente se ha demostrado la actividad hipoglucemiante de la decocción de *Ibervillea sonora* por vía intraperitoneal en ratas y ratones tanto sanas como hiperglucémicas inducidas por aloxan y el efecto de esta raíz realiza la reducción en niveles de glucosa de hasta 67% en ratón y 69% en rata.

La entrada de glucosa a los tejidos y a la membrana celular es llevada a cabo mediante varios tipos de proteínas acarreadoras. Ya que estas moléculas son incapaces de difundir directamente a través de las membranas celulares por lo que requieren proteínas transportadoras especializadas para entrar al interior celular. Es un proceso fundamental para el transporte de nutrientes ya que este azúcar es muy importante para el metabolismo y obtención de energía de la célula.

La glucosa debe entrar al interior de la célula para llevar a cabo funciones de oxidación y almacenaje, primeramente debe incorporarse a la vía metabólica que predomine de acuerdo a las condiciones hormonales y energéticas del momento. Una célula debe evitar que su medio interno se mezcle con el medio ambiente, su membrana celular se lo permite al ser una capa lipídica impermeable a moléculas como la glucosa, es por esto que la glucosa necesita ser transportada al interior. Existen dos proteínas acarreadoras principales: los transportadores de glucosa acoplados a sodio (SGLT) y las proteínas facilitadoras del transporte de glucosa (GLUT):

SGLT: Son sistemas de co-transporte de glucosa acoplados a Na⁺ que permiten la absorción de esta molécula desde el íleo hacia el sistema portal, así como la reabsorción de la glucosa filtrada al torrente sanguíneo. Se conocen 6 isoformas que se valen por el transporte de Na⁺ a favor de su gradiente de concentración para producir cambios conformacionales necesarios para la translocación de la glucosa en la membrana plasmática.

GLUT: Son proteínas encargadas de transportar monosacáridos al interior de las células del organismo y se han identificado 14 isoformas. Es un conjunto de secuencias primarias aminoacídicas que determinan estructuras secundarias generalmente y son responsables de las características funcionales de la proteína. Uno de los transportadores de glucosa (GLUT-1) está situado en las células gliales y regula el paso de este monosacárido por la barrera hematoencefálica, es una proteína transmembranal que cuenta con una organización secundaria característica de esta familia de transportadores.

El azúcar de los vasos sanguíneos es captado por las BGC y es incorporada por los transportadores para que una vez dentro de la célula sea metabolizada hasta lactato y ser suministrado a la neurona. Por lo que GLUT-1 es un importante intermediario en el metabolismo de la neurona y además esta cuenta con transportadores GLUT-3, que transportan directamente la glucosa a la neurona como se muestra en la figura 1.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Material biológico

La raíz seca de *Ibervillea sonora* fue adquirida en el mercado "Sonora" de la delegación Venustiano Carranza, en la Ciudad de México. Fue lavada con agua destilada, se secó a no más de 40°C durante 24 horas y se guardó para su posterior utilización.

Extracción por maceración

Obtención del extracto total acuoso

Se utilizaron 2 kg de raíz de *I. sonora* para la extracción, la raíz fue triturada en un molino manual para grano y el polvo se colocó en un recipiente de plástico con 4 litros de agua destilada. El

recipiente fue sellado y se dejó macerando durante 24 horas con agitación ocasional. A continuación se realizó el proceso de eliminación del solvente, mediante una filtración con gasas y se concentró en un rotavapor (BÜCHI, 461, Switzerland) a 55°C.

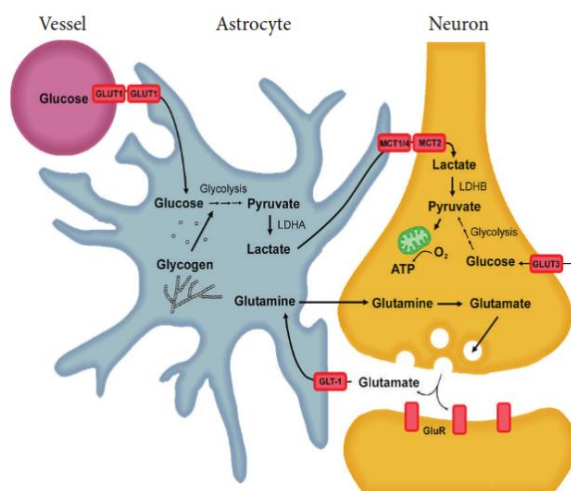


Fig. 1. Dinámica del transporte de la glucosa mediado por los transportadores GLUT1 y GLUT3 en la célula glial y neurona respectivamente. Tomado Modificado Newington, Harris, y Cumming, 2013.

Obtención del extracto total hidroetanólico

Un total de 2 kg de la raíz *I. sonorae*, pasó por un proceso de molienda en molino manual de grano, maceración en un recipiente sellado de plástico con 4 litros de una mezcla de agua-etanol (50:50), durante un período de 24 horas. Posteriormente se filtró con gasas y se concentró en un rotavapor (BÜCHI, 461, Switzerland) a 55°C.

Secado por aspersion

Finalmente el extracto total se obtuvo mediante el secado por aspersion de los extractos obtenidos por la maceración de la raíz, utilizando un secador (BÜCHI Mini Spray Dryer B-290) a 130°C, 0.70% aspiración, 10% de Bomba, outlet a 51°C y Q-Flow de 30-40; con el objetivo de obtener un polvo fino. Asimismo también se utilizó un prototipo de planta piloto, manteniendo las mismas condiciones de operación.

Identificación de la mejor mezcla de solventes

Con el extracto total de *I. sonorae* se realizó un estudio en cromatografía de capa fina, utilizando los solventes más comunes, combinándolos de acuerdo a la polaridad de cada uno, así como variando las concentraciones de 0% a 100%. (Acetato de etilo:Metanol; Acetato de Etilo:Diclorometano; Diclorometano:Metanol; Acetato de Etilo:Etanol; Acetato de Etilo:Ciclohexano), finalmente se registraron los Rf obtenidos y se eligió la mezcla con el mejor Rf promedio.

Obtención de las fracciones por cromatografía

Se realizó la preparación de una columna abierta de cromatografía, utilizando cinco gramos del extracto de la raíz *I. sonorae*, la columna fue empacada con una fase estacionaria de 90g de silica gel (Kiesel gel 60 Merck, tamaño de partícula, 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM) y utilizando

acetato de etilo como eluyente. El extracto total se mezcló con 15 gramos de silica gel, se humectó con el eluyente y se colocó una vez que la columna ya había sido empacada. Consecutivamente la columna fue eluida con acetato de etilo y después se utilizó una mezcla binaria de acetato de etilo:etanol en una proporción inicial de 90:10 y variando las concentraciones en un 10% hasta llegar a la mezcla 10:90 y finalmente se ocupó etanol, obteniendo un volumen muerto de 240 ml, así como un volumen de elusión de 1760 ml recolectados en muestras de tubos de 10 ml cada una. Se agruparon aquellas fracciones que en cromatografía de capa fina (TLC sílica gel 60 F254Merck), mostraron similitud en sus respectivos Rf utilizando como fase móvil los mismos eluyentes y proporciones de la mezcla binaria ocupada en la cromatografía por exclusión. Una vez que las fracciones fueron clasificadas, el eluyente fue evaporado en el rotavapor, para acelerar el proceso y las fracciones fueron recolectadas en diales y etiquetadas para su posterior uso.

Pruebas *in vitro* del transporte de glucosa en células gliales

Cultivo celular

Se preparó un cultivo primario de Glia de Bergmann a partir de cerebelos de embriones de pollo de 14 días de gestación, los cuales fueron homogeneizados utilizando una aguja de calibre 16 y 18. Las células obtenidas fueron sembradas con una densidad de 8×10^5 células/ml en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), integrado con suero fetal bovino al 10% (GIBCO™) y 50 µg/ml de gentamicina. Las células se incubaron de 4 a 6 días a 37°C en 5% de CO₂ hasta que lograran una confluencia del 90%.

Captura de [³H]-Aspartato por Glia en células Gliales

Se realizaron ensayos de saturación para caracterizar el transporte de glucosa en células con 4 días de incubación en dos placas de 24 pozos cada una, se aplicó 1 ml del estímulo hidroetanólico y acuoso al 0.001% de concentración y después se ponen a incubar a 37°C en 5% de CO₂ durante 30 minutos. Después se colocó glucosa marcada radioactivamente con tritio (3H), posteriormente se removió la marca rápidamente con aspiración y se realizaron dos lavados con buffer A (Hepes 25 mM, NaCl 130 mM, KCl 5.4 mM, MgSO₄ 0.8 mM, Na₂HPO₄ 1 mM, Glucosa 33 mM CaCl₂ 1.8mM) a 4 °C para detener la captura y se disolvieron con NaOH 0.1N. Finalmente se utilizó el método de Bradford para cuantificar la concentración de proteína, así como el conteo por centelleo líquido para determinar la radiactividad incorporada por las células.

4. RESULTADOS

Se estandarizaron las condiciones de obtención de los extractos acuosos y etanólicos. En la tabla 1 presentamos los rendimientos obtenidos para dos secadores de aspersión (secador 1-secador por aspersión BÜCHI Mini Spray Dryer B-290- y secador 2-prototipo de planta piloto de UPIBI).

	Secador 1	Secador 2
% Recuperación	12.59 %	2.2%
Rendimiento	$15.73 \frac{g}{l}$	$11.01 \frac{g}{l}$
Productividad	$1.57 \frac{g}{l \cdot h}$	$1.10 \frac{g}{l \cdot h}$

Una vez obtenido los extractos se realizó la separación de las fracciones mediante cromatografía de exclusión bajo las condiciones descritas en la metodología. Se obtuvieron 23 fracciones para el extracto acuoso de *Ibervillea sonora* y 14 fracciones para el extracto etanólico. En las figura 2 y 3 se muestra los factores de retención registradas para estas fracciones:

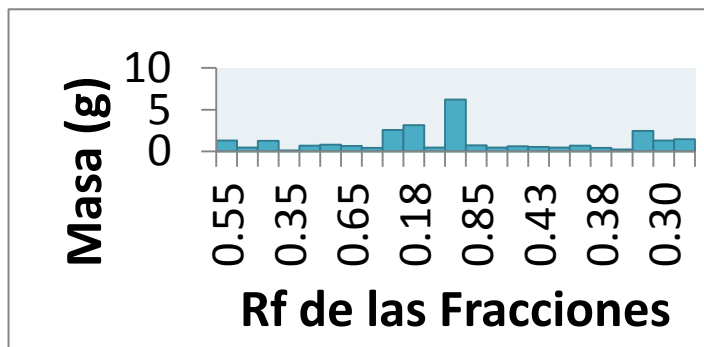


Figura 2. Rf de las fracciones del extracto acuoso obtenidas.

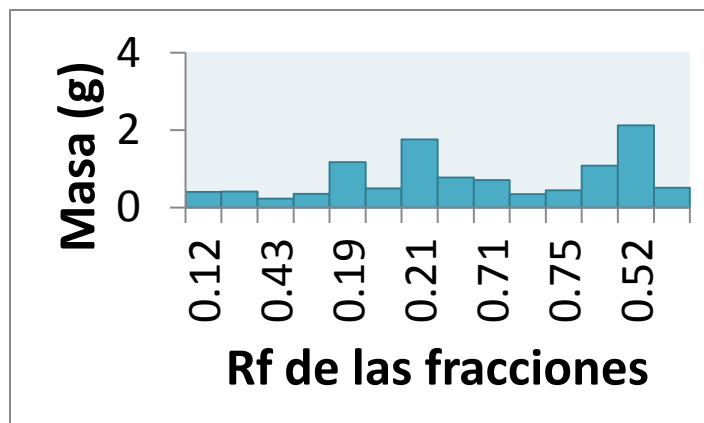


Figura 3. Rf de las fracciones del extracto etanólico obtenidas.

Para identificar en qué fracciones se encontraba la mejor actividad hipoglucemiante los cultivos celulares de células gliales de Bergmann fueron estimuladas con las fracciones obtenidas en un buffer de ensayo por 30 minutos y por triplicado, obteniendo la respuesta en las figuras 4 para las fracciones del extracto acuoso y la figura 5 para las fracciones del extracto etanólico.

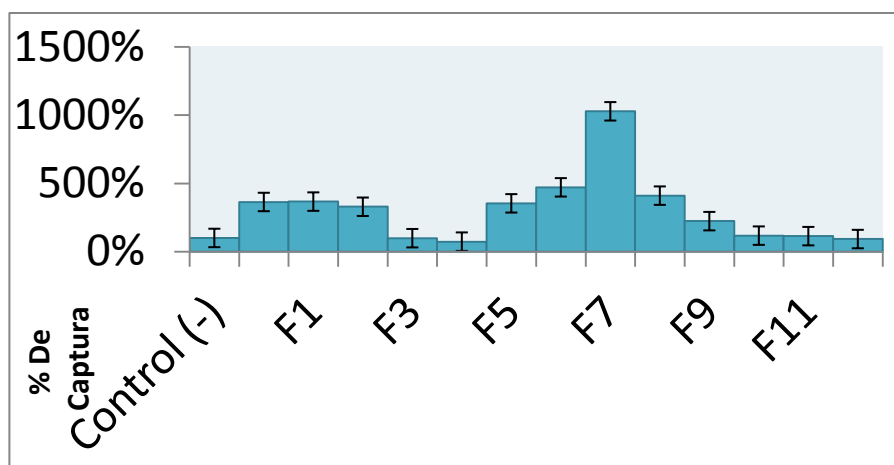


Figura 4. Captura de glucosa en BGC al ser estimulada con fracciones del extracto acuoso de *I. sonorae*.

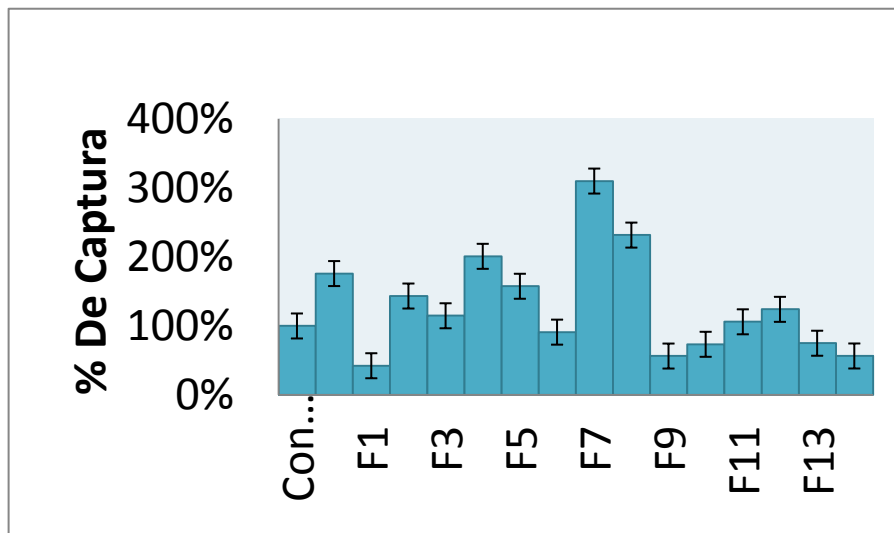


Figura 5. Captura de glucosa en BGC al ser estimulada con fracciones de extracto etanólico de *I. sonorae*.

5. CONCLUSIONES

Se obtuvo extracto etanólico y acuoso, por maceración y secado por aspersión.

Se estandarizaron las condiciones de operación de la columna de cromatografía de exclusión, eligiendo la mezcla acetato de etilo/etanol como fase móvil.

Se identificó que la fracción más activa que afecta el transporte de glucosa es la fracción 7.

Se demostró que efectivamente las fracciones del extracto de *I. sonorae* ejercen un efecto en el transporte de glucosa en células gliales de Bergmann.

Agradecimiento: Secretaría de Investigación y Posgrado, SIP:20150710.

BIBLIOGRAFÍA

1. A, Cetto, M, Heinrich, "Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes". *Journal of Ethnopharmacology*. 2005. 3 (99), 325-348.
2. Achenbach, H. K. (1993). Curcubitane and curcubitane-type glycosides from *Ibervillea sonora*. *Phytochemistry*, 437-445.
3. Aguilar R., R. R. (1998). Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal Ethno-pharmacology*, 191-199.
4. Bermúdez, V. B. (2007). Biología molecular de los transportadores de glucosa: Clasificación, estructura y distribución. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 76-86.
5. Beyra, A. (2004). Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camaguey (Cuba). *Anales del jardín botánico de Madrid*, 182-204.
6. Castrejón, V. (2007). Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de glucosa. *REB*, 49-50.
7. Davis TM, S. I. (1997). Effect of age at diagnosis on diabetic tissue damage during the first 6 years of NIDDM. *Diabetes*, 1435-1441.
8. E., Hernández-Galicia, F., Calzada, R, Román-Ramos, F.J. Alarcón-Aguilar. "Monoglycerides and fatty acids from *Ibervillea sonora* root: isolation and hypoglycemic activity". *Planta Medica*. 2007, 73, 236-240.
9. FID. (2015). Atlas de la Diabetes de la Federación Internacional de Diabetes (Sexta ed.). Bélgica: Karakas Print.
10. Kumar, S. S. (2007). Evidence-based critical evaluation of glycemic potential of *Cynodon dactylon*. *eCAM*, 415-420.
11. M. E., Estrada-Zúñiga, H., Arano-Varela, L, Buendía-González, J., Orozco-Villafuerte. Fatty Acids, Phenols Content, and antioxidant activity in *Ibervillea sonora* callus cultures. 2012. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11 (1), 89-96.
12. Newington, J., Harris, R., & Cumming, R. (2013). Reevaluation metabolism in Alzheimer's disease from the perspective of the astrocyte-neuron lactate shuttle model. *Journal of Neurodegenerative Disease*, 219, 1-13.
13. Hernández, A. "Producción de extractos de *Ibervillea sonora* y su evaluación biológica in vitro e in vivo". Tesis de Maestría, UPIBI-IPN, Bioprocesos. 2011. México.
14. Newington, J., Harris, R., & Cumming, R. (2013). Reevaluation metabolism in Alzheimer's disease from the perspective of the astrocyte-neuron lactate shuttle model. *Journal of Neurodegenerative Disease*, 1-13.
15. Pazos, D. d. (2009). Evaluación del efecto hipolipemiante e hipoglucemiante de extractos de *Turnera diffusa*, *Ibervillea sonora* y *Morinda citrifolia*. Tlaxcala: Instituto Politécnico Nacional.
16. Scobie, I. N. (2007). Atlas of Diabetes Mellitus. United Kingdom: Informa Healthcare.
17. WHO. (2016). Global report on diabetes. France: MEO Design & Communication.

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y POLIFENOLES EN LA CEREZA DEL CAFÉ (*Coffea arabica*)

Diana Ordaz¹, Rosa García¹, Nelio Pastor²

¹ Facultad de Químico Farmacobiología, UMSNH, ²Fac. Ingeniería Civil, UMSNH.

RESUMEN

Las frutas son consideradas como fuentes de antioxidantes, cuyas propiedades fisicoquímicas y nutrimentales son vulnerables a su procesamiento. Actualmente, existe un gran interés en aquellos alimentos que posean la capacidad de inhibir procesos de oxidación. Siendo su consumo asociado con la disminución de enfermedades como el cáncer y aquellas relacionadas con el envejecimiento. El café es una de las mercancías más comercializadas en el mundo, y genera una gran cantidad de residuos o subproductos durante el procesamiento hasta la obtención de la bebida. La cáscara, pulpa y piel comprenden casi el 45% de la cereza del café, y son los principales subproductos de esta industria. El objetivo de este trabajo es aprovechar este producto secundario derivado de la producción del café y explotar sus propiedades nutricionales y antioxidantes para la obtención de un alimento funcional presentándolo como una botana crujiente. Así como también, determinar el índice de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu y la capacidad antioxidante de la pulpa, aplicando los métodos ABTS y DPPH, tanto en la cereza fresca como deshidratada solarmente. Se utilizó la cereza del café en estado maduro y se separó del grano de forma manual. A la cereza del café se le realizó el análisis proximal dando como resultado un alto nivel de fibra 29 % seguido de lípidos en 9 % así como un porcentaje aceptable de proteínas 4%, el contenido de cafeína de 0.42% y en la cereza fresca y deshidratada se obtuvieron resultados 4.13 µg/L y 2.9 µg/L de polifenoles totales respectivamente, de acuerdo con estos resultados la cereza del café puede ser considerada como un alimentos saludable y funcional para su consumo bajo esta presentación.

1. INTRODUCCIÓN

La alimentación cumple funciones nutricionales, hedónicas y simbólicas y cada cultura determina lo comestible, las formas de preparación, distribución y consumo. Desde la cultura se clasifican los alimentos de buenos o malos en función de una tradición, experiencia o una percepción colectiva (Calvo y cols., 2012). Sin embargo los nuevos estilos de vida han provocado que se abandonen ciertos hábitos de alimentación saludables que anteriormente han formado parte de nuestra historia y tradición, estos desequilibrios y desajustes alimentarios están relacionados con la aparición de un gran número de enfermedades. Y es así como en consecuencia de esta situación que surgen los alimentos “funcionales” los cuales pueden compensar estos desequilibrios alimentarios y así garantizar la ingesta de nutrientes recomendadas por expertos en nutrición.

Un alimento puede ser considerado funcional cuando se ha demostrado significativamente que afecta de manera benéfica a una o varias funciones del organismo, aparte de sus efectos nutricionales propios, de tal forma que mejora el estado de bienestar, salud y disminuye el riesgo de enfermedad. Un alimento funcional debe quedar como un alimento y desarrollar sus efectos desde cantidades consumidas consideradas como normales. Un alimento funcional se define como: un alimento natural al que se le añade o se le elimina un componente, se le modifica un componente o se mejora su biodisponibilidad. El número de productos que aparecen en el

mercado bajo la denominación de funcionales ha sido de una gran aceptación por parte del consumidor, sin embargo, hay que ser cuidadoso que la información que se indique en la publicidad y etiquetado sea rigurosa y se ajuste a la realidad sin exagerar los beneficios y las ventajas para la salud que estos productos aporten (Calvo y cols., 2012). Es recomendable incorporar este tipo de alimentos a la dieta diaria pues el fin de ellos es compensar una alimentación desequilibrada, rica en grasas saturadas pero pobre en determinadas grasas insaturadas, minerales, vitaminas y fibra.

Actualmente en el mercado existen diversas variedades de frituras o botanas, que en su mayoría son fritas o hechas a base de harinas beneficiando poco a la salud. Para que este tipo de botanas se puedan manejar como alimento funcional deberá cumplir con ciertas características positivas para que, de tal manera ésta tenga cierta aceptación por parte del consumidor, características tal como, que sea un alimento crujiente que proporcione al consumidor una sensación de placer, goce y satisfacción, otra característica es que este tipo de productos sea libre de procesos de freído, convirtiéndolo así en una botana 100% saludable, reducido en cuanto a su índice calórico, con alto contenido en fibra, además de no contener conservadores. Las botanas creadas como un alimento funcional presentan tanto sus ventajas como sus desventajas, dentro de sus ventajas además de las ya mencionadas en cuanto a su información nutrimental de ser una botana no frita, de productos naturales y libres de conservadores, es que, también se pueden introducir en el mercado infantil, comercializándolas en las escuelas de educación primaria y secundaria, pues se sabe que el país atraviesa una crisis de obesidad en la niñez, otra ventaja sería que se maneja como una alternativa en botanas saludables para el público en general en diferentes establecimientos. Las desventajas a presentar son que existen gran variedad de botanas en el mercado, las botanas fritas están a más bajo costo, las botanas fritas tienen accesibilidad de la competencia a toda población y son un producto poco conocido por la población, entre algunas otras.

El objetivo de este trabajo es aprovechar la cereza del café como producto secundario y como biomasa residual, derivado de la producción del café para explotar sus propiedades nutricionales y antioxidantes presentándolo como una botana crujiente cubierta de chocolate, de tal forma que se rescate éste fruto y que pueda ser considerado como un alimento saludable y funcional para su consumo bajo esta presentación.

2. TEORÍA

Se le denomina café a las semillas provenientes de los arbustos del género *Coffea* de la familia de las Rubiáceas. Se conoce entre más de una docena de especies del género *coffea*, pero solo dos tienen importancia económica debido a su cultivo extensivo, los cuales son el *Coffea arábica*, conocido comúnmente como Arábica que es el que nos interesa, y el *Coffea canéphora* o conocido como Robusta. Existe una tercera especie llamada *Coffea libérica*, conocida también como café de Liberia cuyo cultivo es marginal en comparación con los dos anteriores. La planta del café es un arbusto de hoja perenne, las cuales se encuentran de forma opuestas de color verde brillante, sus flores son de color blanco y crecen en grupos en las axilas de las hojas y son aromáticas. A partir de ellas se producen sus frutos, que son drupas de color rojizo en estado maduro y de un tamaño similar al de una cereza. La gran diferencia entre las dos especies más importantes, está en el grano verde. El grano Arábico es más aplanado y alargado, su color verde es más intenso, y en ocasiones muestra matices azules. En cambio el grano Robusto es más convexo y abombado, con un color verde pálido con matices marrones o grises. La parte exterior del fruto es carnoso y en su interior contiene dos semillas o granos de café, rodeados por una capa membranosa de textura acartonada o conocida también como pergamino. Desde el punto de vista químico el grano de interés que es el Arábico contiene de 1.1 a 1.7 % de cafeína, mientras que el grano de Robusta contiene de 2 a 4.5% de cafeína, en cuanto al sabor, el grano de Arábico es más dulce y aromático, menos amargo y astringente. Dado que el 39 % del fruto maduro del café es pulpa fresca y que el 22% es mucilago, se han buscado medios para utilizar este volumen de desperdicio por así llamarlo, un medio de utilización es para la producción de levaduras alimenticias pues aquí se

aprovecha la máxima cantidad de azúcares del café, pues la pulpa fresca del café contiene 1.57% de sacarosa. Uno de los principales obstáculos para su uso es el alto contenido de agua (50-60%), el café molido contiene 10% de aceite, sin embargo, su extracción no es económica debido a la necesidad de secar el producto antes de la extracción. Otra opción de utilizarlo es para la producción de plásticos a partir del café verde, al cual se le ha extraído la cafeína y aceite. Otra posibilidad, es su uso como material orgánico en la agricultura, así como también reemplazar hasta un 20% de los concentrados comerciales en la alimentación del ganado (Ruiz, 1974).

De los residuos industriales del café puede obtenerse en distintos estados de pureza los mucilagos del café, como los siguientes tipos de sustancias: pectinas sin refinar, azúcares naturales del fruto del café procedentes principalmente del agua del despulpe reciclado que en su mayoría son monosacáridos. Estudios sobre estos subproductos (incluyendo la pulpa, cascarilla, piel plateada y café utilizado) demuestran que tienen una alta actividad antioxidante. Sus propiedades antioxidantes se han atribuido a la presencia de cafeína, trigonelina y ácido clorogénico, entre otros. También se ha reportado que son ricos en carbohidratos, proteínas, pectinas, y algunos otros compuestos bioactivos, como los polifenoles. Las principales características de estos subproductos es que son ricos tanto en fibra como en compuestos polifenólicos, lo que crea el concepto de fibra dietaria antioxidante, haciendo que los mismos tengan mayor preferencia en comparación con otras fuentes de fibra dietaria y que pueden combinarse de varias maneras para hacer una serie de aditivos que puedan tener gran interés para la industria de alimentos saludables.

Los compuestos fenólicos son el grupo más extenso de sustancias no energéticas de metabolitos secundarios presentes en los alimentos de origen vegetal, siendo sus principales fuentes las frutas y verduras o en determinadas bebidas (vino, té, café, etc.). En los últimos años se han demostrado que en una dieta rica en polifenoles vegetales puede mejorar la salud y disminuir la incidencia de enfermedades cardiovasculares. La capacidad de estos polifenoles de modular la actividad enzimática e interferir en mecanismos de señalización y en procesos celulares, puede deberse a las características fisicoquímicas que estos compuestos presentan, pues les permiten participar en distintas reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción. Sus propiedades antioxidantes justifican muchos de sus efectos que benefician a la salud (López, 2011).

La naturaleza y propiedades de los polifenoles varían mucho entre un alimento y otro. Existe un inmensa familia de polifenoles que se pueden clasificar en tres grandes grupos: los ácidos fenólicos, los ácidos hidroxicinámicos y los flavonoides. Estas sustancias se encuentran principalmente en el envoltorio de casi todas las plantas, en especial es sus frutos, las legumbres, cereales y granos. Los polifenoles además de su acción antioxidante, poseen también efectos protectores contra enfermedades vasculares (efectos hipocolesterolemiantes y antioxidantes) y la osteoporosis (efecto de los fitoestrógenos del tipo isoflavonas y lignanos sobre la densidad mineral ósea) (Festy, 2007).

Hoy en día, existe una gran preocupación por los problemas de salud presentes en el país, ya que cada vez aumenta el consumo de la llamada comida chatarra, la cual normalmente no aporta calidad nutricional y su aporte calórico es muy alto, vía grasas y azúcares, y que puede generar sobrepeso y diabetes. Por lo que, al paso del tiempo, se ha ido innovando en el desarrollo de nuevos productos alimenticios e involucrando diferentes factores como costos, salud y calidad. La pulpa del café es rica en nutrimentos y también contiene compuestos químicos importantes como la cafeína y polifenoles con capacidad antioxidante, es por ello que pretendemos rescatar este subproducto de la elaboración de la bebida del café y crear un alimento funcional presentándolo como una botana crujiente, por lo que en esta investigación se propuso evaluar químicamente la cereza del café, deshidratar la pulpa solarmente para después cubrirla con chocolate ofreciendo al consumidor un producto tipo botana de alto contenido nutricional, funcional, innovador, con características sensoriales adecuadas y apto para cualquier edad de la población.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Se empleó la pulpa de la cereza *Coffea arábica* ya en estado maduro, y adquirida de cultivos localizados en zonas aledañas a la ciudad de Morelia, Michoacán. Se lavó y se separó la pulpa manualmente quedando libre del pergamino y grano, posteriormente se procedió a la deshidratación solar. Después se llevó a un tostado en estufa de secado a una temperatura de 100°C durante 15 minutos. A la cereza del café en estado fresco, se le realizó el análisis proximal de acuerdo a la metodología establecida en el AOAC así como también se le determinó el índice de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

4. RESULTADOS

Deshidratación solar y tostado pulpa

Separadas cada una de las partes, se eliminó la humedad contenida en la cereza mediante deshidratación solar obteniéndose un porcentaje de humedad de 13.72%. A éste producto se le valoró mediante pruebas sensoriales, las cuales no resultaron ser favorables dado que la textura obtenida era pegajosa y no crujiente como se esperaba. Por lo que se optó por someter la pulpa a un tostado en estufa a 100°C durante 15 minutos, obteniendo como resultado un 4% de humedad en producto tostado así como una textura crujiente y con un sabor agradable.

Análisis proximal

Los resultados derivados del análisis proximal se muestran en la Tabla 1, pudiéndose observar que la cereza del café es bastante rica en fibra dietética con un porcentaje de 29%, componente químico de suma importancia para el objetivo de ésta investigación.

Tabla 1. Resultados del análisis proximal del fruto *Coffea arábica*

PARÁMETROS (%)	PULPA
HUMEDAD	13.72
CENIZAS	6.16
EXTRACTO ETÉREO	8.85
PROTEÍNA	3.85
FIBRA DIETÉTICA	29.26
CARBOHIDRATOS TOTALES	38.16

Polifenoles totales

Los compuestos fenólicos son sustancias que poseen un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo, e incluyendo derivados funcionales. Los fenoles son metabolitos secundarios de

las plantas que les confieren cualidades deseables como indeseables, tienen un papel importante en el color, en las cualidades sensoriales y nutricias, así como en las propiedades antioxidantes de los alimentos, y que se encuentran presentes en alimentos de origen vegetal. Estos compuestos consisten en dos grupos: flavonoides y ácidos cinámicos. De acuerdo con investigaciones, la actividad antioxidante del café está potencialmente relacionada a su alto contenido de compuestos fenólicos. Dentro de los compuestos fenólicos encontrados en el café, la clase predominante es la de los ácidos clorogénicos. La mayoría de estos compuestos han recibido interés por sus efectos potencialmente protectores en el tratamiento de enfermedades crónicas degenerativas como la diabetes mellitus, cardiovasculares y cáncer (Escobar y Barragán, 2010).

Los resultados obtenidos para la cereza en estado fresco fue de 4.13 µg/L, mientras que para la pulpa deshidratada y tostada de 2.9 µg/L. Esta disminución en concentración de polifenoles se atribuye al proceso de tostado.

En años recientes se ha enfatizado la importancia de los compuestos fenólicos que al ligarse con la fibra dietética no sufren hidrólisis enzimática durante el tracto intestinal. Se sugiere que en forma acomplexada llegan al colon y pueden ser sustrato de fermentación por la microbiota endémica, produciendo efectos benéficos a la salud, y atribuidos a la fibra dietética y antioxidantes ligados como ácido ferúlico, ácido cafeico, catequinas, epicatequinas, derivados de ácido gálico, protocatequinas, ácido parahidroxibenzoico, entre otros (Barrera y Dunia, 2015).

5. CONCLUSIONES

Se pudo obtener una botana elaborada con la pulpa del fruto *Coffea arabica*, deshidratándola mediante un método solar. La pulpa seca es rica en fibra dietética, lípidos y minerales. También contiene polifenoles siendo esto bastante interesante, dada la relación de combinación fibra-antioxidantes, lo cual implica que pueda ser considerada como una botana saludable, potencialmente como un alimento funcional, un snack nutritivo e innovador y con características sensoriales adecuadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barrera, L., Dunia, M. (2015). Universidad Autonoma de Querétaro. Composición química y nutracéutica del residuo sólido del café (*Coffea arabica L.*) utilizado y la actividad de los productos de su fermentación colónica in vitro en un modulo de inflamación.
2. Calvo, S. Gomez, C. Royo,M.. (2012). Nutrición, salud y alimentos funcionales. Madrid: UNED., p. 26, 27 y 28
3. Escobar B., y Barragan H. (2010). Instituto Politecnico Nacional. Extracción de compuestos fenólicos de las cáscaras de cítricos producidos en México.
4. Festy, D.. (2007). Antioxidantes . Barcelona: Robinbook., p. 96
5. Lopez, A. Prado, L. Reyes, M. (2011). La pulpa de café, un residuo fuente de antioxidantes polifenolicos.
6. Ruiz, E. . (1974). utilizacion de subproductos del cafe. Costa Rica: Agrinter., p. 16 y 17

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS AISLADOS DE ARTROPODOS EN CAUTIVERIO DE NUEVO LEÓN.

Amabelly Jassibe Estrada González^{1,2}, Eugenia Guadalupe Ortiz Lechuga¹, Katiushka Arévalo Niño¹ y Carlos Solís Rojas².

¹Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. ²Departamento de Zoología de invertebrados, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

RESUMEN

Los hongos entomopatógenos tienen un gran potencial como agentes de control. Estos hongos se encuentran en la naturaleza, en rastrojos de cultivos, suelo, plantas, etc., logran un buen desarrollo en lugares frescos, húmedos y con poco sol y al dispersarse en el ambiente provocan infecciones fúngicas en las poblaciones de insectos; sabiendo que los hongos entomopatógenos presentan diversas enzimas que le permiten degradar la cutícula del insecto ocasionando la muerte del insecto después de 3 a 14 días iniciada la infección. Siguiendo este enfoque es nuestro objetivo comprobar que los hongos obtenidos de arácnidos presentan una maquinaria enzimática similar a aquella presentada por hongos entomopatógenos con los plaguicidas químicos. En este proyecto se trabajaron con 7 muestras de hongos entomopatógenos aislados de la superficie de tarántulas ubicadas en la colección Aracnológica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Se realizaron raspados a la superficie de los arácnidos los cuales fueron sembrados en agar papa dextrosa (PDA) para la obtención de cultivos puros y en base a esos resultados poder determinar su actividad enzimática. Los ensayos utilizados para determinar actividades enzimáticas de interés fueron: hidrólisis de caseína para la determinación de actividad enzimática de proteasas, medio rodamina B al 0.02% para la determinación enzimática de lipasas y púrpura de bromocresol adicionado con quitina coloidal preparada a partir de quitina de camarón, para la actividad quitinolítica. A partir de 16 aislados recuperados de la superficie de arácnidos, se obtuvieron 2 hongos con actividad proteolítica evaluada por medio de halo de hidrólisis; 2 aislados positivos para la determinación de lipasas determinándose mediante la observación de fluorescencia naranja a 350 nm, mientras que para la determinación de quitinasas, las 7 muestras presentaron actividad enzimática positiva al observar el viraje de color de amarillo morado. Como siguiente paso se realizará la caracterización macro y microscópica de los aislados fúngicos y se realizarán ensayos de semi-cuantificación enzimática.

1. INTRODUCCION

Los hongos entomopatógenos son aquellos que parasitan diferentes órdenes de artrópodos, desde arañas hasta casi todos los grupos de insectos. Existen aproximadamente 700 especies de hongos entomopatógenos en 100 géneros. El proceso de infección está relacionado a la respuesta que tiene el patógeno a su hospedero crítica dictando la secuencia de eventos que culminan en una exitosa infección. La invasión del hospedero, directamente a través de la cutícula, partes bucales, membranas intersegmentales o a través de los espiráculos, sitios donde existe alta humedad que promueve la germinación de las esporas y permite la penetración de las hifas, constituye el principal aspecto de la patogénesis. Se considera que estos microorganismos patógenos actúan por contacto ya que las unidades infectivas, esporas, se adhieren a la superficie de la cutícula a

través de fuerzas hidrófobas debido a la presencia de proteínas ricas en cisteínas llamadas hidrofobinas (Ginns J. 1988).

Una vez en contacto con la cutícula el hongo germina, produce un tubo que empieza a deslizarse sobre la cutícula buscando puntos que faciliten su penetración (Mains, 1998). La penetración es ayudada por la formación de células apresoriales que ejercen presión física sobre el exoesqueleto, además de la producción de enzimas, como proteasas, quitinasas, lipasas y esterases que degradan la cutícula.

Toxinas: Los hongos sintetizan metabolitos con acción tóxica, identificados a partir de los filtrados del cultivo de hongos o mediante la inyección en lepidópteros y dípteros (Ramírez, 1991).

Posterior a la muerte del hospedero, las hifas emergen del cadáver, producen células conidiogénicas y ocurre la esporulación sobre la superficie del hospedero. Los conidios, unidades de dispersión e infección, son diseminados por el viento, la lluvia y por el insecto hospedero, convirtiendo a cada insecto infectado en un foco de infección para la población. El porcentaje de infección o mortalidad resultante está ampliamente gobernado por el estado susceptible del hospedero, la dosis y virulencia del patógeno, el método de aplicación y factores ambientales como la temperatura, humedad, velocidad del viento y estructura de la vegetación (Entomología forestal, 2010).

Meyling y Eilenberg (2007), afirman que los hongos entomopatógenos presentan un reconocimiento cada vez mayor en la biodiversidad de los ecosistemas donde prestan importantes servicios ecosistémicos así como en la producción agrícola ya que según Azevedo y Melo (1998) “pueden eliminar o mantener las plagas en niveles que no ocasionan daños a los cultivos”, por su capacidad natural para regular las poblaciones de insectos, reiterado por Batista Filho (1989); Alves (1998) y Robbs y Bittencourt (1998).

2. PARTE EXPERIMENTAL

Se realizaron raspados de la superficie de artrópodos pertenecientes a la colección aracnológica de la FCB-UANL (Fig. 1)



Fig. 1 Ejemplo de arácnidos micosados

Se obtuvieron 16 aislados fúngicos con características macroscópicas diversas, los cuales fueron resembrados en agar papa dextrosa (PDA) para la obtención de cultivos puros (Fig. 2).

Con los resultados obtenidos, se prepararon los medios para su determinación enzimática, hidrólisis de caseína para la determinación de proteasas, medio rodamina B al 0.02% para la determinación de lipasas y púrpura de bromocresol adicionado con quitina coloidal para la determinación de quitinasas.

En base a los resultados obtenidos, se realizarán posteriormente bioensayos a nivel de laboratorio con insectos lepidópteros prueba para evaluar su potencial entomopatogeno. Para crear una comparación en base a los antecedentes relacionados con investigaciones relacionadas a control biológico.



Fig. 2 Ejemplos de diversidad fúngica obtenidas.

3. RESULTADOS

Hasta la fecha, se han obtenido 7 aislados fúngicos, de los cuales la muestra M4 y MC1 resultaron positivos para producción de proteasas detectada por halo de hidrólisis en medios adicionado con leche descremada al 1% (Fig. 3).

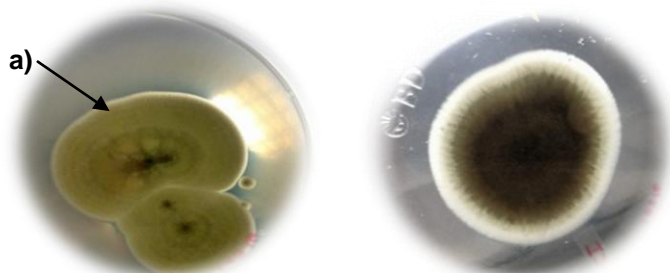


Fig. 3 Muestras positivas para presencia de proteasas (a).

Para la presencia de lipasas se han obtenido 2 aislados positivos, MN1 y MC3, ambas presentando fluorescencia naranja a 350 nm bajo luz UV (Fig. 4).

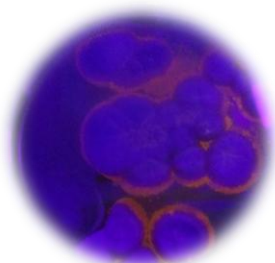


Fig. 4 Muestra positiva para actividad lipolítica.

Finalmente para la detección de actividad quitinolítica, como era de esperarse se obtuvo un 100% de aislados positivos dada la naturaleza de la muestra de donde se aislaron (artrópodos) (Fig. 5).

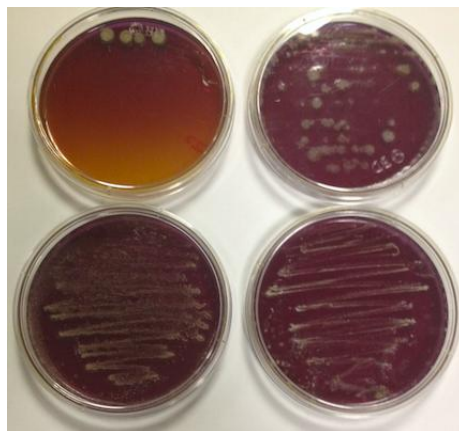


Fig. 5 Muestras positivas para actividad quitinolítica.

4. CONCLUSIONES

Se han logrado aislar 16 hongos de la superficie de artrópodos de la colección aracnológica de la Facultad de Ciencias Biológicas-UANL de los cuales; se obtuvieron en total 7 cepas puras. Se determinó la actividad enzimática (proteasas, lipasas, quitinasas) de cada una de las muestras, obteniendo al menos 1 cepa con la carga enzimática completa (proteasas, lipasas, quitinasas). Como perspectivas se llevara a cabo un análisis semi-cuantitativo de la actividad enzimática en base al índice de actividad enzimática adaptado a ensayo en placa, con posibilidad de realizar un bioensayo con insectos plaga prueba de laboratorio para determinar su potencial como agente de control biológico.

BIBLIOGRAFIA

1. S. B., Alves, Fungos entomopatogênicos. In: Alves, S. B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 289-381.
2. J. L. Azevedo, I. S. Melo, Controle microbiano de insetos - pragas e seu melhoramento genético. Controle Biológico. Jaguariúna: Embrapa, 1998. vol. 1, p. 69-93.
3. A. Batista Filho, Controle biológico e o manejo integrado de pragas. Biológico, v. 55, 1989. pp. 36-39.
4. J. Ginns, Typification of *Cordyceps Canadensis* and *C. capitata*, and new species, *C. longisegmentis*. Mycologia, 80(2), 1988, pp. 217-222
5. E. B. Mains, The Genera *Cordyceps* and *Ophiocordyceps* in Michigan. Proceeding American Philosophical Society. Vol 74, No. 4, 1998, 263-275.
6. N. V. Meyling, J. EILENBERG, Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. Biological Control, v. 43, n. 2, 2007, pp. 145-155.

7. S. Ramírez. Determinación de algunas especies de hongos entomopatógenos de Costa Rica. En Manejo de Plagas (Costa Rica) No. 20-21, 1991, pp. 11-17.
8. C. F. Robbs, A. M. Bittencourt. Controle biológico de insetos. Biotecnología, Ciencia e Desenvolvimento, v. 6, 1998, pp. 71.
9. Entomogenous Fungi of Kyoto. Disponible en: <http://web.kyoto-inet.or.jp/people/ignatius/pages/itiran.htm>
10. Entomopathogenic Fungi Database (EPFDB) [Online] Disponible en: <http://fruit.naro.affrc.go.jp/kajunoheya/epfdb/Ebun/Ehost.htm>
11. Paul Hertzog. Clé des Cordyceps récoltés en Alsace. [Online] Disponible en: http://membres.lycos.fr/sms/bulletin/cle_des_cordyceps.htm
12. Entomología forestal Morales. Consultado el 02 de junio de 2016. [Online]. Disponible en: <http://entomologiafortestalmorales.blogspot.mx/2010/11/uso-de-insectos-depredadores-en-mexico.html>

COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD DE SECUESTRO DE CO₂ EN CLINOPTILOLITA, EPISTILBITA, ERIONITA, MORDENITA Y CAOLINITA COMO CONSTITUYENTES DEL SUELO

Karla Fabiola Quiroz Estrada¹ y Miguel ángel Hernández Espinosa¹

¹ Departamento de Investigación en Zeolitas, ICUAP. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

RESUMEN

Se presentan los resultados experimentales de adsorción de CO₂ en el intervalo de temperaturas de 463-583 K en zeolitas naturales clinoptilolita, mordenita, erionita, epistilbita y en la arcilla caolinita para comparar sus capacidades de adsorción y propiedades texturales. Fueron evaluados los grados de interacción de CO₂ con las zeolitas a través de la evolución de los calores isostéricos de adsorción. Los materiales se caracterizaron por difracción de Rayos X, espectroscopia de dispersión de energía; y su textura fue determinada por adsorción de nitrógeno. Se calcularon los valores de superficie específica por los métodos BET y Langmuir. El volumen total de poro (V_S) fue determinado por la ecuación de Gurvitsch. Los resultados arrojaron que las zeolitas Erionita y Epistilbita mostraron los mejores comportamientos en relación a la cantidad de sustancia adsorbida, sin embargo en la evaluación del calor isostérico de adsorción se observa la presencia de quimisorción a lo largo de la superficie cubierta para la Erionita al tener el mayor valor de superficie específica, mientras que para la Epistilbita el calor de adsorción presenta los menores valores, es decir representa el fenómeno de fisisorción.

1. INTRODUCCIÓN

La adsorción de compuestos orgánicos e inorgánicos en superficies minerales es un proceso importante en la química ambiental ya que estos procesos influyen en el transporte y actividad de contaminantes en los suelos, sedimentos y el agua, por lo tanto afectan la habilidad y biodegradabilidad y el destino de estos contaminantes [1]. La capacidad de adsorción de CO₂ sobre los adsorbentes depende de la temperatura, la presión parcial y el potencial de interacción entre CO₂ y el adsorbente mismo. Así como la morfología de la superficie. La adsorción es considerada a ser uno de los procesos más prometedores usados por nuevas tecnologías para la captura eficiente de CO₂ de corrientes gaseosas. El CO₂ es particularmente importante por su efecto en las condiciones climáticas del planeta ya que este es un gas de larga estadía que permanece activo en la atmósfera por un largo tiempo. Después de su entrada a la atmósfera, el CO₂ se intercambia con los compuestos de corta vida de la biósfera terrestre y la superficie del océano, y es cuando se redistribuye en escalas de tiempo de cientos de años entre los reservorios de carbón activo través del proceso fotosintético de las plantas [2].

El secuestro de dióxido de carbono en los suelos puede depender de la estructura porosa de sus constituyentes y de la composición química de los componentes que constituyan a este suelo. El suelo puede ser considerado como un sistema poroso constituido de dos entidades fundamentales: una parte sólida y una parte porosa [3].

A las entidades huecas se les ha denominado, en forma artificial, como: poros, huecos, antros, cavidades, u oquedades [4]. La clasificación de los poros en función de su tamaño, forma, naturaleza de sitios o enlaces ayuda a anticipar el resultado de algunos fenómenos capilares o de

otro tipo que ocurren dentro de las estructuras porosas. Normalmente los poros están siempre ocupados por uno o más fluidos como agua, aire, aceite, o una mezcla de ellos, etc [5]. Los medios o sólidos porosos pueden ser de origen natural, como las rocas de la corteza terrestre o las sustancias provenientes de diversos organismos vegetales o animales, o el mismo suelo. Esta clase de substratos también pueden ser creados por el hombre y posteriormente modificados mediante tratamientos térmicos (calcinación, sinterización) o mediante tratamientos químicos [6].

Las zeolitas son sólidos altamente cristalinos que están constituidos de microporos como integrantes primarios y de mesoporos como constituyentes secundarios. La mesoporosidad que pueden presentar estos substratos se debe a la presencia de impurezas como arcillas y cuarzo en las rocas zeolíticas de origen natural y de fases amorfas que no alcanzan a cristalizar durante el periodo de síntesis en el caso de las zeolitas sintéticas [7]. Los objetivos del presente trabajo son determinar las propiedades texturales de los materiales así como comparar los resultados experimentales de adsorción de CO₂ por el método dinámico en zeolitas tipo clinoptilolita, erionita, mordenita, epistilbita y la arcilla caolinita a fin de establecer su comportamiento orden de selectividad con respecto a este gas y proponerlos como posibles materiales adsorbedores CO₂.

2. PARTE EXPERIMENTAL

En este trabajo se utilizaron muestras de especímenes de zeolitas naturales sin ningún tratamiento químico adicional, originarios de yacimientos localizados en distintos puntos de la República Mexicana: erionita (ERIN) de Agua Prieta, Sonora, mordenita (MORN) de Cruillas, Tamaulipas, clinoptilolita (CLIN) de Tehuacán, Puebla, epistilbita (EPIN) de Zapopan, Jalisco y la arcilla caolinita (CAON) de San Juan Amecac, Puebla. Los gases usados (He, N₂ y CO₂) son de ultra-alta pureza (99.99 %) y fueron suministrados por INFRA.

Técnicas de Caracterización

Los patrones de difracción de rayos X se obtuvieron en un difractor Siemens D-500 con radiación Cu-K con longitud de onda λ de 1.54 Å.

El análisis elemental se obtuvo mediante un microscopio electrónico de barrido JEOL modelo JSM-5300 equipado con un espectrómetro de energía dispersiva (EDS por sus siglas en inglés), el cual permitió una determinación semicuantitativa de la composición química elemental sobre la superficie de las muestras.

En cuanto a las isotermas de adsorción de N₂, estas fueron medidas a la temperatura de ebullición de nitrógeno líquido (76 K) de acuerdo a las condiciones de altitud 2160 metros sobre nivel del mar de la Ciudad de Puebla, México en un instrumento volumétrico automático de sorción Quantachrome AutoSorb-AS1, en el intervalo de presiones relativas $p/p^0 = [10^{-5}, 0.995]$; la presión de saturación p^0 fue registrada continuamente durante el curso de las medidas de adsorción. Previo a las corridas de adsorción, las partículas de zeolita o arcilla de malla 60-80 fueron desgasificadas a 623 K durante 20 h a una presión inferior a 10⁻⁶ Torr.

Gromatografía de gases- Adsorción de CO₂

Los experimentos de adsorción de CO₂ a diversas temperaturas (463-583 K) sobre los substratos fueron realizados en un cromatógrafo Gow-Mac 350 equipado con un detector de conductividad térmica. Las columnas cromatográficas de acero inoxidable (diámetro interno = 5 mm y longitud = 50 cm) fueron empacadas con gránulos de muestra equivalentes a tamaños de malla 60 – 80. Previo a la adsorción, cada muestra fue pretratada in situ bajo un flujo regulado de He a 573 K durante 8 horas. Posteriormente, se inyectaron 2 mL de CO₂ dosificados en la columna empacada con las muestras a fin de medir el tiempo de retención asociado. Las evaluaciones de la cantidad

adsorbida en función de la presión se realizaron aplicando el método de picos cromatográficos máximos [8]. (GC peak máxima method), empleando helio ($30 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$) como gas de arrastre.

3. RESULTADOS

En la Figura 1a se presenta el patrón de difracción de las muestras en estudio. Se observa que la muestra CLIN exhibe la presencia mayoritaria de la zeolita clinoptilolita (tarjeta JCPDS 3-0427), más cuarzo en $2\theta \sim 27^\circ$ (JCPDS 3-0427) y pequeñas cantidades de montmorillonita (JCPDS 29-1498). Las señales características para CLI están ubicadas en 2θ : $9.85^\circ, 11.08^\circ, 13.03^\circ, 14.84^\circ, 16.86^\circ, 17.02^\circ, 19.04^\circ, 20.73^\circ, 22.35^\circ, 23.88^\circ, 25.42^\circ, 26.24^\circ, 27.00^\circ, 28.09^\circ, 30.01^\circ, 32.31^\circ, 32.57^\circ, 34.80^\circ$ [9]. El patrón de DRX de MORN (Figura 2) es típico de mordenita (JCPDS 29-1257) [20]. Los picos en su patrón son agudos, mostrando la buena cristalinidad del sustrato. Los picos característicos de la mordenita aparecen a los valores de siguientes 2θ : $6.59^\circ, 9.85^\circ, 13.56^\circ, 15.38^\circ, 19.70^\circ, 22.35^\circ, 25.69^\circ, 26.45^\circ, 27.96^\circ$ y 30.99° [10]. También, se observa la presencia de cuarzo en $2\theta \sim 27^\circ$ y pequeñas cantidades de caolinita (JCPDS 001-0527). Para EPIN (figura 2) el patrón de DRX indica la presencia de impurezas pequeñas cantidades de mordenita y cuarzo. En general, todas las muestras de la epistilbita presentan una notable cristalinidad con patrones de difracción relativamente agudos. Las señales características para EPI están ubicadas en 2θ : $9.97^\circ, 22.96^\circ, 25.85^\circ, 29.96^\circ, 39.99^\circ, 47.72^\circ, 60.0^\circ$ [11]. El patrón de DRX de la erionita natural (ERIN) (Figura 2) demuestra las señales características ubicadas en siguientes 2θ : $7.7^\circ, 9.7^\circ, 11.76^\circ, 13.34^\circ, 19.44^\circ, 20.7^\circ, 21.3^\circ, 22.48^\circ, 23.48^\circ, 25.17^\circ, 27.05^\circ, 28^\circ, 30.43^\circ, 31.42^\circ, 32^\circ, 33.41^\circ$ y 35.89° [12]. Finalmente, el patrón de difracción correspondiente a la arcilla indica que la muestra está constituida de caolinita (JCPDS 001-0527), más cuarzo y albita (JCPDS 01-071-1150) (Figura 2). Las señales características están ubicadas en 2θ : $12.42^\circ, 19.96^\circ, 22.02^\circ, 23.47^\circ, 27.69^\circ, 30.44^\circ, 31.89^\circ, 35.53^\circ$ y 53.26° [13].

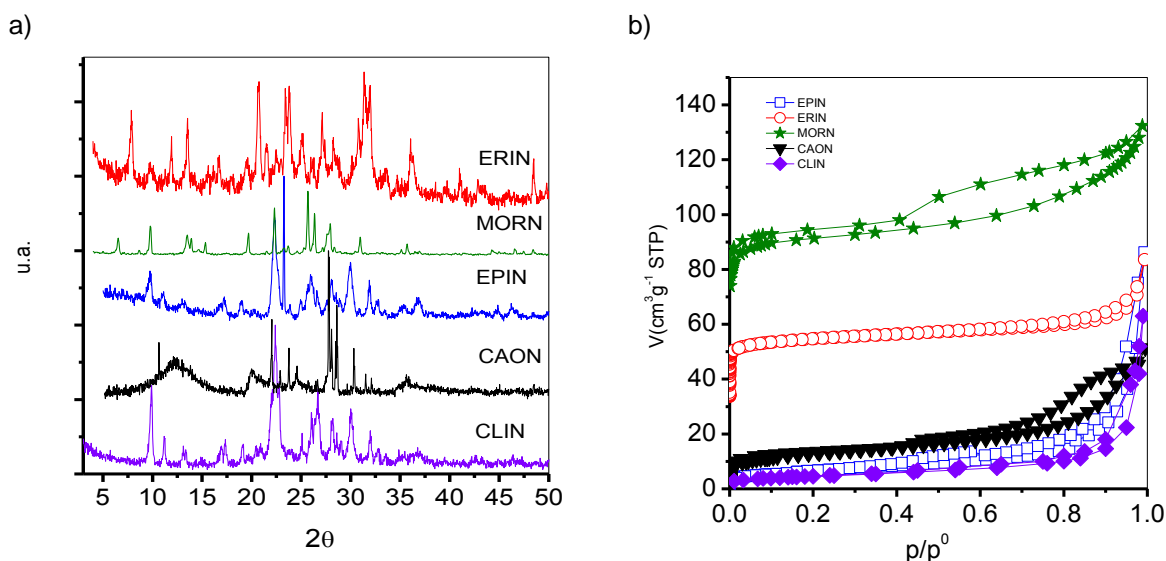


Figura 1. a) Difractograma de rayos X e b) Isotermas de adsorción de N_2 de las muestras en estudio

Las isotermas de adsorción de N_2 en los sólidos estudiados se exponen en la Figura 1b. Mientras que las isotermas de las MORN y ERIN constituyen una combinación de isotermas del Tipo I-IV dentro de la clasificación de la IUPAC [14], las isotermas de las zeolitas CLIN, EPIN y de la arcilla

CAON dentro de esta misma clasificación corresponden a un Tipo IV puro. A diferencia del nítido comportamiento Tipo I que presentan las zeolitas sintéticas durante los procesos de adsorción de gases, casi todas las zeolitas naturales presentan isothermas de adsorción que se desvían del carácter Tipo I especialmente en la zona de altas presiones relativas. Esto se debe tanto a la formación de capas multimoleculares de adsorción como al fenómeno de condensación capilar que se desarrollan en los mesoporos o porosidad secundaria de las zeolitas naturales. La forma híbrida I-IV de las isothermas de adsorción de las zeolitas naturales ERIN y MORN puede ser debida a la presencia de impurezas y materiales amorfos (arcillas, cuarzo, etc.) mezclados con los adsorbentes microporosos. Por su parte las isothermas de adsorción de EPIN, CLIN y CAON describen la formación de un ciclo de histéresis tipo H3 característico por la presencia de poros en forma de placas paralelas o de rendija.

De los datos de composición química evaluados por EDS (Tabla 1) se puede observar el establecimiento de la siguiente secuencia de la relación Si/Al: MORN>CLIN>ERIN>EPIN>CAON. En cuanto a Fe₂O₃ la secuencia es: EPIN>CAON>ERIN>CLIN> MORN. Por su parte para CaO: CLIN>CAON>MORN>EPIN>ERIN, y finalmente para Na₂O la secuencia es: MORN>ERIN>CLIN>CAON>EPIN.

Tabla 1. Composición química elemental de las muestras (EDS).

	CLIN	CAON	ERIN	EPIN	MORN
SiO₂	67.07	33.39	54.85	45.38	72.12
Al₂O₃	11.31	17.12	11.21	18.03	11.96
Fe₂O₃	1.21	2.52	1.8	3.67	0.83
CaO	3.57	2.76	1.22	1.38	1.94
MgO	0.68	-	1.19	0.66	-
Na₂O	2.90	2.52	3.69	1.65	5.98
K₂O	0.52	-	2.31	-	1.25
Si/Al	5.93	1.95	4.89	2.516	6.01
PxC	6.81	39.74	18.84	29.23	5.92

En la Tabla 2 se reportan los resultados texturales (áreas superficiales, volúmenes y diámetros de poro) obtenidos del análisis de las isothermas N₂. Se establece el siguiente orden secuencial con respecto a la superficie específica evaluada por el método BET: A_{SB}: MORN>ERIN>EPIN>CAON>CLIN. Un comportamiento similar lo presenta el volumen total de poros V_Σ el cual fue evaluado a p/p⁰ = 0.95 por la regla de Gurvitsch [15]. Se observa que los valores de la constante C_B de la ecuación BET adquieren valores negativos para las zeolitas ERIN, MORN y EPIN mostrando una inoperancia de este modelo teórico de adsorción. Esto puede ser explicado por el hecho de que la adsorción en microporos no está contemplada dentro del modelo

BET, dado que se supone que la adsorción multimolecular no es físicamente posible en cavidades tan pequeñas como los microporos. Por su parte, los valores de las propiedades texturales de la arcilla CAON y las zeolitas CLIN se describen adecuadamente con la ecuación BET.

Tabla 2. Parámetros texturales obtenidos a partir de las isotermas de adsorción de N₂

Adsorbente	A _{SL} m ² g ⁻¹	A _{SB} m ² g ⁻¹	C _B	V _Σ cm ³ g ⁻¹	Dp _{BJH} nm
CLIN	21	13	65	0.031	3.51
ERIN	244	169	-70	0.101	---
EPIN	45	62	-111	0.048	1.77, 3.51
MORN	211	137	-120	0.106	3.51
CAON	66	45	270	0.064	3.51, 9.82

El método dinámico de cromatografía de gases a grados de cobertura bajos fue utilizado para evaluar las isotermas de adsorción obtenidas de los datos de las curvas de elución del CO₂ sobre las muestras usadas en este estudio. Isotermas de adsorción de CO₂ a diferentes temperaturas son presentadas en la Figura 2. Se observa que a una p= 20 mmHg se establece la siguiente secuencia en cuanto a la cantidad de sustancia adsorbida a473K: ERIN> EPIN> CAON > MORN >CLIN; a 523K: EPIN>ERIN> CAON> MORN >CLIN; y finalmente a 573K la secuencia es la siguiente: EPIN>ERIN = CAON > MORN >CLIN.

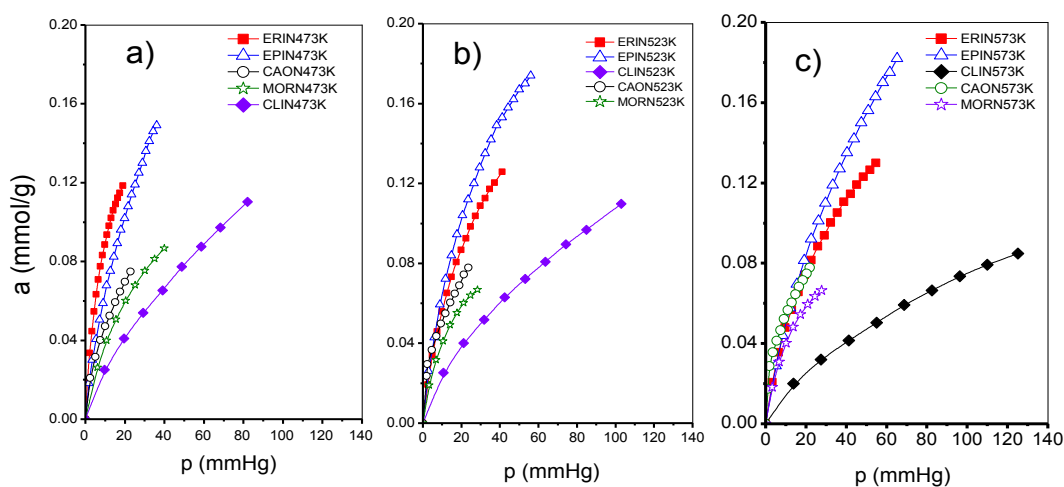


Figura 2. Isotermas de adsorción de CO₂ a) 573 K b) 523 K y c) 473 K

En la Figura 3 se presentan los resultados de la variación del calor isostérico de adsorción q_{iso} de CO_2 en función de la cantidad adsorbida sobre CLIN, ERIN, CAON, EPIN y MORN. El calor isostérico de adsorción de ERIN primero aumenta ligeramente al aumentar la cantidad de CO_2 adsorbido, y a medida que se incrementa la cantidad de sustancia adsorbida comienza a decrecer

continuamente. El comportamiento de q_{st} en ERIN para $a > 0.03 \text{ mmol g}^{-1}$ es un fenómeno que se observa frecuentemente al estudiar la adsorción de gases y vapores en distintos adsorbentes naturales. La explicación clásica se fundamenta en que existen distintos sitios de adsorción desde un punto de vista energético, los cuales son ocupados jerárquicamente por las moléculas del adsorbato (desde los de mayor energía hasta los de menor energía), es decir la superficie es energéticamente heterogénea [16]. Se observa que los valores de los q_{st} en esta zeolita exceden los valores del calor de licuefacción indicando el establecimiento de enlaces de tipo químico entre el CO_2 y los centros activos que están ubicados en el enrejado de esta zeolita. Similar comportamiento lo presenta la arcilla CAON y las zeolitas MORN y CLIN.

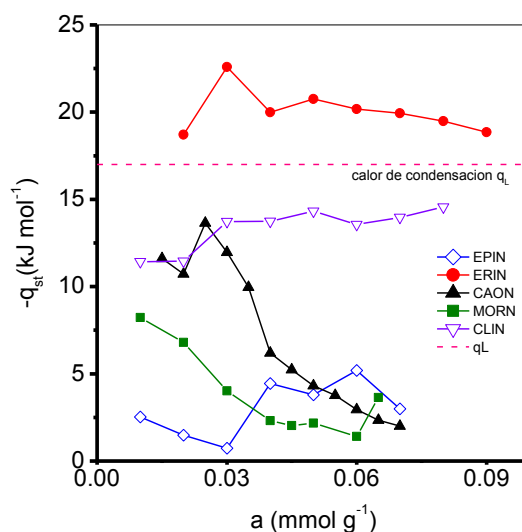


Figura 3. Representación gráfica del comportamiento de los calores isostéricos de adsorción de CO_2

Los valores menores en el q_{st} lo presenta la zeolita EPIN. Para la adsorción a grados de cobertura bajos, el q_{st} está relacionado a la interacción entre la superficie del adsorbente y las fuerzas moleculares de adsorción. En esta zona, la accesibilidad y el tamaño de poro pueden ser factores importantes como es el caso para las zeolitas MORN, CLIN y EPIN, debido a que su porosidad está bloqueada por cuarzo y albita (ver patrones de DRX) o en el caso de la arcilla por la presencia de albita y cuarzo. En el caso de la zeolita ERIN estudiada, los resultados muestran que el q_{st} del CO_2 es muy alto en toda la zona de cobertura de adsorción. Las ligeras fluctuaciones en las curvas del q_{st} que exhiben todos los adsorbentes estudiados podrían ser relacionadas a interacciones laterales entre las moléculas adsorbidas o a efectos cooperativos entre estas mismas moléculas [17].

4. CONCLUSIONES

La adsorción de CO_2 depende de la composición química y estructura de los materiales que se estudiaron, obteniendo que las interacciones obtenidas a través del cálculo de los calores de adsorción se incrementan a medida que se va aumentando la cantidad de sustancia adsorbida

describiendo comportamientos heterogéneos. Las magnitudes del calor isostérico de CO₂ son diferentes para cada componente del suelo y están relacionadas directamente a las interacciones entre cierto tipo de centros de adsorción o cationes predominantes en cada zeolita o del caolín. La utilización de materiales cristalinos como las zeolitas y arcillas contenidas en el suelo representa una opción viable para su utilización en procesos de remoción de contaminantes como el CO₂, al ser estos de bajo costo y fácil acceso que los convierte en sumideros eficientes para el secuestro de dicho gas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Filimonova, S.V.; Knicker, H.; Koegel-Knabner T.I., "Soil micro- and mesopores studied by N₂ adsorption and ¹²⁹Xe NMR of adsorbed xenon", *Geoderma*, no. 130, 2006, pp. 218–228.
2. Solomon, S.; Qin, D.; Manning, M.; Marquis, M.; Averyt, K.; M. Tignor, M. B.; H. L. Miller Jr., and Chen, Z. Eds. *Climate Change 2007: the physical science basis: Working group I contribution to the fourth assessment report of the IPCC (Vol. 4)*. Cambridge University Press, *Climate change 2007-Cambridge University Press*, 26, (2007), available online: https://www.ipcc.ch/publications_and_data/publications_ipcc_fourth_assessment_report_wg1_report_the_physical_science_basis.htm
3. Françoise Rouquerol, Jenn Rouquerol, Kenneth Sing, P. Llewellyn, and G. Maurin, "Adsorption by Powders and Porous Solids": Academic Press, 2014.
4. L. López, M.A. Hernández, J. Ruiz, M. Carcaño, G. Medina, R. Portillo y J. Muñoz, "Adsorción de ácidos carboxílicos de origen vegetal y bacteriano en un suelo agrícola", *Terra Latinoamericana*, no. 30, 2012, pp 261-270.
5. W.J. Weber and W.L. Huang, "A Distributed Reactivity Model for Sorption by Soils and Sediments. 10. Relationships between Desorption, Hysteresis, and the Chemical Characteristics of Organic Domains", *Environ. Sci. Technol.*, no. 30, 1996, 2562–2569.
6. M.A. Hernández and F. Rojas, "Adsorption Characteristics of Natural Erionite, Clinoptilolite and Mordenite Zeolites from Mexico" *Adsorption*, 6, 2000, pp. 33-45.
7. Database of zeolite structures. Consultado el 27 de abril de 2016, página web de la Asociación Internacional de Zeolitas: <http://www.iza-structure.org/databases/>
8. X. Canet, J. Norkman, M. Frare, "Determination of the Henry Constant for Zeolite-VOC Systems Using Massic and Chromatographic Adsorption Data", *Adsorption*, no. 11, 2005, 213-216.
9. F. Rouquerol, J. Rouquerol, K. S. W. Sing, *Adsorption by powders and porous solids*, Academic Press, London, 1999.
10. M. A. Hernández, A. I. González, F. Rojas, V. H. Lara, F. Silva, "Quantitative Study of the Adsorption of Aromatic Hydrocarbons (Benzene, Toluene, and p-Xylene) on Dealuminated Clinoptilolites", *Ind. Eng. Chem.*, no. 44, 2005, pp 2908–2916.
11. A. Susarrey-Arce, V. Petranovskii, M. Herrera-Zaldívar, M. A. Hernández-Espinosa, R. Portillo, W. de la Cruz. "Optical Properties of ZnO Nanoparticles on the Porous Structure of Mordenites and ZSM-5", *J. of Nanoscience and Nanotechnology*, no. 11, 2011, 5574-5579.
12. M. A. Hernández, F. Rojas, M. A. Salgado, R. Portillo, L. Corona and A. De la Cruz, *Zeolite 2014 – 9th International Conference on the Occurrence, Properties and Utilization of Natural Zeolites*, Belgrade, Serbia, 2014.
13. M. A. Hernandez, A. Pestryakov, R. Portillo, M.A. Salgado, F. Rojas, E. Rubio, S. Ruiz and V. Petranovskii, "CO₂ Sequestration by Natural Zeolite for Greenhouse Effect Control", *ProcediaChem*, no. 15, 2015, pp. 33-4.
14. B. Meroufuef, O. Benali, M. Benyahia, Y. Benmoussa, M. A. Zenasni, "Adsorptive removal of anionic dye from aqueous solutions by Algerian kaolin: Characteristics, isotherm, kinetic and thermodynamic studies" *J. Mater Environ. Sci.*, no. 4, 2013, 482-491

15. S. J. Gregg, K.S.W. Sing, Adsorption, Surface Area and Porosity, 2nd ed. (Academic Press, London, 1995).
16. J. C. Groen, L. A. Peffer and J. P. Ramirez, "Pore size determination in modified micro- and mesoporous materials. Pitfalls and limitations in gas adsorption data analysis", *Micropor. Mesopor Mat*, no 60, 2003, 1–17.
17. K. S. W. Sing, R.T. Williams, "The Use of Molecular Probes for the Characterization of Nanoporous Adsorbents" *Part Part Syst. Charact.* 21, 2004, pp. 71-79.

EVALUACIÓN SENSORIAL DE BOMBONES DE CHOCOLATE MEXICANO RELLENOS CON VINO TINTO SHIRAZ.

Chef Michel Camas, Araceli Jiménez Martínez, Libertad Márquez Fernández

Escuela de Gastronomía y Turismo, Universidad de la Sierra A.C.

RESUMEN

El bombón de chocolate tiene su origen en el siglo XVIII, en la corte francesa, cuando el pastelero del rey le presentó frutos bañados en chocolate.⁽¹⁾ El chocolate consumido como bebida prehispánica preparada a partir del cacao de origen mesoamericano, actualmente extendido en todo el mundo, presentado en una variedad amplia de productos con diversos rellenos, fabricados por empresas nacionales y de otros países^(2,3). El vino tinto shiraz se produce en el valle de Parras Coahuila, de la casa madero fundada en 1893, y la producción del vino shiraz en 1999. El chocolate utilizado para la elaboración fue la marca Mayordomo fabricado en Tlacolula, Oaxaca por una empresa familiar a partir de 1956 en el que se emplean ingredientes con certificado de origen⁽⁴⁾. El objetivo de esta investigación es incluir un relleno de vino tinto Shiraz de la casa Madero, en bombones utilizando el chocolate Mayordomo para su elaboración, evaluando la aceptabilidad mediante prueba sensorial, con 30 consumidores de ambos sexos, mediante una escala hedónica de 7 puntos; se determinó la aceptabilidad y preferencia correspondiente entre la calificación 6 “Me gusta mucho” y 7 “Me gusta muchísimo”,⁽³⁾

1. INTRODUCCIÓN

Quetzalcóatl, dios del viento y sacerdote, enseñó a los hombres la agricultura, la industria y el arte, les regaló el maíz y el cacao; semilla cultivada por los aztecas, conocida en jeroglíficos del año 1000 a.C. por la cultura maya; tostando estas semillas, molidas, agregando agua fría, especias y miel, al mezclar se obtiene una bebida espumosa llamada en lengua Nahuatl Xocolatl.

Hernán Cortes, comercializó las habas de cacao y difundió como bebida, ante el rey Carlos I pero no agradó a los europeos por lo que a la bebida se le añadió azúcar. Al final del siglo XVII se inventan artefactos para elaborar chocolate caliente, una máquina que separa la manteca del cacao y se obtiene el polvo. Henry Nestlé descubrió la primera tableta de chocolate con leche combinada elaborada por Daniel Peter. El chocolate mexicano es utilizado para la preparación de bebidas; en 1956 surge una empresa familiar en Tlacolula, Oaxaca; que elabora chocolates en tabletas y barras con diversas proporciones de cacao, manteca de cacao y otros ingredientes. El bombón se origina en el siglo XVIII, en la corte francesa del Rey Luis XV, cuando el pastelero le presentó frutos bañados en chocolate, el rey exclamó “bon bon”, expresión que derivó en bombón. Los bombones comercializados en México provienen de países europeos o son fabricados con chocolate de estas empresas.

La Casa Madero fundada en 1893 en Valle de Parras Coahuila produce el vino tinto shiraz a partir de 2001, reconocido mundialmente por su calidad, con 13.9% de grado alcohólico, de color púrpura con destellos violáceos, con retrogusto a chocolate.

2. TEORÍA

Temperar o atemperar un chocolate tiene como principio el enfriamiento suficiente para la formación de cristales, el conocimiento de los estados cristalinos es importante en la elaboración de bombones, primeramente es inducir la pre cristalización parcial de la manteca de cacao, esta manteca es una mezcla de triglicéridos, pueden tener la estructura del palmítico, oleico o esteárico, las propiedades físicas de la manteca dependen de cómo se ha formado esta estructura y de las proporciones relativas de éstos ácidos que pueden concretarse en varias formas polimórficas; por esta razón cuando se realiza mal la pre cristalización puede producirse exudación grasa por lo que la cantidad de partículas sólidas aumenta ligeramente aumentando su viscosidad y se obtendrían bombones pegajosos, faltos de brillo, fractura y color.

Al comprar un chocolate de calidad, éste ya está templado y al fundirlo para preparar productos de bombonería con moldes se tiene que destemplar, por lo cual se dispersa y se provoca la separación de los cristales. La función del templado es re agrupar los cristales de nuevo mediante una adecuada curva de templado para prevenir la aparición de la eflorescencia de grasa y para que el chocolate tenga brillo durable, resistencia al calor y sea crocante

Para conseguir un correcto atemperado se realizan las siguientes etapas en la primera etapa del atemperado el chocolate debe quedar libre de cristales aproximadamente se consigue a una temperatura de ± 41 °C; la segunda etapa consiste en enfriar suavemente mediante la agitación producida por una espátula mezcladora para favorece el reparto de los núcleos produciendo una estructura fina y homogénea de pequeños cristales; es importante dejar suficiente tiempo para que maduren los cristales reduciendo gradualmente la temperatura para inducir la siembra e iniciar las primeras fases del crecimiento de cristales; en la tercera etapa se hace un recalentamiento para la manteca de cacao y en la siguiente etapa de retención se logra la maduración cristalina.

El atemperado del chocolate se comprueba tomando una muestra y se coloca en una cuba a 20°C; si el chocolate se solidifica rápidamente con aire en reposo y queda con muy buen brillo el atemperado está cercano a su punto óptimo.

El vino Tinto shiraz de la casa Madero se da a conocer comercialmente en 1999, después de haber sido liberado con 12 meses de barrica, forma parte de los vinos de reserva. En conjunto con la Universidad de Adelaide de Australia se inició la plantación de la uva shiraz, fácil de cultivar, poco vulnerable a las enfermedades, pero difícil la elaboración de vinos de calidad ya que requiere controles estrictos y crianza en barricas de roble; sin embargo el vino resultante es tinto, opulento, vigoroso, potente, de textura sedosa, con cuerpo, taninos, característico aroma profundo a violeta y cassis con ligero toque ahumado y gran capacidad de envejecimiento.

El vino shiraz es amable y sabroso, el color es intenso, refinado, sólido y austero, especiado y de acidez destacable. Nota de Cata indispensable en la apertura de aplicaciones inesperadas:

Color púrpura con destellos violáceos.

Aromas a caramelo, champiñones, cassis, chocolate con almendra, flor de violeta, frutos negros y mora silvestre.

Taninos incipientes, acidez franca, dejando paso a moras, hongos silvestres, vainilla y chocolate en el retrogusto.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Para el desarrollo de los bombones, se realizaron varias pruebas con diferentes chocolates utilizando

Chocolate Turín semi amargo.
Chocolate Turín blanco.

Los dos chocolates de la marca Turín, son ideales para la realización de bombones, pero por el tipo de relleno resultaron muy dulces.

Para la preparación de los bombones se investigó que tipo de chocolate mexicano sería apto a utilizar, después de varias pruebas con diversas marcas, se utilizó la marca Mayordomo de la empresa del mismo nombre procedente de Tlacolula, Oaxaca; que utiliza la variedad de cacao Theobroma ovalifolium, conocida como cacao criollo. Se hicieron pruebas con los chocolates:

Mayordomo Premier
Mayordomo 100% cacao

El chocolate Premier no es ideal para temperar, contiene azúcar y no permite su uso en chocolatería. El chocolate 100 % cacao fue el ideal para el uso de bombones ya que tiene las características apropiadas para su uso en chocolatería se puede temperar. El sabor del chocolate es muy amargo por lo mismo de que contiene 100% cacao, pero con el tipo de relleno que se está utilizando nivela los sabores de amargor.

Para obtener el bombón adecuado, se fundió el chocolate a una temperatura de 45° a 50°C, se trabajó en una mesa de mármol y se descendió la temperatura a 27°C, regresándolo al fuego hasta que alcance una temperatura de 31°C.

Se preparó la fruta con el vino shiraz para realizar el relleno y se procedió a realizar los bombones. Los bombones obtenidos gozan de las características: Brillo, consistencia, calidad, sabor, que lo identifican como tal.

4. CONCLUSIONES

Para la prueba de aceptación se utilizó una prueba afectiva escalar con escala hedónica de 7 puntos bipolar, con 30 consumidores de ambos sexos, se determinó la aceptabilidad y preferencia correspondiente entre la calificación 6 “Me gusta mucho” y 7 “Me gusta muchísimo”, en sus características sensoriales.

Prueba afectiva de aceptabilidad

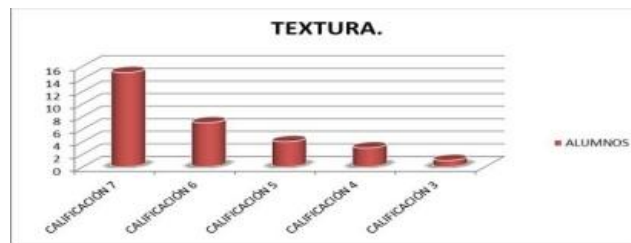
El brillo en los bombones obtuvo una calificación de 6.2, como se muestra en el siguiente gráfico



Al olor los degustadores le otorgaron la calificación promedio de 6.1



La textura de los bombones obtuvo la calificación de 6



La calificación promedio en el sabor fue de 6.2



Después de varias pruebas para encontrar el tipo de chocolate y marca mexicana se compararon los bombones que se obtuvieron de tres tipos de chocolate, comparando su brillo y textura visualmente después de varias formulaciones, se hizo una prueba de ordenamiento hedónico en la que se obtuvo preferencia significativa para la muestra correspondiente a la formulación en la que se utilizó el chocolate mayordomo 100% cacao para una $p < 0.05$.

Con respecto al relleno con vino tinto shiraz se utilizó por la característica de retrogusto y aroma a chocolate entre otras, que hicieron posible su elaboración y se utilizó higo para disminuir el amargor característico del tipo de chocolate. La formulación desarrollada aceptada no lleva aditivos de ninguna especie.

Es posible desarrollar productos diversos a partir de chocolate mexicano y no solo presentarlo como una pasta para elaborar bebidas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Casa Madero (2014), Historia de los vinos del Valle de Parras, Editorial Casa Madero
2. Empresa Mayordomo (2011), Historia de la Empresa, Ediciones Chocolate Mayordomo
3. Franco J. et al. (2012), Ciencia con sabor a Chocolate, expo-chocolate, Universum.unam.mx
4. Lousada Patricia (2000), El libro del Chocolate, Editor Javier Vergara
5. Muñoz Juan (2006), La cata de vinos, Ediciones Timus Mas
6. Ramírez Juan Sebastián,(2012), Análisis Sensorial: pruebas orientadas al consumidor, Ed. Universidad del Valle Colombia
7. Sancho J., E. Bota, J.J. de Castro (2002), Introducción al Análisis Sensorial, Edicions Universitat Barcelona

LA VISIÓN BIOFÍSICA DE LA VIDA

Arturo Reyes Lazalde¹, Marleni Reyes Monreal² y María Eugenia Pérez Bonilla¹

¹Escuela de Biología, BUAP. ²Escuela de Artes Plásticas y Dirección General de Innovación Educativa, BUAP

RESUMEN

El funcionamiento de los seres vivos, desde el cuerpo completo hasta el organelo más sencillo, es extraordinariamente complejo. La biofísica es una ciencia esencialmente cuantitativa, que permite viajar al interior del cuerpo y de la mente, para analizar la complejidad biológica mediante modelos físicos y matemáticos. La mentalidad biofísica percibe y piensa los códigos de la vida numéricamente. Actualmente, la biofísica ya no se limita a cálculos numéricos, se apoya de diversas herramientas disciplinarias: física, matemáticas, computación, química y biología entre otras, para generar nuevos conceptos sofisticados que se desarrollan para construir un área muy amplia y variada del pensamiento humano, que van más allá de un temario escolar típico. Los modelos biofísico-matemáticos permiten realizar experimentos virtuales, inclusive imposibles de efectuar en la realidad; pero posibles en computadora y la mente humana. Los resultados conducen a hipotetizar, teorizar y construir nuevas realidades para beneficio de la humanidad. La formación y desarrollo de una mentalidad biofísica generará creatividad y un sentido inquisitivo inagotable, construyendo nuevos entendimientos que transformarán a la naturaleza en un camino sinfín e inagotable, abriendo nuevas líneas científicas. La biofísica es una aventura del pensamiento, que encuentra el máximo placer por el descubrimiento, capaz de predecir y adelantarse a los hallazgos experimentales. Las aportaciones de varios biofísicos han sido reconocidas con premios Nobel. La biofísica no debe buscarse solamente en los contenidos temáticos, sino en las personas que la construyen, en sus vidas, sus fracasos, sus aciertos y toda la gama de emociones que se viven cuando se descubre un secreto de la naturaleza. La biofísica aporta diversos matices, sus posibles verdades son siempre escurridizas y objeto de acaloradas polémicas, pareciera que las historias de sus creadores y sus resultados son tan diferentes, como cabría imaginar; pero que en realidad están relacionadas de un modo sorprendente y fascinante.

1. INTRODUCCIÓN

Los seres vivos como objeto de estudio son considerados complejos en sí mismos. Esta condición ha impulsado la curiosidad y el sentido investigativo de centenares de científicos. Cada uno de ellos utiliza las herramientas más novedosas o sofisticadas de su tiempo con la ilusión de comprender cómo es que funcionan. Se piensa, razonablemente, que el estudio del hombre permitirá para toda la humanidad una mejor y mayor tiempo de vida. Es difícil estudiar profundamente la fisiología y anatomía humana debido a las implicaciones éticas que implica. Mucho del conocimiento que se sabe al respecto, en realidad es extrapolado del estudio en animales de laboratorio. Desde donde quiera que se estudie los resultados son siempre sorprendentes y maravillosos. Cualquier órgano, tejido, célula, molécula envuelve una gran cantidad de enigmas. Algunos de ellos descubiertos por casualidad y muchos otros por el trabajo tenaz de grandes hombres que lo han dejado todo para concentrarse en sus investigaciones. Físicos, biólogos, químicos, fisicoquímicos, médicos, matemáticos y actualmente computólogos, ¡todos a bordo!; cada uno de ellos con un sinfín de herramientas, técnicas, teorías y grandes esperanzas por comprender algún aspecto que nadie antes los ha descubierto. Todo el conjunto

forma la biofísica y cada parte se relaciona e interacciona una y otra vez. ¿A qué campo disciplinario pertenece la biofísica? ¿Es parte de la física? ¿Es parte de la biología? ¿Es parte de la neurociencias? La biofísica es multidisciplinaria, pertenece a todas, no por separado, sino en conjunto. Todas las disciplinas convergen en este campo. Al final, después de cierto tiempo, todos han contribuido en la construcción de una hipótesis o de un modelo que está listo para ser evaluado, modificado, afirmado o descartado.

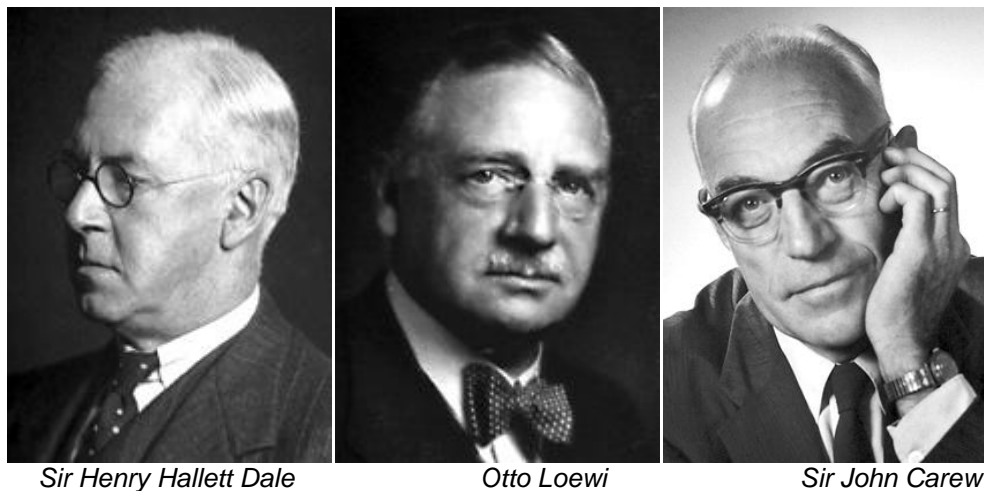
Uno de los tejidos más estudiados y, aún, menos entendido es el tejido nervioso. Su estudio implica comprendernos a nosotros mismos. La complejidad del sistema nervioso queda de manifiesto tan solo con el número de neuronas que lo componen; no se diga por las numerosas actividades que puede realizar: pensar, sentir, moverse, calcular, etc. Todo empezó con el descubrimiento de una técnica de tinción celular lograda por Camilo Golgi y por la tinción de las células del cerebro por Santiago Ramón y Cajal [1]. Premios Nobel de fisiología y medicina en 1906. Entonces, emergió la doctrina de la neurona, a finales del siglo XIX.



Fig. 1. Santiago Ramón y Cajal. Tomada de su autobiografía "Recuerdos de mi vida". Centro Virtual Cervantes [1].

Se propuso que la comunicación entre las neuronas se puede realizar eléctricamente y químicamente. Fue en los trabajos de Sherrington y Schafer de 1897 donde aparece por primera vez el término "sinapsis" [2]. Sherrington dedicó toda su vida al análisis de la conducta refleja en términos de acciones sinápticas excitadoras e inhibitoras; obtuvo el premio Nobel en 1932. La naturaleza química de las sinapsis fue mostrada por Langley en 1901 [3]. Un extracto de glándula suprarrenal estimula uno o más nervios simpáticos. Dixon en 1904 [4] y posteriormente Otto Loewis en 1921 establecieron sin lugar a dudas la transmisión química en el corazón. Henry Dale realizó estudios sobre excitación y transmisión química [5]. Loewis y Dale recibieron el premio Nobel en 1936. Con todos estos descubrimientos, se inicia el estudio de la sinapsis con técnicas electrofisiológicas. Se abre paso una de las técnicas propias de la biofísica. Fue Eccles en 1937 quien inicia el registro extracelular del potencial sináptico en ausencia de un potencial de acción

[6]. En 1955 fue el primero en realizar registros intracelulares en ganglio simpático de mamífero. Eccles fue reconocido en 1963 con el premio Nobel.



Sir Henry Hallett Dale

Otto Loewi

Sir John Carew Eccles

Fig. 2. Investigadores que participaron en la construcción de los conocimientos en las sinapsis. (Fotos obtenidas de: Nobelprize.org)

La biofísica de la sinapsis

Una manera común de proceder en la biofísica del sistema nervioso es hacer uso de un modelo eléctrico que explique el fenómeno estudiado. Se trata de un modelo fenomenológico explicativo. Esta manera de proceder fue usada por Hodgkin y Huxley en 1952 [7]. En su trabajo propusieron el paso de iones a través de la membrana celular por unas partículas que posteriormente se identificaron como canales iónicos. Desde entonces, cada canal iónico es representado por una resistencia variable conectada en serie a otras resistencias variables y a un capacitor. La diferencia que existe en las concentraciones iónicas dentro y fuera de la célula está representada por baterías conectadas en serie a las resistencias variables. La actividad eléctrica de la sinapsis se puede reproducir de la misma manera con un circuito eléctrico. Para el caso de las sinapsis químicas las proteínas que forman el canal tienen un segmento que es el receptor del neurotransmisor. Como puede observarse existen pequeños cambios en la concepción física del modelo comparado con el modelo de canales iónicos dependientes de voltaje estudiado por Hodgkin y Huxley [7].

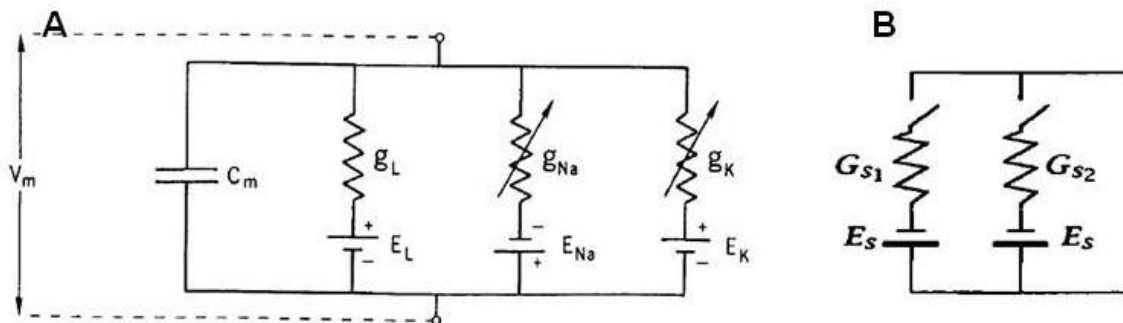


Fig. 3. Circuitos eléctricos. (A) modelo de axón y (B) modelo en una sinapsis. Se observa en (A) cómo los canales iónicos están representados por resistencias variables. Y en (B) los canales

iónicos se accionan con un interruptor que representa el receptor. Cuando el neurotransmisor se une al receptor “el interruptor se activa”.

El siguiente paso es obtener las ecuaciones que explican la función de estos circuitos. Generalmente se trata de ecuaciones diferenciales no lineales que tienen solución relativamente fácil con métodos numéricos en la computadora. Desde luego, existen otros caminos para llegar a modelos matemáticos que describen la función de la neurona en varios de sus aspectos. Por ejemplo, se pueden obtener a partir de leyes físicas y teoremas que llevan a modelos de disparo neuronal. Cada potencial de acción es una espiga que no tiene la forma detallada descrita por el modelo de Hodgkin y Huxley. Sin embargo, nos permite hacer un análisis dinámico del proceso o construir la interacción entre dos o más neuronas que forma una red.

La biofísica de la sinapsis en la placa terminal.

Katz, Kuffner y Eccles en 1941 y 1942 inician el estudio biofísico del nervio y el músculo. Elucidaron la naturaleza del potencial de placa. Para estas investigaciones se usó una preparación del nervio ciático con el músculo sartorio de rana después de ser expuesta a curare para evitar la contracción muscular [8]. Se inicia una nueva era, 50 años después de los trabajos pioneros de Langley y Sherrington.

En 1952 Fatt y Katz registraron potenciales miniatura en la placa terminal de músculo sartorio de rana tratado con prostigmina. Estos potenciales se presentan de manera espontánea y al azar [9]. El tratamiento estadístico efectuado a estos datos experimentales mostró la presencia de múltiplos de una unidad que llamaron cuanta. La unidad básica en la sinapsis. Se predice entonces la presencia de vesículas en la terminal presináptica. Posteriormente, se confirmó que este cuanta corresponde al efecto del neurotransmisor contenido en una vesícula sináptica.



Fig. 4. Sir Bernard Katz (Foto obtenida de: Nobelprize.org).

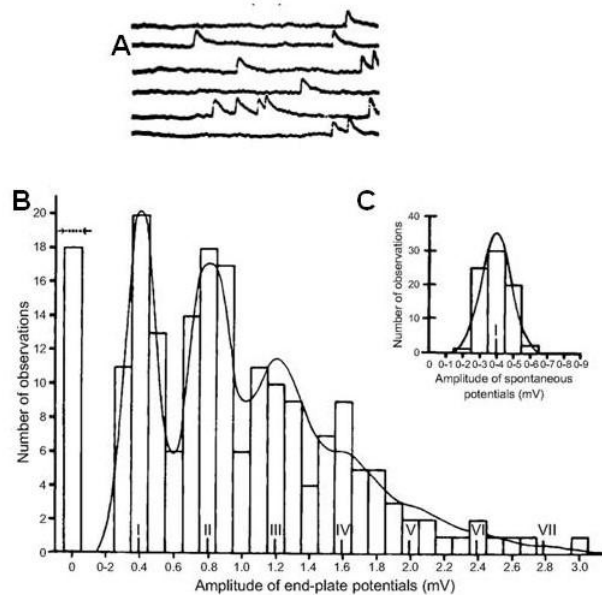


Fig. 5. (A) Registro de potenciales miniatura. (B) Histograma de las amplitudes de los potenciales miniatura en experimentos con bajo calcio. La primer barra a la izquierda corresponde al número de fallas. La primer moda corresponde a una amplitud de 0.4 mV. La segunda, tercera y cuarta corresponden a múltiplos de la primera: 0.8, 1.2 y 1.6 mV. (C) Histograma de amplitud de la cuanta. Corresponde a 0.4 mV con pequeñas variaciones.

2. CONCLUSIONES

Los descubrimientos recientes en el estudio de la transmisión sináptica han sido muy numerosos e interesantes. Cada día aparecen nuevos trabajos con técnicas electrofisiológicas más avanzadas. De la misma manera, aparecen nuevos modelos matemáticos que pretenden explicar los resultados. Sigue más fuerte que nunca la interacción entre diferentes disciplinas, con la esperanza de comprender mejor el funcionamiento sináptico. Está en las sinapsis la explicación de la plasticidad neuronal. Y se cree que también ahí se encuentran los procesos de la memoria y el aprendizaje. Sin duda, los modelos matemáticos darán pie a nuevas investigaciones y los nuevos resultados experimentales darán pie a nuevos modelos matemáticos y así en una espiral ascendente, en una aventura del pensamiento que encuentra el máximo placer en el descubrimiento, capaz de predecir y adelantarse a los hallazgos experimentales. Toca a cada profesor de biofísica emocionar a los alumnos y hacer a un lado los obstáculos que pudieran representar los modelos eléctricos y matemáticos. Hacer énfasis en su utilidad y demostrar su fácil construcción y solución, cuando se aprenden los principios básicos de la matemática y su interpretación biológica. Pasar de ver los modelos matemáticos con la lupa de las matemáticas solamente y verlos con la lupa de la biología puede ser la diferencia en su aprendizaje.

BIBLIOGRAFÍA

1. S. Ramón y Cajal. "Recuerdos de mi vida", 3ed Edición, Centro Virtual Cervantes, 1922. Visto en: http://cvc.cervantes.es/ciencia/cajal/cajal_recuerdos/recuerdos/prologos.htm#p02. [11/04/2016].
2. C. S. Sherrington. "The central nervous system", in A textbook of physiology, Vol. 3, 1897, London Macmillan.
3. J. N. Langley. "Observations on the physiological action of extracts of the supra-renal bodies", J. Physiol., vol. 27, 237-256.
4. W. E. Dixon. "Vagus inhibition", Brit. Med. J., 22nd:1807, 1906.
5. O. Loewi. "Über humorale übertragbarkeit der herznervenwirkung. I. Mitteilung. Pflügers. Archiv. Fur. Die. Gesmnte. Physiologie., vol. 189, 1921, 239-242.
6. J. C. Eccles. "The discharge of impulses from ganglion cells", J. Physiol., vol. 91, 1937, 1-22.
7. A. L. Hodgkin & A. F. Huxley. "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve", J. Physiol., vol. 117, 1952, 500-544.
8. B. Katz & S. W. Kuffler. "The effect of calcium on the neuro-muscular junction", J. Neurophysiol. Vol. 7, 1942, 17-26.
9. P. Fatt & B. Katz. "Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings", J. Physiol., vol. 117, 1952, 109-128.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE COLORANTES TEXTILES.

Diana Guadalupe Sánchez Valdés¹, Gerardo de Jesús Sosa Santillán^{1*}, José Gerardo Gaona Lozano¹, Erika Yanneth Acosta Cruz¹, Yolanda Garza García¹.

¹Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Venustiano Carranza s/n, Col. República Ote., Saltillo, Coahuila, 25280, MÉXICO.

RESUMEN

La degradación de colorantes utilizados en la industria textil ha sido objeto de investigación desde hace ya algunos años debido al problema de contaminación que representan y a los efectos tóxicos que ha producido en la fauna marina. Los procesos biológicos resultan una alternativa favorable para resolver dicho problema al ser más dirigidos y tener un enfoque más propicio para el medio ambiente.

En este trabajo se aislaron 19 cepas a partir de soluciones de colorantes textiles comerciales y de muestras procedentes de la planta de tratamiento de la Empresa textil PARRAS CONE DE MÉXICO. Para la búsqueda de la actividad biodegradativa de las cepas aisladas, éstas fueron probadas con seis colorantes diferentes (rojo escarlata 604, Naranja 618, amarillo luminoso, cristal violeta, verde esmeralda y azul mezclilla), el proceso se realizó durante 48 horas, se seleccionó 1 cepa para cada colorante con el mayor porcentaje de decoloración, posteriormente estas cepas fueron evaluadas en un medio mineral de referencia en un periodo de 48 horas, se seleccionaron las cepas que mostraron mayor potencial de decoloración para cada colorante las cuales fueron: la cepa 2 para el colorante rojo escarlata 604, amarillo luminoso y azul mezclilla 23, la cepa 3 para el colorante Naranja 618 y cristal violeta y la cepa 15 para el colorante verde esmeralda. Después se realizó la caracterización taxonómica de las cepas seleccionadas y tanto la identificación bioquímica como la identificación molecular coincidieron en lo siguiente: la cepa 2 pertenece al género *Corynebacterium*, la cepa 3 a *Staphylococcus* y la cepa 15 a la especie *Escherichia coli*.

1. INTRODUCCIÓN

Como una consecuencia de la industrialización, el mundo enfrenta graves problemas de contaminación de aire, suelos y agua. La industria textil es una de las mayores empresas productoras, pero utiliza grandes volúmenes de agua en los procesos de teñido, generando grandes cantidades de agua residual con una alta carga de colorantes. Algunos colorantes son carcinógenos y mutagénicos, deterioran estéticamente los cuerpos de agua e impactan en la flora y la fauna marina [1]. Debido a su composición química, los colorantes empleados en la industria textil están diseñados de tal forma que puedan resistir la degradación por diversos factores externos y mantener integro su color bajo exposiciones a la luz solar, la acción de productos químicos, condiciones variables de temperatura e incluso a la degradación microbiana [2,3].

En nuestro país la Norma Oficial Mexicana NOM-CCA-014-ECOL/1993, tiene establecidos los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales provenientes de la industria textil a cuerpos receptores de agua, por lo tanto las empresas dedicadas al teñido de prendas deben de cumplir con los requerimientos que marca dicha norma. Este hecho ha forzado el interés por generar tecnologías para el tratamiento de aguas usadas en los procesos de

la industria textil que logren alcanzar un nivel de degradación y mineralización suficiente como para reutilizar las aguas tratadas y reducir el consumo hídrico [4].

Se ha demostrado que los métodos biológicos son eficientes y factibles para el tratamiento de estos efluentes, pues mediante la degradación microbiana o enzimática se puede lograr la completa mineralización de los efluentes y por lo tanto el agua puede ser reutilizada [5]. Los microorganismos usados en los procesos de remediación de efluentes textiles pueden aislarse de algún ambiente contaminado, como un efluente de la industria textil, por adaptación de cepas con el potencial de degradar colorantes o bien, aplicando técnicas de ingeniería genética para obtener microorganismos mejorados [5]. Una de las ventajas de trabajar con cultivos de un solo tipo de microorganismo, es que las condiciones y los parámetros determinados son más reproducibles y la interpretación es más sencilla al trabajar con un sistema simple [6]. Por ello para estudiar la microbiología y cinética de degradación puede ser más conveniente utilizar microorganismos aislados [7], que al ser identificados se puede conocer mejor su mecanismo de degradación y el proceso de decoloración puede ser optimizado.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Aislamiento de bacterias.

Los aislamientos microbianos se llevaron a cabo a partir de soluciones de colorantes textiles comerciales a una concentración de 0.25%, los colorantes fueron rojo escarlata 604, amarillo luminoso, naranja 618, verde esmeralda, cristal violeta y azul mezclilla 23 y de muestras procedentes de la planta de tratamiento de la Empresa textil PARRAS CONE DE MÉXICO del efluente, influente, reactor biológico y lodos activados, las muestras fueron cultivadas en cajas Petri con agar nutritivo durante 24 horas a una temperatura de 37°C.

Búsqueda de actividad biodegradativa en las cepas aisladas.

Los aislados fueron cultivados en caldo nutritivo por 24 horas. Se usaron tubos 13 x 100 conteniendo 1 ml de solución de cada colorante al 0.25 % y 0.5 ml del cultivo de cada cepa aislada. Los tubos fueron incubados durante 48 horas a 37 °C, el contenido de cada tubo fue transferido a tubos eppendorf y centrifugado para separar la biomasa, el sobrenadante fue utilizado para determinar el porcentaje de decoloración a partir de los valores de absorbancia. La capacidad degradativa se expresó en términos de porcentaje de decoloración y se calculó como sigue:

$$\text{Decolorización}(\%) = \frac{(\text{absorbancia inicial}) - (\text{absorbancia observada})}{(\text{absorbancia inicial})} \times 100$$

También se evaluó el comportamiento de las cepas seleccionadas en medio mineral [8], estos ensayos se realizaron en matraces de 250 mL, con un volumen ocupado de 50 mL constituido por 40 mL del medio mineral, inoculado con 10 mL de suspensión de las cepas seleccionadas provenientes del precultivo y 1 mL de solución de cada colorante al 1% e incubados a 37 °C con una agitación de 250 rpm en una incubadora Lab-line Orbit durante 48 horas y se eligió aquellas cepas con los mayores porcentajes de decoloración obtenidos.

3. CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA.

La identificación bioquímica de las cepas seleccionadas en la etapa anterior se realizó de acuerdo a lo establecido en el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, se realizaron las pruebas

bioquímicas convencionales, uso de medios selectivos y pruebas API System (20E) para el seguimiento de un esquema y realizar una identificación a nivel de género.

Para la identificación molecular la extracción de ADN se realizó por el método de bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) y mediante el kit Wizzard Genomic DNA purification kit (Promega). La integridad y concentración de ADN fue verificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.9 % en buffer TE 1x y se visualizó con bromuro de etidio (5 µg/ml) (Sigma-Aldrich). Los geles se fotografiaron bajo luz UV en el sistema fotodocumentador Fisher Scientific.

Se amplificó por PCR un fragmento de 1300 pb del gen 16S ARNr a partir del ADN genómico extraído. Las reacciones de PCR (25 µl) se llevaron a cabo empleando entre 100 a 200 ng de ADN (1µL) como templado en una mezcla de reacción que contenía Tris-HCl 200 mM, pH 8.4, KCl 500 mM, desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's) 200 µM, oligonucleótidos forward y reverse 0.5 µM, MgCl₂ 5 mM, y Taq ADN polimerasa 2.5 U (Bioline). Las amplificaciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador (Thermo Electron Corporation) usando un programa que inicia con una desnaturalización a 94^oC por 5 min, seguida de 30 ciclos de (1) 94^oC por 1 min, (2) hibridación 54^oC por 45 s, (3) extensión a 72^oC por 1 min; y término del programa con una extensión final de 5 minutos a 72^oC. Los productos de PCR (amplicones) se confirmaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.9 % en buffer TE (Tris-HCl 100 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0) y se visualizaron con bromuro de etidio (5 µg/ml). Los productos de PCR fueron secuenciados directamente mediante un servicio externo de secuenciación (Macrogen, USA) empleando los mismos oligonucleótidos utilizados para su amplificación. El alineamiento de las secuencias se llevó a cabo empleando el software BioEdit [9] y la clasificación taxonómica mediante la base de datos RDB (Ribosomal Data Base Project) [10].

4. RESULTADOS

Aislamiento de bacterias.

A partir de las soluciones de colorante se aislaron 9 cepas de las soluciones de colorantes textiles; se identificaron bacilos Gram positivos y negativos agrupados en pares y en cadenas, cocos Gram negativos agrupados en pares y en racimos y cocos Gram positivos agrupados en racimos. A partir de las muestras proporcionas por la Empresa PARRAS CONE se obtuvieron 10 cepas, se identificaron en su mayoría bacilos Gram negativos agrupados en pares y en cadenas y cocos Gram negativos agrupados en cadenas cortas. De acuerdo al tipo de muestra de donde se obtuvieron los microorganismos aislados, era de esperar que las bacterias encontradas en los colorantes textiles y en las muestras procedentes de la empresa PARRAS CONE DE MEXICO tuvieran capacidad biodegradativa.

Búsqueda de actividad biodegradativa en las cepas aisladas.

Cada cepa fue probada con las soluciones de colorante mencionados en la etapa uno, y se seleccionó una cepa para cada colorante de acuerdo al mayor porcentaje de decoloración obtenido. La tabla 1 muestra las cepas seleccionadas en este estudio.

Tabla 1. Cepas seleccionadas con mayor potencial de decoloración

Cepa	Colorante	% de decoloración
Cepa 7	Rojo escarlata 608	48.48
Cepa 19	Naranja 618	53.58
Cepa 2	Amarillo luminoso	69.25
Cepa 3	Cristal Violeta	54.86
Cepa 15	Verde esmeralda	63.78
Cepa 2	Azul mezclilla	73.92

En la evaluación del comportamiento de las cepas en medio mineral los resultados se muestran en la tabla 2. Respecto al porcentaje obtenido con el colorante rojo escarlata 604 probado con la cepa 7 se consideró emplear la siguiente cepa con mayor potencial de decoloración para dicho colorante, que fue la cepa 2 y quien obtuvo un mayor porcentaje respecto a la cepa 7. Probablemente no se obtuvo degradación porque las concentraciones de los componentes del medio mineral no son suficientes para favorecer el proceso biodegradativo. En el caso del colorante naranja 618 se tuvieron dificultades en la purificación de la cepa 19 que fue utilizada bajo esa condición pero también se consideró usar la siguiente cepa con mejor porcentaje de decoloración para este colorante la cual fue la cepa 3 que obtuvo un mayor porcentaje respecto a la cepa 19.

Tabla 2. Porcentajes de decoloración obtenidos en medio mineral

Cepa Seleccionada	Colorante	% de decoloración.
C7 – C2	Rojo escarlata 604	0 - 68.75
C19 - C3	Naranja 618	19.77 - 30.09
C2	Amarillo luminoso	71.85
C3	Cristal violeta	26.79
C15	Verde esmeralda	12.30
C2	Azul mezclilla 23	30.20

Por lo tanto se seleccionaron 3 cepas con mayor potencial de decoloración, estas fueron la cepa 2 para el colorante rojo escarlata 604, amarillo luminoso y azul mezclilla 23, cepa 3 para el colorante naranja 618 y cristal violeta y cepa 15 para el colorante verde esmeralda.

Caracterización taxonómica.

En cuanto a la caracterización taxonómica, la identificación bioquímica se realizó de acuerdo a lo establecido en el manual de Bergey: se consideró al grupo 20 del manual para la cepa 2 donde se encuentran los bacilos Gram positivos irregulares, no esporulantes; para la cepa 3 al grupo 17 al que pertenecen los cocos Gram positivos; y para la cepa 15 se propuso al grupo 5 en el que se ubican los bacilos Gram negativos anaerobios facultativos. En base a los resultados obtenidos con las pruebas bioquímicas convencionales, pruebas API System (20E) así como el uso de medios selectivos se siguieron esquemas de identificación. La figura 1 muestra los esquemas correspondientes a cada cepa.

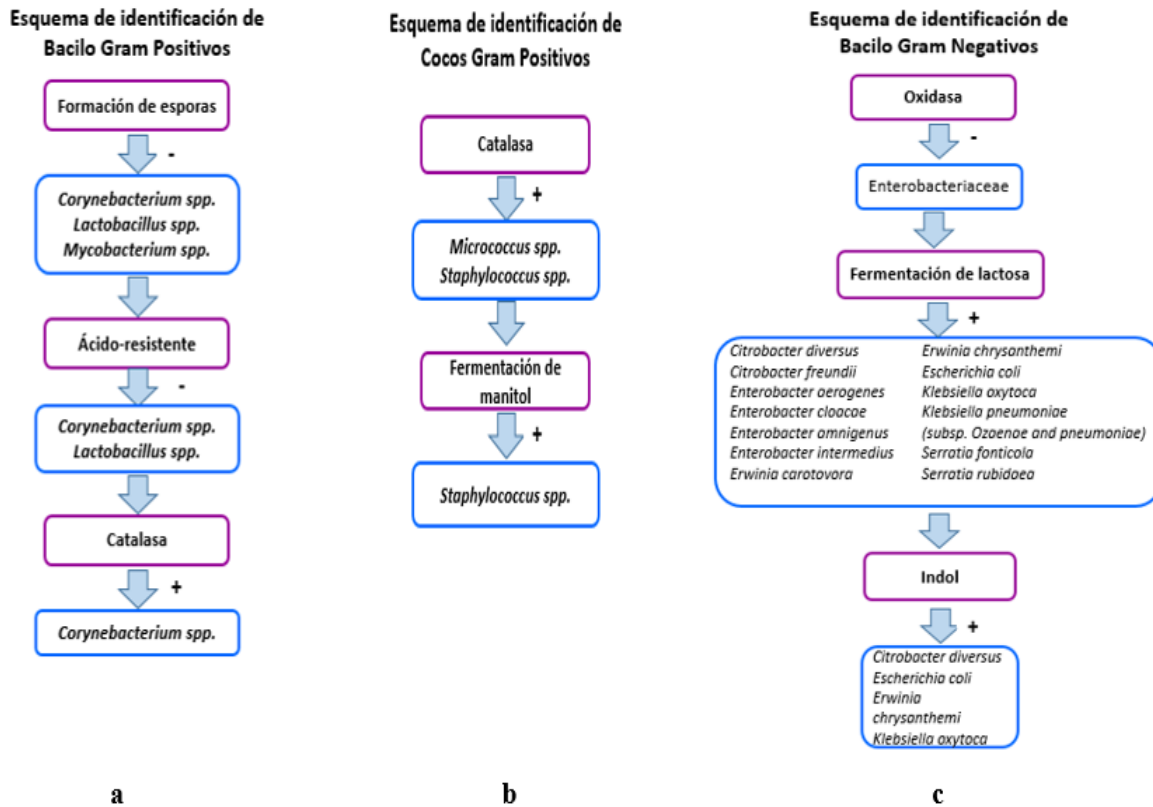


Figura 1. Esquemas de identificación bioquímica. a) Esquema cepa 2, b) Esquema cepa 3, c) Esquema cepa 15.

Por lo tanto se consideró al género *Corynebacterium* para la Cepa 2, *Staphylococcus* para la cepa 3 y la especie *Escherichia coli* para la cepa 15.

Los resultados propuestos en la identificación bioquímica fueron comprobados mediante la identificación molecular. La figura 2a muestra el marcador de peso molecular Hyperladder 1 con el cual fueron comparadas las bandas obtenidas que se presentan en las figuras 2b y 2c, en la figura 2b las bandas representan las muestras obtenidas en el proceso de extracción de ADN por el método de CTAB, el carril M. H1 pertenece al marcador de peso molecular, el carril 1 y 2 corresponden a la cepa 2, el carril 3 a la cepa 3 y el carril 4 a la cepa 15, se tuvieron dificultades en el proceso de amplificación por PCR para la cepa 2 por este método de extracción, y por ello se utilizó el método de extracción Wizzard Genomic DNA purification kit (Promega); la figura 2c presenta las bandas obtenidas en el gel de agarosa para las muestras derivadas de este método. Los métodos de extracción de ADN mediante un kit son más precisos en relación con otras metodologías porque muchos de estos se basan en las características de la pared celular de las bacterias y por lo tanto suelen ser más específicos [11], por ello se obtuvo un mejor resultado para la cepa 2 con el kit Wizzard Genomic DNA purification (Promega) que el obtenido con el método CTAB.

En base a la posición de las bandas se estimó la cantidad de ADN comparada con el marcador de peso molecular y se determinó que la cantidad de ADN extraído fue 10,037 pares de bases, equivalente a 100 ng.

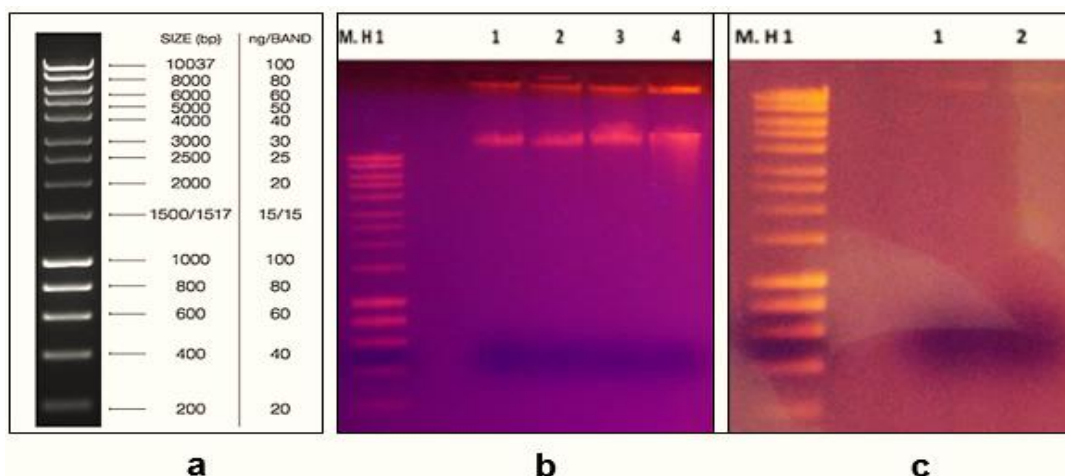


Figura 2. a) Marcador de peso molecular *Hyperladder 1*, b) Muestras de ADN extraído por el método de CTAB cargadas en gel de garosa, c) Muestras de ADN extraído por el Método Wizzard *Genomic DNA purification* (Promega).

Para obtener productos de mayor pureza en la técnica de PCR, en ocasiones es necesario realizar variaciones en la mezcla de reacción y en las condiciones de amplificación, por ello se realizaron algunas variaciones en la metodología propuesta. Para la cepa 2 se realizó una dilución 1:10 del ADN extraído y se utilizó un volumen de 1 μ l, con el fin de eliminar posibles inhibidores de PCR que probablemente se generaron en el proceso de extracción, se empleó el doble de concentración de la enzima Taq ADN polimerasa (Bioline), 5.0 U para generar suficiente producto deseado, además se utilizó un gradiente de temperatura de hibridación de 55-65 $^{\circ}$ C, siendo 64 $^{\circ}$ C la óptima, pues si la temperatura de alineamiento es más alta la especificidad será mayor (aunque si es demasiado alta no se amplificará nada pues la unión de oligonucleótidos con sus sitios complementarios será poco estable y la polimerasa no podrá iniciar su síntesis) [12], estas condiciones corresponden al carril 9 de la figura 3a. Para la cepa 3 se utilizó un volumen de 0.5 μ l de ADN extraído, se emplearon 5.0 U de Taq ADN polimerasa (Bioline) y una mayor concentración de MgCl₂ la cual fue 6 Mm, ya que la polimerasa necesita de iones de magnesio para funcionar adecuadamente y generar productos específicos, estas condiciones pertenecen al carril 6 de la figura 3b. Para la cepa 15 se hicieron mínimas variaciones en el método pues solo se varió el volumen de ADN el cual fue de 0.5 μ l y 5.0 U de Taq ADN polimerasa (Bioline), estas condiciones pertenecen al carril 3 de la figura 3c. Para todos los casos las bandas fueron ubicadas por debajo de la banda correspondiente a 1,500 pb del marcador de peso molecular, estimando que se amplificó un segmento de 1,300 pb.

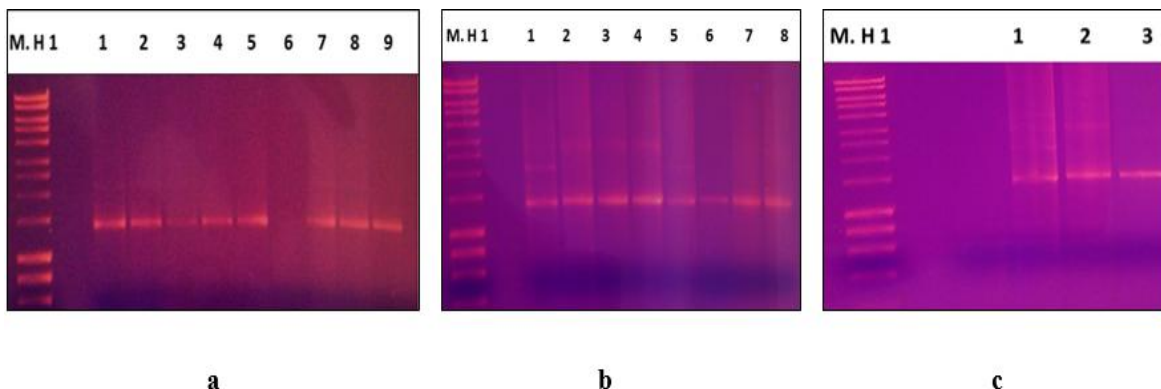


Figura 3. Productos de PCR visualizados en gel de agarosa. (La descripción detallada de cada figura se encuentra explicada en el texto).

Los resultados propuestos mediante la alineación de secuencias para la clasificación taxonómica demostraron un 99% de identidad con el género *Corynebacterium* para la cepa 2, para la cepa 3 un 100% de identidad con el género *Staphylococcus* y para la cepa 15 se determinó un 94% de identidad con la especie *Escherichia coli*, resultados que son compatibles con los propuestos en la identificación bioquímica

5. CONCLUSIONES

Las bacterias capaces de desarrollarse en colorantes textiles y en ambientes contaminados con estos compuestos como los efluentes de la industria textil pueden potencialmente degradar estos compuestos tóxicos.

En este trabajo se seleccionaron 3 bacterias de las 19 aisladas de acuerdo al mayor porcentaje de decoloración para cada colorante, se eligió a la cepa 2 para los colorantes rojo escarlata 604, amarillo luminoso y azul mezclilla 23, la cepa 3 para los colorantes Naranja 618 y cristal violeta, y la cepa 15 para el colorante verde esmeralda.

Respecto a la caracterización taxonómica, la identificación bioquímica y molecular coincidieron con lo siguiente: la cepa 2 perteneciente al género *Corynebacterium*, la cepa 3 al género *Staphylococcus* y la cepa 15 a la especie *Escherichia coli*.

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Autónoma de Coahuila, que a través del Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas, proporcionó lo necesario para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico a través de una Beca de estudios de Maestría.

BIBLIOGRAFÍA

1. Muñoz Rábago Edwin de Jesús, Vicente Rodríguez Ortiz. 2008. Cinética de la decoloración de colorantes en una muestra modelo en presencia de un catalizador. Tesina Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Químicas. Veracruz, México.
2. Pedraza Chan María S, Geissler Dahleim Gunther, Cedillo Ramírez Ma. Lilia y Muñoz Gracia Andrés. 2006. Biodegradación de colorantes azo bajo condiciones reductoras por bacterias Gram-negativas mesofílicas aisladas de diversos ambientes. Memorias del V Congreso Internacional y XI Nacional de Ciencias Ambientales. Morelos, México.
3. Pey Clemente, Jaime. 2008. Aplicación de procesos de oxidación avanzada (Fotocatálisis solar) para tratamiento y reutilización de efluentes textiles. Tesis. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 198 p.
4. Li F., Wichmann K., Otterpolhl R. (2009). Review of the technological approaches for grey water treatment and reuses. *Science of Total Environment*, 407, 3439-3449.
5. Kandelbauer A. y Guebitz G.M. Bioremediation for the decolorization of textile dyes - a review. En *Environmental Chemistry* (Editores: Lichtfouse E, Dudd S, Robert D) Springer Berlin Heidelberg, 269-288. 2005
6. Pearce C.I., Lloyd J.R. y Guthrie J.T., 2003. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dye Pigment*. 58, 179–196.
7. González Gutiérrez Linda Victoria. 2006. Estudio de la degradación de un colorante azo rojo reactivo en un biorreactor anaerobio de flujo ascendente. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química. Instituto Tecnológico de Celaya. Celaya Guanajuato.
8. Sánchez-Valdés, D.G. 2014. Estudio Preliminar Sobre la Biodegradación de Cristal Violeta por una Cepa de *Citrobacter freundii*. Tesis Nivel Licenciatura. Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, México. 54 p.
9. Hall, T. "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT". *Nucleic Acids Symp Ser* 41, 95–98, 1999.
10. Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. and Cole, J.R. "Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy". *Appl Environ Microbiol* 73, 5261–5267, 2007.
11. Dundass N., N. K. Leos, M. Mitui, P. Revell y B. B. Rogers. 2008. Comparison of automated nucleic acid extraction methods with manual extraction. *Journal of Molecular Diagnostics* 10: 311-316.
12. Espinosa Asuar Laura. 2007. Capítulo 17 Guía práctica sobre la técnica de PCR. Pag517-540. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología Universidad Nacional Autónoma de México Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. ISBN 978-968-817-839-3

RECONOCIMIENTO DE LA TUBERCULOSIS LATENTE EN BOVINOS

Susana Flores-Villalva¹, E. Rodríguez¹, G. Canto².

¹CENID Fisiología y Mejoramiento Animal, INIFAP. Ajuchitlán, Colon, Querétaro. ²Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Qro

RESUMEN

En el bovino, como en los humanos, la tuberculosis es en la mayoría de los casos, una enfermedad respiratoria que afecta los pulmones y los ganglios linfáticos asociados. La tuberculosis se manifiesta de dos formas principales: enfermedad activa o enfermedad latente; en esta última no hay sintomatología clínica de la enfermedad debido a que la respuesta inmune es capaz de contener la enfermedad pero no de eliminar al bacilo. Si los mecanismos de defensa del individuo se encuentran en condiciones adecuadas, limitan al mínimo el desarrollo de la bacteria dentro del granuloma, pero estas pueden permanecer viables durante toda la vida del individuo. Por lo que si el estatus inmunológico del hospedero se debilita, el granuloma se convierte en la fuente para la diseminación sistémica de las bacterias. En el bovino, no existe una clara diferenciación entre tuberculosis activa o latente y este concepto ha sido prácticamente ignorado. Quizá esto ha sido influenciado por el relativamente corto período de vida de los bovinos en comparación con el humano. Sin embargo, diversos hechos soportan la existencia de tuberculosis latente en los bovinos, por lo que su entendimiento y reconocimiento es necesario para la implementación de las medidas de erradicación de la enfermedad en el ganado, debido a que la reactivación de la enfermedad puede ocurrir muchos años después de la infección inicial, permitiendo la transmisión de una infección que se creía haber eliminado o que no se tenía sospecha de su presencia. En este trabajo, pretendemos exponer las evidencias documentadas que soportan la existencia de la tuberculosis latente en los bovinos.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es la principal causa de enfermedad y muerte en el mundo, especialmente en Asia y África. Según reportes de la Organización Mundial de la Salud en el año 2012 hubo 8.7 millones de casos nuevos y 1.4 muertes por tuberculosis (1). Ésta enfermedad es causada por bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, en éste grupo se encuentra *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), el agente causante de la tuberculosis bovina, el cual tiene un espectro de hospederos muy amplio, dentro de los que se encuentran los primates, incluido el humano, animales domésticos y de vida silvestre (2).

La tuberculosis bovina es una enfermedad transmisible y crónica, caracterizada por la formación de lesiones granulomatosas (3). Ésta es una de las enfermedades más importantes en la industria pecuaria al ocasionar graves pérdidas económicas, y representar una barrera para la comercialización del ganado y sus subproductos; además de constituir una amenaza para la salud humana (4). La infección en el ganado es usualmente crónica y los animales infectados pueden eliminar al bacilo mucho antes de exhibir algún signo clínico, por lo que es importante detectar al ganado infectado en etapas tempranas de la infección.

La incidencia real de la infección por *M. bovis* en humanos es desconocida y quizá subestimada ya que generalmente no se hace una distinción entre especies del aislado obtenido. Sin embargo, se

ha demostrado que entre el 3 y 10% de los casos de tuberculosis humana puede ser causada por *M. bovis*. En México existe poca información al respecto, en un estudio realizado en pacientes con problemas respiratorios crónicos, 3 de 19 aislamientos obtenidos correspondieron a *M. bovis* (6). Sin embargo, un análisis retrospectivo realizado en San Diego, California reveló que de los años 2001 a 2005 el 8% de los casos de tuberculosis se debió a *M. bovis*, de estos el 60% se presentó en personas de origen mexicano (7). El control de la tuberculosis por *M. bovis* en el humano se basa en el control de la enfermedad en los animales, es por eso que se realiza una intensiva campaña para su erradicación y evitar las pérdidas económicas asociadas y las restricciones a la movilización de animales y sus subproductos.

2. PATOGENIA

En el bovino, como en los humanos, la tuberculosis es en la mayoría de los casos, una enfermedad respiratoria que afecta los pulmones y los ganglios linfáticos asociados. Una vez que el bacilo ha ingresado a las vías respiratorias bajas es fagocitado por los macrófagos alveolares, estos pasan a través de la pared de los bronquiolos, entran a la circulación, y son llevados a los ganglios linfáticos, donde subsecuentemente interactúan con las células ahí almacenadas (8). Diversos estudios han demostrado que *M. bovis* ha desarrollado diversas estrategias para asegurar su entrada dentro de los macrófagos, engañar y evadir la respuesta inmune durante y después de su entrada al fagocito, y modular la función efectora de la respuesta inmune celular (3, 9). Esta interacción induce una respuesta pro-inflamatoria localizada, conduciendo a la producción de quimiocinas y citocinas que amplifican el reclutamiento celular dando lugar a una masa celular conocida como granuloma (10). Esta estructura está compuesta por un centro de macrófagos infectados rodeados por células gigantes vacuoladas o macrófagos espumosos, la capa más externa de la estructura es delineada por linfocitos, y puede estar rodeada de colágena y otros componentes de matriz celular (11). Si los mecanismos de defensa del individuo se encuentran en condiciones adecuadas, limitan al mínimo el desarrollo de la bacteria dentro del granuloma, pero estas pueden permanecer viables durante toda la vida del individuo. Por lo que si el estatus inmunológico del hospedero se debilita, el granuloma se convierte en la fuente para la diseminación sistémica de las bacterias (11).

3. LATENCIA

De esta forma, la tuberculosis se manifiesta de dos formas principales: enfermedad activa o enfermedad latente; en esta última no hay sintomatología clínica de la enfermedad debido a que la respuesta inmune es capaz de contener la enfermedad pero no de eliminar al bacilo. En esta etapa la bacteria se mantiene en un estado de baja o nula actividad replicativa (12). En el bovino, no existe una clara diferenciación entre tuberculosis activa o tuberculosis latente y el concepto de infección latente ha sido prácticamente ignorado y se ha mantenido más como especulación. Quizá esto ha sido influenciado por el relativamente corto período de vida de los bovinos en comparación con el humano. Sin embargo, existen diferentes hechos que soportan la existencia de tuberculosis latente en los bovinos: 1) animales positivos a la prueba de tuberculina o positivos a la prueba de IFN- γ , sin lesiones visibles en la inspección sanitaria, 2) animales con aislamiento positivo en ausencia de lesiones, y 3) los animales positivos a la prueba de IFN- γ , negativos a la prueba de la tuberculina que después convierten su estatus en la prueba intradérmica, con cultivo positivo; pueden explicar en parte el concepto de latencia y la subsecuente reactivación en la tuberculosis bovina (13, 14). Además, la reactivación de una tuberculosis latente en humanos causada por *M. bovis* ha sido documentada (15).

Un hecho largamente ignorado en la epidemiología de la tuberculosis bovina es el largo período de incubación de la enfermedad, después del contacto con la micobacteria un bovino tarda en promedio dos meses (8-65 días) en volverse reactor a la prueba de la tuberculina y después de un año o más puede llegar a un estado de máxima infección (16). Pollock, et al. (8) (Figura 1) han

descrito diferentes escenarios que son posibles después de la exposición a *M. bovis* en el ganado y que son necesarios considerar en el diagnóstico y control de la enfermedad:

- 1) El bovino tiene la capacidad de resistir el desafío de la exposición a través de su respuesta inmune innata por lo que estos animales pueden resultar negativos a las pruebas diagnósticas y permanecer libres de la infección.
- 2) El bovino después de la exposición e infección desarrolla una respuesta inmune eficaz, los cambios patológicos pueden ser menores, por lo que en la inspección post-mortem puede no haber evidencia de la infección. A estos animales se les conoce como reactivos sin lesiones evidentes en la inspección post-mortem. Estos animales pueden encontrarse en una etapa de tuberculosis latente.
- 3) El bovino a pesar de resistir el desafío desarrolla cambios patológicos que pueden ser evidentes en la inspección post-mortem y presenta respuestas positivas a las pruebas diagnósticas.
- 4) El bovino después de la exposición a *M. bovis* es infectado y desarrolla la enfermedad, puede presentar respuestas positivas a las pruebas diagnósticas; sin embargo, conforme la enfermedad progresa puede llegar a ser anérgico. Entonces, si la tuberculosis bovina latente existe en una manera similar a la presentada en humanos, representa un serio problema en la erradicación y control de la enfermedad en el ganado por la posible reactivación de la enfermedad en un animal infectado.

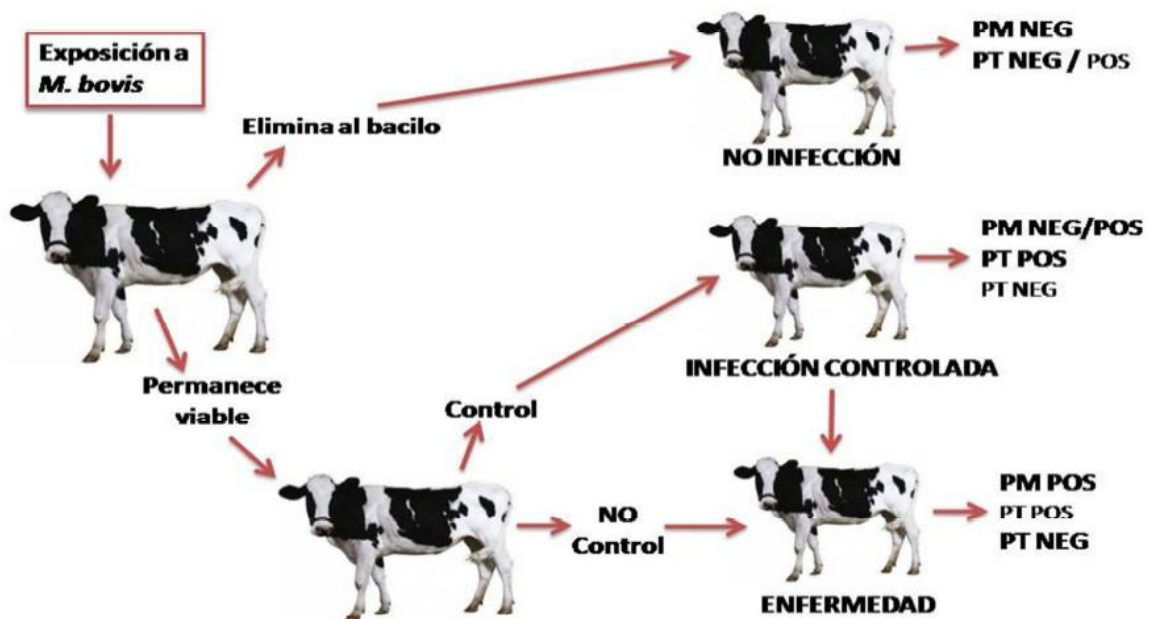


Figura 1. Diagrama que demuestra los posibles resultados después de la exposición del ganado a *M. bovis* (PM: inspección post-mortem; PT: prueba de tuberculina). Tomado y modificado de Pollock, et al. 2002 (8).

Las interacciones o mecanismos moleculares necesarios para el establecimiento de una tuberculosis activa, latente o una reactivación no están claramente definidos; sin embargo, se conoce que tras la infección la micobacteria enfrenta diversos desafíos hostiles como: la activación de la respuesta inmune, especies reactivas de nitrógeno y de oxígeno y un ambiente hipóxico. Todos estos factores afectan a la bacteria e inducen cambios en la transcripción de diversos genes que le permiten persistir exitosamente (17) En este sentido, en los genomas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* se han identificado 3 factores sigma con la capacidad de respuesta ante cambios ambientales que probablemente ocurran durante la adaptación o mantenimiento de la infección latente, estos son sigB, sigE, y sigF cuya transcripción se activa debido condiciones de baja oxigenación, choque térmico o una disminución en la concentración de nutrientes (18).

Diversos estudios han demostrado que el crecimiento, actividad metabólica y perfil transcripcional de la micobacteria están íntimamente asociados con los niveles de oxígeno, esto ha permitido la identificación de diversos genes asociados a latencia, entre ellos: genes asociados al regulon dosR, genes asociados a la respuesta a la hipoxia duradera (EHR, enduring hypoxic response, por sus siglas en inglés) y factores de resucitación (Rfp), entre otros (19).

El gen dosR (Rv3133), participa en la transcripción de genes en respuesta a una reducción en la tensión oxígeno o una exposición a óxido nítrico, regula positivamente cerca de 50 genes y negativamente aproximadamente 68 genes (20). Uno de los principales genes inducidos por el regulon dosR durante condiciones de hipoxia es el gen hspX (Rv2031) que codifica una proteína de 14-16 kDa llamada proteína de choque térmico tipo α -cristalina la cual actúa como una chaperona evitando la agregación de las proteínas. Otros genes inducidos por este regulon son: fdxA (ferredoxina), pfkB (fosfofructoquinasa), narK2 (transportador nitratos/nitritos), nrdZ (ribonucleosido-difosfato reductasa), ctpF (transportador de cationes tipo P ATPasa), bfrB (bacterioferritina), narX (nitrato reductasa) y otsB (trehalosa-6-fosfato-fosfatasa). Así mismo se conoce que los genes icl2, fdxA, Rv2623, Rv2626c son necesarios para la persistencia de la micobacteria en el modelo de ratón (18).

En adición, al regulon dosR, el crecimiento de la micobacteria en condiciones de hipoxia durante largos períodos (4-7 días) también induce la expresión de aproximadamente 200 genes, conocidos como genes asociados a la respuesta hipóxica duradera (EHR), los cuales incluyen a sigE y sigH, factores previamente identificados como importantes reguladores a estrés oxidativo y choque térmico, entre otros (21).

Estos cambios transcripcionales inducen un cambio metabólico en la bacteria permitiéndole entrar en un estado de dormancia, en el cual la bacteria deja de dividirse e incrementa el grosor de su pared celular, en este estado aumenta la expresión de los genes asociados al metabolismo de lípidos, específicamente los necesarios para la síntesis de triacilglicerol; de hecho, este lípido se acumula y forma cuerpos lipídicos dentro de las células (22) los cuales son usados como fuente de energía durante la dormancia y resucitación (23).

Se ha observado que algunas de estas proteínas inducen una respuesta inmune celular y humoral en pacientes con tuberculosis latente. En bovinos recientemente se evaluó la respuesta inmune hacia algunas proteínas del regulon dosR y EHR y se identificaron algunos antígenos EHR inmunogénicos, en especial el antígeno Rv0188, asociado a un grupo de animales con poca patología en quienes quizá la progresión de la enfermedad había sido limitada (24). Sin embargo, aún no se conoce si la expresión de genes asociados a latencia ocurre en un estado de infección natural en el bovino.

4. CONCLUSIONES

Diversos estudios demuestran la presencia de humanos infectados de forma latente con *M. bovis*, lo que indica que esta bacteria es capaz de persistir de esa forma en un huésped no habitual.

Estos hallazgos permiten pensar que *M. bovis* es capaz de persistir de forma latente en su huésped preferido, el bovino. Además, esta bacteria ha sido aislada de bovinos aparentemente sanos, sin signología clínica de la enfermedad lo que impone un desafío para tratar de establecer la evidencia de una infección latente o persistente en los bovinos. Lo descrito anteriormente nos demuestra la necesidad de determinar el estado de infección latente y su impacto en la epidemiología de la tuberculosis bovina, con el objetivo de establecer las medidas de control y seguimiento pertinentes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Global Tuberculosis Report. 2012 World Health Organization.
2. Morris RS, Pfeiffer DU, Jackson R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Veterinary Microbiology* 1994;40:153-77.
3. Thoen OC, Barletta RG. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis*. In: Thoen OC, Steele HJ, Gilsdorf JM, editors. *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. 2nd ed. Iowa, USA: Blackwell 2006. p. 18-29.
4. López Marin LM, Díaz Otero F, Vallecillo Maza AJ, Esquivel Solís H, Gutierrez-Pabello JA. Tuberculosis humana y bovina en Latinoamérica: De estudios sobre virulencia hacia herramientas para su control. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 2006;48(2):173-8.
5. LoBue P. Public Health Significance of *M. bovis*. In: Thoen OC, Steele HJ, Gilsdorf JM, editors. *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. 2nd ed. Iowa, USA.: Blackwell Publishing; 2006. p. 6-12.
6. Toledo OP, Milian SF, Santillán FM, Ramírez CIC. Aislamiento e Identificación de *Mycobacterium bovis* a partir de muestras de expectoración de pacientes humanos con problemas respiratorios crónicos. *Veterinaria México* 1999;30:227-9.
7. Rodwell TC, Moore M, Moser KS, Brodine SK, Strathdee SA. *Mycobacterium bovis* tuberculosis in binational communities. *Emerging Infectious Diseases* 2008;14(6):1-16.
8. Pollock JM, Neill SD. *Mycobacterium bovis* Infection and Tuberculosis in Cattle. *The Veterinary Journal* 2002;163:115-27.
9. Trejo Márquez H, Gorocica P, Porrás F, Chávez R, Lascurain R, Zenteno E. Bases moleculares de la interacción de *Mycobacterium tuberculosis* con los macrófagos. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias* 2003;16:41-7.
10. Pieterss J. *Mycobacterium tuberculosis* and the Macrophage: Maintaining a Balance. *Cell Host and Microbe* 2008;3:399-407.
11. Russell DG. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nature Reviews* 2007;5:39-47.
12. Zhang Y. Persistent and Dormant Tubercle Bacilli and Latent Tuberculosis. *Frontiers in Bioscience* 2004; 9: 1136-1156.
13. Cassidy JP. The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. *Vet Microbiol* 2006, 122: 151-161.
14. Whipple DL, Bolin CA, Miller JM. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *J Vet Diagn Invest* 1996; 8 (3): 351-354.
15. Larsen MV, Sorensen IJ, Thomsen VO, Ravn P (2008) Re-activation of bovine tuberculosis in a patient treated with infliximab. *Eur Respir J* 32: 229–231.
16. Goodchild AT, Clifton-Hadley RS. The Fall and Rise of Bovine Tuberculosis in Great Britain. In: Thoen OC, Steele HJ, Gilsdorf JM, editors. *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. Iowa, USA: Blackwells; 2006. p. 100-16.
17. Wayne LG, Sohaskey CD. Nonreplicating Persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu. Rev. Microbiol* 2001. 55: 139-163

18. Wang X, Wang H, Xie J. Genes and regulatory networks involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci China Life Sci.* 2011; 54 (4): 300-310.
19. Chao MC, Rubin EJ. Letting Sleeping *dos* Lie: Does Dormancy Play a Role in Tuberculosis? *Annu Rev Microbiol.* 2010; 64: 293-311.
20. Kumar A, Toledo JC, Patel RP, Lancaster JR, Steyn AJC. *Mycobacterium tuberculosis* DosS is a redox sensor and DosT is a hypoxia sensor. *Proc Natl Acad Sci.* 2007; 104: 11568-11573.
21. Rustad TR, Harrell MI, Liao R, Sherman DR. The Enduring Hypoxic Response of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE* 2008; 3 (1): e15202. doi:10.1371/journal.pone.0001502.
22. Sirakova TD, Dubey VS, Deb C, Daniel J, Korotkova TA, Abomoelak B, Kolattukudy PE. Identification of a diacylglycerol acyltransferase gene involved in accumulation of triacylglycerol in *Mycobacterium tuberculosis* under stress. *Microbiology* 2006; 152 (9): 2717-2725.
23. Low KL, Rao PSS, Shui G, Bendt AK, Pethe K, et al. Triacylglycerol utilization is required for regrowth of in vitro hypoxic nonreplicating *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *J Bacteriol* 2009; 191:5037-5043.
24. Jones GJ, Pirson C, Gideon HP, Wilkinson KA, Sherman DR, Wilkinson RJ, Hewinson G, Vordermeier M. Immune Responses to the Enduring Hypoxic Response Antigen Rv0188 Are Preferentially Detected in *Mycobacterium bovis* Infected Cattle with Low Pathology. *PLoS ONE* 2011; 6 (6): e21371. doi:10.1371/journal.pone.0021371.

EFFECTO DE GELANA DE ALTO ACILO EN UN FERMENTADO LACTEO TIPO YOGURT SOBRE SU COMPORTAMIENTO REOLOGICO.

Emmanuel Cervantes-Monroy, Emma Gloria Ramos-Ramírez, María Dolores Díaz-Cervantes, Miguel Márquez-Robles, María del Pilar Méndez-Castrejón, Juan Alfredo Salazar-Montoya*.

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN, Av. IPN 2508. Col. San Pedro Zacatenco. Cd. México.

RESUMEN

El yogurt es un producto de la fermentación láctica de la leche, donde *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus* utilizan como fuente de carbono la lactosa; el ácido láctico producido precipita las proteínas de la leche formando estructuras tridimensionales para obtener un gel débil. El principal problema tecnológico de éste producto es la sinéresis, por lo que se requiere la adición de un polisacárido estabilizador que evite éste proceso. La gelana es un polisacárido secretado extracelularmente por *Sphingomonas paucimobilis* constituido por unidades de repetición de un tetrasacárido (1,3-β-D-glucosa, ácido 1,4- β-D-glucurónico, 1,4 β-D-glucosa, y 1,4-α-L-ramnosa). En éste estudio se obtuvo un fermentado lácteo, tipo yogurt, con el objetivo de determinar el efecto de la adición de un polisacárido de alto peso molecular como la gelana de alto acilo a diferentes concentraciones (0.25%, 0.5%), antes y después de la fermentación y determinar la influencia en su comportamiento reológico. Como control se obtuvo un yogurt natural sin la adición de gelana y como control negativo un yogurt comercial. Se utilizó un reómetro LS100 de Paar Physica y una geometría de placa placa PP20. Todos los fermentados, incluidos los controles, presentaron un índice de comportamiento al flujo <1 por lo que se consideran fluidos no Newtonianos de tipo reofluídificante. El comportamiento reológico presentado se ajustó al modelo de Ostwald de Waele ($R^2 > 0.988$). La mayor viscosidad del yogurt (689.3 mPas) se obtuvo cuando se adicionó gelana de alto acilo a menor concentración; es decir un aumento del 15.32% y 85.90% con respecto al yogurt comercial y al estándar. Así mismo, la adición de gelana en el fermentado produjo un mayor índice de consistencia (2.245 Pas^n) y de tixotropía (12400 Pas^{-1}) a la mayor concentración. En todos los fermentados se presentó $G' > G''$; la componente elástica es mayor que la componente viscosa.

1. INTRODUCCION

La fermentación de los alimentos es una de las técnicas más antiguas y económica utilizada para la conservación del producto, en muchos casos mejora la calidad nutritiva y las características organolépticas del alimento (Alty, Karbancioglu, Daskaya, & Heperkan, 2013). Entre éstos alimentos, se encuentra el yogurt, producto de la fermentación láctica de bacterias ácido lácticas (BAL) que son capaces de romper los enlaces β-1-4 glucosídicos de la lactosa, haciendo que la digestión de macromoléculas como carbohidratos y proteínas sea más sencilla para el consumidor, además de mejorar la biodisponibilidad de los minerales presentes en la leche como lo es el calcio (Hancioğlu & Karapinar, 1997). El yogurt es un alimento milenario con beneficios para el consumidor, es por eso que junto con otros lácteos forman parte de una dieta equilibrada y son incluidos en la Norma Oficial Mexicana NOM 043-SSA-2005-2, en el grupo de Leguminosas y Alimentos de origen animal del Plato del Bien Comer (Secretaría de Salud, 2006).

La evaluación tradicional de las propiedades organolépticas de los yogurts involucra el uso de una escala para evaluar la estructura, cuerpo, color apariencia y sabor (Kasapis & Boskou, 2001).

Actualmente se pueden utilizar métodos oscilatorios los cuales permiten evaluar las componentes elásticas y viscosas del comportamiento mecánico de los productos alimenticios correspondientes a la estructura (Ozer, Robinson, Grandison, & Bell, 1997). Al ser el yogurt un gel, debido a que su formación involucra la generación de una red tridimensional o una matriz biopolimérica (Rosas, Ramos, & Salazar, 2012). Formado por una fase dispersa (líquido), en una fase continua (Micelas de la leche e hidrocoloide), la entropía tiende a desestabilizar el sistema ocasionando que el líquido de la fase discontinua se separe de la continua provocando un fenómeno llamado sinéresis (Badui, 2011). Entidades como la Profeco en México recomienda que al momento de comprar y consumir el yogurt, éste tenga su consistencia característica y que no exista una separación del suero de la leche (Revista del Consumidor, 2002). El uso de estabilizantes es una práctica común para evitar que exista una separación de las fases que integran el yogurt. Estos productos contienen proteínas, lípidos e hidrocoloides que generan un gran rango de consistencia y niveles de fragilidad. Los efectos que tienen sobre el alimento pueden ser investigados y analizados mediante el estudio de las propiedades reológicas (Schenz, 1997). El principal objetivo del estudio fue la caracterización reológica estática y dinámica de fermentados lácteos, tipo yogurt, adicionados con gelatina de alto acilo.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Los materiales utilizados fueron Leche comercial (Alpura 2000 clásica. México), cultivos iniciadores lácteos (Danisco, Yogo-Mix. Dupont, USA), gelatina alto acilo (Kelcogel LT 100, Kelco Biopolymers. USA). Los equipos fueron potenciómetro (2000, VWR Scientific, USA), parrilla con agitación (Barnstead International, PMC. USA), balanza digital (Analytical Plus, Ohaus. USA), reómetro (LS100, Paar Physica. Alemania), baño de circulación con control de temperatura (PolyScience, modelo 7306A11B. USA).

Pasteurización

Para la elaboración del fermentado lácteo, tipo yogurt, se utilizó leche comercial (Alpura 2000 clásica. México), se pasteurizó previo a la inoculación, se utilizó una parrilla con agitación (Barnstead International, PMC. USA) una vez que la leche llegó a los 90 °C se mantuvo durante 10 min posteriormente se dejó enfriar hasta que alcanzó una temperatura de 42 °C.

Reactivación de las cepas

Los cultivos iniciadores fueron obtenidos de la compañía Danisco (Yogo-Mix, Dupont. USA), el producto contiene microorganismos de la especie *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus*, en una relación 1:1 y una concentración de 2%. Previo a la inoculación, fue necesario reactivarlas; se realizó en 50 mL del volumen total, 250 mL de leche, por 30 min en Baño de María a una temperatura de 42 °C.

Fermentación Láctica

Tras la pasteurización y la reactivación del cultivo láctico se homogenizaron en la parrilla (Barnstead International, PMC. USA) a temperatura y agitación constante durante 5 min. Posteriormente el volumen total se colocó en 2 vasos de precipitado de 150 mL que fueron sellados y colocados en el Baño de María durante 6 hr a 42 °C en donde se alcanza un pH de 4 aproximadamente.

Preparación y adición del hidrocoloide

La adición del hidrocoloide a concentraciones (0.25% y 0.5%) se incorporó antes y después de la fermentación. El hidrocoloide utilizado fue gelatina de alto acilo. Fue necesario hidratar la goma con un volumen pequeño de la leche para evitar que se formarán grumos y hubiera una correcta dispersión de la goma, a la leche se le añadió la gelatina a las concentraciones indicadas durante 5

min con agitación constante. Una vez concluida la fermentación se adicionó la gelana y se homogenizó durante 5 min con agitación constante. Posteriormente, los fermentados se colocaron en un refrigerador a 5 °C durante 12 hr, para el posterior estudio reológico. Previo a las determinaciones reológicas las muestras se atemperan.

Determinaciones Reológicas

Con el objetivo de determinar como influyen en la estabilidad del fermentado las concentraciones del hidrocoloide, así como la adición en la fermentación, se realizaron las determinaciones viscoelásticas para comparar los diferentes comportamientos reológico mostrado por los yogurts. El comportamiento de los yogurts se ajustó al modelo Ostwald de Waele ($R^2 > 0.988$). Como control se utilizó un yogurt sin hidrocoloide y un control negativo consistiendo de un yogurt comercial de la misma marca de la leche.

3. RESULTADOS

La leche comercial utilizada para la elaboración del yogurt cumple con la NOM-181-Scifi-2010, diversos estudios recomiendan realizar la pasteurización de la leche para asegurar la inocuidad de la leche previo al proceso y el contenido de sólidos presentes en la leche, ya que al aumentar el contenido de sólidos se incrementa el cuerpo del yogurt y fuerza del gel (Yildiz, 2010). Otro factor importante es el uso de cultivos iniciadores ya que al utilizar microorganismos BAL de la especie *L. acidophilus* y *S. thermophilus* en relación 1:1 se obtiene un efecto positivo sobre el yogurt, debido principalmente al sinergismo que existe entre ambos (Yildiz, 2010). La tasa de crecimiento de *S. thermophilus* es mayor a la de *L. acidophilus*, y se presenta reducción del pH que a su vez estimula su crecimiento. El pH se alcanza después de las 6 hr aproximadamente. Este es el tiempo promedio de una fermentación láctica utilizando estos cultivos iniciadores, posteriormente la fermentación se completa y se refrigera a 5°C.

En relación al comportamiento reológico del yogurt sin adición de la gelana (Figura 1) se determinó que el índice al comportamiento al flujo de todas las muestras, incluyendo los controles presenta valores < 1 , por lo tanto los yogurts se clasifican como fluidos no Newtonianos de tipo reofluidificante, ajustados al modelo de Ostwald de Waele ($R^2 > 0.988$). Para el caso particular de los yogurts con gelana de alto acilo, se observó que a menor concentración es más viscosa en yogurts antes y después de la fermentación, siendo esta última la que mayor viscosidad presenta.

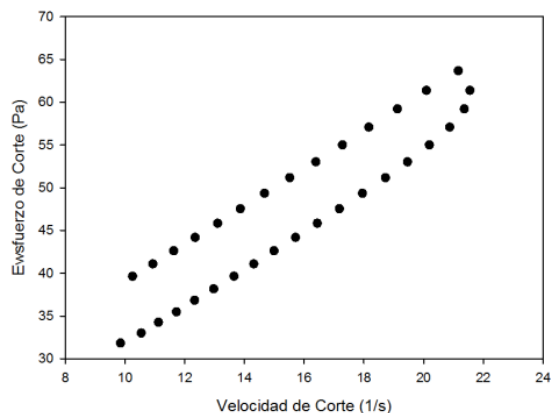


Figura 2. Curva de flujo del yogurt sin gelana de alto acilo.

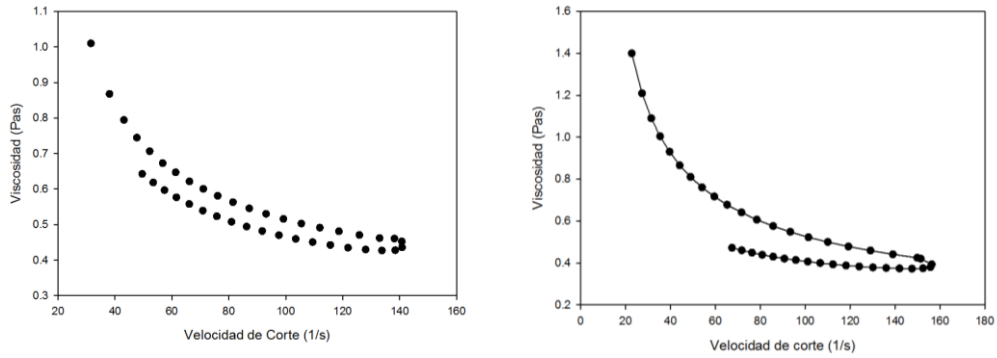


Figura 2. Curvas de Viscosidad en yogurt comercial y yogurt con gelana después de fermentar.

En la Figura 2 se observa el comportamiento de la viscosidad en función de la velocidad de corte del yogurt comercial, lado izquierdo y del yogurt con gelana de alto acilo a una concentración de 0.25%; éste, presentó la mayor viscosidad (689.3 mPas).

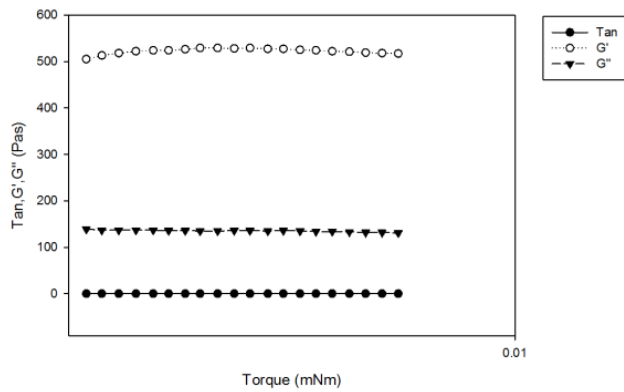


Figura 3. Barrido de Amplitud de yogurt con gelana antes de fermentar.

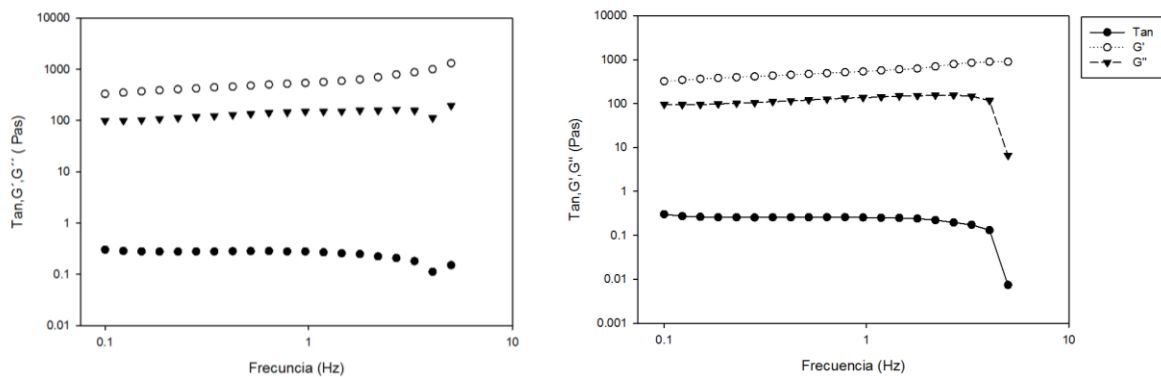


Figura 4. Comportamiento de G' y G'' en función de la frecuencia de yogurt sin y con gelana antes de fermentar.

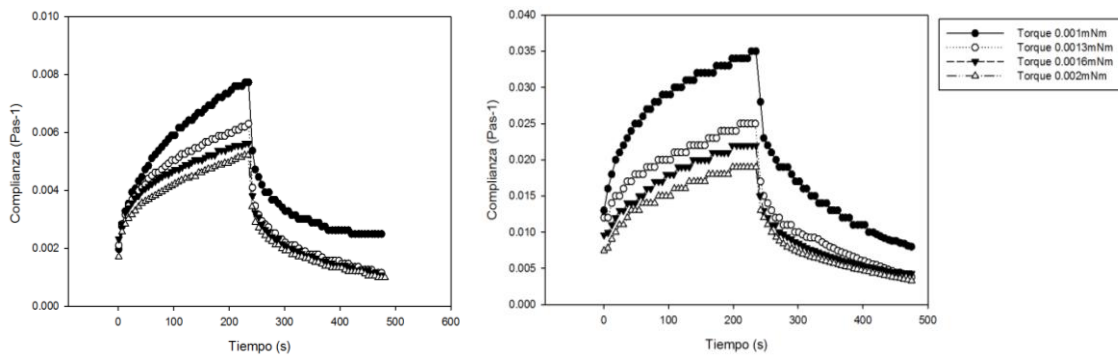


Figura 5. Curva de Creep de yogurt con gelana [0.25%] antes y después de fermentar.

Dentro de las determinaciones dinámicas oscilatorias se realizaron barridos de amplitud (Figura 3) con el objetivo de obtener para los yogurts la zona viscoelástica lineal, antes de obtener los parámetros dinámicos, ya que ésta zona los módulos de almacenamiento y de pérdida G' y G'' son independientes del esfuerzo que se le aplique.

Posteriormente se realiza un barrido de frecuencia (Figura 4), en los yogures; se observa la dependencia de la componente elástica y viscosa a diferentes frecuencias. Se puede entonces observar tanto en la Tabla 1 como en la Figura 4 que la componente elástica (G') es mayor que la componente viscosa (G''). Se observa en la Tabla 1 que el yogurt con mayor elasticidad es el correspondiente a la gelana de alto acilo con una concentración de [0.25%] antes de fermentar. Esto supone que la mayoría de los yogurts realizados, exceptuando la gelana de alto acilo al [0.5%] después de fermentar antes de fermentar presentan menor módulo elástico con respecto al comercial; por lo que es posible afirmar que los yogurts obtenidos se pueden clasificar como geles débiles (Clark & Ross-Murphy, 1987).

Tabla 1. Comportamiento reológico y parámetros dinámicos de yogurts estudiados.

Muestra	Comportamiento al flujo				Barrido de Amplitud	Barrido de Frecuencia		Creep
	$n \times 10^{-3}$	$K \times 10^{-2}$	η (mPas) $\times 10^{-2}$	$R^2 \times 10^{-1}$	ZVL $\times 10^{-3}$	$G' \times 10^2$	$G'' \times 10^2$	% Recuperación
Comercial	8.65	0.762	5.98	9.96	2.13	267	35.4	69.61
Estandarizado	7.89	0.0109	3.71	9.96	2.54	583	1.35	76.63
Gelana AA [0.25%] AF	8.70	0.901	6.44	9.97	1.73	656	2.70	81.75
Gelana AA [0.25%] DF	5.37	4.53	6.89	9.98	1.67	515	1.34	84.88
Gelana AA [0.5%] AF	8.98	0.0225	3.47	9.97	4.38	552	1.18	75.76
Gelana AA [0.5%] DF	8.30	0.0130	4.52	9.95	2.61	249	39.4	73.18

Con respecto a las curvas de Creep el yogurt que presenta mayor recuperación es la adicionada con un porcentaje menor de gelatina de alto acido [0.25%], un aumento de 17.44% y 6.67% con respecto al control positivo y negativo; es decir sin gelatina y comercial. Por lo anterior el comportamiento de los yogurts es de sólidos viscoelásticos.

4. CONCLUSIONES

Los yogurts obtenidos presentan un comportamiento de fluido no Newtoniano de tipo reofluidificante y puede representarse matemáticamente con el modelo de Ostwald de Waele. La componente elástica en todos los yogurts fue mayor que la componente viscosa. Los porcentajes de recuperación obtenidos en los yogurts conteniendo gelatina estuvieron en un rango de 73.18 a 84.88%. De acuerdo a los resultados obtenidos los yogurts presentan un comportamiento de sólidos viscoelásticos. Se considera que los resultados obtenidos permiten disponer de información para que diversos hidrocoloides que puedan incorporarse eviten la sinéresis en Iso yogurts.

BIBLIOGRAFIA

1. Alty, F., Karbancioglu, F., Daskaya, C., & Heperkan, D. (2013). A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics. *International Journal of Food Microbiology*, 167(1), 44-56.
2. Badui, S. (2001). *Química de los Alimentos*. Pearson Educación de México, S. A. de C. V.
3. Hancioğlu, Ö. & Karapinar, M. (1997). Microflora of Boza, a traditional fermented Turkish beverage. *International Journal of Food Microbiology*, 35(3), 271-274.
4. Kasapis, S. & Boskou, D. (2001). Rheological and sensory properties of popular Greek foodstuffs: A Review. *International Journal of Food Properties*, 4(2), 327-340.
5. Ozer, B., Robinson, R., Grandison, A., & Bell, A. (1997). Comparison of techniques for measuring the rheological properties of labneh (concentrated yogurt). *International Journal of Dairy Technology*, 50(4), 129-133.
6. *Revista Del Consumidor*, (2002). Yogur. Recuperado de http://www.profeco.gob.mx/revista/pdf/est_02/yogurs.pdf
7. Rosas, W., Ramos, E., & Salazar, J. (2012). Importancia biotecnológica de los geles. *Dossier Avance y Perspectiva*, (4).
8. Schenz, T. W. (1997). Using rheology of weak gels to improve fluid foods. *Food Technology*, 51(3), 83-85.
9. Secretaria de Salud,. (2006). Norma Oficial Mexicana NOM-043-SSA2-2005. Ciudad de México: Diario Oficial.
10. Yildiz, F. (2010). *Development and manufacture of yogurt and other functional dairy products*. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis.

LOS MICRORNA COMO NUEVOS BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS

Elba Rodríguez-Hernández¹, Susana Flores Villalva¹, Ana María Anaya escalera¹, Germinal J. Cantó Alarcón², Feliciano Milián Suazo²

¹Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal CENIDF y MA-INIFAP. ² Universidad Autónoma de Querétaro.

RESUMEN

Micobacterium tuberculosis es el agente causal de la tuberculosis en humanos, se estima que un tercio de la población mundial está infectada con tuberculosis y que menos del 10% de los infectados desarrollarán la enfermedad activa, resultando en alrededor de 9 millones de casos nuevos y 1.6 millones de muertes anualmente. La población restante no desarrolla síntomas pero la bacteria está latente con potencial a reactivarse y sin posibilidad de ser diagnosticada. Como una alternativa para determinar de manera específica las infecciones por tuberculosis, recientemente se han investigado nuevos candidatos para desarrollar métodos efectivos de diagnóstico. La secuenciación de alto rendimiento ha permitido la identificación de pequeños RNA no codificantes; entre los cuales, los microRNA (miRNA) son los más estudiados debido a sus funciones regulatorias. En este trabajo revisaremos los avances en la investigación de los miRNA como potenciales biomarcadores de diagnóstico de la tuberculosis. Recientemente se ha propuesto que los miRNA podrían utilizarse como marcadores para monitorear la tuberculosis pulmonar (Tbp) y podrían ser moléculas clave en la patogénesis. Los miRNA han sido detectados en sangre de pacientes con Tbp. En un estudio mediante microarreglos y PCR en tiempo real, se detectaron 59 miRNA circulantes diferencialmente expresados entre pacientes con Tbp y sanos. Interesantemente se detectaron dos sobreexpresados en muestras de suero y esputo de pacientes con Tbp activa comparada con los sanos. Uno de ellos es el miR-29 que regula la respuesta inmune innata y adaptativa a Tb, por lo que se propone como candidato para biomarcador de detección de infecciones por Tbp activa.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis pulmonar es una enfermedad infecciosa estudiada desde hace muchos años y que tiene un gran impacto en la salud pública alrededor del mundo. Actualmente, no se ha podido controlar la enfermedad a pesar de una larga historia de vacunación con BCG en la población. La patogénesis molecular de la enfermedad no es muy clara, sin embargo estudios recientes demuestran la importancia de los microRNA en la patogénesis de la Tbp y que estos pueden ser detectados en sangre de pacientes con la enfermedad. A través de la secuenciación se han identificado una gran variedad de pequeños RNA no codificante (Cole et al., 2009; Lee et al., 2009). Los miRNA han sido señalados como moléculas candidatas para diagnóstico debido a sus funciones regulatorias (Bartel, 2009; Stewart et al., 2013). El papel de los miRNA en la patogénesis de la Tbp es un tema interesante en la medicina actual, recientemente se ha propuesto que pueden ser marcadores útiles para el monitoreo de la tuberculosis pulmonar y podrían formar parte importante en la patogénesis de la enfermedad. Estos han sido detectados en sangre de pacientes con Tbp (Guo et al., 2010). Ma y sus colaboradores demostraron que el miRNA miR-29 ayudo al control de la respuesta inmune innata y adaptativa a Tb enfocando a interferón γ (Ma et al., 2011), a pesar de que no cabe duda que los miRNA podrían ser detectados en sangre de pacientes aún no

se conoce su origen, los miRNA podrían venir del hospedero ó del patógeno y este es un tema para futuros estudios.

Diversos reportes indican que los miRNA juegan un papel importante en la interacción patógeno hospedero; miRNA circulantes han sido detectados de forma estable en sangre y prometen servir como marcadores moleculares para diversas condiciones fisiológicas y patológicas. Usando perfiles de expresión basados en microarreglos seguido por una validación por PCR tiempo real, se compararon los niveles de miRNA circulantes entre pacientes con tuberculosis pulmonar activa y controles sanos; alrededor de 92 miRNA fueron significativamente diferenciales, 59 disminuyeron su expresión y 33 se sobreexpresaron en suero de pacientes con Tb comparándolos con los niveles en pacientes sanos. Interesantemente sólo dos miRNA mostraron sobreexpresión no sólo en el suero si no también en esputo de pacientes con Tbp activa comparada con los sanos. Los autores proponen que el miR-29 sobreexpresado podría discriminar entre pacientes con Tb y sanos con gran sensibilidad y especificidad (Ma et al., 2011). También se ha investigado las rutas de regulación de este miRNA, con lo que se ha podido establecer un número importante de rutas reguladas por miR-29 circulante; algunas están envueltas en la respuesta de fase aguda, respuesta inflamatoria y regulación del citoesqueleto. El miR-29 circulante tiene gran potencial para utilizarse como marcador de detección de infecciones de Tbp activa. Existen varios reportes de la modulación de miRNA en respuesta a la infección de micobacterias como *M. tuberculosis* y *M. bovis* entre los que se encuentran miR-125b, miR-155, miR-144*, miR-155* miR-3179, miR-147, miR-146a/b, miR-886-5p, let-7e, let-7i (Rajaram et al., 2011; Liu et al., 2011; Yi et al., 2011; Sharbati et al., 2011); sin embargo aún queda un gran camino por recorrer para determinar el verdadero potencial de los miRNA en este tipo de infecciones.

2. BIOGÉNESIS Y FUNCION DE LOS MIRNA

Los miRNA son pequeños RNA no codificantes y su biogénesis involucra un complejo proceso multi-enzimático partiendo de una molécula de RNA precursora de una longitud aproximada de 22 nucleótidos, la mayoría de los genes que se transcriben a miRNA están localizados en regiones intergénicas y sólo algunos se localizan en regiones intrónicas. Los miRNA intergénicos se transcriben como unidades autónomas con su propio promotor y regiones regulatorias y se pueden encontrar muy cercanos dentro de la secuencia, por lo que se transcriben como una unidad policistrónica (Lee et al., 2002). Los genes que codifican miRNA por lo general se transcriben en el núcleo por la RNA pol II, en un transcrito largo (>1 kb) el cual se somete a procesamiento como la adición del cap y la poliadenilación. La molécula precursora (pri-microRNA) es cortada en el núcleo por la enzima Drosha, el corte genera dos moléculas de RNA entre 70 y 100 nucleótidos estas cadenas forman estructuras complejas de doble cadena tipo tallo-asa (figura 1), esta molécula es el pre-microRNA que se exporta fuera del núcleo por una vía que depende de la proteína exportina 5, ahí es cortada por Dicer para transformarse en microRNA maduro (dsRNA lineal) de 21 a 24 nucleótidos, estas moléculas son procesadas por el complejo complejo ribonucleoproteínico (miRISC) este complejo dirige el silenciamiento de los genes específicos. Generalmente en la vía de los microRNA se silencian los genes evitando la traducción del mRNA, bloqueando la síntesis de proteínas.

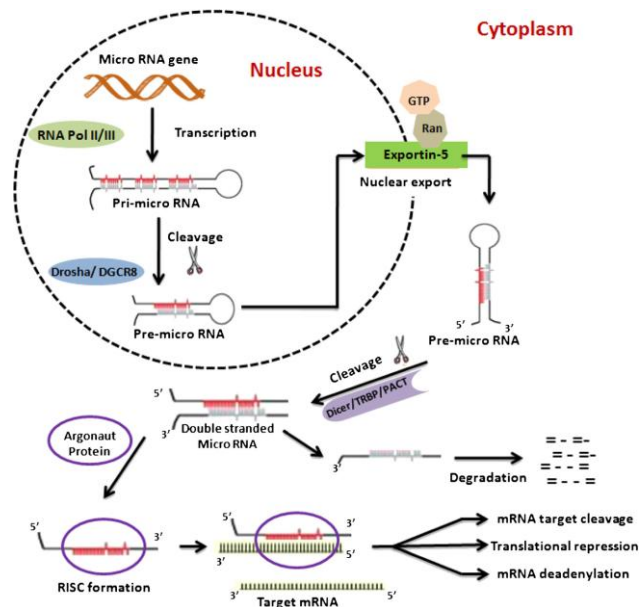


Figura 1. Ruta sintética de la biogénesis de microRNA (Singh et al., 2013)

3. MIRNA INVOLUCRADOS EN INFECCIÓN CON TUBERCULOSIS

En el genoma humano se han identificado alrededor de 1,000 miRNA, todas estas moléculas pueden tener cientos de blancos y se ha estimado que alrededor del 60% del transcriptoma humano puede estar regulado por los miRNA. Aunque es poco claro el papel de los miRNA en los procesos de regulación fisiológicos específicos, es innegable la evidencia que sugiere que estas moléculas tienen un papel importante en los procesos infecciosos dentro del organismo. Existe evidencia de que los miRNA se regulan en respuesta a la infección con Tb, en el cuadro 1 se enlistan algunos reportes disponibles en la modulación de los miRNA del hospedero en respuesta a algunas especies de *Mycobacterium*.

Cuadro 1. Regulación de los miRNA del hospedero en respuesta a la infección por micobacterias

miRNA regulado	Especie de Micobacteria	Referencia
Sobreexpresado: miR-125b	<i>M. tuberculosis</i>	Rajaram et al.
Expresión baja: miR-155		
Sobreexpresión: miR-144*, miR-155, miR-155*		Liu et al.
Sobreexpresión: miR-29 ^a		Fu et al.
Sobreexpresión: miR-3179, miR-147, miR-29 ^a		Yi et al.
Sobreexpresión: miR-155, miR-146a/b, miR-886-5p, let-7e, let-7i, miR-29 ^a	<i>M. bovis</i>	Sharbati et al.

El diseño de herramientas de diagnóstico basadas en moléculas de miRNA permitirá asegurar una alta sensibilidad en el resultado. El miR-29 así como miR-155 y miR-29 han mostrado ser buenos candidatos a marcadores de diagnóstico para tuberculosis activa; el miR-21 juega un papel importante en el tratamiento con estreptomycin de la Tbp (cuadro 2).

Cuadro 2. Principales miRNA identificados como potenciales moléculas para diagnóstico de Tb

Molécula	Posible uso en tuberculosis	Referencia
miR-29	Marcador de diagnóstico para Tbp activa	Ma et al., 2011
miR-155	Marcador de diagnóstico para Tb activa	Wu et al., 2012
miR-155*	Marcador de diagnóstico para Tb activa	
miR-21	Función importante en tratamiento de Tbp	Fu et al., 2011
miR-29	Marcador de diagnóstico para Tbp activa	Bose et al., 2012

4. CONCLUSIONES

Los miRNA son moléculas prometedoras en el desarrollo de métodos de diagnóstico de la tuberculosis activa. La evidencia demuestra que los miRNA modulan su expresión en el hospedero en respuesta a infecciones causadas por micobacterias entre las que se encuentran *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Entre los miRNA que se han identificado como posibles candidatos de diagnóstico de la Tbp activa en suero de humanos, se encuentran el miR-29, miR-155, miR-155, miR-21, miR-29. La futura identificación de nuevos miRNA involucrados en el proceso de infección de diferentes enfermedades y en especial de micobacterias, permitirá determinar los mecanismos moleculares específicos en los que se encuentran involucradas estas moléculas dentro del hospedero y proponer nuevas alternativas de control y terapia, no tan sólo de tuberculosis si no de enfermedades neurodegenerativas y como el cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

1. Y. S. Lee, Y. Shibata, A. Malhotra, A. Dutta. A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs). *Genes Dev.* 2009, 23, 2639–2649.
2. C. Cole, A. Sobala, C. Lu, S. R. Thatcher, A. Bowman, J.W. Brown, et al. Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant Dicer-dependent small RNAs derived from tRNAs. *RNA* 1, 2009, 5, 2147–2160.
3. D. P. Bartel. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009, 136, 215–233.
4. C. R. Stewart, G. A. Marsh, K. A. Jenkins, M. P. Gantier, M. L. Tizard, D. Middleton, et al. Promotion of Hendra virus replication by microRNA 146a. *J. Virol*, 2013, 87, 3782–3791.
5. W. Guo, J. T. Li, X. Pan, et al. Candidate Mycobacterium tuberculosis genes targeted by human microRNAs. *Protein Cell*, 2010, 1:419-21.

6. F. Ma, S. Xu, X. Liu, et al. The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon- γ . *Nat Immunol*, 2011, 12:861-9.
7. J. Wu, C. Lu, N. Diao, et al. Analysis of microRNA expression profiling identifies miR-155 and miR-155* as potential diagnostic markers for active tuberculosis: a preliminary study. *Hum Immunol*, 2012, 73:31-7.
8. Y. Fu, Z. Yi, X. Wu, et al. Circulating microRNAs in patients with active pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 2011, 49:4246-51.
9. D. Bose, G. Jayaraj, H. Suryawanshi, et al. The tuberculosis drug streptomycin as a potential cancer therapeutic: inhibition of miR-21 function by directly targeting its precursor. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51:1019-23.
10. Y. Lee, K. Jeon, J. T. Lee, S. Kim, V. N. Kim: MicroRNA maturation: Stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*, 2002, 21(17):4663–4670.
11. Z. Yi, Y. Fu, R. Ji, R. Li, Z. Guan: Altered micro RNA signatures in sputum of patients with active pulmonary tuberculosis. *PLoS One*, 2012, 7(8):e43184.
12. J. Sharbati, A. Lewin, B. Kutz-Lohroff, E. Kamal, R. Einspanier, S. Sharbati: Integrated microRNA-mRNA-analysis of human monocyte derived macrophages upon *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* infection. *PLoS One*, 2011, 6(5):e20258.
13. M. V. Rajaram, B. Ni, J.D. Morris, M. N. Brooks, T. K. Carlson, B. Bakthavachalu, D. R. Schoenberg, J. B. Torrelles, L. S. Schlesinger: *Mycobacterium tuberculosis* lipomannan blocks TNF biosynthesis by regulating macrophage MAPKactivated protein kinase 2 (MK2) and microRNA miR-125b. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(42):17408–17413.
14. D. S. Ghorpade, R. Leyland, M. Kurowska-Stolarska, S. A. Patil, K. N. Balaji: MicroRNA-155 is required for *Mycobacterium bovis* BCG-mediated apoptosis of macrophages. *Mol Cell Bio*, 2012, 32(12):2239–2253.
15. Y. Liu, X. Wang, J. Jiang, Z. Cao, B. Yang, X. Cheng: Modulation of T cell cytokine production by miR-144* with elevated expression in patients with pulmonary tuberculosis. *Mol Immunol*, 2011, 48(9–10):1084–90.
16. P. K. Singh, A. V. Singh and D. S. Chauhan. Current understanding on micro RNAs and its regulation in response to *Mycobacterial* infections. *Journal of Biomedical Science*, 2013, 20:14

RESPUESTA A FEROMONAS DE LA HEMBRA EN MACHOS HÁMSTER CON Y SIN EXPERIENCIA SEXUAL.

1Denisse Tapia Magallanes, 1Gabriela Arellano Reyes, 1Zeltzin Vergara Riveros, 2Alfredo Trejo Córdova, 2María del Carmen Navarro Maldonado y 2Demetrio Ambriz García
1Licenciatura en Biología Experimental. UAMI. 2Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

RESUMEN

Las feromonas juegan un papel importante en la reproducción, especialmente durante la atracción o cortejo. Los hámsteres (*Mesocricetus auratus*) son individuos que naturalmente viven apartados aproximándose solamente entre géneros durante la cópula. La secreción vaginal post ovulatoria es abundante y muy aromática e indica el principio del metaestro, sin embargo se ha señalado a ésta como atractiva para ocurrencia de la cópula. En los bioterios dada la necesidad de reducción de costos se prefiere mantener a las hembras y a los machos en grupos independientes. El objetivo del presente trabajo fue conocer el efecto de la secreción vulvar de las hembras en etapas de estro, metaestro y diestro sobre la atractividad a machos con o sin experiencia sexual. Se utilizó un dispositivo de 3 vías donde se impregnó la entrada de cada vía con la secreción vulvar. Los machos fueron colocados por turno y por azar en la zona de elección. Cada prueba duró 1 minuto siendo algunas de adaptación y otras de evaluación. Entre cada una de ellas el dispositivo fue perfectamente limpiado y secado con agua destilada y toallitas. Se encontró que los machos sin experiencia lamieron con frecuencia y de manera indistinta las secreciones, mostraron titubeo en su elección y finalmente prefirieron la secreción de hembras en diestro (43% en 38-43 seg, $P < 0.05$). Los machos expertos prefirieron la etapa de metaestro eligiendo muy rápidamente (43% en 3-6 seg, $P < 0.05$). Se concluye que la respuesta a las feromonas sexuales depende de la experiencia sexual previa de los machos.

1. INTRODUCCIÓN

Percibir el olor de las flores sobre la mesa, el de una mascota, el de un perfume y muchos más que entran por nuestro sistema olfativo pareciera tan solo una variedad sin trascendencia de estímulos. Sin embargo, para los animales, los olores son una manera de comunicación compleja y en buena medida relacionada con la reproducción. Se han descrito, mensajeros químicos aromáticos, como el bisulfito de metilo, emitidos desde la boca y los genitales que actúan, percibidos por el olfato, de forma indiscriminada como "olor sexual" y otros más específicos como las feromonas, que son detectados por un órgano el vomeronasal (VNO), que está situado en la parte interna de la nariz y conectado directamente a través de prolongaciones nerviosas con el hipotálamo, que es un lugar central del cerebro, responsable de cambios hormonales y funciones biológicas básicas. Las feromonas influyen sobre múltiples funciones cerebrales, incluso sin acaso ser detectadas de manera evidente por el olfato. La acción de las feromonas es muy especializada y son activas en cantidades muy pequeñas. Se pueden agrupar en tres clases:

- 1.- Feromonas iniciadoras, que modifican el equilibrio hormonal del receptor.
- 2.- Feromonas liberadoras, que inducen pautas de conducta específicas, como variaciones del impulso sexual.

3.- Feromonas informativas que transmiten información sobre características de quien las genera tales como sexo, edad, estado de salud, etc.

Las feromonas son sustancias que luego de ser liberada por individuo, son capaces de modificar la fisiología de sus congéneres, intervienen en el comportamiento sexual y territorial, además tienen importancia vital en la bioestimulación sexual, lo cual es utilizado para describir los efectos estimulatorios de un macho o una hembra, para propiciar la relación sexual con el fin de perpetuar la especie. En el cerdo macho maduro (*Sus scrofa domestica*), la saliva tiene atrayentes sexuales como la feromaxeina, 5-androstenona y el 5-androstenol. Durante la interacción precopulatoria con la hembra, el dicho macho produce cantidad copiosa de saliva espumosa que gotea de su hocico, difundiendo las feromonas, indicando con ello a la hembra que él es sexualmente maduro y aumentando en consecuencia la receptividad sexual de la pareja. La forma en que estas feromonas inducen la conducta sexual de las hembras es a través de la estimulación de neuronas sensoriales del epitelio del sistema olfativo principal (Hart, 1985).

Otro ejemplo del papel de las feromonas se da en las cabras (*Capra hircus*), así como en borregos (*Ovis aries*), donde si ocurre una exposición, sin necesidad de contacto directo, de las hembras en anestro, al olor de machos sexualmente activos, les desencadena la secreción de hormona luteinizante, así como la presentación del estro y la sincronización de la ovulación, este fenómeno se conoce como "efecto macho". Uno de los compuestos responsables del olor característico de los machos maduros de las cabras es el 4-etil ácido octanoico, que induce los eventos neuroendocrinos preovulatorios en la hembra que acompañan al estro.

Por otro lado, en el caso de la hembra del Hámster Sirio Dorado, ésta tiene un ciclo estral con duración de cuatro días. Las hámsteres sirias hembras participan en una serie de diferentes comportamientos precopulatorios, incluyendo el marcado vaginal, que es un olor muy intenso que estereotipa este comportamiento que resulta en la deposición de la secreción vaginal que se realiza en el segundo día del estro y concluye con el enfoque preferencial hacia los olores del sexo opuesto, mismo que atrae al macho para la interacción sexual (Petrulis, 2009).

Esta secreción contiene altas concentraciones de feromonas, o señal de atracción para permitir la proximidad del macho, quien se encuentra, en condiciones de vida libre, en constante tránsito en búsqueda de la ubicación de las hembras, para detectarlas y en su caso, acudir a ellas para el apareamiento (Gutiérrez, 2004).

Las fases del ciclo estral en esta especie son:

El Proestro, que dura aproximadamente 12 horas, en esta etapa el pH vaginal es de 5.4.

El Estro que dura de 9-15 horas, el pH vaginal es de 4.2 y aparece un flujo vaginal abundante y caseoso. La ovulación ocurre 8-11 horas después de la aparición del estro.

El Metaestro que se divide en 2 etapas. El metaestro I, que dura 15 horas, se produce el pico de hormona luteinizante (LH) y la consecuente ovulación múltiple y espontánea. El metaestro II, dura 6 horas, la vagina se ve húmeda y los óvulos liberados se encuentran en el oviducto.

Y finalmente el Diestro que dura 57 horas. El pH vaginal es de 6.1, el diámetro de la luz uterina es de 2.5 mm.

El Objetivo del presente estudio fue conocer la preferencia que presentan los Hámsteres Sirio Dorado macho, que permanecen en grupo o aislados, ante la secreción vulvar odorífera de hembras en etapas de estro, metaestro y diestro.

2. MÉTODO

Se contó con dos grupos de machos, el primer grupo constó de 4 individuos, que permanecieron juntos desde su destete (21 días de edad), los cuales no tenían experiencia sexual, con un peso promedio de 174g y edad de 5 meses. El segundo grupo constó de 3 machos aislados (uno por caja), con amplia experiencia sexual previa y peso promedio de 132.8g y edad de 12 meses.

Las hembras utilizadas para la obtención muestras aromáticas (por impronta), tenían un peso promedio de 165g y edad de 10 meses.

Los machos permanecieron en cajas de acrílico de 23cm de alto, 34 cm de largo y 17cm de ancho, con cama de viruta y reja superior de metal. Todos en condiciones de bioterio con fotoperiodo de 10 hrs de oscuridad y 14 hrs de luz, con disponibilidad de alimento (Nutricubos Harlan) y agua *ad libitum*, con temperatura promedio de 23°C, humedad relativa de 60%.

Para las improntas vulvares se usaron hisopos y tubos de ensayo de plástico, previamente esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 min. Las improntas se tomaron cada día directamente de la vulva en las etapas de estro, metaestro y diestro. El hisopo fue colocado dentro de un tubo de ensayo plástico y cerrado hasta su uso.

Se diseñó un dispositivo de selección, el cual comprendió tres canales de tubos de pvc, cada uno con un largo de 51 cm y un diámetro interno de 7cm. El área de elección con diámetro de 17cm y altura de 10cm. Con este dispositivo fueron realizados entrenamientos de los individuos previos a las determinaciones, las cuales consistieron en colocar cada macho en el dispositivo de selección durante un minuto y permitirle libremente recorrer cada uno de los tubos de salida deseado. Para motivar el recorrido por los túneles se colocó al final de cada uno de ellos una semilla de girasol. La prueba se suspendió cuando el animal abandonaba por completo alguno de los tubos o al cumplirse un minuto. Se repitió con cada animal en tres ocasiones y al término se limpió todo el aparato con agua destilada y toallitas secants de papel, para dar oportunidad a otro de los machos.

Para las determinaciones de selección de las feromonas de secreción vulvar de hembras en estro, metaestro y diestro, se destaparon los tubos con los hisopos correspondientes y se untó en la parte media basal a 10 cm de la entrada del área de elección, además para conservar las feromonas los tubos fueron cerrados en su extremo distal con tapas plásticas y cinta adhesiva. Los individuos fueron tomados con un guante de algodón y fueron colocados al centro del área de elección. Una vez colocados se comenzó a registrar el tiempo en un cronómetro y se anotaron el tiempo a la entrada parcial (manos y cabeza) y total (cuerpo completo) al tubo, así como su salida parcial y total del mismo. Cada prueba tuvo un tiempo de duración de un minuto, se repitió tres veces la prueba por cada macho y acto seguido se limpió perfectamente el aparato (tubos y área de selección) con agua destilada y toallitas, para proceder con el registro del siguiente macho y así sucesivamente. La hora de registro fue de las 14:30 a las 15:00 horas en el cuarto de observación del bioterio.

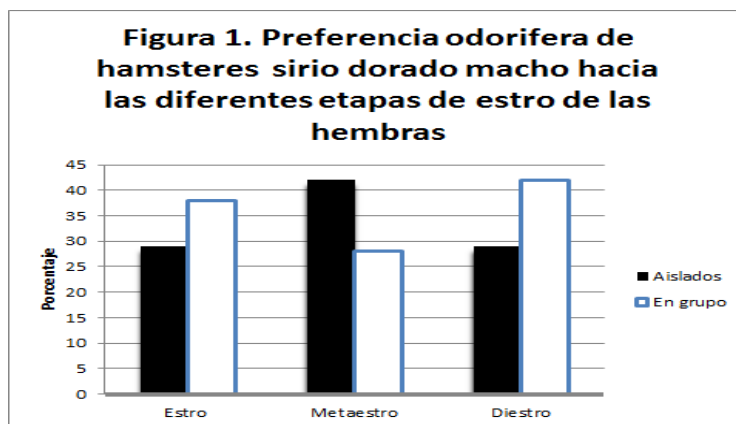


Dispositivo de elección de sustancias aromáticas.

3. RESULTADOS

Los machos criados en grupo y sin experiencia sexual (ni odorífera de pareja), tendieron a lamer las marcas de secreción vaginal que estaban al inicio de cada tubo, para posteriormente entrar en un tubo o entrar y salir en los 3 tubos. Mostraron preferencia odorífera hacia las marcas de las hembras en diestro, seguidas de las de estro (Figura 2). Cabe mencionar que fue notoria la indecisión de estos machos al entrar a los tubos después de lamer las marcas, por lo que el tiempo de la prueba fue más prolongado.

Los machos aislados, por su parte tuvieron preferencia odorífera por las marcas de las hembras en etapa de metaestro, y además, de manera particular estos machos no lamían las marcas de secreción en el tubo, por lo que no tardaron en entrar a alguno de éstos y permanecían dentro de él hasta el término de la prueba. Cabe mencionar que estos animales son utilizados para la cópula con hembras de la colonia de reproducción en el proestro tardío, por lo que ya tienen experiencia tanto odorífera como sexual. Se esperaba que estos machos tuvieran preferencia por las secreción de hembras en estro, aunque cabe la posibilidad, que a corta distancia, la feromona es tan intensa que se prefiera para mejor elección una concentración menor.



Al comparar a los dos grupos de machos, se observa que el comportamiento hacia la preferencia odorífera (feromonas) de secreción de hembras por etapa de ciclo estral es diferente, así que mientras los machos aislados prefieren especialmente la secreción de las hembras en etapa de metaestro, los machos en grupo son atraídos por la secreción de hembras en etapa de diestro seguida de la de estro.

4. DISCUSIÓN

La conducta aquí observada en Hámsteres Sirio Dorado (machos en grupo y aislados), está regida por el olfato, ante el cual influyen fundamentalmente las feromonas de las hembras, que provocan bioestimulación sexual de la pareja. El marcado vaginal o deposición de la secreción, que es propio de las hembras hámster, sirve como atrayente hacia los machos (Martínez y Petruilis, 2011). El olor de atractividad sexual está vinculado a la identificación, localización y estimulación de los posibles compañeros para el apareamiento. Las hembras hámster depositan estas marcas de atracción sexual durante su ciclo estral, pero principalmente lo hacen en la etapa de estro, de tal manera que con ella, dirigen al macho a la zona de cópula y de nidificación. Sin embargo, los resultados aquí obtenidos mostraron que los machos que permanecieron en grupo y sin

experiencia sexual previa, tuvieron la necesidad de intensificar el olor recibido a través de lamer las secreciones vaginales colocadas en la entrada de los tubos, evidenciando que si bien les fueron agradables, no fueron lo suficiente para motivarles una respuesta sexual completa y que incluso buscaran mas la secrecion del diestro, que no es propia para la ocurrencia de la cópula. Por su parte los machos aislados sexualmente expertos, tuvieron, a diferencia de los anteriores, preferencia por la secreción vaginal del metaestro. La respuesta de los machos de ambos grupos fue contrastante, pues se esperaba que respondieran preferentemente a la secreción vaginal del estro. Cabe señalar que en la fase de metaestro, aumenta la hormona luteinizante (LH), la cual va a determinar el final de la producción de estrógenos y el inicio de la producción de progesterona proveniente de los cuerpos lúteos, y con ello la vagina estará más húmeda. Por su parte la secreción vaginal de las hámsteres hembra, en la etapa del diestro hace a los cuerpos lúteos producir abundante progesterona que ayuda a liberar la hormona folículo estimulante (FSH) y la LH, requisito para iniciar nuevamente el ciclo estral, con el desarrollo de nuevos folículos dando paso a la etapa de proestro (Chanut FJ y Williams AM, 2015).

5. CONCLUSIÓN

Los hámsteres sirios dorados machos en grupo, sin experiencia sexual, tuvieron una mayor preferencia por la secreción vaginal de las hembras en etapa de diestro, mientras que los machos aislados, con experiencia sexual, fueron atraídos por las secreciones de la etapa de metaestro. Los machos en grupo, no tenían contacto directo con las hembras, por lo que los olores característicos de éstas en las diferentes etapas de ciclo estral probadas, fueron nuevos para su olfato.

BIBLIOGRAFÍA

1. I. Córdova, Alejandro, Nava N. J. R., Alfonso F. P. I. "Importancia de las feromonas en la reproducción animal" Medicina Veterinaria, Vol. 19, 7-8, 2002, pp 99-107.
2. Chanut y Williams AM, "The Syrian Golden Hamster Estrous Cycle: Unique Characteristics, Visual Guide to Staging, and Comparison with the Rat" Toxicol Pathol. 2015.
3. BL. Hart. "The behavior of domestic animals. New York WH Freeman & Company", 1985. pp 230
4. Martinez A., Petrusis A. "The medial preoptic area is necessary for sexual odor preference, but not sexual solicitation, in female Syrian hamsters" Horm Behav. Vol 63, 4. 2013. pp 606–614.

ELEMENTOS BENÉFICOS AFECTAN PH Y CE DE LA SOLUCIÓN ASÉPTICA Y LA FISIOLOGÍA DE LA PLANTA DE CAÑA DE AZÚCAR EN EL PROCESO DE HÍBRIDACIÓN

Héctor Emmanuel Sentíes-Herrera¹, Libia Iris Trejo-Téllez¹, Fernando Carlos Gómez-Merino¹, Carlos Flores-Revilla² Y Roberto Loyo-Joachin²

¹Colegio De Postgraduados. ²Centro De Investigación Y Desarrollo De La Caña De Azúcar.

RESUMEN

Los elementos benéficos, sin ser esenciales pueden mejorar positivamente procesos fisiológicos de las plantas. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de Al, La, I, Si y Ti a diferentes concentraciones en la solución aséptica empleada en el proceso de hibridación de la caña de azúcar. Se evaluaron 15 tratamientos más un testigo absoluto. Se empleó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones. Las variables evaluadas en las soluciones fueron: pH y conductividad eléctrica (CE); en planta se determinaron lecturas SPAD, diámetro del tallo (DT) y diámetro del raquis central (DRC). El valor del pH de la solución aumenta con la adición de Ti en sus tres concentraciones, mientras que con Al éste disminuye. Con La, I y Si, conserva valores similares al testigo. La CE se incrementó en todos los casos, excepto con Ti [50 µM] que la redujo, en comparación al testigo. Las lecturas SPAD, se redujeron considerablemente con I en sus tres concentraciones, ocasionando un mayor amarillamiento de las hojas. Por otra parte, el DT no fue afectado por los tratamientos evaluados. El DRC, se redujo significativamente con Ti [75 µM], en comparación con el testigo. En conclusión, los elementos benéficos tienen efectos diferenciales en la solución aséptica y en las variables fisiológicas evaluadas en caña de azúcar para propósitos de hibridación.

1. INTRODUCCIÓN

El programa de mejoramiento de caña de azúcar de México, está coordinado por el Centro de Investigación y Desarrollo de la Caña de Azúcar, A. C. (CIDCA), que cuenta con un banco de germoplasma compuesto por 3,184 variedades, de las cuales 1,133 son mexicanas y 2,051 extranjeras (Sentíes-Herrera *et al.*, 2014; CIDCA, 2016). El principal insumo para llevar a cabo dicho trabajo son las inflorescencias, por lo que el proceso de floración es una condición deseable para los fitomejoradores (Salgado-García *et al.*, 2013), para el desarrollo de nuevas variedades (Silva *et al.*, 2013). Para lograr este objetivo, se debe mantener la viabilidad de las inflorescencias durante el periodo que dure el cruzamiento, para lo cual se hace uso de una solución séptica compuesta por las concentraciones de los ácidos siguientes: 100, 50, 25 y 25 mg L⁻¹, para dióxido de azufre, ácido fosfórico, sulfúrico y nítrico, respectivamente. Sin embargo, no siempre se cumple este objetivo, por lo que el uso de elementos benéficos podría ser una alternativa para mejorar las condiciones del medio de establecimiento de los cruzamientos, y así promover el desarrollo y viabilidad de las inflorescencias. Dentro del grupo de elementos benéficos destacan aluminio (Al), yodo (I), lantano (La), silicio (Si) y titanio (Ti).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en la estación de Hibridación de la Caña de Azúcar, dentro de las instalaciones del Centro de Investigación y Desarrollo de la Caña de Azúcar, A. C. (CIDCA), ubicada geográficamente en Tuxtla Chico, Chiapas, a 14° 56' latitud norte y 92° 51' longitud oeste,

a una altitud de 320 m (INAFED, 2016). El clima es cálido húmedo con temperatura media anual de 26.4 °C y precipitación media anual de 4,259 mm (Serrano-Altamirano *et al.*, 2006; CONAGUA, 2016).

Se utilizaron los progenitores de caña de azúcar femenino CC 93-3826 y masculino CP 80-1743, para llevar a cabo un cruzamiento biparental. Este cruzamiento se realizó de acuerdo a las condiciones de trabajo del CIDCA, para lo cual se utilizaron tallos con flores disponibles para armar cada cruzamiento. La duración de éste fue de 12 días. Los tratamientos ensayados consistieron en agregar a la solución aséptica tres concentraciones de cinco elementos benéficos de la forma siguiente: Al a 50, 100 y 150 µM; I a 20, 40 y 60 µM; La a 10, 20 y 30 µM; Si a 5, 10 y 15 µM; y Ti a 25, 50 y 75 µM. Las fuentes fueron Al₂(SO₄)₃, KI, LaCl₃, SiO₂, y TiO₂, respectivamente. Como testigo absoluto se utilizó la solución aséptica que usa el CIDCA. La adición de estos elementos se realizó dos veces durante la duración del cruzamiento, siguiendo el criterio de la reposición de ácidos fijos.

Las variables evaluadas en la solución fueron: pH y conductividad eléctrica (CE); en planta se midieron: lecturas SPAD, diámetro del tallo (DT) y diámetro de raquis central (DRC). Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones. La unidad experimental fue un tallo por progenitor con tres repeticiones. Se realizó de manera independiente para cada progenitor el análisis de la varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$) con el programa estadístico SAS v. 9.4.

3. RESULTADOS

El pH promedio durante la duración de cruzamiento fue modificación por efecto de la concentración de cada elemento benéfico ensayado (**Figura 1**). Las tres concentraciones de Ti, aumentaron significativamente el pH de la solución aséptica, mientras que 50 y 100 µM Al, y 5 µM Si, presentaron los pH más ácidos.

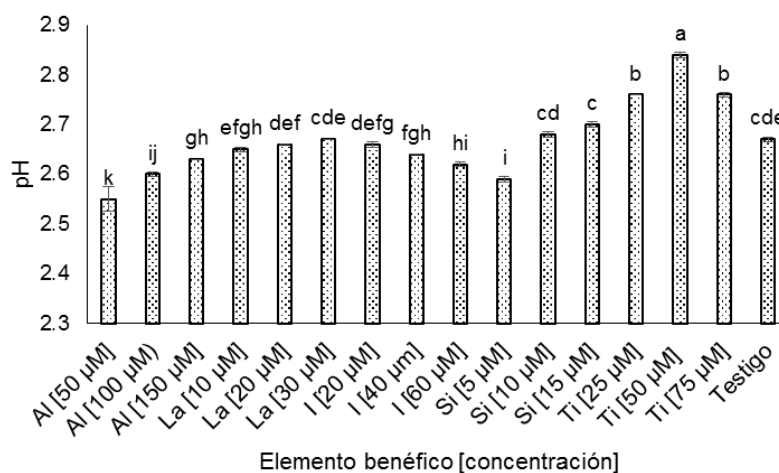


Figura 1. Valores de pH de la solución aséptica por efecto de elemento benéfico y concentración. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias estadísticas entre concentración por elemento benéfico (Tukey, $P \leq 0.05$).

La conductividad eléctrica (CE), también mostró cambios en el periodo de duración del cruzamiento, con una tendencia a aumentar en la mayor parte de los tratamiento ensayados, a diferencia de lo observado por la adición de 50 μM Ti, que redujo significativamente esta variable; mientras que, con la adición de I en una concentración de 60 μM , se presentó el mayor aumento en la CE.

Los valores de lecturas SPAD del progenitor femenino CC 96-3826, mostraron gran relación con el amarillamiento de las hojas observado visualmente. Las tres concentraciones de I, fueron las que tuvieron un mayor impacto negativo, mientras que el resto de los tratamientos se mantuvieron en valores cercanos al testigo. Las concentraciones de 100 μM Al y 5 μM Si, presentaron las lecturas mayores y por ende el mayor verdor de las hojas; sin embargo, éstas fueron estadísticamente iguales al testigo.

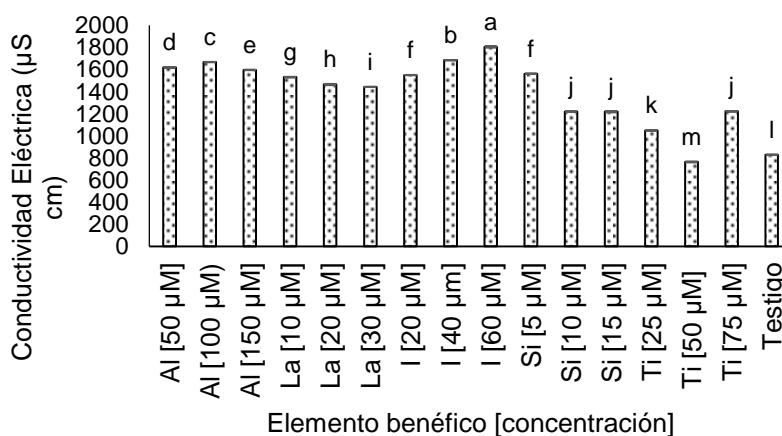


Figura 2. Valores de conductividad eléctrica de la solución aséptica por efecto de elemento benéfico y concentración. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias estadísticas entre concentración por elemento benéfico (Tukey, $P \leq 0.05$).

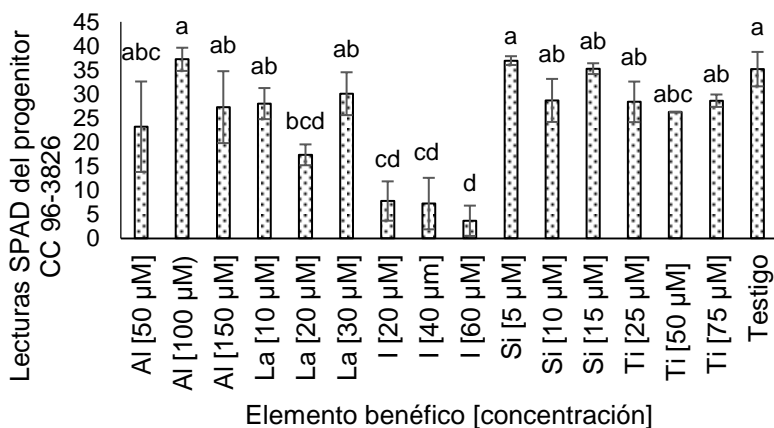


Figura 3. Lecturas SPAD en el progenitor femenino CC 96-3826 por efecto de elemento benéfico y concentración. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias estadísticas entre concentración por elemento benéfico (Tukey, $P \leq 0.05$).

Las lecturas SPAD del progenitor masculino CP 80-1743, se comportaron de manera diferencial al progenitor femenino. Las concentraciones de 20 y 30 μM La, 20 μM I, y 10 μM Si, fueron las que tuvieron mayor impacto negativo en esta variable. El resto de los tratamientos, fueron estadísticamente iguales al testigo, aunque con valores por debajo a éste y el Al [50 μM] presentó lecturas muy similares.

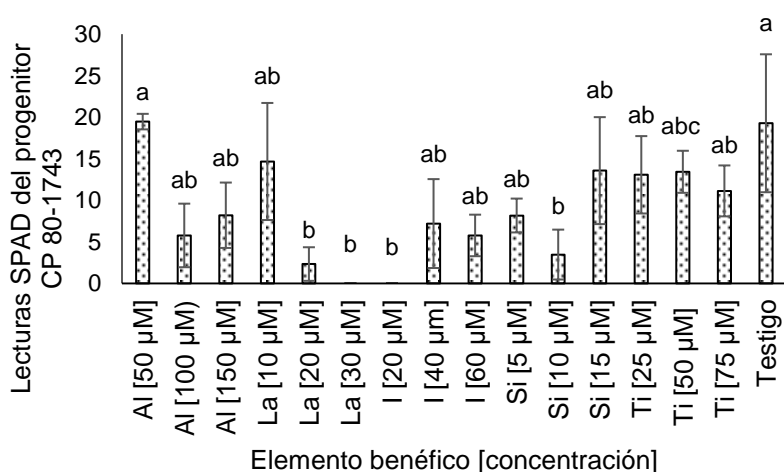


Figura 4. Lecturas SPAD en el progenitor masculino CP 80-1743 por efecto de elemento benéfico y concentración. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias estadísticas entre concentración por elemento benéfico (Tukey, $P \leq 0.05$).

En lo que refiere al diámetro del tallo (DT), para ambos progenitores, no se presentaron diferencias estadísticas significativas (datos no mostrados). El diámetro del raquis central (DRC), en el progenitor hembra, fue reducido con 75 μM Ti, y el resto de los tratamientos fueron estadísticamente iguales al testigo. Sin embargo, en el progenitor masculino, todos los tratamientos tuvieron un efecto negativo, al reducir el DRC.

A pesar que el Al es considerado como elemento benéfico, Gallardo *et al.* (2005), reportaron que en plantas de trigo crecidas en presencia de Al con un pH de 4.8, se puede reducir el crecimiento de raíces y la actividad de la enzima nitrato reductasa, pero las afectaciones pueden ser de mayor grado dependiendo del genotipo. En nuestro experimento, pudimos observar una acidificación de la solución e incremento de la CE, y esto afectó de manera significativa en cada uno de los progenitores las lecturas SPAD, siendo más severas en el progenitor masculino. El La, presenta efectos positivos en la fisiología de la planta y mejora indicadores de rendimiento en cultivos (Hu *et al.*, 2004). En el caso de maíz, puede estimular el crecimiento radical por la acción que presenta el La en la estabilización del citoesqueleto en la célula (Liu y Hasentein, 2005). Las lecturas SPAD, pueden ser afectadas en mayor o menor medida por este elemento, y esto estará en función de la

concentración de La en el medio de crecimiento y la concentración del mismo, y por el genotipo en cuestión, que en nuestro caso, el progenitor masculino se vio mayormente afectado. Blasco *et al.* (2013), demostraron que a bajas concentraciones de I en el medio de cultivo pueden ser benéficas para algunas especies, aunque también pueden tener efectos perjudiciales para el desarrollo en general. En frutales se ha reportado que puede adelantar procesos de floración, debido al aumento de la actividad fotosintética y la acumulación de azúcares (Landini *et al.*, 2012). Por otra parte, Dai *et al.* (2004), determinaron que acumulaciones crecientes de este elemento puede no presentar un efecto benéfico de su suministro en distintos genotipos. En esta investigación, se encontró un efecto negativo en la concentración de pigmentos fotosintéticos, ya que con las tres concentraciones ensayadas, se adelantó el amarillamiento de las hojas y causando una marchitez prematura en ambos progenitores de caña de azúcar. La caña de azúcar es un acumular de Si (Takahashi *et al.*, 1990), mismo que puede tener efectos benéficos en la fisiología de la planta y en la mitigación del estrés por factores biótico y abióticos (Xiao-Dong *et al.*, 2010; Jamali y Rahemi, 2011). Con la adicción de Si a la solución aséptica, no se mostró cambios en el pH, pero si aumentó la CE. En relación a lecturas SPAD, se muestra una fuerte afectación en el progenitor masculino aunque sin diferencia estadística, mientras que en el progenitor femenino se mantienen similares al testigo. Se ha demostrado que el Ti, mejora el crecimiento en plantas de avena ya que estimula procesos enzimáticos e incrementa la absorción de otros iones (Hruby *et al.*, 2002). Concentraciones menores a 50 mg de Ti, pueden incrementar la materia seca, altura de planta y el contenido de clorofilas (Kuzel *et al.*, 2003). En esta investigación, el Ti, tiene efectos en el pH y la CE, dependiendo de la concentración será el efecto en estas variables. Caso contrario a lo reportado por Kuzel *et al.* (2003), en la presente investigación encontramos que existe una reducción de las clorofilas y en mayor medida en el progenitor masculino. Lo anterior, da evidencia de la existencia de efectos de los elementos benéficos en genotipos de una misma especie.

4. CONCLUSIONES

Los elementos benéficos tienen efectos diferenciales en la solución aséptica y en las variables fisiológicas evaluadas en caña de azúcar para propósitos de hibridación.

BIBLIOGRAFÍA

1. F. Gallardo, B. M. Pino, M. Z. Alvear, B. F. Borie. "Efecto del aluminio en la producción de materia seca y en la actividad nitrato reductasa de dos variedades de trigo, creciendo en soluciones nutritivas", R.C. Suelo Nutr. Veg., Vol. 5, 1, 2005. pp. 30-36.
2. Blasco, R. Leyva, L. Romero, J. M. Ruiz. "Iodine effects on phenolic metabolism in lettuce plants under salt stress", J. Agric. Food Chem. Vol. 61, 2013. pp. 2591-2596.
3. Jamali, M. Rahemi. "Carnation flowers senescence as influenced by nickel, cobalt and silicon", J. Biol. Environ. Sci. Vol. 5, 15, 2011. pp. 147:152.
4. CONAGUA. "Precipitación pluvial media histórica y total anual en el Estado de Chiapas". Disponible en: <http://www.conagua.gob.mx/OCFS07/Contenido/Documentos/mediasgrfs.htm>. 2016.
5. Takahashi, J. F. Ma, Y. Miyake. "The possibility of silicon as an essential element of higher plants", Comments Agric. Food Chem. Vol. 2, 1990. pp. 99-122.
6. INAFED. "Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México. Tuxtla Chico". Disponible en: <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM07chiapas/municipios/07102a.html>. 2016
7. J. L. Dai, Y. G. Zhu, M. Zhang, Y. Z. Huang. "Selecting iodine-enriched vegetables and the residual effect of iodate application to soil", Biol. Trace Elem. Res. Vol. 101, 2004. pp. 265-276.

8. M. Hruby, P. Cígler and S. Kuzel. "Titanium in plant nutrition. The contribution to understanding the mechanism of titanium action in plants". *J. Plant Nutr.* Vol. 25, 2002. pp. 577-598.
9. M. Landini, S. Gonzali, C. Kiferle, M. Tonacchera, P. Agretti, A. Dimida, P. Vitti, A. Alpi, A. Pinchera, P. Perata. "Metabolic engineering of the iodine content in *Arabidopsis*". *Sci Rep.* Vol. 2, 2012. pp. 338.
10. M. Liu, K. H. Hasenstein. "La³⁺ uptake and its effect on the cytoskeleton in root protoplasts of *Zea mays L*", *Plant Physiol.* Vol. 220, 2005. pp. 658-666.
11. S. Kuzel, M. Hruby, P. Cígler, P. Tlustos, P. N. Van. "Mechanism of physiological effects of titanium leaf sprays on plants grown on soil". *Biol. Trace Elem. Res.* Vol. 91, 2003. pp. 179-189.
12. V. Serrano-Altamirano, G. Díaz-Padilla, A. López-Luna, M. A. Cano-García, A. D. Báez-Gonzalez, E.R. Garrido-Gonzalez. "Estadísticas climatológicas básicas del Estado de Chiapas (período 1961-2003)". (Centro de Investigación Regional Pacífico Sur, Campo Experimental Centro Chiapas. Libro Técnico 1. INIFAP, 2006). p. 186.
13. W. Xiao-Dong, C. Ou-yang, F. Zhe-ren, S. Gao, F. Chen, L. Tang. "Effects of exogenous silicon on seed germination and antioxidant enzyme activities of *Momordica charantia* under salt stress". *J. Anim. Plant Sci.* Vol. 6, 3, 2010. pp. 700- 708.
14. Z. Hu, H. Richter, G. Sparovek and E. Schnug. "Physiological and biochemical effects of rare earth elements on plants and their agricultural significance: A review", *J. Plant Nutr.* Vol. 27, 2004. pp. 183-220.

POTENCIAL PRODUCTIVO DE LA CAÑA DE AZÚCAR Y SUS SUBPRODUCTOS EN LA ALIMENTACIÓN ANIMAL

Berenice Sánchez Mendoza¹, Miguel A. Camargo Gurgua², Yissel S. Valdez García³, Elsa A. Contreras Contreras¹.

¹INIFAP- CENID FyMA. ²Pilgrims México. ³Universidad Autónoma de Nayarit.

RESUMEN

La caña de azúcar es un recurso forrajero, con gran potencial, debido a su gran producción de biomasa por unidad de superficie, pero presenta ciertas deficiencias nutricionales. Es usada en procesos de fermentación aeróbica, y puede utilizarse como fuente de energía para el crecimiento microbiano. El azúcar representa solo el 10% de la caña mientras que el resto, lo constituyen cantidades de mayor magnitud que pueden resultar en más de 50 derivados de primera generación, que a su vez dan lugar a más derivados. La asociación entre la industria azucarera y la alimentación animal puede incrementar la productividad de la caña de azúcar; la importancia de su producción radica en el potencial de rendimiento energético obtenible a partir de esta y sus diferentes procesados para mejorar su calidad nutricional. Sin embargo la tasa de ganancia obtenida de este producto dependerá del subproducto o derivado que sea más productivo para la industria cañera. A pesar del potencial forrajero de la caña de azúcar, los países productores de azúcar se enfrentan al reto de diversificar su producción, como respuesta a las dificultades del mercado internacional y las tendencias desfavorables de los precios del azúcar, por tal motivo el objetivo del presente trabajo es analizar el potencial productivo de la caña de azúcar y sus subproductos en la alimentación animal. La importancia en la producción de caña de azúcar en la alimentación animal radica en el potencial de rendimiento energético obtenible, y sus diferentes procesados para mejorar la calidad nutricional de esta.

1. INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar es una gramínea perenne adaptada al ambiente tropical y subtropical que usualmente se utiliza para la producción de azúcar. Esta es considerada como un recurso forrajero, con potencial, debido a su gran producción de biomasa por unidad de superficie (Alexander, 1988), pero presenta ciertas deficiencias nutricionales, tiene un bajo contenido de proteína y minerales (Martín, 2004). La concentración de azúcares se incrementa con la edad de la planta, entre ellos la sacarosa, la cual es usada en procesos de fermentación aeróbica, y puede utilizarse como fuente de energía para el crecimiento microbiano, con el incremento de su contenido de proteína (Elías *et al.* 1990). El azúcar representa alrededor del 10% de la caña mientras que el resto (Subproductos de la cosecha o industria) constituyen cantidades de mayor magnitud que pueden resultar en más de 50 derivados de primera generación, que a su vez dan lugar a más de 100 nuevos derivados. Una hectárea de caña de azúcar por año es capaz de aportar 100 t de materia verde, más del doble que otras plantas. En términos de energía, 75,000 Mcal (313,935 Mj) (ICIDCA, 1990). En comparación con el maíz que produce, 69,01200 Mcal (288,8704 Mj). A pesar del potencial forrajero de la caña de azúcar, los países productores de azúcar se enfrentan al reto de diversificar su producción, como respuesta a las dificultades del mercado internacional y las tendencias desfavorables de los precios del azúcar, por tal motivo el objetivo del presente trabajo es analizar el potencial de la caña de azúcar y sus subproductos en la alimentación animal.

2. TEORÍA

Subproductos y derivados de la caña

La caña como materia prima da lugar a 8 productos primarios que se originan durante la cosecha y su procesamiento (Salgado et al. 2003). **Azúcar**, se obtiene como producto cristalizado para su comercialización y como componente de la miel final, en la que constituye de 32 a 38% de su peso. En la alimentación para no rumiantes es considerada como una excelente fuente de energía, pero hasta el momento los precios de este producto limitan su uso, por lo cual se toman en cuenta otras alternativas, como es la melaza o el jugo de caña (Mena, 1985), que ha demostrado ser una excelente fuente energética para los cerdos en ceba sin embargo no tuvo éxito cuando se usó para compensar el menor contenido de energía de la miel. **Jugo de caña**, o guarapo ha demostrado ser una excelente fuente de energía para los cerdos. Sus desventajas radican en su rápida fermentación que puede ser resuelta con el uso de aditivos, y en los volúmenes que es necesario trasladar dado su bajo contenido de materia seca (Savón y Díaz, 1989). **Mieles**, por su alto contenido de carbohidratos se utilizan en la formulación de alimento para la ganadería, mezcladas con paja de caña o bagazo fino, como fuentes de fibra y con aditivos nutricionales como urea, esta también es materia prima para la industria fermentativa. **Alfa-amilasa**, es un preparado enzimático de origen bacteriano, obtenido a partir de *Bacillus subtilis*, esta participa en la degradación del almidón hidrolizado indistintamente, al agar. El resultado es una mezcla de glucosa, maltosa, y dextrinas de bajo peso molecular. Su mecanismo de acción depende de la fuente de la enzima. **Levadura *Saccharomyces***, microorganismos unicelulares utilizados con fines industriales y comerciales. Se usan como aditivos en la alimentación y para forrajes, por su alto contenido de proteína, buen balance de aminoácidos y elevado contenido de vitaminas del complejo B, esta tiene ventajas en relación con otros microorganismos por la capacidad de asimilar gran variedad de sustratos, velocidades de crecimiento altas y biomasa fácilmente separable. Esta es utilizada en la formulación de piensos para aves y cerdos. Lezcano y Castañeda (2000), utilizaron esta levadura, para la preservación de los residuos proteicos de la destilería del alcohol, que permiten lograr un efecto estabilizador en el tracto gastrointestinal de los lechones al eliminar la proliferación de bacterias patógenas como *E. coli* o por el contenido de vitaminas en las levaduras y la producción de ácido láctico. **Producción de grasas a partir de levaduras**, son microorganismos como *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* y levaduras de los géneros *Candida*, *Liporuyces* y *Rhodotorula*. **Mieles para uso directo como alimento**, obtenidos a partir de la concentración y agotamiento del jugo de caña dentro del proceso azucarero, se distinguen cuatro tipos de mieles: miel rica o meladura, miel A, miel B y miel C o final. Se trata de siropes oscuros de alta concentración de sólidos, alta viscosidad y densidad en la que la proporción de sacarosa disminuye. Díaz y González (1999), demostraron la autorregulación en la alimentación de los cerdos con la ingestión de miel final, pero la mejora en los indicadores productivos depende de la concentración proteica del pienso; ya que cuando ésta es menor al 15%, el comportamiento se deprime. **Miel proteica**, es una mezcla de carbohidratos y proteínas en proporciones que permite obtener un contenido de 12 a 13.5% de proteínas y entre 44 y 45% de MS. El aporte proteico es con la adición de crema de levadura, puede ser complementado con metionina. Se emplea en la alimentación porcina, en las dietas de reproductoras y ceba, es complementada con una premezcla de vitaminas y minerales (ICIDCA, 1990). Marrero, 1976, evaluaron el uso de la miel enriquecida en la alimentación de los cerdos en ceba y la consideraron una excelente fuente de energía, con la correspondiente desventaja de la ausencia de nitrógeno proteico. **Bagacillo predigerido**, es un alimento fibroso con 53% de humedad, y baja densidad volumétrica, alcanza una digestibilidad de 55 a 60% con hidróxido de sodio; se emplea como alimento en dietas para rumiantes. **Residuos de la cosecha procesados**, es un producto destinado a la alimentación de rumiantes a partir del procedimiento mecánico de estos residuos, los cuales son mezclados con miel, urea y sales minerales. Pueden sustituir el 100% del forraje de baja calidad, o el ensilaje o heno en una dieta de mantenimiento en animales estabulados (ICIDCA, 1990). **Enriquecimiento proteico de residuos de la cosecha cañera**, mediante un proceso de fermentación en estado sólido con cepas de hongos filamentosos pertenecientes al género *aspergillus* se puede aumentar el contenido de proteína verdadera con

vistas a mejorar la calidad nutricional de los mismos y ser empleados en la alimentación de rumiantes. **L-Lisina**, no puede ser sintetizado por los organismos animales, su obtención es por vía fermentativa, puede presentarse de forma líquida, bioconcentrado, y cristalina. Se emplea en el enriquecimiento de cereales y en la formulación de piensos para no rumiantes. **Ácido propiónico**, puede ser obtenido por vía química microbiológica, se usa en la industria alimentaria. **Bagazo**, se utiliza como materia prima para sus derivados debido a que está asociado con el proceso de producción de azúcar y es muy rentable (Salgado et al. 2003), este es un residuo lignocelulósico fibroso que está presente en el tallo de la caña, este se ha usado como combustible.

Los procesados de la caña

La extracción del jugo moliendo la caña es una de las primeras etapas del procesamiento del azúcar crudo. En las prácticas de molienda más eficientes, más del 95% del azúcar se convierte en jugo, este porcentaje se conoce como extracción de sacarosa. El bagazo final que sale del molino contiene el azúcar no extraído, fibra leñosa y de un 45-55% de agua. El jugo que es color verde, ácido y turbio, tiene un proceso de clarificación, diseñado para remover las impurezas tanto solubles como insolubles, emplea como agentes clarificantes cal y calor. La cal neutraliza la acidez del jugo, formando sales insolubles de calcio. El calentamiento del guarapo alcalinizado hasta el punto de ebullición o ligeramente arriba, coagula la albúmina y algunas grasas, ceras y gomas. Este precipitado atrapa las partículas sólidas en suspensión sin importar su tamaño. El agua contenida en el jugo se evapora al vacío, se hace hervir el jugo contenido y al final se pasa a un condensador de donde sale un jarabe con 65% de sólidos y 35% de agua. Posteriormente se añade al jarabe cal y ácido fosfórico, se airea con la adición de un floculante. El jarabe floculado pasa a un clarificador, en este proceso el jarabe se evapora hasta quedar saturado de azúcar, aquí se añaden semillas a fin de que sirvan de núcleos para los cristales de azúcar. Con la masa formada del cristalizador se integran las mieles, que contienen aproximadamente una tercera parte de sacarosa, una quinta parte de azúcares reductores y el resto ceniza (Salgado et al. 2003).

Potencial de la caña de azúcar en la alimentación animal

La caña de azúcar se considera como un recurso forrajero, debido a su alta producción de biomasa por unidad de superficie, ya que es un cultivo eficiente en la captura de la energía solar durante la fotosíntesis. Además, se puede emplear en las etapas críticas de disponibilidad de pastos y forrajes, sobre todo en la época de seca, ya que es en ella cuando tiene la mayor producción de biomasa, debido a que este cultivo requiere poca agua cuando está en edad adulta. Salgado et al. (1994) al estudiar diferentes variedades de caña, dosis de fertilización y drenaje subterráneo, reportaron producciones de 89 a 150 t/ha/año. Al igual que en otros cultivos, los rendimientos de la caña pueden ser variables. Martín (2004) al revisar el rendimiento en varios países encontró que, la producción de tallos puede variar entre 88 y 148 t/ha/año e indicó que si se consideraba la biomasa total (tallos, cogollos y hojas) aprovechable para la alimentación animal, la producción se incrementaría en 30%. Lo anterior coincide con los estudios de composición morfológica realizado por López et al. (2003) en ocho variedades de caña, donde encontraron que, como promedio, los tallos de la caña representaron el 68.5% del total, el cogollo el 14.7% y la paja 16.8%; así mismo, López et al. (2004) al estudiar 5 variedades de caña, encontraron que los tallos como promedio representaron 68.2%, el cogollo el 26.0% y la paja el 6%. El potencial máximo de producción de biomasa total de la caña de azúcar en las regiones tropicales y subtropicales se estimó por Alexander (1988) en 395 y 276 t/ha/año, respectivamente, muy superior a lo señalado en la literatura internacional. La caña de azúcar presenta deficiencias nutricionales, ya que tiene bajo contenido de proteínas (2 a 3%); es deficiente en minerales, principalmente en fósforo y azufre. Debido a esto, para su empleo en la producción animal se debe suplementar adecuadamente con una fuente NNP, como la urea (1 a 2%), además, de azufre en una relación N: S de 10:1.

Existen otras alternativas para el uso de caña en la alimentación animal como son sus subproductos, en la Cuadro 2 se observa la composición bromatológica de fuentes energéticas

obtenidas de la caña de azúcar, resalta a primera vista el hecho que sólo los productos sometidos a procesos biotecnológicos tienen determinadas concentraciones de proteína, así como la alta proporción de fibra cruda de otros.

Cuadro 1. Composición química (%), de los ingredientes usados en los procesos de FES de la caña de azúcar.

Ingredientes	MS	NT	NP	NNP	FDN	FDA	Lig	MO
Tallos de caña ¹	24.40	0.36	0.26	0.09	50.96	36.62	5.99	3.62
Miel final	81.20	0.59		0.59				9.90
Vitafert	19.00	4.80	2.88	1.92				

¹Grado Brix del tallo de caña de azúcar: 19.33 ± 0.58 .

Alimentación con mieles

En los sistemas de alimentación con caña de azúcar que han sido evaluados, se ha seguido el método de ofrecer los productos secos y líquidos en el mismo comedero, suministrando primero los secos y posteriormente los líquidos, se ha demostrado que cuando se suministra miel final y pienso ad libitum en comederos independientes, el porcentaje de ingestión es óptimo. Los indicadores productivos de los cerdos resultan variables, con diferencias más marcadas, según se elevaba el porcentaje de miel final en la dieta, esto se debe a que disminuyen los coeficientes de digestibilidad, al menor contenido de energía digestible de las dietas y a que los cerdos no elevan el consumo para compensar esto y dedican menos tiempo a descansar. Díaz y Rodríguez (2002a), encontraron diferencia en la proporción de ingestión de la miel final, en machos castrados vs hembras ya que tuvieron un mayor porcentaje (18.2 contra 17.1 %), el CMS, miel final y total fue 1.64, 0.34 y 1.98 y 1.63, 0.36 y 1.99 kg para hembras y machos, respectivamente. Estos resultados constituyen la primera información de un sistema de alimentación con pienso (53 % de azúcar crudo) suministrado ad libitum, al igual que la miel final de caña de azúcar, pero en comederos independientes. Los resultados permitieron sugerir que para este período es posible alcanzar ganancias diarias de alrededor de 700 g. Díaz y Rodríguez (2002a), suministraron un pienso con 14.3 % de proteína bruta y azúcar cruda o miel final, ad libitum, pero en comederos independientes. El consumo de pienso solo (kg) (2.18 y 2.50) y total (3.02 y 3.30), la conversión alimentaria del pienso (2.93 y 4.19) y la total (4.06 y 5.53), así como la proteína (0.42 y 0.60) fueron mejores en los cerdos que consumieron azúcar crudo y concluyeron, que cuando se utiliza un pienso con un contenido medio de proteína, el comportamiento de los cerdos es mejor al suministrarles azúcar crudo, que miel final.

Fermentación en estado solidó (FES), con el uso de la caña de azúcar

Las FES han sido utilizadas ampliamente para el reciclaje de materiales voluminosos a través de tecnologías sencillas con las que se logra incrementar los niveles proteicos, mejorar el balance de aminoácidos y la digestibilidad de las materias primas empleadas. No obstante los conocidos beneficios que se logran con estas tecnologías, aún necesitan ser estudiados para mejorar la eficiencia de su proceso. En otros experimentos se ha buscado determinar la variación en el tiempo de los indicadores químicos y fermentativos de mezclas de caña de azúcar y boniato (50:50), Rodríguez et al. (2001b), realizaron un experimento con cuatro repeticiones por cada tiempo de muestreo (0, 24, 48, 72, 96, 138 y 336 h) y observaron que la MS disminuyó 50 %

mientras que la proteína verdadera se quintuplicó. La PB mostró un comportamiento inverso al de la MS excepto a las 96 horas donde hubo una reducción, momento en el que se encontraron los valores máximos de NH₃ y conteos de levaduras (11.34 meq/l y 7.50 x 10⁻⁹) La síntesis real de proteína mostró su máximo valor a las 96 h (3.32 unidades porcentuales) y aún cuando continuó sintetizándose proteína esto ocurrió más lentamente (3.5 veces el tiempo) y concluyeron que bajo las condiciones estudiadas es necesario incrementar el tiempo de fermentación a 96 h para lograr un mayor enriquecimiento proteico.

Cuadro 2. Composición bromatológica de fuentes energéticas obtenidas de la caña de azúcar.

Productos	Composición, base húmeda, %						
	MS	PB	6.25	FC	Ca	P	ED Mj/kg
Jugo de caña o guarapo	15.0						2.0
Miel integral	79.5				0.10	0.80	11.1
Miel rica	80.0				0.08	0.05	11.3
Miel A	80.0				0.70	0.05	11.2
Miel B	75.0				0.85	0.05	11.0
Miel C o final	74.7				0.80	0.10	10.9
Azúcar	99.0						17.4
Caña troceada	26.2			7.3	0.14	0.04	2.4
Saccharina húmeda	33.0	3.3		7.3	0.10	0.08	3.6
Saccharina deshidrata	88.1	8.9		20.4	0.27	0.22	9.5
Saccharina-maíz	88.3	9.0		11.0	0.32	0.27	10.5
Saccharina-boniato	88.6	9.0		9.0	0.30	0.25	10.6
Bagazo	88.3	1.4		49.0	0.70	1.18	0.08

MS = Materia seca, PB = Proteína bruta, FC = Fibra cruda, Ca = Calcio, P = Fósforo, ED = Energía digestible

Saccharina (SA)

La saccharina es un alimento proteínico energético, que se obtiene a partir del proceso de fermentación de la caña de azúcar en estado solidó, que se traducen en la generación de un alimento con mayor contenido de proteína total. Elías et al. (1990) desarrollaron una tecnología de enriquecimiento proteínico de la caña de azúcar, limpia y molida (98%, sin hojas, sin pajas y sin cogollo) mediante la FES durante 24 horas, con la inclusión de 1.5% de urea y 0.5% de minerales, para obtener síntesis de proteína microbiana. Durante el proceso de fermentación aeróbica, la energía disponible en forma de carbohidratos solubles, es utilizada para la conversión del NNP de

la urea en nitrógeno precipitable al ácido tricloroacético a través de un proceso físico biológico, en el cual tienen un papel importante los microorganismos epifíticos de la caña de azúcar (Valiño et al. 1994 a y b). En esta FES, la eficiencia de conversión de los carbohidratos solubles a proteína puede llegar a valores de 61%, debido al desarrollo de la microbiota que se establece en el sistema. El contenido de proteína bruta (PB), proteína verdadera (PVE) y fibra bruta (FB) de la Saccharina está en el rango de 11.1 a 16.0%, entre 8.9 a 13.8% y de 24,6 a 26.6%, respectivamente. Debido a su alto contenido de polisacáridos estructurales, se le han incluido otros alimentos que puedan servir como agentes dilutores de la fibra o potencializadores de la eficiencia fermentativa, como producto destinado para la alimentación animal presenta ciertas limitaciones en su uso para monogástricos debido a su elevado contenido en fibra y proteína verdadera, considerando los requerimientos de estas especies (Rodríguez et al. 2001a).

Lezcano *et al.* (1994) con la variante rústica de la Saccharina, lograron mejorar la eficiencia de utilización de la proteína por los microorganismos en más de 15 unidades porcentuales y alcanzó 51.6 % al incrementar el grosor de la capa de fermentación. La eficiencia de utilización del nitrógeno por los microorganismos, está directamente relacionada con diversos factores como: la disponibilidad de energía, las condiciones ambientales de pH y aireación. Estos aspectos pueden variar mucho en dependencia del sustrato que sirva como matriz para la fermentación en estado sólido. Se conoce que varios grupos funcionales de microorganismos son capaces de tomar fuentes de azufre inorgánico e incorporarlas a su protoplasma en forma de aminoácidos azufrados esenciales por lo cual la incorporación de sulfato de amonio en base fresca (0.75%), como complemento de la fórmula original de la SA, en un período de 16 h, incrementa la proteína presente (9.76% a 15.58 %) (Ruiz *et al.* 2002). Sin embargo no todos los resultados han sido favorables ya que Ly (1999), probando la digestibilidad ileal y total del tracto digestivo en cerdos con una dieta de harina de maíz o soya y niveles crecientes de harina, caña de azúcar enriquecida (0, 10 y 20%). Observo una reducción significativa en la digestibilidad total e ileal de nutrientes y energía al aumentar el nivel de Saccharina en la dieta. La digestión del intestino grueso osciló entre 13.4 y 15.5% de la energía desaparecida en el tracto digestivo. La digestibilidad ileal y total del N (39.9 y 45.4%) y energía (27.5 y 37.1%) de la Saccharina indicó que la inclusión de esta en la dieta reduce la digestibilidad ileal y total del tracto digestivo.

Caña, soya y maíz, inoculados con vitafert

El Vitafert es un producto que se obtiene por fermentación, en estado líquido, de una mezcla de excreta de gallinas (gallinaza), urea, sales minerales y otros sustratos ricos en bacterias lácticas y levaduras. Se estudió el efecto que producía la harina de maíz, de soya desgrasada, o ambas, en la FES de la caña inoculada con Vitafert (Elías et al. 2001). El Vitafert incrementó la PB, PVE, MO y disminuyó la FB en la caña (testigo). Los mayores valores de PB, PVE y DMO se obtuvieron cuando se mezcló la caña con el maíz, la soya y se inoculó con el Vitafert, 22.19, 15.93, 95.39%, respectivamente. Así mismo, el valor de FB fue el menor (9.92%).

Caña de azúcar con excreta vacuna

Mantiene el mismo principio de la SA, pero la variante fue la inclusión de excreta vacuna, la urea y las excretas, en general. La excreta constituye un sustrato cuya composición es idónea para la multiplicación de gran número de bacterias, como son enterobacterias, lactobacillos, levaduras. En la excreta se encuentra el nitrógeno en diferentes formas como son amonio, aminoácidos, péptidos y proteínas, además factores energéticos como oligosacáridos, monosacáridos, almidones carbohidratos estructurales. Sin embargo, también contiene microorganismos que son patógenos potenciales entre los que se encuentra *E. coli*, que constituye además, Índice del grado de contaminación con enterobacterias. La literatura sobre los procesos fermentativos con la excreta vacuna informa la desaparición de *E. coli* en un proceso anaerobio de 12 días (Bocourt et al. 1998).

Carrasco *et al.* (1998 a y b) mezclaron caña de azúcar con excreta vacuna en una proporción 70:30 (base húmeda) y se le adicionó 0.5% de minerales. Se estudió el efecto de tres niveles de urea (0, 0.5 y 1%) y dos grosores de capa (15 y 20 cm). La concentración de amoníaco y el pH se incrementaron al aumentar la cantidad de urea, independiente del grosor de la capa. Las dosis de urea aumentó la PVE, independientemente del grosor de la capas y los mayores valores se obtuvieron con 0.5 y 1% de urea y grosor de la capa de 15 cm (9.56 y 9.99%, respectivamente). Se obtuvo para la PB un resultado similar (10.18 y 11.79%, respectivamente).

Biofermel

El Biofermel nombre del producto es una mezcla de melaza, bagazo de caña de azúcar (o rastrojos de maíz o paja de trigo o de sorgo), estiércol, urea y agua, del cual existía un sobrante excesivo derivado de los procesos industriales en los ingenios azucareros, conocido como melaza, miel fina o incristalizable y las indeseables reacciones en el ganado, así que se produjo, una fermentación tipo láctica, elaborada a partir de la miel incristalizable y una fuente de microorganismos, esta última tomada del estiércol, ya que las bacterias nocivas que podrían habitar en este, son destruidas al fermentar la melaza, al tiempo que con ello se fomenta el desarrollo de microorganismos benéficos capaces de producir altos niveles de ácido láctico, el cual corrige el proceso digestivo de los animales, y lo torna similar al del consumo de granos de maíz. Las características del producto final son: proteína cruda 12-15 %, grasa 0.5 - 1.0 %, fibra cruda 14.2-15.3, humedad 23.0-25.0%; aportes energéticos: TND 69.5, ED 3.08 Mcal/Kg, EM 2.53 Mcal/Kg, NE 1.62 Mcal/Kg, NEg 1.15 Mcal/Kg, NEL 1.60 Mcal/Kg (Instituto de investigaciones biomédicas. 2006).

3. CONCLUSIONES

La asociación entre la industria azucarera y la alimentación animal puede incrementar la productividad de la caña de azúcar, debido a su disponibilidad en cualquier época y a su producción de biomasa, la información presentada permite afirmar que es factible y viable la conformación de sistemas de alimentación a partir del uso de alimentos provenientes de la caña de azúcar. La importancia en la producción de caña de azúcar en la alimentación animal radica en el potencial de rendimiento energético obtenible a partir de esta, y sus diferentes procesados para mejorar la calidad nutricional, sin embargo la menor o mayor tasa de ganancia obtenida de este producto dependerá del subproducto o derivado que sea más productivo para la industria cañera y el lugar donde este sea procesada.

LITERATURA CITADA

1. Alexander AG. 1988. Sugarcane as a source of biomass. In. Sugarcane as feed. FAO animal production and health paper. Rome. 46 – 60 pp.
2. Bocourt R, Carrasco E, Febles I y Riveri Z.1998.Nota sobre la depuración biológica de *Escherichia coli* en la fermentación aeróbica de la excreta vacuna fermentada con caña molida Rev. Cubana Cienc. agríc.32:409.
3. Carrasco E, Boucourt R, Elías A. y Febles I. 1998a. Indicadores bromatológicos de la caña de azúcar fermentada con excreta vacuna y diferentes niveles de urea y grosor de la capa fermentativa. Rev. Cubana Cienc. Agríc. 32:275.
4. Carrasco E, Boucourt R, Elías A y Febles I. 1998b. Nivel de urea y grosor de la capa en los indicadores fermentativos de la caña de azúcar procesada con excreta vacuna. Rev. Cubana Cienc. Agríc. 32:395.

5. Díaz CP. y Rodríguez Y. 2002a. Consumo voluntario de cerdos en crecimiento alimentados con azúcar crudo y miel final. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 36, No. 1.
6. Díaz CP y González E. 1999. Sistemas de alimentación con el uso de derivados de la caña de azúcar. XIII Forum de Ciencia y Técnica. Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba.
7. Díaz CP, González E y Rodríguez Y. 2002b. Uso de la miel final o el azúcar crudo en la alimentación de cerdos en ceba. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 36, No. 3.
8. Elías A y Lezcano O. 1993. Efecto de la fuente de N y algunos factores de crecimiento en la población de levaduras que se establecen en la producción de Saccharina. Rev. Cubana Cienc. Agríc. 28:319.
9. Elías A, Lezcano O y Herrera FR. 2001. Algunos indicadores bromatológicos y productos finales de la fermentación para la obtención de cuatro tipos de Sacarinas inoculadas con Vitafert. Rev. Cubana Cienc. Agríc. 35:153.
10. Elías A, Lezcano O, Lezcano P, Cordero J y Quintana L. 1990. Reseña descriptiva sobre el desarrollo de una tecnología de enriquecimiento proteico de la caña de azúcar mediante fermentación en estado sólido (Saccharina). Rev. Cubana Cienc. Agríc. 24:1
11. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. 1990. manual de los derivados de la caña de azúcar. 2ª ed. Geplacea. Mexico.447pp.
12. Instituto de investigaciones biomédicas. 2006. UNAM. <http://www.biomedicas.unam.mx> . 6/06/06
13. Lezcano P, Valdivié M y Marrero AI. 1994. Utilización de la Saccharina en la alimentación de monogástricos. Memorias II Enc. Monogástricos. Instituto de Ciencia Animal, La Habana. p. 199
14. Lezcano P Y Castañeda S. 2000. Una nota sobre la sustitución parcial pienso por residuos proteicos destilerías de alcohol para cerdos preceba Rev. Cubana Cienc. Agrícola.
15. López I, Aranda IEM, Ramos JJA y Mendoza MGD. 2003. Evaluación nutricional de ocho variedades de caña de azúcar con potencial forrajero. Rev. Cubana Cienc. Agríc. 37:381.
16. López V, Ramírez JL, Nieves K y Fonseca PL. 2004. Valor nutritivo de variedades de caña de azúcar para forraje. Pastos y forraje. Vol. 27, No. 3.
17. LY J. 1999. Evaluación de la proteína y energía de la Saccharina en cerdos ileorrectostomizados. Rev. Cubana Cienc. agríc. 33:57
18. Martín MPC. 2004. La alimentación del ganado con caña de azúcar y sus subproductos. Ed. EDICA. La Habana, Cuba. 193 p.
19. Marrero L y Díaz CP. 1976. Uso de la miel final y subproductos del arroz en la alimentación de puercos en crecimiento. Rev. Cubana Cienc. Agríc. 10:163.
20. Mena A. 1985. The utilization of sugar cane by-products as substitutes for cereal in animal feed. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación (FAO). 91–101 pp.
21. Rodríguez Z, Elías A, Boucourt R y Núñez O. 2001a. Efectos de los niveles de nitrógeno ureico en la síntesis proteica durante la fermentación de mezclas de caña (*Saccharum officinarum*) y boniato (*Ipomea batata Lam*). Rev. Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo. 35, No. 1.
22. Rodríguez Z, Boucourt R, Elías A y Madera A. 2001b. Dinámica de fermentación de mezclas de caña (*Saccharum officinarum*) y boniato (*Ipomea batata*) Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 35, No. 2.
23. Ruiz CJ, Ruiz M, Ruiz G y Torres V. 2002. Efecto de la inclusión de sulfato de amonio en el para la elaboración de Saccharina rústica Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 36, No. 2
24. Salgado GS, Bucio AL y Lagunes ELC. 1994. Evaluación de cinco variedades de caña de azúcar bajo tres dosis de fertilización y cinco espaciamientos de drenaje subterráneo. In. Memorias de avances de investigación. Campus Tabasco del Colegio de Postgraduados. H. Cárdenas, Tabasco. 44 – 46 pp.
25. Salgado GS, Bucio AL, Riestra DD y Lagunes ELC. 2003. Caña de azúcar. Hacia un manejo sustentable. Villahermosa, Tabasco. México. Colegio de Postgraduados campus Tabasco. 395 pp.

26. Savón L y Díaz CP. 1989. Jugo de caña, guarapo proteico y miel proteica. En alimentación de cerdos y aves a partir de la caña de azúcar. EDICA. Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba. p 81.
27. Valiño E, Elías A, Álvarez E, Quintana M y Montes de Oca N. 1994a. Composición de especies de bacterias aisladas del proceso de obtención de la Saccharina. 1. Bacterias gram negativas. Rev. Cubana Cienc. Agríc. 28:69.
28. Valiño E, Elías A, Álvarez E, Quintana M y Montes de Oca N. 1994b. Composición de especies de bacterias aisladas del proceso de obtención de la Saccharina. II. Bacterias gram positivas. Rev. Cubana Cienc. Agríc. 28:75.

AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO DE CASOS DE OTITIS EXTERNA EN CANINOS DE LA ZONA METROPOLITANA DE GUADALAJARA, JALISCO.

Juanita Acero Ortega¹, María Cristina Moran Salas¹, María Magdalena Cisneros Amigon¹, Mónica Deyanira Hernández Rea¹

¹Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.

RESUMEN

El oído es el órgano responsable de la audición y el equilibrio, cuando este se inflama sin importar la causa se le denomina otitis. Según la zona del oído afectado puede ser otitis externa, media o interna. Los animales de compañía presentan con frecuencia infecciones óticas. Siendo la otitis externa una de las patologías auditivas más frecuentemente diagnosticadas. Los microorganismos son factores asociados a esta enfermedad, y pueden ser causantes de cambios secundarios en el conducto auditivo por una infección crónica. El objetivo de esta investigación fue identificar las especies bacterianas más comunes presentes en exudados de caninos con signos clínicos de otitis, y la susceptibilidad de los microorganismos aislados a los antibióticos. Se obtuvieron 23 muestras de exudado ótico de caninos con sintomatología y hallazgos clínicos compatibles con otitis externa durante el periodo comprendido entre octubre 2014 – septiembre 2015. A partir de las muestras, se realizaron cultivos bacteriológicos e identificación de géneros bacterianos, mediante perfiles bioquímicos para cada uno de los microorganismos aislados. Las razas más afectadas fueron Criollo (30.4%), *Caniche* (21.7%) y *Pastor alemán* (8.7%). Las bacterias que más predominaron en los aislamientos fueron *Staphylococcus intermedius* (21.74%) y *Micrococcus spp* (21.74%). En las pruebas de susceptibilidad por el método de Kirby-Bauer se obtuvo el mayor nivel de susceptibilidad de las bacterias a la gentamicina (69.57%) y levofloxacin (69.57%), seguida de tetraciclinas (52.17%), cefalosporinas (39.13%) y sulmametoxazol-trimetropin (39.13%). En base a los resultados obtenidos, se concluye que el género *Staphylococcus spp.* ocasiona con mayor frecuencia problemas de otitis externa en caninos.

1. INTRODUCCIÓN

Un alto porcentaje de los hogares mexicanos tienen un animal de compañía, porque les produce un efecto positivo a los dueños y contribuye a disminuir la tensión arterial, la presión cardiaca, mejora el estado de ánimo, entre otros.

En México la mascota preferida es el perro, el cual no está libre de padecimientos. Entre las afecciones que sufre el canino está la otitis. Esta enfermedad es de etiología multifactorial, como la presencia de cuerpos extraños, alergias, trastornos de la queratinización, desórdenes endocrinológicos, desordenes glandulares, neoplasias, enfermedades autoinmunes e infecciosas. Entre los microorganismos que contribuyen de modo importante a esta enfermedad, se incluyen parásitos, virus, levaduras y bacterias (Duran, 2012). Estas últimas están involucradas con mayor frecuencia como causa secundaria de la infección en el canal auditivo predispuesto por anomalías o enfermedades que hacen susceptible a las infecciones por flora oportunista o normal. Además, a consecuencia de la estructura anatómica de la oreja, del estrechamiento u obstrucción del canal auditivo, se induce la presentación de otitis, ya que la forma del cartílago auricular crea un ambiente oscuro y de poca ventilación que favorece la proliferación de bacterias.

También, la edad y la raza son factores asociados que influyen en la presentación de estas infecciones.

La otitis puede ser externa, media e interna. La otitis externa es la más importante, se presenta prácticamente asociada a la otitis media. Esta última puede originarse, como en el caso de la otitis externa, por una infección respiratoria o por vía sanguínea. La otitis interna se presenta como una extensión de la otitis media y afecta las funciones vestibular y coclear del oído.

Las infecciones del oído externo pueden presentarse de forma subclínicas o clínica. Las primeras pueden pasar desapercibidos por los dueños de los caninos ya que no presenta signos que las evidencien. En otros casos los agentes infecciosos, como las bacterias, invaden y colonizan el conducto auditivo, perpetuando la otitis y contribuyendo a cambios crónicos que evidencian la infección por signos clínicos como: prurito manifestado cuando el animal mueve la cabeza, se rasca o frota la oreja contra el piso u objetos; situación que lastima las regiones cercanas a la oreja, causando intenso malestar, dolor que se evidencia por la inclinación de la cabeza (Grandemange et al, 2013).

Los cuadros de otitis en caninos representan uno de los problemas más frecuentes de la práctica diaria, Se estima que la frecuencia de otitis en el perro va del 10 al 20 % de la población canina y resulta menos frecuente en gatos (Lorenzana, 2013). Por lo tanto, estas son un desafío para el clínico, tanto desde el punto de vista diagnóstico como terapéutico por lo que es ideal que los médicos veterinarios hagan una historia completa, al igual que un examen general y de la oreja para identificar las posibles causas de la enfermedad que sufre el paciente. Los diagnósticos de otitis externa son de tipo clínico, al examen físico se observa alopecia, pelo quebradizo y escoriaciones. Asimismo, el médico hace uso de otoscopio para determinar los cambios secundarios extensión de las inflamaciones, secreciones y condición de la membrana timpánica.

En las complicaciones de las otitis a consecuencia de la colonización bacteriana se observa la eliminación de secreciones que pueden ser purulentas, húmedas y mal olientes, el color del exudado está a menudo relacionado con el tipo de infección bacteriana.

En algunos casos los diagnósticos de las otitis se apoya en un examen citológico, mientras que para casos crónicos están indicadas las pruebas de laboratorio como el cultivo bacteriológico y el antibiograma. Al respecto Sánchez et al. (2011) realizaron un estudio en 429 caninos, descubrieron que el género *Staphylococcus intermedius* es el más frecuente (27.72%) involucrado en otitis canina, seguido de *Pseudomonas aeruginosa* (19.80%). Las bacterias, como *Pseudomonas spp.* y *Proteus mirabilis* frecuentemente se encuentran en casos crónicos y son conocidas por no responden a los tratamientos con antibióticos (Morgan et al., 2004).

Por lo antes expuesto, es importante realizar un aislamiento del germen que está afectando el oído externo del animal y retarlo a diferentes antibióticos, para evaluar la respuesta de este a los antimicrobianos y el médico veterinario pueda seleccionar una terapia específica y adecuada a la condición del paciente, ya que actualmente las bacterias crean resistencia a los fármacos (Barrosa et al., 2001).

El objetivo de esta investigación fue identificar las especies bacterianas más comunes presentes en exudados de caninos con signos clínicos de otitis, y la susceptibilidad de los microorganismos aislados a los antibióticos.

2. PARTE EXPERIMENTAL

El presente estudio se realizó en caninos que viven en la ciudad de Guadalajara, con sintomatología y hallazgos clínicos compatibles con otitis externa durante el periodo comprendido entre octubre 2014 – septiembre 2015. Se obtuvieron 40 muestras de exudado ótico de los pacientes y se remitieron al Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Medicina Veterinaria

de la Universidad de Guadalajara. A partir de las muestras, se realizaron cultivos bacteriológicos e identificación de géneros bacterianos, mediante perfiles bioquímicos para cada uno de los microorganismos aislados, seguida de una prueba de susceptibilidad a antibióticos mediante la técnica de Kirby Bauer para el posible tratamiento del paciente.

3. RESULTADOS

Esta investigación permitió detectar, que aunque los pacientes tenían signos clínicos de otitis, no todas fueron de origen bacteriano. Del total de muestras remitidas al laboratorio el 17.85% no mostraron crecimiento bacteriano.

Las mayoría de las muestras procedía de machos (82.61%). En relación al porcentaje de caninos afectados con otitis externa fue mayor en los Criollo (30.4%), seguida del *Caniche* (21.7%) y *Pastor alemán* (8.7%), escenario que se evidencia en la figura 1.

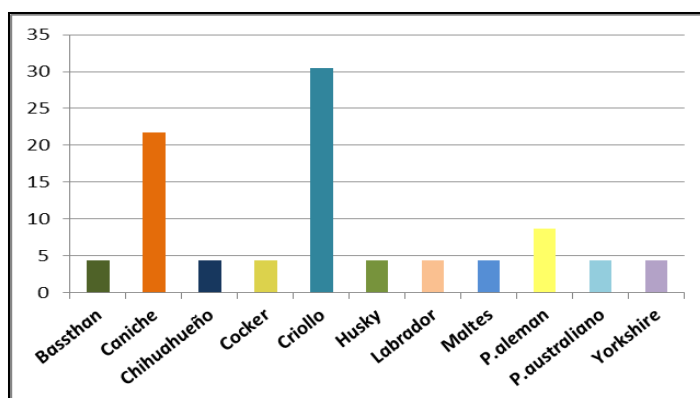


Figura 1. Porcentaje de razas de caninos con otitis externa

En lo referente a los aislamientos bacteriológicos de los exudados auditivos, se obtuvo que el *Staphylococcus intermedius* (21.74%) y el *Micrococcus spp* (21.74%) fueron las bacterias que más predominaron. Asimismo, se encontró estructuras levaduriformes (figura 2).

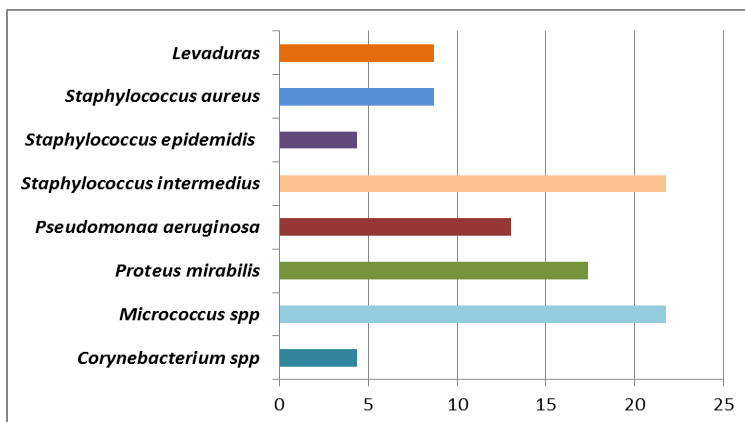


Figura 2. Especies bacterianas aisladas de caninos con otitis externa

Con relación a las pruebas de susceptibilidad de las cepas aisladas por el método de Kirby-Bauer, se obtuvo un nivel de susceptibilidad mayor a la gentamicina (69.57%) y levofloxacina (69.57%), seguida de tetraciclinas (52.17%), cefotaxima (39.13%) y sulmametoxazol-trimetropin (39.13%). Estos antibióticos fueron empleados en las bacterias gram positivas y gram negativas.

4. CONCLUSIONES

Los aislamientos bacteriológicos obtenidos en esta investigación se asemejan a los reportados por la literatura en las cuales menciona al *Staphylococcus intermedius* como el principal responsable de otitis externa en caninos (Gutiérrez., 2014, Sánchez, 2011).

Con base en los resultados obtenidos in vitro, se observa que en la mayoría de los caso de otitis el antibiótico de elección gentamicina y levofloxacina.

La herramienta diagnóstica más adecuada para orientar el tratamiento terapéutico del paciente con problemas óticos es sin duda el cultivo bacteriológico y la realización posterior del antibiograma.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barrosa Martín JL, PA Lupiola Gómez, Z. González, MT Tejedor Junco, Actividad antimicrobiana de quince antibióticos frente a las enterobacterias aisladas en otitis externas caninos crónicos, Cli. Vet. Peq. Anim. Vol.21, No3, 2001.
29. Duran Ramírez Felipe, Consultor clínico veterinario, Grupo latino editores, 2012, Colombia.
30. Grandemange Erik, Frédérique Woehrlé, Olivier Roy, Florence Pillet, Field Comparison of the Impact of Different Treatment Durations in the Treatment of Acute Otitis External in the Dog. Open Journal of Veterinary Medicine, 2013, 3, 289-296.
31. Gutiérrez R. Luz Adriana, Carolina Ortiz del Río, Juan Esteban Hincapié, Luz Adriana Ramírez A, Evaluación in vitro de Dos Fármacos de Uso Veterinario frente a Patógenos Causantes de Otitis Externa en Perros, Rev Inv Vet Perú 2014; 25(4): 538-544. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v25i4.10814> [Accedido el 8 marzo 2016].
32. Lorenzana Castro Carlos, 2013, Otitis Externa: Etiopatogenia, diagnóstico y tratamiento. Actualización científica y tecnológica, Virbac, México, 15, 1-6.
33. Morgan R, Bright R, Swartout M., Clínica de pequeños animales. 4ª ed. Madrid: Elsevier, 2004, 1355 p
34. Sánchez R, Calle S, Falcón N, Pinto C. Aislamiento bacteriano en casos de otitis canina y su susceptibilidad antibiótica. Rev Inv Vet, Perú 2011, 22: 161-166.

OBTENCIÓN DE EMBRIONES DE *Ovis canadensis* HEMBRA POR CLONACIÓN MANUAL INTERESPECÍFICA A PARTIR DE OVOCITOS DE *Ovis aries*

José Roberto Vázquez Avendaño¹, Sarahí Hernández Marínez¹, Ernesto Hernández Pichardo², Demetrio Alonso Ambríz García¹, Juan Arturo Rivera Rebolledo³, Gábor Vajta⁴ y María del Carmen Navarro Maldonado¹

¹Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa ²Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, ³Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre, ⁴Queensland University of Australia.

RESUMEN

El borrego cimarrón (*Ovis canadensis*), es una especie emblemática de nuestro país que actualmente figura en la lista roja de especies silvestres en riesgo. Ante esta situación, es necesario implementar alternativas de reproducción y conservación a partir de biotecnologías reproductivas como la clonación manual, una variante de la Transferencia Nuclear de Células Somáticas (TNCS). La finalidad de este trabajo fue producir embriones de *Ovis canadensis* por clonación manual interespecífica utilizando fibroblastos de piel de oreja de borrega cimarrona joven (carioplastos) y ovocitos de borrego doméstico (*Ovis aries*) (citoplastos). Se generaron 197 embriones de *Ovis canadensis* hembra, de los cuales 188 segmentaron (95.5%). Estos últimos alcanzaron las etapas de 2-, 4-, 8- células y mórula (1, 4, 10 y 86%, respectivamente). Sin embargo, al evaluar su calidad mediante tinción Hoechst, se determinó que solo 11 (6%) eran embriones intactos, mientras que el resto eran fragmentados. La alta incidencia de fragmentación embrionaria encontrada, puede deberse a diversos factores: la calidad de los ovocitos, el tipo celular utilizado como donador de núcleos, el método de clonación, el sistema de cultivo para desarrollo embrionario, etc. A pesar de esto se lograron clonar 6% de embriones viables de *Ovis canadensis* por primera vez en México, como alternativa de conservación de esta especie endémica en riesgo.

1. INTRODUCCIÓN

En nuestro país existe un gran número de especies silvestres que se encuentran amenazadas y con riesgo de extinguirse, entre ellas, el borrego cimarrón (*Ovis canadensis*), una especie emblemática de nuestro país que ha sido catalogada como sujeta a protección especial en la Norma Oficial Mexicana 059 (NOM-059-SEMARNAT-2010), ya que durante los últimos años se ha notado una reducción considerable de sus poblaciones como consecuencia de diferentes actividades antropogénicas, entre ellas la fragmentación de hábitat y caza ilegal principalmente. Debido al estatus actual en el que se encuentra la especie, es necesario implementar alternativas reproductivas que puedan disminuir su riesgo de extinción. Los estudios generados hasta el momento en el borrego cimarrón solo se limitan a monitorear poblaciones, descripciones anatómicas y seguimiento del ciclo estral (Navarro et al., 2015), sin embargo, la implementación de biotecnologías reproductivas no ha figurado dentro de estos estudios, por lo cual su implementación podría ofrecer una alternativa de conservación de la especie.

La Transferencia Nuclear de Células Somáticas (TNCS) es una biotecnología reproductiva, mediante la cual se obtienen clones genéticamente similares. Para llevarla a cabo es necesario la unión de dos tipos celulares: la célula somática donadora de núcleo (carioplasto) que es fusionada con un ovocito enucleado (citoplasto) que será el receptor de la información genética de la célula

somática. Actualmente se han descrito varios métodos para llevar a cabo la transferencia de núcleos, sin embargo en el 2001, Vajta desarrolló la Clonación Manual que permitió un mayor cuidado de las células y prescindió del uso de equipos especializados (HMC por sus siglas en inglés o Handmade Cloning) (Bosch, 2005). La clonación Manual involucra varios pasos que van desde la maduración del ovocito y su preparación para convertirse en citoplasto, para ello el ovocito es enucleado mediante el uso de micronavajas que permiten eliminar al primer cuerpo polar y la placa metafásica (donde se encuentra la información genética). La parte restante (citoplasto) se fusiona eléctricamente con un carioplasto (célula somática), formando así un triplete celular, el cual activado químicamente dividirá y desarrollará un embrión que puede implantarse en una hembra pseudogestante, la cual continuará el desarrollo del embrión hasta obtener crías nacidas (Vajta, 2003).

La transferencia de núcleos por clonación manual ha permitido la factibilidad de producir embriones de diferentes especies. Entre los mamíferos domésticos clonados manualmente encontramos: bovinos (Vajta et al., 2003), porcinos (Du et al., 2007), caprinos (Akshey et al., 2008), ovinos (Zhang et al., 2013), entre otros. En cuanto a especies silvestre existen dos estudios de producción de embriones de fauna silvestre en riesgo como el antílope tibetano (*Pantholops hodgsonii*) (Yu et al., 2011) y el Búfalo Arnee (*Bubalus arnee*) (Priya et al., 2014). Sin embargo, el éxito de esta biotecnología sigue bajo, esto probablemente debido a la escasa segmentación de embriones y obtención de blastocistos, ya que la mayoría de los embriones quedan arrestados en mórula o sufren un proceso de alteración divisional conocido como fragmentación, el cual puede ser causado por diferentes factores como: la calidad ovocitaria, el tipo de célula somática donadora de núcleo, el método de producción de embriones in vitro o el sistema de cultivo embrionario, etc. (Fujimoto et al., 2011). A pesar de estas posibles alteraciones a las cuales están propensos los embriones desarrollados in vitro, se lograron clonar por primera vez en México embriones de *Ovis canadensis* viables, como una alternativa de conservación de esta especie endémica en riesgo.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Obtención de Carioplastos

De acuerdo al protocolo de Navarro et al. (2012) se obtuvo, una muestra de 0.5 cm² de piel de oreja de una hembra joven de ovino silvestre (*Ovis canadensis*) perteneciente al Zoológico de Chapultepec de la Ciudad de México, el manejo del animal se realizó bajo la autorización de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) mediante el permiso de colecta SGPA/DGVS/07250/15.

El tejido de piel se transportó al laboratorio en un tubo Eppendorf de 1.5 mL conteniendo 1 mL de PBS (por sus siglas en inglés Phosphated Buffered Saline) suplementado (2% de Antibac-Antifun 100X Microlab, 10,000 unidades de Penicilina, 10 mg de Sulfato de Estreptomina y 25 µg de Anfotericina B por mL). En el laboratorio, al tejido se le retiró el excedente de pelo, se desinfectó con alcohol al 70% y se lavó con PBS suplementado. En seguida el tejido fue sometido a disgregación mecánica y enzimática utilizando Colagenasa tipo I y tipo II (2 mg/mL. Gibco) y se colocó en un oscilador dentro de una estufa precalentada a 37 °C durante 3 horas. La acción de la colagenasa se detuvo adicionando 5mL de DMEM-suplementado (88% DMEM, 10% SFB, 2% Antibac-Antifun, ajustando pH a 7.4 con Bicarbonato de Sodio). La solución se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos descartando el sobrenadante. El botón celular se sembró en una caja Petri y se cultivó a 37 °C y 5% de CO₂ durante 7 días hasta la confluencia celular, para posteriormente efectuar un pasaje celular. Para ello, las células se sometieron a una reacción enzimática añadiéndoles 700 µL de Tripsina-Verseno (0.05%-0.05%) para desprenderlas de la base de la caja de cultivo, se agregaron 2 mL de DMEM suplementado y se centrifugaron a 1600 rpm durante 6 minutos. Se descartó el sobrenadante y el botón celular se homogenizó nuevamente en 0.5 mL de DMEM suplementado, la mitad de la población celular se criopreservó y la otra se resembró en una caja de Petri para proseguir los cultivos hasta alcanzar el 14° pasaje celular.

Maduración de ovocitos

Los ovarios fueron colectados de hembras adultas recién sacrificadas de un establecimiento procesador de carne en el Estado de México. Estos fueron transportados al laboratorio durante una hora en una solución salina (0.9% NaCl y 10% de Antibac-Antifun) a 35 °C. En el laboratorio los ovarios fueron lavados isotérmicamente en solución salina al 0.9%. Con base a la metodología propuesta por Robledo-Verduzco et al. (2009), la obtención de los ovocitos se realizó mediante la punción-aspiración de los folículos ováricos con una jeringa de 10 mL de capacidad y una aguja calibre 20 mm. Los ovocitos recuperados fueron lavados en medio de maduración (83% de TCM-199 con Hepes, 1% de EGF (Por sus siglas en inglés Epidermal Growth Factor), 5 µg/mL de FSH, 5UI/mL de hCG, 15% de Suero Fetal Bovino y Antibac-Antifun 65 µL/100x) antes de ser colocados en una caja de 4 celdas con el mismo medio de maduración. El tiempo de maduración in vitro (MIV) consistió en 20 horas de incubación a 38 °C y 5% de CO₂.

Preparación de citoplastos

De acuerdo con la metodología de Kragh et al. (2004), una vez ocurrida maduración, los ovocitos que presentaron cuerpo polar fueron desprovistos de las células de la granulosa utilizando hialuronidasa (0.5 mg/mL). Los ovocitos desnudos se incubaron por 1 hora en una solución de Demecolcina a una concentración de 0.5 µg/mL 20 µL y se lavaron en microgotas de T2 (TCM-199 con Hepes y 2% de SFB). Para disgregar la zona pelúcida, los ovocitos se colocaron en Pronasa (2 mg/mL) por 5 a 10 minutos, la reacción se detuvo con T20 (TCM-199 con Hepes y 20% de SFB). En la parte media de una caja Petri se colocaron microgotas de T10 (TCM-199 con Hepes y 10% de SFB), en las cuales se alinearon como máximo 5 ovocitos por gota para proceder a enuclearlos.

Enucleación

Para enuclear los ovocitos se realizó una bisección manual de acuerdo a Vajta (2003), utilizando una micronavaja (Ultra Sharp Splitting Blade-Bioniche). Los ovocitos fueron orientados con el primer cuerpo polar hacia el norte de tal manera que, utilizando la micronavaja, se eliminarán el cuerpo polar y la placa metafásica (una cuarta parte del ovocito). Los citoplastos (ovocitos sin núcleo ni cuerpo polar) fueron recuperados en una microgota de T20.

Fusión

Previo a la fusión celular, los carioplastos (fibroblastos derivados de tejido de piel de oreja de *Ovis canadensis* de cada pasaje celular) fueron tripsinizados, colocándolos en 0.5 mL de T20. Mientras tanto, se preparó la cámara de fusión y el electrofusionador (Cell Fusioner Instrument BLS). A la cámara se le adicionaron 300µL de medio de fusión (5.46 g de Manitol y 0.1 g de PVA en 98mL de agua destilada). En una caja de Petri chica se colocaron microgotas de T20, Fitohepatoglutinina o PHA (5mg/mL), T2, Medio de fusión y T20. Los carioplastos se colocaron en la gota de T2 y los citoplastos se colocaron en la gota de T20, de ahí se pasaron dos citoplastos a la gota de PHA, en seguida a la gota de T2, a modo que uno de los citoplastos se uniera con un carioplasto. Dos citoplastos con un carioplasto unido (tripletes), se colocaron en la gota de medio de fusión y posteriormente se colocaron en la cámara de fusión conectada al electrofusionador. Cada triplete fue fusionado con un pulso de una corriente eléctrica de 100 V durante 9 µs, posteriormente se incubaron durante 2 horas para llevar a cabo la reprogramación (Vajta, 2003).

Activación

Los tripletes (embriones reconstruidos) se incubaron en T2 con 8 µM de ionóforo de calcio durante 5 minutos. Después se lavaron 2 veces en T20 y se incubaron individualmente en gotas de medio de cultivo con 2µM de DMAP (6-dimethylaminopurina a 38°C y 5% de CO₂ durante 4 horas (Vajta, 2003).

Cultivo

Pasado este tiempo, los embriones se retiraron del DMAP y se lavaron dos veces en T20. Luego se transfirieron al sistema celda sobre celda o WOW (Por sus siglas en inglés Well Of The Well) con medio de SOF durante 7 días a 38 °C y 5% de CO₂ (Vajta, 2003).

Tinción

Los embriones fueron fijados con paraformaldehído al 4% durante 1 hora, se lavaron en 1 ml de PBS y se incubaron con Hoechst (5 mg/ml de Hoechst, SIGMA B-2883, disuelto en PBS con 1g/L de polivinil alcohol) durante 5 min. Finalizado el tiempo de incubación se realizó un lavado en PBS y posteriormente se montaron sobre un portaobjetos con medio de montaje (1:1 de glicerol y PBS) y se cubrieron con un cubreobjetos cuyas orillas se sellaron con esmalte de uñas. Los embriones montados se observaron a 400 x en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E600) con un filtro UV-2A: Standard filter block for UV. Ex. 330-380 nm. Con base al conteo de núcleos de los embriones teñidos con Hoechst se clasificaron en: No fragmentados, aquellos embriones donde el número de núcleos correspondía con el número de blastómeros y cada uno de ellos poseía solo un núcleo. Fragmentados, embriones donde el número de blastómeros era mayor al número de núcleos.

3. RESULTADOS

Se realizaron un total de 14 experimentos de clonación manual, cada uno de ellos correspondiente a un pasaje celular de fibroblastos de piel de oreja de *Ovis canadensis*. De *Ovis aries* se obtuvo un total de 1321 ovocitos de los cuales 1078 (82%) fueron evaluados como maduros por la presencia del cuerpo polar, 566 (53%) fueron enucleados y reconstituyeron a su forma esférica original, 255 (90%) citoplastos fueron fusionados con un fibroblasto de cimarrona para formar un triplete y finalmente 197 (77%) incorporaron el fibroblasto para formar un embrión reconstruido (Cuadro 1). En cuanto al desarrollo embrionario, 188 (95%) embriones reconstruidos activaron, de los cuales 2 (1%) alcanzaron solo el estadio de 2 blastómeros, 7 (4%) el estadio de 4 blastómeros, 18 (10%) el estadio de 8 blastómeros (Figura 1) y 161 (86%) el estadio mórula (mayor a 16 blastómeros) (Figura 2). Se reporta además, que la tinción con Hoechst confirmó la producción de 11 (6%) embriones viables que no presentan características de fragmentación (Cuadro 2).

Número de experimento	Ovocitos n (%)			Tripletes n(%)	
	Obtenidos	MIV	Enucleados y Reconstituidos	Fusionados	Reconstruidos
1	127	90 (71)	56	26 (93)	19 (73)
2	49	27 (55)	15	7 (93)	5 (71)
3	80	72 (90)	46	19 (83)	10 (53)
4	133	99 (74)	66	25 (93)	14 (56)
5	77	61 (79)	35	15 (86)	13 (87)
6	132	96 (73)	60	27 (90)	25 (93)
7	110	92 (84)	5	21 (82)	17 (81)
8	76	66 (87)	33	10 (65)	10 (100)
9	119	102 (86)	58	18 (76)	15 (83)
10	92	78 (85)	41	20 (98)	15 (75)
11	81	75 (93)	42	19 (90)	11 (58)
12	70	63 (90)	29	14 (97)	14 (100)
13	78	65 (83)	41	17 (97)	15 (88)
14	97	92 (95)	39	17 (87)	14 (82)
Total	1321	1078 (82%)	566 (53%)	255 (90%)	197 (77%)

Cuadro 1.- Obtención de ovocitos y preparación de citoplastos de *Ovis aries*

Pasaje celular del fibroblasto	Desarrollo Embriones n(%)					
	Activados	DIV (2-blastómeros)	DIV (4-blastómeros)	DIV (8-blastómeros)	DIV (Mórula)	Viables (No fragmentados)
1°	19 (100)			1 (5)	18 (95)	1 (5)
2°	5 (100)		1 (20)		4 (80)	1 (20)
2°	10 (100)		1 (10)		9 (90)	1 (10)
3°	14 (100)				14 (100)	0
4°	12 (92)		2 (15)	1 (8)	9 (69)	1 (8)
5°	19 (76)		1 (4)	4 (16)	14 (56)	0
6°	17 (100)	2 (11)	1 (6)	4 (24)	10 (59)	3 (18)
7°	9 (90)			2 (20)	7 (70)	0
8°	14 (93)				14 (93)	0
9°	15 (100)		1 (7)	2 (13)	12 (80)	3 (20)
10°	11 (100)			1 (9)	10 (91)	0
12°	14 (100)			1 (7)	13 (93)	0
13°	15 (100)				15 (100)	0
14°	14 (100)			2 (14)	12 (86)	1 (7)
Total	188 (95%)	2 (1%)	7 (4%)	18 (10%)	161 (86%)	11 (6%)

Cuadro 2.- Desarrollo in vitro de embriones clonados manualmente interespecie (*Ovis canadensis* y *Ovis aries*) cultivados en medio SOF-1

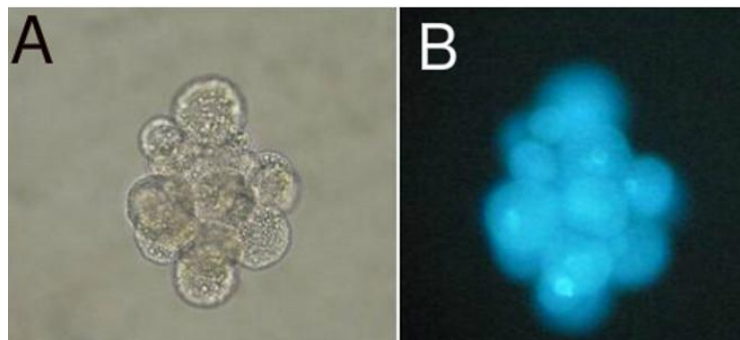


Figura 1.- Embrión de *O. Canadensis* teñido con Hoescht. A) Embrión de 12 blastómeros en campo claro. B) Embrión con 12 núcleos en campo de fluorescencia. Visto a 40x con Filtro de UV.

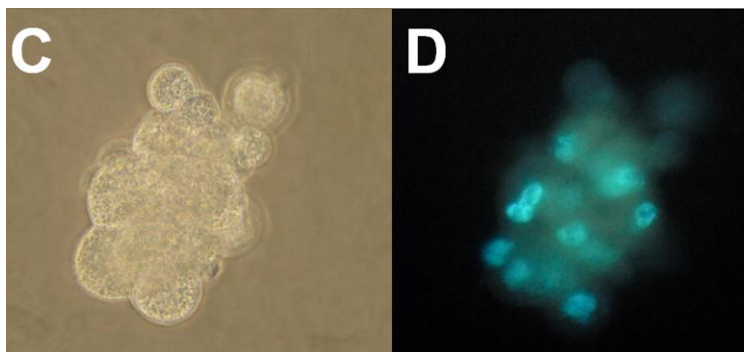


Figura 2.- Embrión clonado de *O. canadensis* en estadio de mórula (17-núcleos), teñido con Hoechst a los 5 días de cultivo. C) En campo claro. D) En fluorescencia. Filtro de excitación de UV 350 nm. Aumento a 40X.

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, fue factible obtener embriones producidos por clonación manual interespecífica utilizando fibroblastos derivados de piel de oreja de cimarrona (*Ovis canadensis*) joven como donadores de núcleo fusionándolos con ovocitos enucleados de borregas domesticas (*Ovis aries*) adultas, esto como una propuesta de conservación de especies en riesgo. Nuestros resultados coinciden con Priya *et al.*, 2014 al producir 92% de embriones segmentados y 8% de blastocistos mediante clonación manual interespecífica entre búfalo salvaje (*Bubalus arnee*) y búfalo doméstico (*Bubalus bubalis*). El interés de implementar biotecnologías reproductivas de vanguardia en especies silvestres radica en aportar una alternativa más de conservación de fauna silvestre. Si bien, está documentado que las tasas de éxito en clonación son bajas es necesario seguir estudiando cada paso que compone a la clonación manual, para comprender y analizar el mecanismo de cada célula participante, así como lograr identificar los puntos sensibles a errores dentro del desarrollo embrionario *in vitro* que puedan estar produciendo el fenómeno de fragmentación en los embriones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Akshey Y. S., Malakar D. y De A. K. 2008. Production of handmade cloned goat blastocysts using fetal fibroblast cells. *Reproduction Fertility and Development*. 20: 91–92.
2. Du Y., Lin L., Schmidt M., Bøgh I. B., Kragh P. M., Sørensen C. B., Li J., Purup S., Pribenszky C., Molnár M., Kuwayama M., Zhang X., Yang H., Bolund L., y Vajta G. 2008. High hydrostatic pressure treatment of porcine oocytes before handmade cloning improves developmental competence and cryosurvival. *Cloning and Stem Cells*. 10(3): 325-330.
3. Fujimoto V.Y. Browne R. W., Bloom M. S., Sakkas D. y Alikani M. 2011. Pathogenesis, developmental consequences, and clinical correlations of human embryo fragmentation. *Fertility and Sterility*. 95(4): 1197-1204.
4. Kragh P. M., Vajta G., Corydon T. J., Purup S., Bolund L. y Callesen H. 2004. Production of transgenic porcine blastocysts by hand-made cloning. *Reprod Fertil Dev*. 16(3): 315-8.
5. Navarro M. M.C., Ambríz G. D., Vargas M. B., Hernández M. S. y Martínez I. J. L. 2012. Derivación de fibroblastos de piel de ovino (*Ovis aries*) en la estrategia de la conservación. Memorias del 1er Congreso Nacional “Aprovechamiento Sustentable de Vida Silvestre” Chapingo, Edo México. Noviembre 17, 2012.
6. Navarro M. M. C., Hernández-Martínez S., Vázquez-Avendaño J. R., Martínez-Ibarra J. L., Zavala-Vega N. L., Vargas-Miranda B., Rivera-Rebolledo J. A. y Ambríz-García, D A. 2015. Epitelial cells derived from *Ovis canadensis* mexicana thawed skin tissue for a germplasm bank. *Acta Zoológica Mexicana*. 31(2): 275-282.
7. Priya D., Selokar N. L., Raja A. K., Saini M., Sahare A. A., Nala N., Palta P., Chauhan M. S., Manik R. S. y Singla S. K. 2014. Production of wild buffalo (*Bubalus arnee*) embryos by interspecies somatic cell nuclear transfer using domestic buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. *Reproduction Domestic Animals*. 49(29): 343-351.
8. Robledo-Verduzco, J. M., Herrera-Camacho J. Cajero-Juárez M. Navarro-Maldonado M. C, García-Valladares A. 2009. Evaluación de dos medios de maduración *in vitro* para la producción de embriones ovinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 10(1): 95-9.
9. Vajta G., Lewis I. M., Trounson A. O., Purup S., Maddox-Hyttel P., Schmidt M., Pedersen H. G., Greve T. y Callesen H. 2003. Handmade Somatic Cell Cloning in Cattle: Analysis of Factors Contributing to High Efficiency *in vitro*. *Biology of Reproduction*. 68(2): 571-8.
10. Yu H. H., Guo Z. L., Qi D. L., Yang X. L., Yue P. P., Cao H., Xie L. y Zhao X. Q. 2011. Interspecies embryo reconstruction in Tibetan antelope (*Pantholops hodgsonii*) by handmade cloning. *African Journal Online*. 10(12): 2360-2365.
11. Zhang P., Liu P., Dou H., Chen L., Lin L., Tan P., Vajta G., Gao J., Du Y. y Runlin Z. Runlin. 2013. Handmade cloned transgenic sheep rich in Omega-3 fatty acids. *Plos One*. 8: 1-9.

INFLUENCIA DE LA FUENTE DE C Y N EN LA CONIDIACIÓN DE *Trichoderma spp.*

Ricardo Salazar González, Christian J Gallegos Núñez, Gerardo Vázquez Marrufo, Virginia A. Robinson Fuentes

Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo

RESUMEN

La identificación de especies fúngicas se realiza por diversas técnicas aprovechando sus estructuras. En este caso, las conidias de *Trichoderma spp* se han analizado por Electroforesis Capilar (EC) y se han obtenido señales que son útiles para su identificación; sin embargo, algunas especies de este hongo tardan más de 7 días en conidiar por lo que se busca obtener conidias en un menor tiempo para optimizar su identificación y así poder aplicar, en un futuro, esta técnica con fines diagnósticos. En este estudio se propone buscar condiciones (diferentes fuentes de C y N) en las que se obtengan conidas en menor tiempo. Se usó *Trichoderma atroviride* IMI 206040 que se sembró en agar Vogel; este medio fue modificado para que contuviera diferentes fuentes de carbono (glucosa, dextrosa, maltosa, lactosa, fructuosa, xilosa, albumina), de nitrógeno (nitrito y nitrato de sodio, urea, cisteína, alanina) y pH (5, 5.90, 7, 8). Todas se incubaron a 28°C. Se realizaron curvas de crecimiento y se registró el tiempo en que aparecen las conidias. Después, se procesaron las conidias y se analizaron por EC usando un capilar de sílice fundida de 100 µm d.i., 50 cm L. Se usó como buffer HEPES 10mM, pH 7. Las curvas de crecimiento mostraron que con Fructosa y Alanina, a pH entre 5 y 6, se obtienen conidias en la mitad del tiempo que usando medio Vogel normal. Las señales electroforéticas fueron similares para todas las conidias obtenidas en los diferentes medios, por lo que no sufren cambio o modificación significativos al crecer en las condiciones aquí descritas.

1. INTRODUCCIÓN

Desde los comienzos de la humanidad, hemos estado estrechamente relacionados con los hongos tanto macroscópicos como microscópicos. El análisis, caracterización e identificación de los hongos, es crucial en diversas áreas del conocimiento, por ejemplo en el área de la salud son relevantes en la industria alimenticia, farmacéutica, en la medicina y en el sector público (Alexopoulos y Mims, 1985). Desde el punto de vista médico-clínico, es imprescindible la búsqueda e identificación del factor etiológico de una enfermedad infecciosa, lo cual es un paso necesario para el control y tratamiento de la enfermedad. Así mismo, en la industria alimenticia la presencia de hongos y sus metabolitos en los alimentos y granos almacenados, pueden traer como resultado pérdidas económicas considerables; aunado a esto, las enfermedades producidas por productos contaminados son el resultado directo de graves problemas en la salud. El análisis de los hongos puede llevar al desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de dichas enfermedades. En el área de la biotecnología, se ha incrementado el uso de los hongos en la obtención de alimentos y bebidas. Además, los hongos filamentosos producen el 25% de los antibióticos conocidos hasta el momento (López et al., 2006).

La identificación de los hongos se realiza principalmente mediante cultivos y observación microscópica. De esta manera se obtiene información sobre la morfología del hongo; sin embargo, estas técnicas requieren de tiempos largos de análisis debido a la preparación de la muestra y su

cultivo. Hoy en día existen nuevas metodologías como la detección de antígenos y/o anticuerpos y la biología molecular; aunque para éstas se requiere de instrumentos sofisticados y personal altamente especializado, además de que la preparación de la muestra requiere de pasos complicados, reactivos costosos y gran consumo de tiempo. Debido a estos inconvenientes se hace indispensable el desarrollo de una técnica rápida para la identificación y caracterización de hongos. Los componentes de la pared celular fúngica pueden contribuir al desarrollo de métodos de diagnóstico basados en su identificación. La pared celular fúngica está constituida por polisacáridos como quitina, β y α – glucanas, y glicoproteínas; además, contiene pequeñas cantidades de lípidos, pigmentos como la melanina y sales orgánicas e inorgánicas. La composición predominante de los constituyentes de la pared celular, varía según el grupo taxonómico y le confiere diversas características a cada tipo de hongo. Además, el conocimiento de los componentes de la pared fúngica contribuye al entendimiento de fenómenos biológicos relacionados con su superficie (Cázares, 2009).

En trabajos anteriores, se ha visto la posibilidad de utilizar técnicas de electromigración, como la electroforesis capilar, para realizar una pronta identificación de hongos. Se ha observado también que las conidias de los hongos son fáciles de analizar y representan bien a su género; sin embargo, en ocasiones los hongos toman varios días en conidiar, por lo que se hace necesario encontrar las condiciones en que éstos hongos puedan conidiar más rápido.

En este trabajo se ensayan diferentes condiciones de crecimiento para *Trichoderma atroviride* IMI 206040: diferentes fuentes de C, de N y pH, para favorecer la rápida conidiación del hongo que permita su caracterización por electroforesis capilar.

Comportamiento electroforético. La utilidad de realizar estos estudios es para buscar nuevas formas de identificación, cuantificación y comprensión de sus propiedades de interacción/repulsión, con esta técnica se obtendrán resultados en cortos tiempos de análisis, de manera económica y con buena sensibilidad.

OBJETIVOS

Objetivo General

Encontrar condiciones de rápida conidiación de una cepa de referencia y cuatro cepas silvestres de *Trichoderma* y establecer si se afectan las propiedades de superficie.

2. MATERIALES Y METODOS

Reactivos: Acido Clorhídrico, Hidroxido de Sodio, Hepes, Bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB), Agua Destilada, Agua Inyectable Esteril

Medio de cultivo: medio mínimo Vogel,.

Fuentes de Carbono: Glucosa, Dextrosa, Fructosa, Maltosa, Lactosa, Xilosa y Albumina.

Fuentes de Nitrógeno: Cisteína, Alanina, Urea, Nitrato de Sodio y Nitrito de Sodio.

Cepa de referencia: *Trichoderma atroviride* IMI 206040.

Cepas silvestres: *Trichoderma tomentosum* CMU-221, *Hypocrea lixii* / *Trichoderma harzianum* CMU-1, *Hypocrea rufa* / *Trichoderma viride* CMU-218, *Hypocrea atroviridis* / *Trichoderma atroviride* CMU-8 (todas ellas facilitadas por el Laboratorio de Conservación de Hongos del CMEB/FMVZ/UMSNH)

Morfología y Cinética de Crecimiento

La cepa fue subcultivada en agar Vogel con sus diferentes modificaciones en pH, fuente de carbono y nitrógeno, por duplicado en Campana de Bioseguridad Nivel I, se incubaron a 28° C , y se realizaron mediciones del diámetro de la colonia en cm con ayuda de un Vernier cada 6 horas, también se registró el tiempo en el que apareció la conidiación.

Corrimiento Electroforético

Se cosechan las conidias con agua inyectable esteril, se realizan dos lavados con agua esteril y finalmente se suspenden en buffer de corrimiento. Se realizan los corrimientos electroforéticos usando un equipo de electroforesis capilar Beckman Coulter (P/ACE MDQ); el buffer de corrimiento consiste en HEPES 10 mM pH 7 adicionado con 1% de CTAB. La inyección es hidrodinámica a 20 psi por 5 seg, el voltaje es a -17 KV, la temperatura se mantiene a 25°C. Se usa un capilar de sílice fundido de 50 cm Lt y 40 cm Ld con 100 µm d.i, que se mantuvo a . La detección se realizó a 201 nm en DAD.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

Morfología y Cinética de Crecimiento Incubación a 28 °C

La cepa utilizada *T. atroviride* IMI-206040 presentó una morfología tanto macroscópica como microscópica muy parecida entre sí en sus diferentes modificaciones en fuente de carbono, fuente de nitrógeno, pH, la velocidad de crecimiento, tiempo y forma de conidiación; en general presentaron un micelio algodonoso blanco, con conidiación color verde intenso, verde-amarillento y café, de acuerdo con Butler y Day (1998), esto se debió a diferentes concentraciones de melanina en la pared celular, no pigmentó el medio de cultivo, al microscopio se observaron hifas septadas y hialinas; particularmente manifestó conidiación a manera de anillos concéntricos, los anillos de conidiación centrales fueron de una tonalidad verde, mientras que los anillos más externos denotaron coloración verde amarillento, al microscopio se observaron conidióforos alargados y con muchas ramificaciones, fiálides cortas y conidias esféricas de color verde. En la cinética de crecimiento se observó que la mayor velocidad se presentó en el orden siguiente: pH 8 < pH 7 < pH 5 = pH normal,

La Fructuosa, como fuente de carbono y la Alanina, como fuente de nitrógeno, incubada a 28 ° C (Figura 1), presentaron una mayor velocidad de conidiación que fue un dato clave para la estandarización en la preparación de la muestra. En este estudio se pudo apreciar que el tiempo de conidiación varió de una fuente de nutriente a otra y de un pH a otro; se pudo comprobar que *Trichoderma atroviride* IMI-206040 tiende a conidiar entre las 72 y 120 h ya que es una especie que en la naturaleza presentan un estado asexual, esto les permite adaptarse rápidamente a condiciones tanto ambientales como de laboratorio.

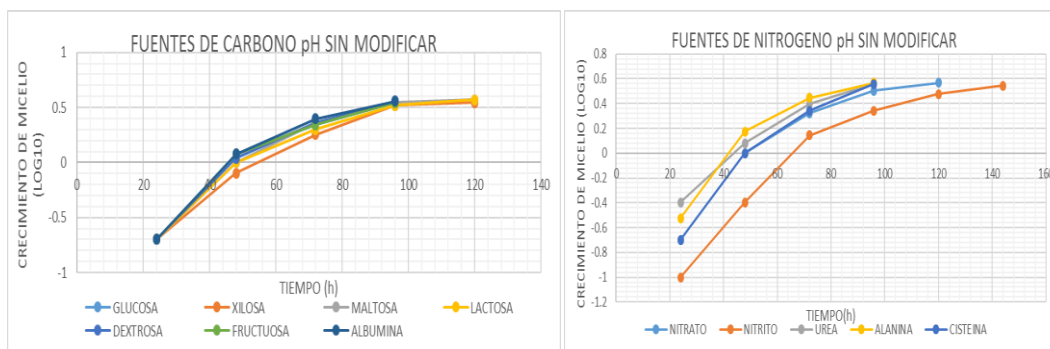


Figura 1. Cinética de crecimiento. Cultivos en agar Vogel modificado en su fuente de C y N a pH sin modificar con incubación a 28 °C.

Una vez obtenidos los resultados en base a la conidiación de cada una de las fuentes a diferente pH se realizó una selección de las mejores condiciones donde se obtuviera de forma más rápida las conidias y estas fueron la fructuosa como fuente de carbono y la alanina como fuente de nitrógeno. En estas condiciones, se sembraron las 4 cepas silvestres, *H. lixii* / *T. harzianum*, *H. atroviridis* / *T. atroviride*, *H. rufa* / *T. viride* y *T. tomentosum*, y la cepa de referencia que se venía estudiando, *T. atroviride* IMI-206040. Se sometieron a las mismas condiciones experimentales, incubación a 28°C, medición de crecimiento y tiempo de conidiación observándose resultados alentadores. *Hypocrea lixii* / *Trichoderma harzianum*, *Hypocrea rufa* / *Trichoderma viride*, *Trichoderma tomentosum* presentaron un tiempo de conidiación de 42 h con una conidiación muy difusa con tonalidad verde, seguido de *Trichoderma atroviride* IMI 206040 a las 48h que conidió a manera de anillos concéntricos de tonalidad verde, verde-amarillento y, finalmente, *Hypocrea atroviridis* / *Trichoderma atroviride* a las 60 h con una conidiación verde intenso difusa por el medio. En todos los casos, la velocidad de crecimiento fue mayor con las diferentes fuentes ensayadas, en comparación con la velocidad de crecimiento en medio Vogel normal (Figura 2).

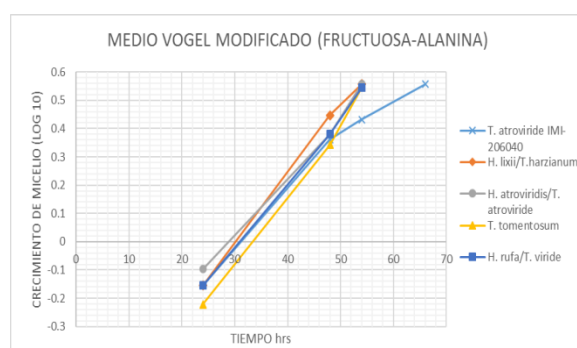


Figura 2. Cinética de crecimiento. Cultivos en agar Vogel modificado en su fuente de Carbono y Nitrógeno con incubación a 28 °C.

Análisis Electroforético de las Conidias obtenidas en el Medio Vogel Modificado

Para realizar los análisis electroforéticos se seleccionaron los cultivos con mayor conidiación considerando el crecimiento en las diferentes fuentes de carbono y fuentes de nitrógeno en el siguiente orden: monosacáridos, disacáridos, polisacáridos, fuentes de nitrógeno orgánicas y fuentes de nitrógeno inorgánicas como se muestra ascendentemente en la Figura.3.

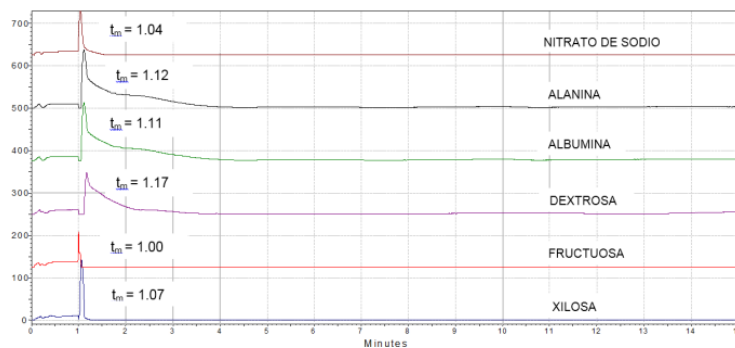


Figura 3. Electroferogramas de las conidias de *Trichoderma atroviride* IMI-206040 obtenidas con diferentes fuentes de Carbono y de Nitrógeno a pH normal (5.9) del medio. El buffer de corrimiento

fue HEPES 10mM, pH 7 con CTAB 15 mM añadido a la muestra. Los análisis se realizaron a -17 KV. Demás condiciones se detallan en la parte experimental. t_m , corresponde al tiempo de migración.

Como se puede apreciar en la fig. 3 se logró agrupar las conidias en un solo pico electroforético agudo y definido por la interacción con el CTAB permitiendo una mayor compactación de las células en la banda electroforética durante la migración de éstas a través del capilar. La forma de los picos varía entre las diferentes fuentes en unos más definidos que en otras; esto puede indicar que hay ciertas diferencias tentativas en la superficie de la conidia. A pesar de estas diferencias en las superficies celulares de las conidias, la mayoría muestra similitud en los tiempos de migración obtenidos. Estos tiempos son cortos y muestran ligeras diferencias entre ellos, por lo que se decidió aplicar una prueba de t para determinar si, desde el punto de vista estadístico, se pueden considerar iguales o diferentes. Como resultado de este análisis, se encontró que no existen diferencias significativas en los tiempos de migración.

4. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se encontraron condiciones de rápido crecimiento y conidiación de una cepa de *Trichoderma atroviride* IMI 206040.

El pH que ocasionó un mayor crecimiento fue el pH 5; sin embargo, el pH del medio Vogel (5.9) propició una conidiación más rápida.

La fuente de carbono que ocasionó un mayor crecimiento y más pronta conidiación fue fructosa; mientras que la de N, fue alanina. La combinación de ambas fuentes en el medio de cultivo ocasionó un crecimiento aún mayor que los obtenidos de manera individual.

Usando las condiciones arriba mencionadas se logró disminuir el tiempo de crecimiento de entre 4 y 5 días a dos y dos días y medio.

Las nuevas condiciones (medio Vogel pH 5.9, con fructosa y alanina) ocasionaron la conidiación en cuatro cepas silvestres en dos días a dos días y medio, sin necesidad de someterlas a estrés mecánico a la cepa.

Aparentemente no existen cambios en las superficies de las conidias obtenidas bajo las diferentes condiciones ensayadas, como se pudo apreciar por microscopía y los corrimientos electroforéticos. Estos últimos muestran diferencias sutiles que podrían abordarse en el futuro para establecer si hubo algún cambio en la estructura de la pared celular.

BIBLIOGRAFIA

1. Adams DJ. 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*. 150: 2029–2035.
2. Agosin, E., Volpe, D., Muñoz, G., San Martín, y R., Crawford, A. 1997. Effect of culture conditions on spore shelf life of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 13, 225-232.
3. Alexopoulos, C.J., y Mims, C.W. 1979. *Introductory mycology* (3ª Ed.). New York: Willey.

4. Castillo Rodríguez MA, Revilla Vázquez AL, López Arellano R, Rivera García P. 2005. Fundamentos de electroforesis capilar. 1a ed. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México; 180 p.
5. Cázares García SV. 2009. Movilidad electroforética de células fúngicas. Tesis de maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich.
6. Cázares-García SV. 2007. Estudio de la Factibilidad del Análisis de Células Fúngicas por Electroforesis Capilar. Tesis de Licenciatura. Escuela de Químico Farmacobiología. Morelia, Michoacán. México.
7. Druzhinina, I. & Kubicek, C. P. 2005. Species concept and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters. J Zhejiang Univ Sci B 6, 100–112.

ELABORACIÓN DE MEMBRANAS A BASE DE POLIVINILPIRROLIDONA Y ACETATO DE CELULOSA MEDIANTE ELECTROSPINNING

Héctor López-Calderón, Adriana Marisol Rangel Rodríguez, Carlos Solís Rojas y Katiushka Arévalo-Niño

Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

RESUMEN

El electrospinning funciona por el principio electroestático. Una gran cantidad de parámetros de diferente naturaleza influyen en el resultado del proceso (Wendorff, Agarwal, & Greiner, 2012). La finalidad es producir fibras a nivel micrométrico y nanométrico, brindando propiedades que pueden imitar la estructura de la matriz extracelular (Agarwal, Wendorff, & Greiner, 2009). Se han procesado gran variedad de polímeros entre los que, para propósitos relacionados con la biotecnología médica, son preferidos los biocompatibles. La polivinilpirrolidona (PVP) ha sido utilizada en aplicaciones médicas anteriormente. El acetato de celulosa ha demostrado poder inmovilizar biomoléculas y confiere mejoras estructurales a la PVP. El presente trabajo está enfocado en obtener membranas basadas en una mezcla de PVP/AC empleando el método de ES. Las membranas obtenidas son blancas, brillantes, sedosas y flexibles con un grosor promedio de 230 μ m. El FT-IR muestra los compuestos poliméricos sin modificaciones posterior al proceso de electrospinning, lo cual sugiere que ambos polímeros se encuentran presentes en las fibras que componen las membranas. Mediante TGA se determinó una estabilidad térmica de las membranas de hasta 350°C. El SEM no detectó presencia de perlas en las fibras y determinó un diámetro promedio de 1.24 μ m. Las membranas arrojaron un tiempo de humectación total de 5s y en solubilidad presentan una pérdida del 50% de su masa durante a lo largo de 1h. Tales características sugieren que las membranas son lo suficientemente estables para ser empleadas como cubiertas y vehículos para la liberación de principios activos en heridas en piel.

1. INTRODUCCIÓN

El proceso de electrospinning funciona por el principio electroestático. Aunque aparenta ser simple, una gran cantidad de parámetros de diferente naturaleza tienen influencia en el resultado del proceso de electrospinning (Wendorff et al., 2012). Entre las características importantes de la técnica de electrospinning está la producción de fibras de sólo algunos nanómetros y micrómetros de diámetro lo que brinda propiedades como una amplia superficie por unidad de área, áreas de gran porosidad que pueden imitar la estructura de la matriz extracelular en términos de dimensiones y propiedades químicas (Agarwal et al., 2009). La técnica ha permitido procesar una gran variedad de polímeros, integrando en los últimos años otras clases de materiales, sin embargo durante el desarrollo del proceso existen una serie de variables que influyen en las características de los elementos obtenidos, ya sea porque están ligadas a las características del material base o porque su desempeño está relacionado con otros parámetros dentro del proceso (Duque-Sánchez, Rodríguez, & López, 2014). Las características estructurales así como fisicoquímicas de las membranas obtenidas por electrospinning permiten obtener propiedades como son una excelente permeabilidad al oxígeno, mantenimiento de un ambiente húmedo, tamaño de poro que impide la penetración bacteriana generando una protección ante

microorganismos, entre otras. Una ventaja particular de estos sistemas puede ser la posibilidad de liberación uniforme de agentes bioactivos en los sitios de las heridas (Liu et al., 2010).

Una de las consideraciones clave del proceso es la elección del material, lo cual depende de la aplicación que se esté buscando. Para propósitos relacionados con la biotecnología médica, son preferidos los polímeros biocompatibles y biodegradables. La elección está comúnmente basada en las propiedades del tejido cercano al cual se expondrá el polímero. La PVP, también llamado comúnmente polividona o povidona, es un polímero soluble en agua que se obtiene a partir del monómero N-vinilpirrolidona. Es soluble en agua y en solventes polares y ha sido utilizado en aplicaciones médicas y técnicas (Knappe, Bienert, Weidner, & Thünemann, 2010). El AC fue la primera membrana asimétrica de alto rendimiento, y tanto este polímero como sus derivados son adecuados como materiales de membrana, debido a las ventajas tales como flujo moderado, propiedades de rechazo de sal alta, la rentabilidad, la fabricación relativamente fácil, es un recurso de materias primas renovables, y presenta una muy baja toxicidad. Ha sido ampliamente utilizado para osmosis inversa, microfiltración y separación de gases (Kamal, Abd-Elrahim, & Lotfy, 2014).

2. TEORÍA

Desde la década de 1980 y especialmente en los últimos años la popularidad del proceso de electrospinning se ha incrementado con más de 200 universidades e institutos de investigación de todo el mundo estudiando diversos aspectos del proceso de electrospinning. Algunas empresas como eSpin Technologies, NanoTechnics y KATO Tech participan activamente en cosechar los beneficios de las ventajas únicas que ofrece electrospinning, mientras que empresas como Donaldson Company y Freudenberg han estado utilizando este proceso para las dos últimas décadas en sus productos de filtración de aire (Ramakrishna, Fujihara, Teo, Yong, & Ramaseshan, 2006).

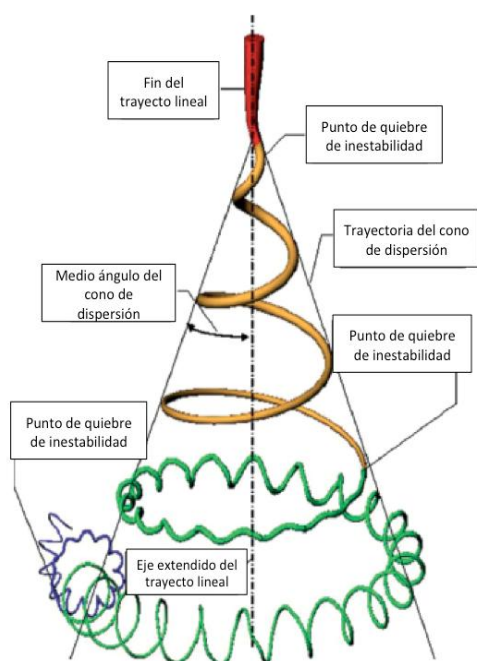


Figura 1. Trayectoria del chorro de un fluido polimérico electrificado en el recorrido de la aguja hacia el colector. Modificada de Cui et al. 2011.

El equipo que se utiliza para el proceso de electrospinning incluye una aguja conectada a un electrodo proveniente de una fuente de poder, donde se genera una diferencia de potencial entre el electrodo conectado a la aguja y el colector, que se conecta a tierra. Mediante este proceso, el fluido polimérico es electrificado, generando así un campo de alto voltaje el que resulta en el estiramiento de las gotas del fluido, (Figura 1), que se considera como el responsable de la formación de las fibras en el electrospinning (Bhattacharjee & Rutledge, 2011). Una gran cantidad de parámetros de diferente naturaleza tienen influencia en el resultado del proceso de electrospinning (Tabla 1). Entre estos parámetros se pueden considerar a) condiciones ambientales: temperatura, humedad, velocidad del aire; b) propiedades de la solución: elasticidad, viscosidad, conductividad, tensión superficial; c) condiciones físicas: distancia entre la boquilla y el colector, potencial eléctrico, flujo, peso molecular del polímero, geometría del colector, etc. (Wendorff et al., 2012).

Existe una enorme gama de polímeros que se utilizan en electrospinning y son capaces de formar nanofibras finas dentro de la gama submicrónica y se utiliza para aplicaciones variadas. Se han reportado diferentes polímeros sintéticos, polímeros naturales o mezclas

de ambos, incluyendo proteínas, ácidos nucleicos e incluso polisacáridos. En los últimos años se ha logrado procesar mediante electrospinning más de 200 polímeros a partir de polímeros naturales, e incluso se han caracterizado con respecto a su aplicación (Bhardwaj & Kundu, 2010). Las nanofibras de estas soluciones de polímero se han utilizado en diversas aplicaciones tales como, andamios de ingeniería de tejidos, membranas de filtración y en diversas aplicaciones biomédicas. Los polímeros naturales normalmente presentan una mejor biocompatibilidad y baja inmunogenicidad, en comparación con polímeros sintéticos, cuando se usan en aplicaciones biomédicas. Una razón de peso para el uso de polímeros naturales para electrospinning es su capacidad inherente para la unión de células (Huang, Zhang, Kotaki, & Ramakrishna, 2003).

Tabla 1. Resumen general de los parámetros y sus aportaciones en las características de las fibras obtenidas mediante el proceso de electrospinning.

Parámetro	Característica que aporta
Concentración de la solución	∧ Dificulta el paso de la solución por el capilar.
	∨ Las fibras se rompen en gotas antes de llegar al colector.
Tensión superficial	∧ Presencia de cuentas en las fibras.
	∨ Se obtienen fibras lisas. Se pueden adicionar solventes con menor tensión como el etanol.
Conductividad de la solución	∧ Mayor transporte de cargas, mayor estiramiento de la solución, fibras más delgadas.
	∨ Menor transporte de cargas, menor estiramiento de la solución, fibras más gruesas.
Voltaje	∧ Fibras gruesas, aparición de cuentas.
	∨ Poco impulso para que la solución llegue al colector.
Flujo de salida	∧ Fibras más gruesas, cuentas de mayor diámetro.
	∨ Mayor tiempo para evaporación del solvente. Sin <i>cuentas</i> .
Distancia del colector	∧ Las fibras pueden romperse por su propio peso. Mayor estiramiento de la solución, generando fibras delgadas.
	∨ Poco tiempo de evaporación del solvente, por lo que las fibras llegan húmedas.
Humedad relativa	∧ Aparición de poros en las nanofibras.
Temperatura	∧ Reducción del diámetro de las fibras.

La PVP es un importante polímero sintético cuyo monómero consta de carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, presenta un conjunto de propiedades como buena adhesión, baja toxicidad, alta higroscopicidad, excelente compatibilidad fisiológica, alta solubilidad en agua y solventes orgánicos, etc. Debido al rango tan amplio de características que presenta este polímero, actualmente se utiliza en una gran cantidad de aplicaciones como adhesivos, pinturas, detergentes, electrónicos, bebidas, cosméticos, fármacos, materiales para ingeniería biológica, entre otras. Así mismo, el uso del complejo PVP-Yodo se ha convertido en universal para la desinfección de heridas ya que se ha encontrado que es menos tóxico que las tinturas de yodo. Las aplicaciones biomédicas y farmacéuticas y en la actualidad los sistemas de administración de fármacos PVP basado están bajo intensa investigación (Knappe et al., 2010). Desde el primer reporte de fibras de PVP obtenidas mediante electrospinning, por Bognitzki et al. (2001), se ha usado ampliamente en la obtención de fibras junto con otros materiales como biopolímeros y otros compuestos mediante diversas mezclas con la finalidad de emplear las fibras en medicina y aplicaciones biológicas (Chuangchote et al., 2009).

El Acetato de Celulosa (AC) fue la primera membrana asimétrica de alto rendimiento, y tanto este polímero como sus derivados son adecuados como materiales de membrana, debido a las ventajas tales como flujo moderado, propiedades de rechazo de sal alta, la rentabilidad, la fabricación relativamente fácil, es un recurso de materias primas renovables, y presenta una muy baja toxicidad. Ha sido ampliamente utilizado para osmosis inversa, microfiltración y separación de gases (Kamal et al., 2014). En años recientes el interés en la celulosa, polisacáridos relacionados y los derivados de éstos ha crecido considerablemente como materiales amigables con el ambiente. El AC es el derivado mas importante, usado para diversas aplicaciones industriales en forma de membranas y fibras debido a sus propiedades físicas, además de esto ha sido reportado como potencialmente biodegradable. El acetato de celulosa exhibe un amplio rango de propiedades entre los que está la biocompatibilidad de los materiales basados en éste polímero en términos de biodegradabilidad (Konwarh, Karak, & Misra, 2013).

Preparaciones de PVP/AC y sus compuestos en membranas mediante electrospinning se han reportado. La forma en que se han realizado es mediante la variación de coaxial en ambas configuraciones AC/PVP/AC y PVP/AC/PVP. Otra manera en que se han realizado membranas con ambos polímeros ha sido mediante el uso de sistemas de doble aguja independientes (Konwarh et al., 2013). Recientes trabajos se han enfocado en el uso de matrices de AC elaboradas mediante electrospinning para la liberación de drogas de forma transdermal (TDD por sus siglas en inglés). TDD hace referencia a la administración de medicamentos en forma de parches que liberan las drogas con un efecto sintético a un ritmo determinado, mejora el cumplimiento del paciente y reduce la variabilidad en los pacientes. Entre los trabajos que se han realizado hasta ahora se encuentra el de Catillo-Ortega y colaboradores (Castillo-Ortega et al., 2011) en dónde obtuvieron membranas mediante la variante coaxial en configuración AC/PVP/AC para la aplicación controlada de amoxicilina mediante aplicación gastrointestinal y parches transdermales.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Los polímeros elegidos para la realización de este trabajo (polivinilpirrolidona y acetato de celulosa), fueron adquiridos mediante la compañía Sigma-Aldrich. PVP (lote número WXBB5757V) con un peso molecular promedio de 360,000, y AC (lote número MKBM8033V) con peso molecular promedio de 30,000. Los solventes elegidos para la preparación de las soluciones fueron etanol (Jalmek, México) y acetona (Jalmek, México).

Soluciones con concentraciones de polímeros totales de 8, 12 y 16% (p/v) en proporción 1:1, fueron elaboradas con tres distintas proporciones de etanol (EtOH) y acetona (Ace), 1:1, 1:2 y 1:4, valores de conductividad, viscosidad y pH, fueron determinados.

Fueron probados parámetros necesarios para obtener membranas con la menor formación de *cuantas* en base a lo reportado en la literatura y a las propiedades fisicoquímicas de los polímeros utilizados, Entre los parámetros que se variaron se encuentran:

Voltaje. Se probaron valores de 9 a 15 kV.

Distancia entre aguja y colector. Se probaron distancias de 15 a 25 cm.

Flujo de alimentación. Se evaluó un rango de 1 a 5 ml/h.

Utilizando el equipo “Standard unit NEU-01” (Shenzhen Tong Li Tech Co).

Las membranas resultantes se caracterizaron mediante las siguientes técnicas:

Espectroscopia Infrarroja por la Transformada de Fourier (FT-IR). Se realizaron lecturas por triplicado de los compuestos poliméricos para poder establecer lecturas comparativas de las membranas obtenidas. Posteriormente se realizaron lecturas de membranas de PVP con 4%(p/v) y las membranas de PVP 4%/AC 4%(p/v) con la finalidad de monitorear la presencia de los grupos característicos de los compuestos.

Humectación y Solubilidad. Se realizaron pruebas de humectación colocando 2cm² de las membranas sobre una capa de papel absorbente de 10cm de diámetro empapados con 3ml de buffer de acetatos a pH 5. Para la prueba de solubilidad se utilizaron muestras de las membranas similares a las mencionadas anteriormente y se sumergieron en 10ml de buffer de acetatos pH 5. Se aplicó agitación a 100RPM.

TGADSC. Para los análisis térmicos se empleó el equipo SDT Q 600 (TA Instruments) con el que los procedimientos se realizaron de forma simultánea en muestras de ≈10mg un rango de 25 a 600°C con un aumento de 10° por minuto en atmósfera de nitrógeno.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Con la finalidad de analizar la morfología de las membranas de PVP/AC se realizaron observaciones mediante SEM en las instalaciones del Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV Monterrey) empleando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Nova NanoSEM 200, FEI). Las condiciones empleadas durante el procedimiento fueron adaptándose durante el transcurso del mismo en relación a las necesidades que la muestra fue requiriendo.

4. RESULTADOS

Las proporciones de los solventes probados mostraron diferencia en su efectividad para la disolución de los polímeros. En una relación 1:1 de EtOH:Ace, el AC no permitió una solubilización total. Las relaciones 1:2 y 1:4 de EtOH:Ace mostraron una disolución de los polímeros ideal. La proporción 1:2 de EtOH:Ace fue seleccionada por presentar una menor cantidad de solvente disminuyendo la probabilidad de citotoxicidad en las membranas. Posteriormente, se determinaron los valores de viscosidad, conductividad y pH de las soluciones con distintas concentraciones de polímeros (Tabla 2). La viscosidad aparente de las soluciones preparadas con un 8%PVP:8%AC (p/v) de polímeros totales impedía ser inyectada al sistema de electrospinning. Al realizar las pruebas con las dos concentraciones restantes, se observó que con la concentración 4%PVP:4%AC se obtenía formación de fibras de forma más sencilla (Tabla 2).

Tabla 2. Características de las soluciones obtenidas al variar la concentración de polímeros

Concentración	Viscosidad	pH	Conductividad
4%PVP:4%AC	200cP	5.1	4.1uS/cm
6%PVP:6%AC	950cP	6.4	4.67uS/cm
8%PVP:8%AC	4000cP	7.1	4.59uS/cm

Las condiciones óptimas para la obtención de fibras con la concentración elegida fueron: 9kV, distancia de 15cm, colector en posición vertical con un flujo de 5ml/h. El tiempo de generación de las membranas se fijó en 1 hora. Las membranas obtenidas presentaron una coloración blanca con una textura sedosa; son flexibles sin embargo no presentan elasticidad (Figura 2.)

El análisis de FT-IR mostró que los compuestos poliméricos utilizados para la elaboración de las mismas se mantienen presentes sin aparentes modificaciones al observarse las señales características de los polímeros. En la Figura 3 se puede apreciar el grupo carbonil amida en 1670cm^{-1} de PVP y del AC se presentan picos 1020cm^{-1} y 1230cm^{-1} correspondientes a los C-O de enlace sencillo, 1700cm^{-1} del grupo carbonil y bandas en 2850^{-1} a 2950cm^{-1} de los grupos CH_3 .

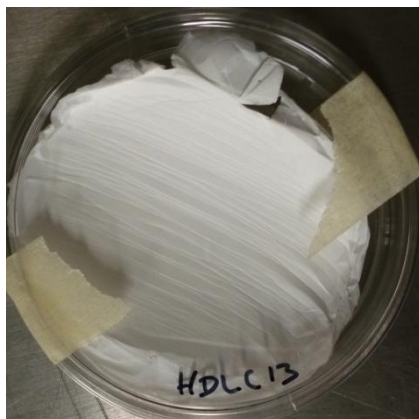


Figura 2. Membrana obtenida por electrospinning de la solución polimérica con 4%PVP:4%AC a 9kV, 15cm y 5ml/h durante 1h.

Los análisis térmicos arrojaron como resultado una estabilidad térmica por parte de las membranas por encima de los 350°C (Figura 4), temperatura que se encuentra por encima de lo que se esperaba.

En la Figura 5 se muestran las imágenes obtenidas por SEM. En ellas se puede apreciar una morfología uniforme de las fibras con ausencia de cuentas dentro de las mismas. Se estimó un diámetro aproximado de fibra de $1.24 \pm 0.25\mu\text{m}$.

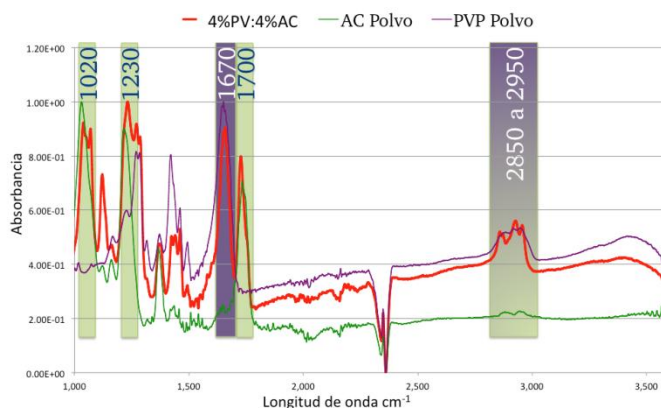


Figura 3. Resultados del FT-IR de membranas con 4%PVP:4%AC comparadas con los polímeros puros.

En las pruebas de humectación y solubilidad, se obtuvo un tiempo de humectación máxima de 5s para las muestras de las membranas. Para poder realizar una comparativa de la estabilidad estructural que la mezcla de ambos polímeros aporta, se realizaron comparaciones con membranas obtenidas mediante electrospinning a base únicamente de PVP(4%p/v). Cabe mencionar que las membranas adicionadas con AC son más estables en presencia de líquidos en comparación con las formuladas únicamente con PVP, las cuales mantienen su estructura solamente durante el periodo que les toma humectarse, tiempo después del cual pierden su estructura (Figura 6). Para la evaluación de la solubilidad de las membranas se realizó un monitoreo de peso constante de muestras de las membranas después de diversos lavados durante 2h. En la Figura 7 se puede apreciar que durante la primer hora hay una pérdida del 50% de la masa de las muestras. Aún y cuando esto puede parecer un periodo corto, hay que tomar en cuenta que el uso que se propone de las membranas obtenidas en este trabajo no presentaría condiciones de tanta humedad como las que se manejaron en la prueba, por lo que consideramos que los resultados obtenidos son aceptables.

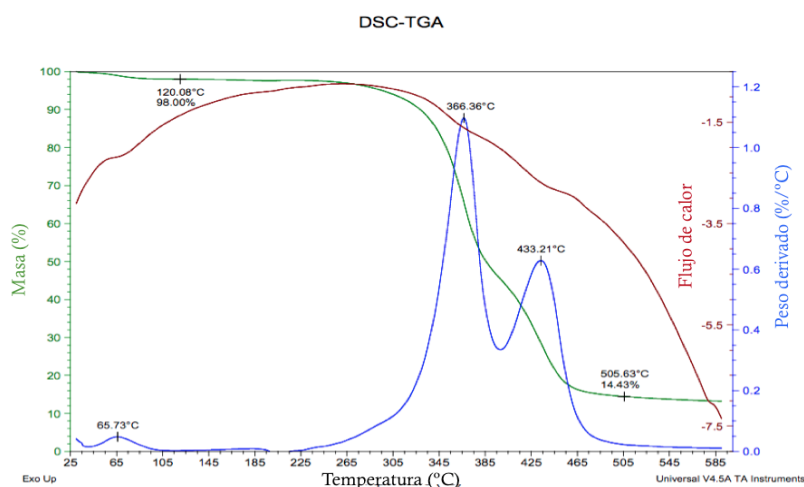


Figura 4. Análisis de estabilidad térmica de las membranas de 4%PVP:4%AC obtenidas mediante electrospinning. Se observa un decaimiento de la masa de la muestra alrededor de los 350°C

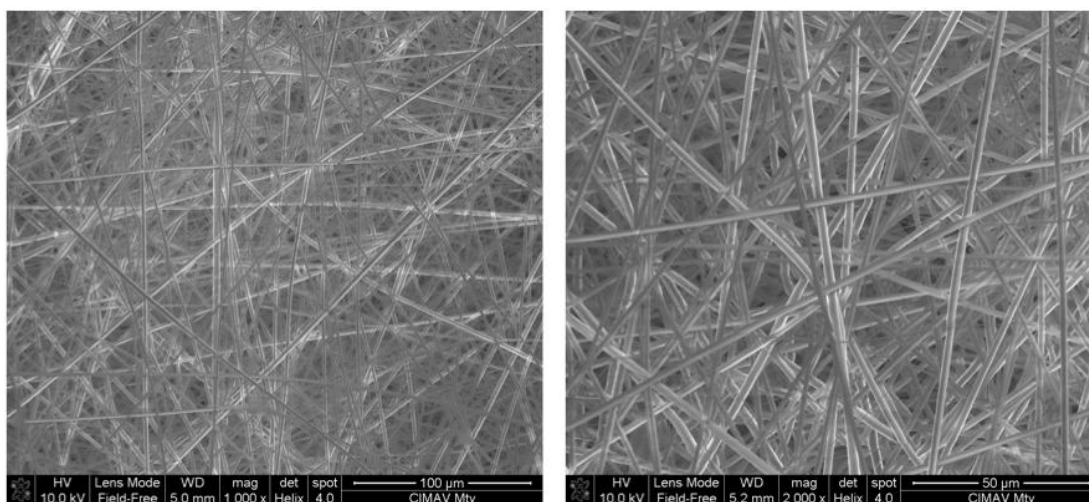


Figura 5. Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido en las que se aprecia la morfología de las fibras obtenidas en el presente trabajo.



Figura 6. Comparativa entre membranas a base de PVP y las obtenidas en este trabajo con la adición de AC. Aún y cuando el tiempo de humectación es el mismo, la estabilidad de las que presentan AC es superior.

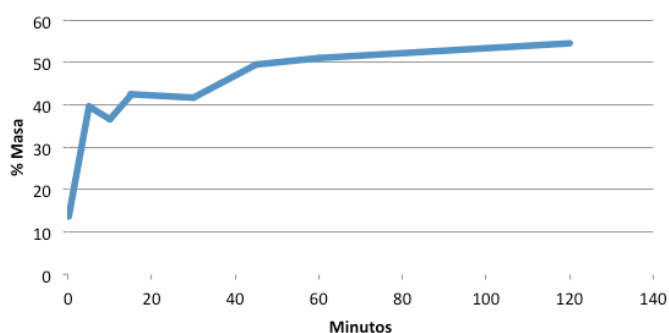


Figura 7. Monitoreo en base a peso constante para evaluar el porcentaje de pérdida de material de las muestras de membranas al estar sumergidas en buffer a pH 5.

5. CONCLUSIONES

Es posible obtener membranas de una mezcla de los polímeros PVP y AC mediante electrospinning. Las membranas obtenidas están formadas por fibras uniformes y no presentan *cuentas*, lo cual es un indicativo de la correcta realización del proceso de electrospinning, sin embargo el diámetro de las fibras es mayor al reportado en literatura referente a la técnica de electrospinning. Se puede apreciar interacción entre los compuestos poliméricos presentes en las membranas obtenidas por el proceso de electrospinning según lo observado en el FT-IR. La presencia de AC en las membranas confiere una mayor estabilidad a condiciones de

almacenamiento y resistencia a la humectación y la solubilidad en contraste a las membranas compuestas solo de PVP.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agarwal, S., Wendorff, J. H., & Greiner, A. (2009). Progress in the Field of Electrospinning for Tissue Engineering Applications. *Advanced Materials*, 21(32-33), 3343–3351. <http://doi.org/10.1002/adma.200803092>
2. Bhardwaj, N., & Kundu, S. C. (2010). Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 28(3), 325–347. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004>
3. Bhattacharjee, P. K., & Rutledge, G. C. (2011). Electrospinning and Polymer Nanofibers: Process Fundamentals. In *Comprehensive Biomaterials* (pp. 497–512). <http://doi.org/10.1016/B978-0-08-055294-1.00039-8>
4. Bognitzki, M., Frese, T., Steinhart, M., Greiner, A., Wendorff, J. H., Schaper, A., & Hellwig, M. (2001). Preparation of fibers with nanoscaled morphologies: electrospinning of polymer blends. *Polymer Engineering and Science*, 41(6), 982–989. <http://doi.org/10.1002/pen.10799>
5. Castillo-Ortega, M. M., Nájera-Luna, a., Rodríguez-Félix, D. E., Encinas, J. C., Rodríguez-Félix, F., Romero, J., & Herrera-Franco, P. J. (2011). Preparation, characterization and release of amoxicillin from cellulose acetate and poly(vinyl pyrrolidone) coaxial electrospun fibrous membranes. *Materials Science and Engineering C*, 31(8), 1772–1778. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2011.08.009>
6. Chuangchote, S., Sagawa, T., & Yoshikawa, S. (2009). Electrospinning of Poly(vinyl pyrrolidone): Effects of Solvents on Electrospinnability for the Fabrication of Poly(p-phenylene vinylene) and TiO₂ Nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 114, 2777–2791. <http://doi.org/10.1002/app.30637>
7. Cui, W., Chang, J., & Dalton, P. D. (2011). Electrospun Fibers for Drug Delivery. In *Comprehensive Biomaterials* (pp. 445–462). <http://doi.org/10.1016/b978-0-08-055294-1.00151-3>
8. Duque-Sánchez, L. M., Rodríguez, L., & López, M. (2014). Electrospinning : La Era De Las Nanofibras. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 14(1), 10–27.
9. Huang, Z. M., Zhang, Y. Z., Kotaki, M., & Ramakrishna, S. (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 63(15), 2223–2253. [http://doi.org/10.1016/S0266-3538\(03\)00178-7](http://doi.org/10.1016/S0266-3538(03)00178-7)
10. Kamal, H., Abd-Elrahim, F. M., & Lotfy, S. (2014). Characterization and some properties of cellulose acetate-co-polyethylene oxide blends prepared by the use of gamma irradiation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(2), 146–153. <http://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.01.003>
11. Knappe, P., Bienert, R., Weidner, S., & Thünemann, A. F. (2010). Characterization of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)s with broad size distributions. *Polymer*, 51, 1723–1727. <http://doi.org/10.1016/j.polymer.2010.02.039>
12. Konwarh, R., Karak, N., & Misra, M. (2013). Electrospun cellulose acetate nanofibers: The present status and gamut of biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 31(4), 421–437. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.002>
13. Liu, W., Li, Y., Learn, G. H., Rudicell, R. S., Robertson, J. D., Keele, B. F., ... Hahn, B. H. (2010). Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. *Nature*, 467(7314), 420–425. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature09442>
14. Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W., Yong, T., & Ramaseshan, R. (2006). Electrospun nanofibers: solving global issues. *Materials Today*, 9(3), 40–50.
15. Wendorff, J. H., Agarwal, S., & Greiner, A. (2012). *Electrospinning Materials, Processing, and Applications*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA.

REPORTE DE AGENTES ZONÓTICOS TRANSMITIDOS POR GARRAPATAS PRESENTES EN ROEDORES SILVESTRES

Lorena Lara Olvera¹, Gabriela Aguilar Tipacamú¹, Juan Joel Mosqueda Gualito¹, Bertha Isabel Carvajal Gámez¹, Andrea Margarita Olvera Ramírez¹, Carlos Machain Williams² y Julian Garcia Rejón²

¹ CA Salud Animal y Microbiología Ambiental, Facultad de Ciencias Naturales, UAQ, ² Centro de Estudios Regionales Dr Ideyo Nuguchi UADY

RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por vectores representan más del 17% de todas las enfermedades infecciosas. Actualmente los cambios climáticos han influido sobre la distribución temporal y espacial de las enfermedades, así como la dinámica estacional e interanual de patógenos, vectores, hospederos y reservorios. Ante estos cambios, la epidemiología de enfermedades transmitidas por ixodidos y otros roedores han modificado su distribución geográfica, incidencia y patogenicidad. La presencia de estos en la transmisión de enfermedades a los animales domésticos y a la población humana, donde antes no eran reportadas es de gran impacto y por ello el interés de ser estudiadas. El objetivo del presente estudio fue detectar la presencia de agentes zoonóticos transmitidos por garrapatas en roedores silvestres de la Sierra Gorda de Querétaro. Un total de 92 roedores fueron capturados y muestreados obteniendo sangre, suero y órganos como son bazo, riñón, corazón e hígado. El suero fue utilizado para detectar anticuerpos contra *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* y *Rickettsia rickettsii* utilizando la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta, la sangre para PCR y de los órganos obtenidos se extrajo RNA (cDNA) para realizar la RT-PCR. Los resultados obtenidos fueron 92 sueros positivos a *Anaplasma phagocytophilum* y *Ehrlichia canis*, mientras que para *Borrelia burgdorferi* y *Rickettsia rickettsii* resultaron negativos. Los sueros que resulten positivos a las pruebas de Inmunofluorescencia indirecta, se les realizará una prueba de PCR. En la búsqueda de infección de virus para las familias Bunyaviridae, Flaviridae y Togaviridae no se observó amplificación del material genético en ninguna muestra de los órganos analizados, lo cual sugiere que las muestras colectadas no contenían ningún virus o material genético viral sugestivo de dichas familias. Se demostró la presencia de anticuerpos contra *A. phagocytophilum* y *E. canis* en el suero de roedores silvestres.

1. INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son vectores que transmiten enfermedades virales y bacterianas a los animales domésticos incluyendo al hombre. A nivel mundial se ha registrado anualmente más de 1000 millones de casos y más de 1 millón de muertes debido a las enfermedades transmitidas por vectores. Las enfermedades reportadas son Paludismo, Dengue, Esquistosomiasis, Tripanosomiasis Africana humana, Leishmaniasis, enfermedad de Chagas, Fiebre Amarilla, Encefalitis Japonesa y Oncocercosis. Estas enfermedades transmitidas por vectores representan más del 17% de todas las enfermedades infecciosas. En México, existen reportes de prensa y boletines de salud de brotes recientes de enfermedades transmitidas por vectores al humano como la “Fiebre Manchada de las Montañas Rocallosas”, estos informes indican que Sonora es el estado con mayor casos registrados en el 2015, ocupando el primer lugar a nivel nacional (<http://www.uniradionoticias.com/noticias/salud/395105/sonora-aplica-plan-de-accion-contra->

rickettsia.html), también se han reportado casos y muertes en el estado de Baja California Sur a causa de esta enfermedad (<http://www.unimexicali.com/noticias/bajacalifornia/352599/muere-victima-17-por-rickettsia-en-mexicali.html>). De los estudios realizados en Yucatán, México se detectaron anticuerpos contra *E. chaffeensis*. En otro estudio de enfermedades Rickettsiales transmitidas por garrapatas en roedores, se reporta la presencia de los patógenos *A. phagocytophilum*, *E. canis*, *R. rickettsii* (Sosa et al., 2014).

Las garrapatas pueden transmitir al humano otros patógenos como virus, dentro de estos encontramos a las familias *Bunyaviridae*, *Flaviviridae* y *Togaviridae*. La familia *Togaviridae* comprende a los *Alphavirus* los cuales pueden ser transmitidos por artrópodos y ocasionar enfermedades al humano como Encefalitis Equina Venezolana, Encefalitis Equina del Este y Oeste, Chikunguya, Enfermedad de Ross river. Son virus RNA monocatenarios y pueden producir infecciones asintomáticas (Calisher, 1994).

La presencia de vectores y roedores en la transmisión de enfermedades a los animales domésticos y a la población humana, donde antes no eran reportadas es de gran impacto y por ello el interés de ser estudiadas. Por lo anteriormente citado, el objetivo del presente estudio fue detectar anticuerpos contra *A. phagocytophilum*, *B. burdogferi*, *E. canis* y *R. rickettsii* e identificar la presencia de material genético de los virus de la familia *Bunyaviridae*, *Togaviridae* y *Flaviviridae* transmisores de enfermedades zoonóticas que pudieran estar presentes en roedores silvestres de la sierra de Querétaro. Por lo anteriormente citado, el objetivo del presente estudio fue detectar la presencia de agentes zoonóticos transmitidos por garrapatas en roedores silvestres de la Sierra Gorda de Querétaro

2. MATERIAL Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el municipio de Jalpan de Serra, en las localidades del El Lindero y Purísima de Arista ya que se tienen reportes de estudios previos de problemas de garrapatas y roedores en las Unidades de Producción bovina. El municipio se localiza al norte del Estado de Querétaro, entre los paralelos 21°40'11" y 21°05'53" de latitud Norte y entre los meridianos 99°06'21" y 99°32'58" de longitud Oeste. Jalpan de Serra presenta una temperatura promedio anual de 23.3 °C y una precipitación pluvial de 965.7 mm³ (http://www.elclima.com.mx/jalpan_de_serra.htm).

Se desconoce la población de mastofauna en la zona, por lo que, para establecer el tamaño de muestra, se utilizaron registros publicados referentes a abundancia relativa de los mamíferos a capturar con respecto a la vegetación o ecosistema de la zona; encontrando para roedores los siguientes géneros, *Peromyscus* 20.1 – 57.5 individuos/km², *Reithrodontomys* 6 – 30 individuos/km², *Lyomys* 8.33 individuos/km², *Baiomys* 2 – 60 individuos/km², *Orizomys* 2 – 12 individuos/km² y *Sigmodon* 10 – 12 individuos/km² (Linzey et al., 2008a; Linzey et al., 2008b; Linzey et al., 2008c; Linzey et al., 2008d); por lo tanto para cada sitio de colecta considerando los 20km² de área de este, se espera tener una abundancia de roedores de 40 – 1200 individuos con variaciones de acuerdo a cada género; es por eso que se extrajo el 10% de los animales.

Para capturar a los roedores en las Unidades de Producción se utilizó el permiso de colecta FAUT-0043 expedido por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Se utilizó el método de contención mixto., primero se realizó una contención física utilizando trampas tipo Sherman folding-style live trap (3 x 3.75 x 12") cebadas con una mezcla de avena, crema de cacahuete y vainilla para roedores de acuerdo a lo descrito por Gallina y López (2011). Se aplicó el método químico para realizar la inmovilización y poder tomar las muestras biológicas (sangre). Fue utilizado Isoflurano como método de sedación, esto se hizo por medio de inmersión colocando al animal dentro de una cámara hermética la cual contenía un algodón humedecido con el anestésico de acuerdo con lo mencionado por la American Veterinary Medical Association (2013). Las muestras sanguíneas de los roedores se obtuvieron por decapitación ajustando la técnica

recomendada por la American Veterinary Medical Association (AVMA, 2013) y el Comité Asesor Bioética FONDECYT – CONICYT (2009) a las necesidades en campo. Se les extrajo el bazo, riñones y corazón y fueron conservados en trizol a -70°C para extraer RNA. Al mismo tiempo, se realizó una inspección física de los animales para determinar la presencia de garrapatas. Las muestras de sangre obtenidas fueron transportadas al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ, en donde se centrifugaron y al suero se les realizó la prueba de Inmunofluorescencia indirecta y la sangre para pruebas de PCR.

Para detectar anticuerpos en los ratones de los agentes *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, y *Rickettsia rickettsii* se utilizó la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) usando laminillas vmrd siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó una dilución de 1:64 del suero problema para *Borrelia burgdorferi* y *Rickettsia rickettsii* y 1:50 para *Anaplasma phagocytophilum* y *Ehrlichia canis*. La proteína G que es recombinante de Alexa fluor 488 detecta la IgG1 de ratón e inmunoglobulinas de rata y fue usada a una dilución 1:20. Las laminillas fueron leídas en un microscopio de inmunofluorescencia con un filtro específico especial para el fluorocromo.

Para detectar la presencia de arbovirus de las familias *Bunyaviridae*, *Togaviridae* y *Flaviviridae* se cortaron finamente y se maceraron cada uno de los órganos a los cuales se les extrajo el RNA para realizar la transcripción reversa (cDNA) y posteriormente se les realizó las pruebas de PCR.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Los resultados obtenidos de las inmunofluorescencias indirectas son presentados en el cuadro 1, figura 1 y 2.

Cuadro 1. Resultados del análisis serológico por medio de IFI en roedores silvestres.

Agente	Positivos	Negativos	Total
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (<i>A. phagocytophilum</i>)	92	0	92
<i>Borrelia burgdorferi</i> (<i>B. burgdorferi</i>)	0	92	92
<i>Ehrlichia canis</i> (<i>E. canis</i>)	92	0	92
<i>Rickettsia rickettsii</i> (<i>R. rickettsii</i>)	0	92	92

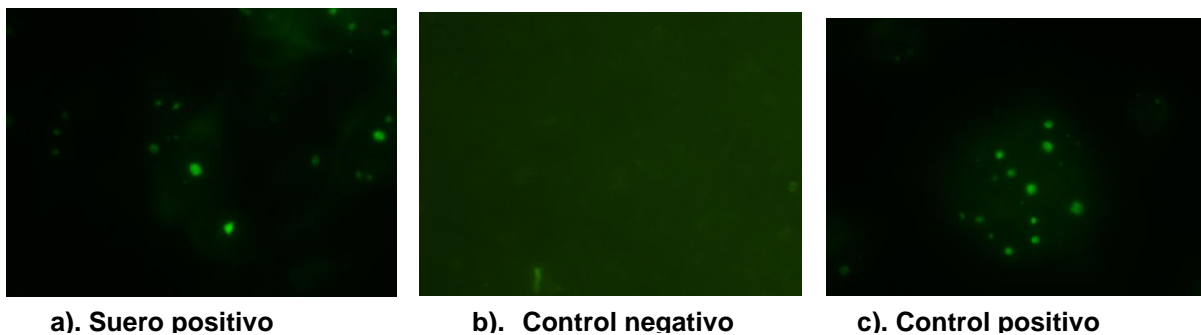


Figura 1. Fluorescencia de sueros probados para la identificación de anticuerpos de *Anaplasma phagocytophilum*.

Con respecto al análisis de los órganos para detectar agentes virales de las familias Bunyaviridae, Togaviridae, Flaviviridae, los resultados fueron negativos a la prueba de PCR.

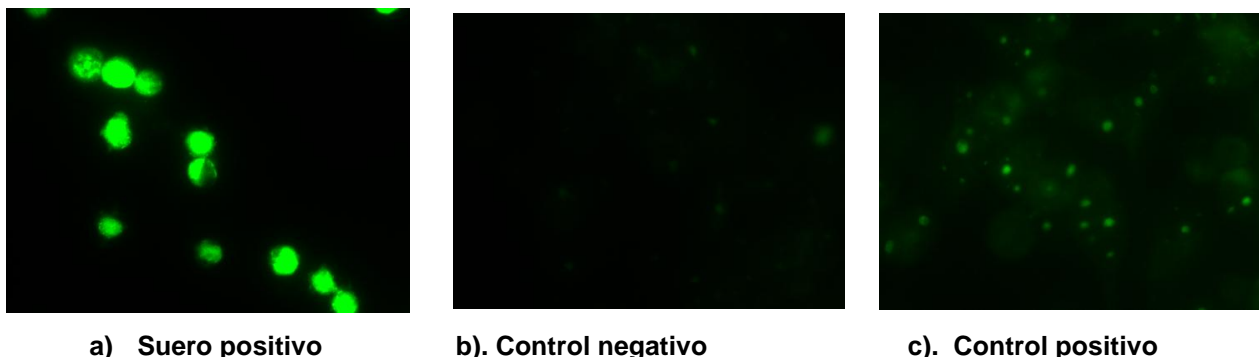


Figura 2. Fluorescencia de sueros probados para la identificación de anticuerpos de *Ehrlichia canis*.

De acuerdo a los resultados obtenidos por IFI puede observarse frecuencias del 100% para los agentes *A. phagocytophilum* y *E. canis*, sin embargo es necesario realizar pruebas más específicas como la PCR que permitan descartar falsos positivos. Estos resultados son parciales y actualmente se está trabajando en las PCR de estas muestras y en la identificación taxonómica de los roedores.

En un trabajo realizado por Sosa *et al* (2014) de patógenos rickettsiales transmitidos por garrapatas en roedores de México reportan una frecuencia para *A. phagocytophilum* de 3.7% (18) y *E. canis* 9.8% (47) de una población 478 roedores usando la prueba de PCR, siendo el roedor *Peromyscus* el más infectado. Es necesario considerar la epidemiología de los roedores en las enfermedades rickettsiales transmitidos por garrapatas.

Con respecto a los resultados negativos de las familias *Bunyaviridae*, *Togaviridae* y *Flaviviridae* en roedores silvestres es necesario realizar estudios con muestras sanguíneas para poder realizar otras pruebas complementarias como Elisás de bloqueo e Inhibición.

4. CONCLUSIÓN:

Se demostró la presencia de anticuerpos contra *A. phagocytophilum* y *E. canis* en el suero de roedores silvestres en dos municipios de Querétaro (Arroyo Seco y Jalpan de Serra). Estos resultados son parciales y actualmente se está trabajando en las pruebas de PCR.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Veterinary Medical Association (2013). AVMA guidelines on euthanasia. http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf. Consultado: 20 de marzo de 2014.
2. Calisher, C.H. (1994). Medically important arboviruses of the United States and Canada. *Clin Microbiol Rev.* 7(1): 89-116.

3. Gallina TS, López GC. (2011). Manual de Técnicas para el estudio de la fauna. Universidad Autónoma de Querétaro. Pp 390.
4. Rodríguez D, Olivares JL, Sánchez CY, Alemán Y, Arece J. (2013). Cambios climáticos y su efecto sobre algunos grupos de parásitos. Rev. Salud Anim. Vol. 35: 3. 145-150.
5. Sosa GCG., Vargas M., Torres J., Gordillo PG. (2014). Tick-Borne Rickettsial pathogens in rodents from Mexico. J. Biomedical Science and Engineering 7: 884-889.
6. Linzey AV; Timm R. (2008a). *Reithrodontomys fulvescens* In: IUCN 2013. IUCN Red list of threatened species. VERSION 2013.2. Recuperado a partir de www.iucnredlist.org.
7. Linzey, AV; Timm R, Matson J. (2008b). *Peromyscus leucopus* In: IUCN 2013. Red list of threatened species. VERSION 2013.2. Recuperado a partir de www.iucnredlist.org.
8. Linzey AV; Matson J; Timm R, Woodman N. (2008c). *Sigmodon Hispidus* In: IUCN 2013. Red list of threatened species. VERSION 2013.2. Recuperado a partir de www.iucnredlist.org.
9. Linzey AV; Timm R; Woodman N; Matson J; Samudio R. (2008d). *Oryzomys couesi* In: IUCN 2013. IUCN Red list of threatened species. VERSION 2013.2. Recuperado a partir de www.iucnredlist.org.

ESTUDIO DE LA PROPUESTA DEL CULTIVO DE GRANA COCHINILLA COMO UNA OPCIÓN FACTIBLE DENTRO DE UN CULTIVO MULTIVARIADO

Gabriela Arroyo Figueroa¹, Ana Karen Alejo Carmona¹, Tomas Torres Anaya¹, María Isabel García Vieyra¹, Luis Fernando Saavedra Medina¹

¹Universidad de Guanajuato

RESUMEN

El enfoque actual de la agricultura es el de un sistema integral que responde a las demandas de los mercados y a los requerimientos de los consumidores, que aumentan e intensifican la calidad y variedad de los productos solicitados. Por lo anterior es fundamental desarrollar y emprender acciones que nos permitan aprovechar los espacios ya destinados para la actividad agrícola o en su caso optimizar los sistemas de producción ya existentes, atendiendo a la producción de cultivos novedosos y demandados en el mercado, asegurando así su venta y la retribución económica al sector productivo. Dicha optimización de espacio da oportunidad a la práctica de cultivos múltiples, acoplados de acuerdo a su fisiología y fenología. El objetivo de este trabajo es analizar la factibilidad del cultivo de grana cochinilla como parte de una producción multivariada, así como la selección de las posibles variedades de cultivos convencionales de invernadero, con las que puede coexistir bajo las mismas condiciones climatológicas el insecto. Dicha factibilidad evaluada a través de los requerimientos de los cultivos involucrados y las condiciones estándar de la zona productiva del bajío. Contribuyendo con ello al mantenimiento del cultivo de grana cochinilla que representa un cultivo económicamente viable que garantiza un ingreso adicional para los productores, representando una actividad que ocupa una mínima parte de terreno para su explotación y que genera un producto con demanda existente durante todo el año y en crecimiento.

1. INTRODUCCIÓN

Cada vez más la agricultura es vista como una actividad económica, un negocio que independientemente de su escala y complejidad social, sobrepasa la producción primaria y es por lo tanto, un sistema integral que responde a las demandas de los mercados y a los requerimientos de los consumidores, con una visión y estrategias de cadenas agroalimentarias [G. M. Jaime, *et al.*, 2012]. Los inicios de la historia de la agricultura en México, se caracterizan por el uso de cultivos de primera necesidad destinados al autoconsumo entre ellos destacan el maíz, trigo, frijol, calabaza y jitomate [Anónimo, 2016]. Posterior al asentamiento de las poblaciones y durante época de la conquista española, dicha producción comienza a ser mas intensiva, generando la importancia económica que tiene hoy día. Algunos otros cultivos, no básicos, pero trascendentes por demanda e influencia cultural, comenzaron a tomar importancia en la historia económica de México, representando un fuerte impulso para dicha economía, llegando estos, a ser productos representativos del país. Entre estos se encuentra el nopal, el maguey y la grana cochinilla. La grana cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa), es un insecto que se instala en las pencas del nopal y del cual se obtiene un colorante natural rojo. Sin embargo, como resultado de la aparición de los colorantes sintéticos, la historia del país y los problemas a los que se enfrentó, la producción del insecto llego casi a desaparecer por completo [P. A. Tovar, 2000]. Hay diferentes tipos de cultivo para la producción de grana que son utilizados desde la época prehispánica y que se siguen utilizando hasta ahora en México, pero hay dos que son básicos; el de planta en pie (cielo abierto y tapexco) y los de penca cortada (micro túnel o invernadero comercial) [V. S. Cruz, 2014].

Actualmente la forma de cría de este insecto se ha modificado de acuerdo al clima, temperatura, presencia de depredadores, disponibilidad del hospedero y otros factores abióticos propios de cada región en donde se pretenda establecer la unidad de producción [P. Liberato y V. A. Lilia, 2008]. Hoy por hoy, se han hecho esfuerzos con la finalidad de rescatar la producción del insecto por medio de varios proyectos encaminados a la implementación de la producción. Pero los altos costos de inversión inicial y las oscilaciones en los precios internacionales, han limitado que se pueda desarrollar esta actividad de manera más amplia, aun contando con condiciones adecuadas para hacerlo [H. S. Inés, 2004]. Aunado a este esfuerzo desde hace poco más de 10 años, se ha comenzado con la investigación biológica del insecto, para optimizar rendimientos, elevar calidad y disminuir costos de producción [F. V. Coronado, 2011].

Con la finalidad de hacer un aporte al conocimiento se han investigado nuevas estrategias que se puedan implementar, para poder tener un mejor control de la producción dentro del invernadero, lo cual favorezca el manejo de la temperatura y humedad relativa presentes. Como parte de dicho aporte se ha buscado tener una interacción de varios cultivos dentro del invernadero que tengan la capacidad de poder desarrollarse bajo las mismas condiciones climatológicas de la grana cochinilla, a esta interacción le hemos denominado cultivo multivariante, pues se pretende con ello controlar y a la vez conjuntar las diferentes variables que son necesarias para cada una de las variedades. Para la selección de los cultivos, se observó cuáles son los más aptos para la región y cuales se ellos se encuentran entre los que más interesan al productor, haciendo una revisión bibliográfica y analizando las diferentes recomendaciones de sociedades productoras y de capacitación.

Declara Jeffrey Jones, el subsecretario de Sagarpa, para la revista Imagen Agropecuaria, que México tiene ventajas competitivas, por su ubicación y variedad de climas, para especializarse en cultivos con un enorme potencial por lo que debemos alinear toda nuestra actividad agroalimentaria a lo que está demandando el mercado. Entre los cultivos de oportunidad donde ha aumentado la demanda del mercado estadounidense, que absorbe el 85% de las exportaciones mexicanas, están el aguacate, brócoli, berenjena, chile, espárrago, coliflor, pepino, fresa, tomate, mango, papaya y camarón. En base a lo anterior es fundamental desarrollar y emprender acciones que permitan aprovechar los espacios ya destinados para la actividad agrícola o en su caso optimizar los sistemas de producción ya existentes, atendiendo a la producción de cultivos novedosos y demandados en el mercado, a fin de asegurar su venta y retribución económica al sector productivo.

En el mercado actual, las estrategias de planificación de cultivos requieren que los agricultores consideren muchos factores de producción, tales como el cambio climático global, la calidad de agua subterránea y la gestión de los nutrientes así como la calidad de los alimentos y los impactos de especies invasoras, puesto que ellos tienen una gran influencia en la planificación de cultivos, producción y rentabilidad. La selección de cultivos es el primer paso en la planificación de cultivos. Y para ello se ha de considerar: temporada/clima, mercado, mano de obra, costos de producción, vulnerabilidad a las plagas, cultivos acompañantes, rotación de cultivos, fertilidad del suelo, erosión, preferencia personal (Agricultura & Land-Based Training Association ALBA, 2012) y sistema de producción.

Los productores de invernadero se han convertido en activos invaluable para los gerentes de comercializadoras de hortalizas al abastecerlos de productos frescos. Los consumidores, por su parte, también responden de manera favorable a la consistente calidad, sabor y precio estable de los productos conocidos, así como de las variedades nuevas e innovadoras que se ofrecen. Por lo tanto las cosechas de invernadero se están volviendo artículos de primera necesidad en el abasto familiar, y esto junto con la reciente tendencia del mercado a comprar y consumir alimentos sembrados en la localidad, alienta a considerar el cultivo de frutas y verduras (AMHPAC, 2009).

Según el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), México es el principal exportador a Estados Unidos de las siguientes frutas y hortalizas (por porcentaje de participación en el mercado): fresas (99%), alcachofas (97%), calabacitas (94%), maíz (91%), tomates (88%), pimientos (84%). Pepinos (83%), berenjena (82%), aceitunas (82%), espinacas (82%), apio (80%), papaya (72%), aguacate (71%) y cebollas (57%) (US Agriseeds, 2015). Agregado a esta situación se ha mencionado ya la ventaja climatológica para producción de hortalizas de nuestro país en comparación con el país comprador vecino, cuyas tendencias de consumo se inclinan cada vez más hacia productos naturales producidos en México, lo cual genera un posible incremento de demanda sobre las hortalizas producidas, específicamente en invernadero por garantizar su disponibilidad a lo largo del año.

Con base a la información recopilada y en busca de ofrecer a la empresa “Mujeres Exitosas de San José de Pintores S.P.R de R.L.”, una alternativa para el aprovechamiento de sus instalaciones de producción en invernadero, se han seleccionado cuatro productos que de acuerdo a sus requerimientos climatológicos son adecuados para su producción en los invernaderos de la empresa mencionada. Dichos cultivos son: berenjena, pepino, pimiento y fresa blanca, elegidos de acuerdo a la comparación de las condiciones disponibles para producción en la empresa y tomando en cuenta los requerimientos que dichos productos implican en su ciclo de producción, mismos que se especifican de manera general en el presente escrito.

2. TEORÍA

La producción de grana (*Dactylopius coccus* Costa) en México ha tenido en los últimos años una demanda creciente, unido al interés de diferentes investigadores por encontrar la manera más adecuada para obtener la calidad deseada, utilizando tecnologías más avanzadas para su cultivo, como los micro túneles e invernaderos. El Gobierno Federal en México, a través del Fondo Nacional de Apoyos para Empresas en Solidaridad (FONAES), como resultado del estudio de diferentes proyectos productivos, detectó el modelo de producción intensiva de grana cochinilla como una alternativa económicamente viable. Este Modelo se basa en la experiencia que tiene la empresa social apoyada por FONAES denominada “Campo Carmín” en la producción del nopal y de grana cochinilla [FONAES, 2012]. Dentro de este proyecto se apoyó a diferentes empresas, las cuales tenían la inquietud de producir grana cochinilla, en diferentes estados del país. El modelo de FONAES utiliza pencas adultas de la variedad de nopal *Opuntia ficus indica*, como hospedero del insecto, nopal que presenta ventajas para la reproducción de la grana bajo condiciones de invernadero, ya que soporta temperaturas de 10°C hasta los 50°C [C. F. Manuel y L. C. Celina, 2003]. Las mejores épocas para siembra en invernadero son Marzo-Abril y Agosto-Septiembre. Entre los factores climáticos de influencia en el ciclo biológico del insecto cultivado bajo invernadero se encuentran los vientos directos, la luz, temperatura y humedad relativa [TECNOS, ACERCA, 2000]. La empresa Mujeres Exitosas de San José de Pintores localizada en el municipio de Abasolo Guanajuato, es una de las empresas apoyadas por FONAES y se encuentra activa en la producción de grana cochinilla fina desde el 2012. Su forma de producción es bajo condiciones de invernadero, el cultivo del insecto se desarrolla en forma de nopaloteca, con el sistema de penca cortada colgante [T. A. Tomas y V. R. Lorena, 2014]. Es importante destacar que las estaciones climatológicas, en esta región Bajío donde está localizado el municipio de Abasolo Guanajuato, son inconstantes, lo cual hace que en cada estación haya variaciones en la producción, en el tiempo del ciclo biológico del insecto y en las características a manejar dentro del invernadero [E-Local, 2015].

3. PARTE EXPERIMENTAL

Evaluación del sistema de producción actual.

Primeramente se tomaron como base el registro de temperatura y humedad relativa, así como la localización geográfica presentados en la empresa “Mujeres Exitosas” [T. A. Tomas y V. R. Lorena,

2014]. Posteriormente se aplicaron cuestionarios dirigidos a los trabajadores encargados de la producción. Con la finalidad de conocer cuáles son las situaciones a las que se han enfrentado y que han hecho para resolverlas, así como que experiencia les ha dejado la producción hasta el momento. Además de conocer los productos hortícolas alternativos que les que son de interés. Y finalmente se realizó una entrevista personal con el representante de la empresa para evaluar la utilidad de la presente propuesta y escuchar sus intereses en cuanto a variedades hortícolas.

Evaluación de la demanda y producción de hortalizas en el Bajío.

Para poder conocer las mejores opciones de cultivos hortícolas de acuerdo a la ubicación del invernadero de la Empresa Mujeres Exitosas, se llevo a cabo una revisión de la información del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), y diferentes notas periodísticas.

Elección de la combinación de variedades.

Una vez investigada la situación de producción y comercialización del estado, tomando en cuenta los resultados observados sobre las condiciones de temperatura y humedad relativa de la unidad de producción y los antecedentes de la producción en el lugar, consultando investigaciones ya realizadas; y de acuerdo a los intereses de los productores y del representante de la empresa, se tomó la decisión de elegir cuatro cultivos que pudieran adaptarse a las condiciones de temperatura y humedad relativa del invernadero antes señaladas, realizándose una revisión bibliográfica acerca de sus requerimientos y sus necesidades.

Diseño de la distribución de los productos seleccionados para el cultivo multivariado.

Teniendo recopilada la información de los requerimientos climáticos y fenológicos de las variedades hortícolas seleccionadas para producirse en convivencia con la grana cochinilla, se evaluaron dichas necesidades y se distribuyeron los productos para su cultivo, de acuerdo a las variaciones de temperatura y humedad relativa, registradas dentro del invernadero de la empresa "Mujeres Exitosas".

4. RESULTADOS

Sistema de producción actual.

El invernadero de la empresa "Mujeres exitosas" se encuentra ubicado en la localidad de San José de Pintores, en el municipio de Abasolo, Guanajuato, a 101°34'45.3 Longitud Oeste, 20°28'16.9 Altitud Norte, a una altura de 1760 msnm. Los resultados obtenidos tras los veranos de investigación científica en la empresas permiten conocer las condiciones que se presentan dentro del invernadero, y apoyados en múltiples investigaciones bibliográficas sobre los requerimientos y las necesidades de los cultivos, se ha optado por trabajar sobre las condiciones que ayudan a poder controlar de una mejor manera el cultivo de la grana cochinilla, estas son, la humedad relativa y la temperatura (Figura 1).

Durante el periodo de registros diurnos de temperatura y humedad relativa se observó que las máximas de temperatura y humedad relativa correspondieron a un valor de 32.1°C 90%; en tanto que las mínimas estuvieron de 18.6°C y 40%. [T. A. Tomas y V. R. Lorena, 2014].



Figura 4. Invernadero de producción en la empresa "Mujeres Exitosas". Fuente Torres Anaya 2014.

Demanda y producción de hortalizas en el Bajío.

Según Declara José Calzada Rivorosa, "Guanajuato se ha convertido en uno de los líderes productores de hortalizas y otros productos del campo a nivel nacional y del mundo", ocupando entre otras cosas, el tercer lugar, a nivel mundial, como exportador de pimiento morrón. Es el estado con la producción agrícola más grande del país (de acuerdo al reporte más reciente del SIAP del 2014, la superficie total cosechada del estado reportada es de 3943, 140.66 Ha.) y ocupa el segundo lugar nacional en exportaciones del sector alimentario en productos como brócoli, ajo, coliflor, esparrago y zanahoria, dice Miguel Ángel Márquez Márquez, gobernador del estado. [Comunicación Social de Gobierno, 2016]. Dichas catalogaciones han sido logradas en base a los crecimientos de producción y venta que ha logrado el estado en los últimos 12 años, se reportan crecimientos extraordinarios en productos como pimientos (creció 39 veces en 10 años), tomates frescos (28 veces) y lechugas (7 veces). Estos indicadores soportan el crecimiento por triplicado de las exportaciones nacionales. [Periódico am, 2014].

Elección y combinación de variedades.

En el caso específico y atendiendo la demanda de la empresa productora de grana cochinilla "Mujeres Exitosas de San José de Pintores S. P. R. de R. L.", de presentar una propuesta de variación en su cultivo tradicional, se han elegido la berenjena, el pepino, la fresa blanca y el pimiento, como productos novedosos con demanda establecida en el mercado, que coinciden con el cultivo de grana cochinilla en cuanto a los requerimientos climatológicos que necesitan para producirse. Así mismo, se tomó en cuenta para su elección el fenotipo de los cultivos mencionados, a fin de que su naturaleza permitiera el uso de las instalaciones de la empresa y los recursos disponibles. Se trata pues de especies cuyo desarrollo se mantiene dentro del intervalo de 20-30°C de temperatura con humedad relativa abundante; mismas condiciones que son soportadas por la grana cochinilla, y que se presentan dentro de las instalaciones de la empresa. Se proponen los cultivos de las variedades que se enumeran a continuación:

- 1.- Berenjena (*solanun melonjena*)
- 2.- Pepino (*Cucumis sativus*)
- 3.- Frutilla Chilena, Fresa Chilena o Frutilla Blanca (*Fragaria chiloensis*)
- 4.- Pimiento morrón (*Capsicum annum L.*)

Ubicación gráfica para los cultivos dentro del invernadero

De acuerdo a la estructura que posee el invernadero, se plantea mantener la producción de grana cochinilla en la parte central donde las condiciones climáticas que tienen incidencia alta en la producción son más equilibradas en comparación con el resto del espacio. El ubicar los cultivos

hortícolas en los límites del invernadero ayuda a disminuir la eficiencia lumínica sobre los cladodios de nopal donde se cultiva la grana cochinilla y cuyos requerimientos de luz son mínimos.

Para los cultivos hortícolas propuestos, se planea tener dos variedades en cada sección lateral. La fresa blanca se propone en la parte superior izquierda del croquis del invernadero, donde por su ubicación respecto al sol, se tiene una menor temperatura y menor penetración de luz, condiciones capaces de ser resistidas por la fresa. En la parte inferior izquierda se propone ubicar la berenjena a fin de aprovechar la temperatura e iluminación moderada, en comparación con el resto del espacio, evitando las bajas temperaturas que afectan este cultivo, manteniendo el 50% o más de humedad, apto para la grana cochinilla.

El pimiento morrón y el pepino en la parte derecha, ya que son los que necesitan mayor incidencia de luz y calor, pudiendo obtenerlos en este lugar. En la parte superior del lado derecho, se propone el pepino a fin de aprovechar las altas temperaturas e incidencia de luz, afines para el desarrollo óptimo de esta cucurbitácea. En la parte inferior derecha, se planea el pimiento morrón para aprovechar la alta incidencia de luz y temperatura necesarias para su crecimiento, a la vez que se evita el descenso de la temperatura que tiene serias repercusiones sobre el cultivo de pimiento morrón. En la Figura 2, se muestra el dibujo del plano del invernadero se especifica con señalizaciones el lugar donde se encontraría cada cultivo:

De igual manera se han tomado en cuenta para la distribución de los cultivos, la compatibilidad que existe entre las variedades hortícolas elegidas, definida según la familia de las especies que genera competencia entre las especies por los nutrientes del suelo, y más aún por la posibilidad de anidar enfermedades específicas para la familia botánica a la que pertenece, previniendo esto aun cuando no pretende tener contacto directo entre el suelo y las cuatro variedades hortícolas.

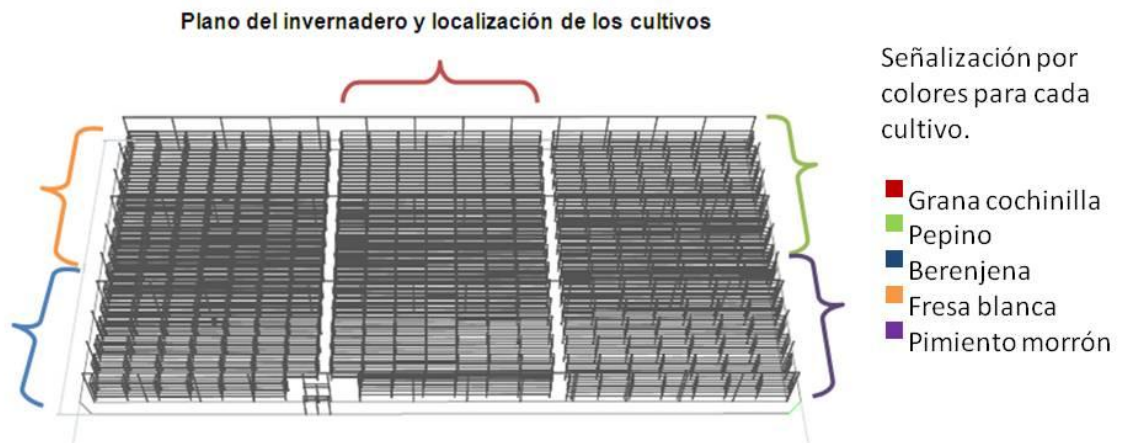


Figura 2. Plano de invernadero y localización de los cultivos.

5. CONCLUSIONES

Los datos presentados y las condiciones de cultivo de la grana cochinilla, la colocan como un insecto conveniente para su producción, tanto por la demanda existente y constante como por la posibilidad de adaptación del cultivo en el estado, ya sea a campo abierto o en un sistema de invernadero, así mismo por la ubicación del país respecto al mayor comprador que es Estados Unidos, lo cual representa una ventaja comercial. Las variadas técnicas de producción de grana permiten, en conjunto con la superficie destinada, la consideración de este insecto como elemento

de un sistema multivariado, que de oportunidad al productor de aprovechar al máximo sus recursos para obtener varias cosechas de más de un producto a la vez. Esto a través de la selección de especies que puedan interactuar con el cultivo de grana cochinilla, de acuerdo a las especificaciones climatológicas y espaciales que este último cultivo requiere; lo cual significaría la oportunidad de los productores interesados de variar sus cosechas apoyando la legendaria producción de grana cochinilla en nuestro país.

BIBLIOGRAFÍA

1. G. M. Jaime, F. J. M. Lucero, V. C. Sánchez, 2012. Inteligencia de mercado de pepino. Edit. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C. La Paz Baja California Sur, México. pp. 85, Consultado en: <http://intranet.cibnor.mx/personal/bmurillo/docs/inteligencia-mercado-pepino.pdf>.
2. 26/01/16. Anónimo, 2016, La agricultura en México, capítulo 4, Lo que siembres recogerás, pp. 1:2, consultado: http://www.pps.k12.or.us/district/depts/edmedia/videoteca/curso2/htmlb/SEC_86.HTM 29/04/16.
3. P. A. Tovar, 2000, Producción de grana cochinilla del nopal *Dactylopius coccus* Costa (Homóptera: *Dactylopiidae*) en dos localidades del sur del estado de Nuevo León, Tesis de Maestría, Universidad autónoma de Nuevo León, Linares, N.L., México, [pp. 1-21].
4. V. S. Cruz, 2014, Determinación de la relación beneficio costo en una unidad de producción de grana cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) ubicada en el municipio de Villanueva, Zacatecas, Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, División de Ciencias Socioeconómicas, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, [pp. 1-22].
5. P. Liberato y V. A. Lilia., 2008, Cría de grana cochinilla, Manual técnico, Universidad de Guadalajara, [pp. 10-18].
6. H. S. Inés, Febrero 2014, Formulación del proyecto de una empresa productora de grana cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa), Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales, Texcoco, Estado de México, [pp. 1-25].
7. F. V. Coronado, 2011, Efecto de la fertilización del nopal (*Opuntia Ficus-indica*) sobre la productividad y la calidad de grana cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa), Tesis de maestría, Colegio de Postgraduados, Campus Puebla, [pp. 1-17].
8. Planea Sagarpa reconvertir áreas maiceras hacia cultivos más rentables. Ernesto Perea. Imagen Agropecuaria. Consultado en: http://imagenagropecuaria.com/2008/planea_sagarpa_reconvertir_areas_maiceras_hacia_cultivos_mas_rentables/ 26/01/16.
9. Farmer Education Program (PEPA) Resource Guide. Planificación Y Rotación De Cultivos. Agriculture&Land- Based Training Association (ALBA). Mayo 2012.
10. Oportunidades de exportación para México. US Agriseeds@1 Julio 2015. Consultado en: <https://www.hortalizas.com/cultivos/oportunidades-de-exportación-para-México> 27/01/16.
11. Asociación Mexicana de Horticultura Protegida. AMHPAC. 2009. Estudio de oportunidades externas para el desarrollo de la inteligencia comercial del mercado de exportación de la horticultura protegida.
12. FONAES, 2012. Estudio para el desarrollo del modelo de negocio replicable producción intensiva de grana cochinilla en condiciones de invernadero, Actualización 2012 a cargo de la Dirección General de Impulso Productivo de la Mujer y Grupos Vulnerables, [pp. 2-35].
13. C. F. Manuel, L. C. Celina, 2003, Producción de grana cochinilla *Dactylopius coccus* (homoptera: *dactylopiidae*) en invernadero, Agrociencia, Núm. 2, Vol. 37, marzo-abril, [pp. 149-155].

14. TECNOS, ACERCA, 2000, Estudio del mercado mundial de la cochinilla del nopal, [pp. 56-60].
15. T. A. Tomas, V. R. Lorena, 2014, Control de calidad por parámetros climáticos en la producción de grana cochinilla, Memorias de los Veranos de la Investigación Científica de la Universidad de Guanajuato 2014.
16. E-Local, México. Enciclopedia de Los Municipios y Delegaciones de México. Estado de Guanajuato. Recuperado de http://www.e-local.gob.mx/wb2/ELOCAL/EMM_guanajuato [revisado 01/07/15].
17. Comunicación Social de Gobierno."Guanajuato líder en producción de hortalizas en el país". Consultado en: <http://noticias.guanajuato.gob.mx/2016/04/29/guanajuato-lider-en-produccion-de-hortalizas-en-el-pais/30/05/16>.
18. Periódico am. "Guanajuato: El rey verde" 2014.Columba López. Consultado en: <http://www.am.com.mx/l/local/guanajuato-el-rey-verde-119008.html> 31/05/16.

USOS DEL AGUA EN LA MICROCUENCA LA JOYA, QUERÉTARO

Elsa Angélica Contreras Contreras¹, Diana Elisa Bustos Contreras², Rosalía Téliz Triujeque³

¹INIFAP-CENID Fisiología y Mejoramiento Animal. ^{2,3}INIFAP-Sitio Experimental Querétaro

RESUMEN

México se caracteriza por la inequidad en la distribución, el acceso y control del agua, así como por un uso ineficiente de este recurso. El acceso al agua depende de factores que se relacionan con la forma en que la sociedad está organizada, quiénes toman las decisiones y con base en qué criterios se distribuye el recurso. El presente trabajo tiene por objetivo realizar un análisis sobre la disponibilidad, uso y manejo del agua en la microcuenca La Joya, ubicada en el municipio de Querétaro, para identificar las actividades productivas y reproductivas que realizan hombres y mujeres en torno al uso del agua. La metodología de trabajo fue mixta ya que ofrece varias ventajas: se logra una perspectiva más precisa del fenómeno; ayuda a clarificar el planteamiento del problema, así como las formas más apropiadas para estudiar y teorizar determinado fenómeno. Como parte de los resultados y conclusiones se encontró que el uso y manejo del agua en la microcuenca se da en dos ámbitos, el doméstico y el productivo. El agua para uso doméstico depende de las mujeres, si bien en algunos casos reciben ayuda del esposo o de los hijos, su participación es determinante para el consumo, el uso depende del número de integrantes del grupo doméstico y de la edad de los miembros. En el caso del agua para uso productivo la responsabilidad recae en los hombres y encontramos una diferencia fundamental con las mujeres y es que su participación en este sector está relacionado más que con el abasto, con la toma de decisiones y la gestión.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el tema del agua ha cobrado una enorme importancia, no sólo por ser vital para la sobrevivencia de la vida en el planeta, sino porque se ha convertido en un recurso natural escaso. Pero además de ser un recurso escaso, enfrenta otro problema igual de grave, en la mayoría de las regiones, el problema no es la falta de agua sino, más bien, la mala distribución de los recursos hídricos.

México se caracteriza por ser un sistema marcado por las desigualdades en la disponibilidad, el acceso y control del agua, así como por un uso ineficiente de este recurso. Una gran cantidad de personas viven en situación de pobreza extrema, la escasez de agua incrementa el deterioro de su nivel de vida y afecta prácticamente todos los ámbitos de la vida familiar y comunitaria. Cabe señalar que el 45 por ciento de la población a nivel nacional no cuenta con el servicio de agua potable en la vivienda (Soares, 2006). Este 45% son personas de menores ingresos que viven en comunidades rurales y colonias populares, que no disponen de agua suficiente para las necesidades más elementales en el ámbito doméstico. No es raro observar comunidades y poblados carentes de agua al lado de zonas turísticas que parecen ajenas al problema de escasez.

El acceso al agua no depende solamente de la abundancia o escasez natural del recurso, sino de otros factores que se relacionan con la forma en que la sociedad está organizada, quiénes toman las decisiones y con base en qué criterios se maneja y se distribuye el recurso. Tomando en cuenta el contexto nacional y local de la situación del agua, el presente trabajo tiene por objetivo

realizar un análisis de género sobre el uso y manejo del agua en la microcuenca La Joya, ubicada en el municipio de Santiago de Querétaro. Se considera tanto el ámbito productivo como el doméstico, considerando que son dos formas distintas de relacionarse con este recurso, en este sentido es común pensar que las mujeres se relacionan únicamente con el agua para uso doméstico, sin embargo el análisis de género permite identificar las diversas actividades productivas y reproductivas que realizan hombres y mujeres, haciendo visible su participación.

2. TEORÍA

Género y Agua

Se está viviendo en México y en el mundo una crisis de los recursos hídricos asociada a un modelo de gestión que ya acusa repercusiones en el acceso al recurso, disponibilidad y calidad. Los problemas relacionados con el agua que actualmente son el centro de atención de las organizaciones de la sociedad civil, de los organismos internacionales y de los gobiernos, existen desde hace mucho, pero hoy se les presta mayor atención debido al cambio climático, al deterioro acelerado de los ecosistemas y, en definitiva, a la pérdida de la biodiversidad que cada día se expresan de manera fehaciente en todo el planeta (Salazar, 2010).

Sin embargo como plantea Salazar (2010), no todas las personas se ven afectadas de la misma manera; existen realidades muy diferentes en cuanto al acceso al agua. Por ejemplo en las zonas rurales sobre todo en las comunidades más aisladas o alejadas de los centros urbanos, el acceso al agua para uso doméstico está muy limitado. En este sentido no sólo depende de la abundancia o escasez natural del recurso, sino de otros factores que se relacionan con la forma en que la sociedad está organizada, quiénes toman las decisiones y con base en qué criterios se maneja y se distribuye el recurso.

El derecho al agua, segura, suficiente, limpia y accesible para el uso doméstico y productivo es reconocido como uno de los derechos humanos básicos de todas las personas. Sin embargo, el ejercicio de este derecho se ve obstaculizado por las desigualdades sociales existentes derivadas del nivel de ingresos, la etnia y el género.

El primero determina la posibilidad de vivir en zonas con todos los servicios o de habitar en asentamientos sin la infraestructura necesaria para tener acceso al recurso. La etnia determina el acceso porque el hecho de que las comunidades indígenas se encuentren entre las más afectadas por la pobreza y la falta de agua indica que la discriminación es otro factor que influye en el acceso al recurso, más allá de su abundancia o escasez. Por último el género al que se pertenece, el limitado acceso de las mujeres a la tierra en las zonas rurales y, por consiguiente, al agua para uso productivo se relaciona con una cultura en la que aún persiste la creencia de que ellas no requieren factores productivos porque su papel es el cuidado de los hijos y el trabajo en la casa (Salazar, 2010).

La mala distribución del agua afecta a hombres y mujeres, sin embargo existen diferencias entre unos y otras tanto en el grado de afectación del problema y la forma que se percibe, como en las acciones para enfrentarlo. Ante esta situación desde hace varias décadas distintos organismos internacionales preocupados por el tema han llevado a cabo conferencias, cumbres y convenciones para llegar a acuerdos internacionales que garanticen el derecho al agua de hombres y mujeres. En el siguiente apartado se presentan los resultados encontrados al respecto de los usos del agua en el ámbito doméstico y productivo y el acceso de hombres y mujeres a este recurso.

3. RESULTADOS

Zona de estudio

La microcuenca La Joya se encuentra ubicada en el cráter del Volcán La Joya e incluye las localidades La Joya y El Charape. Situada en la delegación Santa Rosa Jáuregui en el Municipio de Querétaro, en el estado de Querétaro, se encuentra en los límites político-administrativos con el estado de Guanajuato. Se localiza en la parte noroeste del municipio de Querétaro. Tiene como coordenadas extremas 335586.47 y 340417.62 en longitud este y 2298474.56 y 2304080.23 latitud norte. Cuenta con una superficie de 15.92 Km² y una extensión perimetral de 16.9 Km y su rango altitudinal abarca desde los 2250 hasta los 2715 msnm.

La vegetación existente en la corresponde a: chaparral, pastizal, matorral subinermes e inermes y bosque de encino. Sin embargo es característico de ésta el alto grado de erosión de los suelos, la falta de cobertura vegetal en algunos sitios y la escasez de agua.

De acuerdo al Censo de Población y Vivienda INEGI (2010), la población del municipio de Querétaro es de 734,139 personas, dentro de las cuales se incluían las 245 personas que conformaban las comunidades de El Charape y La Joya y que se distribuían de la siguiente manera: 94 habitan en la comunidad El Charape y 151 en La Joya, de tal forma que ambas representan el 0.04% de la población municipal. En la comunidad de El Charape hay 25 familias, mientras que en la comunidad con más habitantes La Joya hay 31 familias. La distribución poblacional en función al sexo, se comporta de la siguiente manera: 48.5% de la población son varones y 51.5% son mujeres. Referente a las edades entre las cuales se distribuye la población; el grupo más representativo entre hombres y mujeres son los menores de 14 años, que representan 37.5% de la población, seguido por el grupo que comprende entre los 15 y 35 años y que representa el 32%. De acuerdo con la CONAPO las comunidades de la microcuenca presentan un índice de marginación alto, como ya se menciona en la primer parte de este trabajo, son las comunidades rurales marginadas las que mayormente padecen los efectos de la escasez del agua, por tal motivo resulta importante remarcar el papel de hombres y mujeres en los usos del agua.

a) Agua para uso doméstico

El agua para uso doméstico, es aquella que se destina para el consumo humano y para el saneamiento, este último se refiere al agua destinada al uso particular de las personas y del hogar (Nazar et al., 2010). El acceso y la disponibilidad del agua son cruciales para una buena calidad de vida en los hogares. Es claro que las y los integrantes de una familia que puede disponer del líquido en tomas dentro de la vivienda, de manera regular, tienen mejores condiciones de vida que aquellas que tienen que acarrearlo, lo reciben de manera irregular o de mala calidad.

Nazar et al. (2010) señalan que en las comunidades donde la escasez de agua es significativa, los costos de este problema recaen principalmente en las mujeres y niñas quienes ocupan largas horas de trabajo para acceder a este líquido. Ésta es la razón que explica por qué son las mujeres las más interesadas en que los servicios de agua y saneamiento sean más accesibles en los grupos domésticos. En este sentido se encontró que en la microcuenca La Joya, el peso de las actividades domésticas recae en las mujeres por tal motivo depende de ellas principalmente garantizar el abasto de este líquido en los hogares, situación que resulta inequitativa, pues son ellas las que se encargan del acarreo de agua de los manantiales, cuando llega a escasear el agua potable.

En los talleres participativos que se realizaron se mencionaron los siguientes usos domésticos del agua:

- Preparación de alimentos
- Lavado de ropa
- Limpieza del hogar

- Higiene personal
- Uso en el baño
- Para uso en el traspatio

El agua potable llegó a la microcuenca en el año 2001, el servicio consiste en llaves públicas distribuidas en ambas comunidades. Pese a que ya cuentan con agua potable el servicio no es regular y llega de manera intermitente, es por eso que cuando dejan de abastecer los tinacos comunales, las mujeres, niños y niñas principalmente tienen que acarrear agua de los manantiales aun disponibles en las comunidades, sin embargo esto representa un aumento en las jornadas de trabajo implicando una sobrecarga. Es por eso que una de las estrategias a la que recurren es la cosecha y reúso de agua. Como parte del programa Vivienda Sustentable en las comunidades rurales del municipio de Querétaro, en el año 2009 la Agencia de Desarrollo Sierra Gorda con apoyo del municipio y de la SEMARNAT, llevaron a las viviendas un paquete de ecotecnias con la finalidad de contribuir a la recuperación de la microcuenca, esto si bien contribuye a aminorar la problemática de la mala distribución del agua, se encontró que en el tema referente al agua para uso doméstico los hombres no tienen ninguna injerencia, son las mujeres encargadas de abastecer a los grupos domésticos de este vital liquido.

c) Agua para uso productivo

En la microcuenca el uso del agua en actividades productivas está ligado a la agricultura y ganadería, el agua que se usa es de lluvia. La agricultura es de subsistencia y se sostiene sólo con el temporal, para el caso de la ganadería se ocupa el agua de los bordos y el arroyo. En este sentido representa un recurso muy importante para el sostenimiento de estas actividades.

Generalmente como las actividades productivas se relacionan con los hombres se deja fuera del análisis a las mujeres, sin tomar en cuenta su contribución en el campo, considerando su participación en este trabajo como “ayuda” al esposo. Sin embargo su participación es fundamental, para la producción y reproducción en grupo doméstico. En el siguiente apartado se analizará esta participación tomando en cuenta la tipología de los grupos domésticos que hemos analizado.

Actividades agrícolas

Las actividades en el rubro agrícola son consideradas puramente masculinas, sin embargo las mujeres han participado desde siempre en los trabajos agrícolas. Desempeñan un papel estratégico en diversos niveles: como productoras de alimentos en la pequeña producción campesina o de subsistencia y en la agricultura vinculada a las hortalizas, leguminosas y frutales. De acuerdo a los datos obtenidos en los talleres encontramos que su participación en actividades agrícolas es permanente, aunque el esposo se encuentre en casa.

Para entender la dinámica de trabajo en la parcela es pertinente mencionar qué tipo de productores y productoras son, de acuerdo a la definición que ofrece la FAO la forma de organización social de producción en la microcuenca La Joya, corresponde a la clasificación de productores de subsistencia, es decir que cuentan con los recursos mínimos como son la tierra y los instrumentos para producir únicamente para satisfacer las necesidades familiares y de producción.

Es interesante observar que en estas actividades el conocimiento tradicional está presente por ejemplo en la microcuenca se utiliza el estiércol como abono para fertilizar el suelo, esta práctica sustituye el uso de fertilizantes. Hombres y mujeres tienen conocimientos diferentes debido a las actividades que realizan cada uno. Por ejemplo las mujeres saben que la maleza es un recurso que se puede aprovechar como forraje o incluso para consumo humano (los quelites por ejemplo).

Los hombres saben que la asociación de maíz, frijol y calabaza, permite amortiguar los riesgos de pérdida por alguna incidencia climática, (heladas, sequía, etc.). El trabajo en la parcela es parte del sentido de pertenencia a la comunidad, sentirse parte de un grupo, ser propietario de una parcela o no serlo tiene implicaciones no sólo económicas sino también políticas.

Actividades pecuarias

La actividad pecuaria en la microcuenca puede decirse que es de subsistencia ya sea ganado bovino, ovino y caprino, lo venden cuando atraviesan por alguna situación de emergencia. En lo que respecta al uso del agua para actividades pecuarias encontramos que se utiliza el agua de lluvia que se capta en bordos, la del arroyo y los manantiales y son los hombres quienes se encargan de la gestión y administración de este recurso para estas actividades. En este sentido la tenencia de la tierra juega un papel fundamental diferencias por grupo doméstico están determinadas por la tenencia de la tierra, ya que son los ejidatarios quienes deciden sobre la construcción y administración de los bordos, respecto al agua de los manantiales y el arroyo es de uso común. En la actividad pecuaria el traspatio representa el lugar donde se generan ingresos adicionales para sobrevivir funciona como un pequeño sistema productivo, la distribución del espacio está en función estratégica para incentivar la seguridad alimentaria.

La ganadería de traspatio es considerada una actividad propiamente de las mujeres y no es considerada como trabajo productivo, sin embargo provee de alimento al grupo doméstico por lo que su aporte debería ser reconocido como tal.

4. CONCLUSIONES

Existen variables como el género y la edad que determinan el uso y manejo del agua, en este sentido el sector más vulnerable son los adultos mayores pues es la población que más padece los efectos de la escasez y mala distribución del recurso. La mala distribución del agua afecta de manera diferenciada a hombres y mujeres, ya que a pesar de las distintas estrategias empleadas y de la participación familiar, recae en la población femenina la tarea de abastecer de agua al grupo doméstico. Por el contrario la relación de los hombres con este recurso está enfocada al ámbito productivo y por este motivo son ellos quienes se encargan de gestionar este recurso. Encontramos que en la microcuenca las desigualdades de género están muy marcadas, se sigue relegando a las mujeres al ámbito doméstico, a pesar de que participan y están presentes en las reuniones, la toma de decisiones recae en los hombres, por lo que las necesidades y demandas de las mujeres quedan fuera del ámbito político de toma de decisiones a pesar de ser ellas las que más padecen la escasez.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. Nazar, E. Zapata y V. Ramírez, “Género y agua. Estrategias para alcanzar la sustentabilidad con equidad”, en: El Agua en México: cauces y encauces. México: Academia Mexicana de Ciencias, 2010, pp. 383-411.
2. D. Soares, “Mujeres, agua, leña y desarrollo: Estudio de caso sobre género y recursos naturales en los Altos de Chiapas”, en: Gestión y cultura del agua Tomo II. México: SEMARNAT, IMTA y CP., 2006, pp. 293-312.
3. R. Salazar, H. Salazar, B. Rodríguez y M. Rodríguez, “ Agenda de género y agua en Iztapalapa: acciones para el disfrute del derecho humano al agua, 2010, México, Mujer y Medio Ambiente A.C.

EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS DE UNA BACTERIA ÁCIDO LÁCTICA AISLADA DE UNA BEBIDA AUTÓCTONA

Ramírez-Torres A.¹, Ventura- Canseco C.¹, Vidal-López D.²

1Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, 2 Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.Carr. Panamericana km. 1080, C.P. 29050, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluaron características probióticas in vivo de una bacteria ácido láctica (BAL) autóctona, reportada con características probióticas in vitro. Primeramente se realizó la identificación molecular de la cepa BAL-03 mediante la amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA. La evaluación de la toxicidad se llevó a cabo empleando ratones hembras de la cepa BALB/c con un peso de 21 ± 2 g y 6 semanas de edad; los cuales recibieron una dosis diaria aproximada de 108, 109, 1010 UFC/mL de BAL-03 durante 6 semanas. Para la evaluación de la seguridad de la cepa bacteriana se realizó la prueba de actividad hemolítica. El efecto del consumo de BAL-03 sobre bacterias nativas se llevó a cabo realizando la siembra de heces fecales de ratones durante los 0,15, 30 y 60 días de evaluación. De acuerdo a la identificación molecular se encontró que la cepa aislada de la taberna (BAL-03) pertenece al género *Lactobacillus* especie *plantarum* con un 99% de similitud. Los niveles de coliformes y enterococos al realizar la administración de la cepa BAL fueron estadísticamente iguales al grupo control ($P>0.05$). Con base a los resultados obtenidos de las pruebas de toxicidad y seguridad se demostró que la cepa de *L. plantarum* es una cepa segura y susceptible de ser empleada para el consumo humano, sin embargo se es necesario la realización de más pruebas.

1. INTRODUCCIÓN

Los probióticos se definen como “microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidad adecuada confieren un efecto beneficioso sobre la salud del huésped” (FAO, OMS, 2006). Para que un organismo sea definido como probiótico debe reunir algunas características como ser habitante normal del intestino humano, no ser patógeno ni toxigénico, sobrevivir al medio ácido del estómago y a la bilis en el duodeno, capacidad de adhesión a células epiteliales, adaptarse a la microbiota intestinal sin desplazar la microbiota nativa ya existente, y producir sustancias antimicrobianas. Son diversos los microorganismos reconocidos como probióticos y no todos tienen los mismos efectos y mecanismos de acción (Castro, 2006). Dentro de los estándares para evaluar que un microorganismo es seguro y efectivo, la FAO/OMSS (2006) recomiendan la identificación de la cepa para conocer su género y especie ya que el efecto probiótico es diferente de cada cepa. La identidad de la cepa es importante para vincular una cepa a un efecto de salud específico, así como para permitir la vigilancia precisa y estudios epidemiológicos; la caracterización probiótica a través de pruebas in vitro y el uso de modelos de experimentación animal lo cual resulta muy útil para evaluar in vivo la seguridad y los efectos de la administración de dosis, antes de desarrollar ensayos clínicos en humanos, para ello se realiza la evaluación de la toxicidad aguda, subaguda y crónica de la ingestión de cantidades muy grandes de probióticos deben llevarse a cabo para todas las cepas potenciales.

La presente investigación tuvo como objetivo la identificación molecular y la evaluación de seguridad mediante ensayos de toxicidad y actividad hemolítica de la cepa BAL-03 aislada de la taberna, así como su efecto sobre bacterias nativas.

2. TEORÍA

Los probióticos constituyen uno de los subgrupos más destacados dentro de los alimentos funcionales. En la actualidad, todavía se desconocen muchos aspectos relativos a sus mecanismos de acción; sin embargo, se reconoce su funcionalidad en la prevención y el tratamiento de trastornos gastrointestinales, la reducción de la intolerancia a la lactosa, la modulación de la respuesta inmunitaria y la reducción de los valores de colesterol y triglicéridos (Sanz et al. 2003). La importancia que han adquirido los probióticos en los últimos años ha incrementado su demanda, por esa razón se ha optado la búsqueda de nuevas fuentes alternativas para su obtención, provenientes de alimentos fermentados, de intestinos de animales y seres humanos.

Rodríguez-Álvarez (2008) realizó el aislamiento de 15 microorganismos de la taberna que resultaron con características propias de bacterias ácido lácticas. Un segundo estudio de la taberna consistió en utilizar el gen 16S rDNA para el análisis molecular del consorcio bacteriano durante la cinética de fermentación de la bebida, determinándose la presencia de los géneros *Zymomonas*, *Lactobacillus*, y *Acetobacter* (Alcántara et al. 2010). Alegría-Mundo (2012) mediante un análisis molecular evaluó la dinámica poblacional de bacterias ácido lácticas que participan en el proceso de fermentación natural de la savia de palma *Acrocomia aculeata* utilizada para elaborar taberna. Durante los primeros 5 días de fermentación de la taberna se logró el aislamiento de 35 BAL, posteriormente se realizó la identificación por secuenciación del gen rDNA, encontrando a *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. nagelli* y *L. sucicola*. González-Escobar (2013) realizó una evaluación in vitro del potencial probiótico de las BAL aisladas de la taberna, para seleccionarlas por su capacidad de crecimiento, supervivencia en condiciones gastrointestinales simuladas, capacidad de disociación de taurocolato de sodio, producción de ácido láctico, producción de exopolisacáridos, fermentación de azúcares y actividad antimicrobiana. Con base a los resultados obtenidos de este análisis las BAL podrían ser empleadas como probióticos; sin embargo; de acuerdo a la guía de evaluación de microorganismos probióticos, es necesario llevar a cabo análisis in vivo en modelos animales para comprobar su seguridad, efectividad y así finalmente comprobar los efectos benéficos en seres humanos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Microorganismo

La cepa BAL-03 fue proporcionada por la colección de cultivos del Laboratorio de Investigación del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

Identificación molecular mediante amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA

La extracción del ADN de la cepa BAL-03 se realizó utilizando el kit 'ZR Fungal/bacterial DNA MiniPrep' de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La amplificación de ADN se realizó con el protocolo de amplificación descrito por Rusznyák et al. (2008). Las secuencias obtenidas se visualizaron con el programa FinchTV Versión 1.4.0. Posteriormente, la secuencia se comparó con las secuencias de los organismos de referencias en la herramienta de alineamiento BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la base de datos NCBI (Altschul et al. 1990). Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa Seaview Version 4.2.6. y procesadas por el programa Sequin versión 13.05.

Prueba de toxicidad

El estudio de toxicidad se llevó a cabo empleando 32 ratones hembras BALB/c con 6 semanas de edad y un peso de 21 ± 2 g. Se conformaron 4 grupos, un grupo control alimentado con Teklad Global (2018 Rodent Diet) y 3 grupos de estudio. El primer grupo de estudio recibió una dosis aproximada de 108 UFC/mL/día; el segundo grupo, 109 UFC/mL/día y el tercer grupo 1010 UFC/mL/día de la cepa BAL-03; la dosis se administró diariamente durante 6 semanas. Se realizaron observaciones de los posibles cambios que pudieron presentar los animales; se registró el consumo de agua y alimento y peso corporal de los animales, del hígado y bazo.

Actividad hemolítica

Los ensayos de actividad hemolítica se llevaron a cabo tomando 2 μ L de cultivo en su fase exponencial los cuales se sembraron sobre placas de agar Columbia adicionadas con 5% de sangre de oveja.

Evaluación del efecto de bacteria ácido láctica sobre bacterias nativas de las heces fecales

El experimento se llevó a cabo usando 12 ratones hembras. Cada grupo estuvo conformado por 6 ratones, el grupo control y el grupo de estudio. El grupo control y el de estudio recibieron el alimento de consumo cotidiano (Teklad Global 2018S Diet Rodent) durante la fase experimental. El grupo de estudio recibió una dosis de la cepa BAL-03 de aproximadamente 109 UFC/mL/día durante 60 días. Durante este periodo de tiempo se recogieron muestras de heces fecales de los ratones a los 0, 15, 30 y 60 días después de realizar la administración del probiótico. Se realizaron diluciones seriadas y se llevó a cabo la siembra en agar Slanetz y Bartley y en agar bilis rojo violeta.

4. RESULTADOS

Identificación molecular mediante amplificación y secuenciación del gen 16S Rrna

La secuenciación del gen del 16S rRNA de la cepa BAL-03 fue realizada para confirmar la identidad de ésta. Las secuencias de genes obtenidas se introdujeron en el NCBI revelando valores altos de similitud a un número de secuencias en la base de datos del GenBank. La cepa BAL-03 fue identificada con un 99% de homología de secuencia de 16S rRNA con *Lactobacillus plantarum*.

Toxicidad

De los 32 animales empleados durante las 6 semanas de experimentación, no se encontró ningún animal muerto. En la Tabla 1 ninguna diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) fue observada en el peso corporal en el grupo control y los grupos de estudio durante las 6 semanas. La administración de diferentes dosis no afectó el peso corporal de las unidades experimentales deduciendo que el consumo de *Lactobacillus plantarum* no ocasiona diarrea o infección sistémica que contribuya a la pérdida de peso de los ratones.

Tabla 1. Peso corporal promedio de los ratones BABL/c.

Tratamiento	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Control	23.73±2.87 ^a	25.42±3.9 ^a
10 ⁸ UFC/mL/día	21.57±2.36 ^a	23.91±2.61 ^a
10 ⁹ UFC/mL/día	21.63±2.40 ^a	22.92±1.44 ^a
10 ¹⁰ UFC/mL/día	22.56±1.42 ^a	23.77±0.96 ^a

Los resultados se expresan como medias, ± es el error estándar de las medias, n=8. Las letras minúsculas iguales en la misma columna y fila indican que no hay diferencia significativa ($P>0.05$).

La administración oral de *Lactobacillus plantarum* no generó ningún efecto adverso sobre la ingesta de alimentos y agua, no encontrándose diferencia estadística significativa ($P>0.05$) en el consumo de agua y alimento entre el grupo control y los tratamientos a lo largo de las 6 semanas del experimento (**Figura 1**).

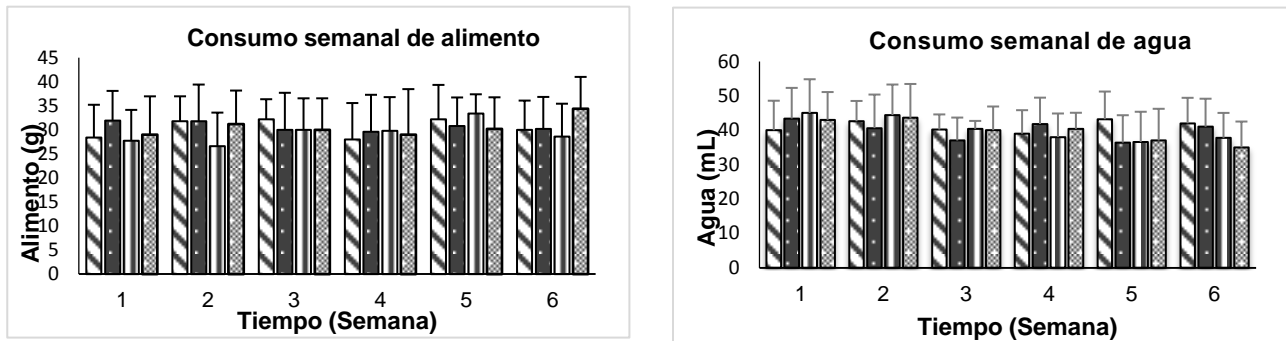


Figura 1. Consumo semanal de alimento y agua. Los resultados se expresan como medias, ± el error estándar de las medias, n=8 ($P>0.05$). ▨ Grupo control, ■ Dosis 10⁸ UFC/mL, ▤ Dosis 10⁹ UFC/mL, ▩ Dosis 10¹⁰ UFC/mL.

En cuanto a los pesos de los órganos, no hubo ninguna diferencia significativa ($P>0.05$), entre el grupo control y los tratamientos (**Tabla 2**). La evidencia de ningún cambio en los pesos del bazo e hígado en los ratones tratados indica que la cepa bacteriana no provoca o induce infecciones sistémicas en ratones experimentales.

Tabla 2. Peso promedio del bazo e hígado

Tratamiento	Bazo (g)	Hígado (g)
Control	0.132±0.02 ^a	1.57±0.37 ^a
10 ⁸ UFC/mL/día	0.141±0.05 ^a	1.39±0.21 ^a
10 ⁹ UFC/mL/día	0.150±0.02 ^a	1.34±0.27 ^a
10 ¹⁰ UFC/mL/día	0.164±0.03 ^a	1.52±0.31 ^a

Los resultados se expresan como medias, \pm es el error estándar de las medias, $n=8$ Letras minúsculas iguales en la misma columna indican que son significativamente iguales ($P>0.05$).

Actividad hemolítica

La siembra de *Lactobacillus plantarum* en agar sangre no demostró presencia de alfa y beta hemólisis como se muestra en la Figura 2.

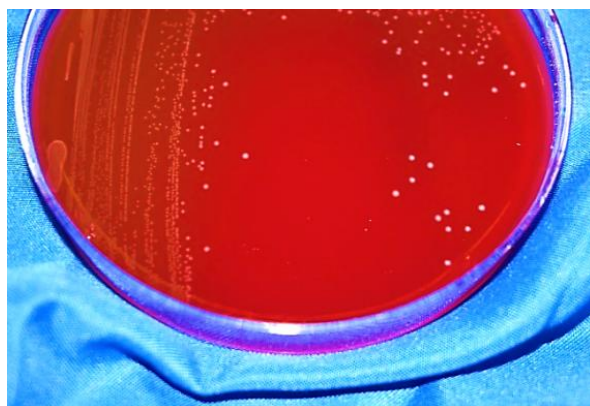


Figura 2. Ausencia de actividad hemolítica por *Lactobacillus plantarum*

Evaluación del efecto de *L. plantarum* sobre bacterias nativas de las heces fecales

Los niveles de coliformes y enterococos en las heces fecales durante los 0, 15, 30 y 60 días de administración de *Lactobacillus plantarum* no presentaron diferencia estadística significativa ($P>0.05$) con respecto a las cuantificadas en el grupo control, concluyendo que la bacteria ácido láctica (*Lactobacillus plantarum*) que se administró no provocó alteración en la microbiota nativa de los ratones empleados como modelos (Figura 3).

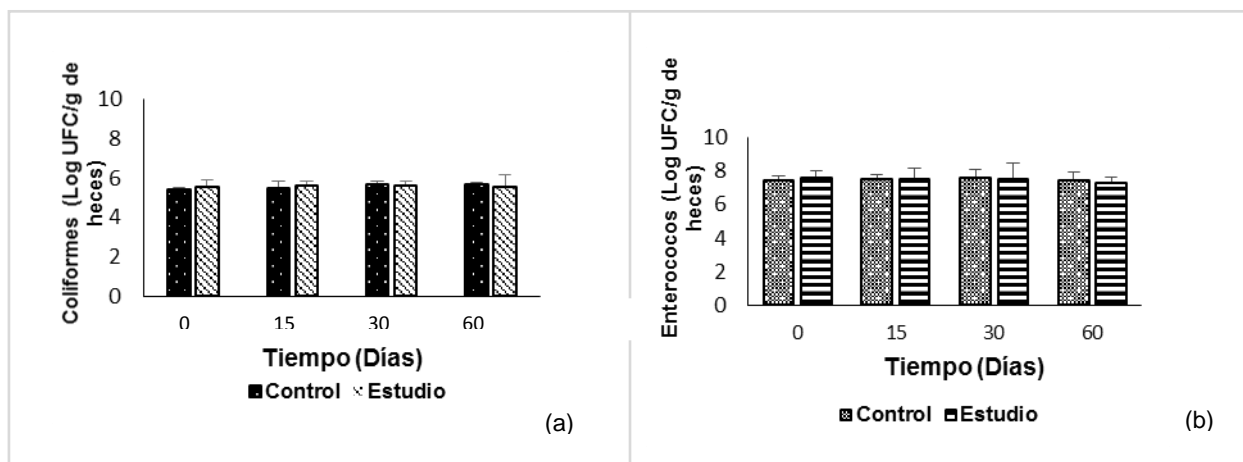


Figura 3. Cuenta viable de coliformes (a) y enterococos (b) en heces fecales. Los resultados se expresan como medias \pm el error estándar de las medias, $n=6$ ($P>0.05$)

5. CONCLUSIONES

La cepa BAL-03 aislada de la taberna, fue identificada mediante amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA, encontrando un 99% de identidad con *Lactobacillus plantarum*. *Lactobacillus plantarum* aislada de la taberna es una cepa segura y no causó efectos detrimentales en la salud del huésped, sin embargo se es necesario el desarrollo de más pruebas experimentales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alcántara-Hernández, R.J., Rodríguez-Álvarez, J.A., Valenzuela-Encinas, C., Gutiérrez-Miceli, F.A., Castañón-González, H., Marsch, R., Ayora-Talavera, T. & Dendooven, L. (2010). The bacterial community in 'taberna' a traditional beverage of Southern Mexico. *Journal of Applied Bacteriology*, 5, pp. 558-63.
2. Alegría-Mundo, H. (2012). Evaluación de la dinámica poblacional de levaduras, bacteria ácido lácticas y ácido acéticas durante la fermentación de la taberna. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.
3. Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E. & Lipman, D. (1990). Basic local alignment search tool. *The Journal of Molecular Biology*, 3 (215), pp. 403-410.
4. Castro, L. A. (2006). probióticos: utilidad clínica. *Colombia Médica*, 34(4), 308-314.
5. FAO/OMS. (2006). Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. *Informe de la Consulta de Expertos FAO/OMS*. Roma, pp. 1-46.
6. González-Escobar (2013). Evaluación *in vitro* del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de una bebida fermentada autóctona de Chiapas. Tesis Profesional para la maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

7. Rodríguez-Álvarez, JA. (2008). La taberna como Probiótico. Tesis Profesional para la licenciatura de Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.
8. Ruzsnyák, A., Vladár, P., Szabó, G., Márialigeti, K. & Borsodi, A. (2008). Phylogenetic and metabolic bacterial diversity of *Phragmites australis* periphyton communities in two Hungarian soda ponds. *Extremophiles*, 12, pp. 763–773.
9. Sanz, Y., Collado, MC. & Dalmáu, J. (2003). Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta Pediátrica Española*, 61 (9), pp. 476-481.

DETERMINACION DE INTERACCIONES MOLECULARES EN MEZCLAS DE BIOPOLIMERO DE CHIA – GELATINA MEDIANTE CALORIMETRIA DE BARRIDO DIFERENCIAL (DSC)

Dolores Gabriela Martínez Vázquez¹, Emmanuel Flores Huicochea², Ana Verónica Charles Rodríguez¹, Mario Alberto Cruz Hernandez¹, Armando Robledo Olivo¹

¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. ² Instituto Politecnico Nacional-Ceprobi

RESUMEN

Las interacciones moleculares son responsables de las propiedades específicas de las sustancias, debido a su fuerza de cohesión¹. La semilla de chía en medio acuoso, forma una cápsula gelatinosa debido a la presencia de un polisacárido en la superficie de la semilla; mientras que la gelatina es un polipéptido obtenida del colágeno². Se ha reportado que con la mezcla de biopolímeros se obtienen materiales con propiedades superiores a las que poseen de forma individual³.

Mediante DSC se analizaron las mezclas del biopolímero de la chía: gelatina en las siguientes proporciones: 75:25, 50:50, 25:75, a una concentración de biopolímero total del 1% y en presencia de iones Na⁺ (0, 5, 10, 25 y 50mM). Los termogramas indican que a mayor proporción del biopolímero de chía, se favorece el incremento de la temperatura de transición, siendo ésta 52°C y 48°C a 0 y 10mM Na⁺, respectivamente. Lo anterior es una medida indirecta de la interacción molecular entre biopolímeros.

1. INTRODUCCIÓN

Un biopolímero es una macromolécula biológica la cual está constituida por unidades repetidas, por ejemplo, en los polisacáridos las unidades repetidas son tretrasacáridos o disacáridos⁴. Estas especies químicas tienen alto peso molecular, gran tamaño y estructura predominantemente alargada; forman parte de las paredes celulares de células animales y vegetales⁵, además de cumplir diversas funciones en el organismo tales como: soporte estructural (celulosa), catalizadores y funciones informativas de características genéticas como lo son el ADN y RNA⁶. Algunos biopolímeros son solubles en agua, formando hidrocoloides, y éstos son ampliamente utilizados en la industria alimentaria debido a su capacidad de modificar la reología de los sistemas alimentarios, principalmente su comportamiento al flujo (viscosidad), así como sus características sólidas (textura).

La chía es una semilla que era cultivada y consumida por las civilizaciones precolombinas de América Central y México, alrededor del año 3500 A.C.; se utilizaba como ingrediente de pinturas corporales y decorativas. Los aztecas los utilizaban como alimento y también como ofrenda a sus dioses^{7,8}. La composición de la semilla de chía consiste de proteína (19-23%), carbohidratos (26-41%), fibra dietaria (18-30%), aceite (30-33%)⁹. La semilla de chía en medio acuoso, forma una cápsula gelatinosa, debido a la presencia de un polisacárido en la superficie de la semilla, que tiene propiedades de gel¹⁰. El polisacárido puede absorber varias veces su peso en agua¹¹.

La gelatina es una proteína estructural que constituye el 30% de las proteínas presentes en los animales, formada por una mezcla heterogénea de polipéptidos multiramificados y monoramificados¹². Las principales fuentes de gelatina para la industria alimentaria y

farmacéutica, son las pieles y huesos de origen bovino y porcino. La gelatina se obtiene cuando el colágeno es sometido a una hidrólisis generándose una estructura fibrosa, la cual es ideal en la elaboración de recubrimientos comestibles para evitar deterioros y lograr un aumento en la vida de anaquel de los productos alimenticios. Con este biopolímero se pueden obtener películas simples, bicapas y multicapas¹³.

En ocasiones cuando un biopolímero no cumple con los requerimientos necesarios para la elaboración de un recubrimiento comestible, resulta conveniente la elaboración de mezclas entre los biopolímeros. Lo anterior puede lograrse seleccionando biopolímeros con características específicas, y posteriormente mezclarlos para generar empaques con propiedades a la medida. Así mismo el rendimiento de algunas propiedades requeridas para los empaques de alimentos no se logran alcanzar únicamente con biopolímeros. En muchos casos, la mejor combinación de atributos en empaques se alcanzan usando la combinación de materiales. Es por ello que se han estudiado diversas técnicas para lograr la integración del biopolímero y de películas sintetizadas, esto mediante la integración de matrices la cual se refiere a la formación de una película conformada por dos o más materiales mezclados por homogenización¹⁴. En ocasiones la presencia de iones tales como Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ en biopolímeros con naturaleza polielectrolítica, pueden cambiar su viscosidad debido a que se modifica la rigidez molecular y el volumen molecular, haciendo pasar a los polielectrólitos como una molécula sin carga; y la adición de un exceso de iones puede transformar al polielectrólito en una molécula totalmente plegada (colapsada) o aún volverla insoluble. La versatilidad de los polielectrólitos presenta la posibilidad de interacciones moleculares, por lo que en esta investigación se analizaron mezclas del biopolímero de la chíá y la gelatina, determinando la temperatura de transición por Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC), permitiendo detectar esta condición al tener temperaturas de transición mayores a las que presentan las componentes puros.

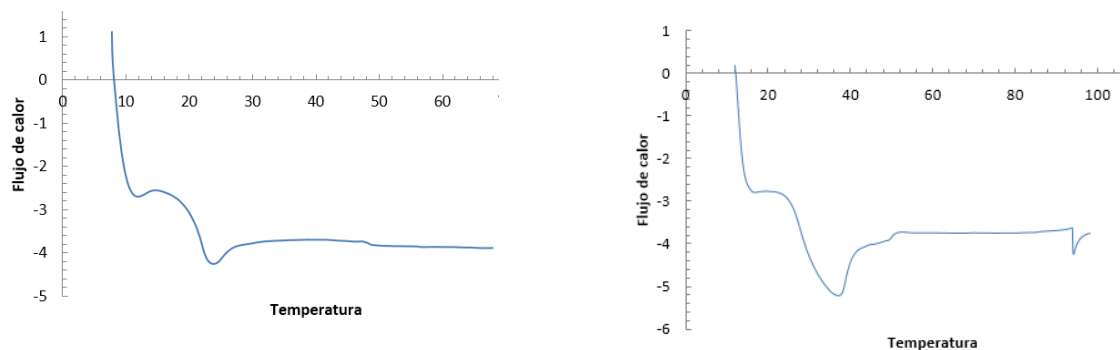
2. METODOLOGÍA

El biopolímero de la chíá se obtuvo mediante un proceso de liofilización reportado por Rodríguez Cruz¹⁵, el cual se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI) del Instituto Politécnico Nacional ubicado en Yautepec, Morelos. Se utilizó gelatina grado reactivo. Los análisis térmicos se realizaron con un calorímetro TA Instruments, USA, a una velocidad de calentamiento de 5°C/min, en un intervalo de temperatura de 10 a 70°C. Las mezclas de biopolímeros (chía:gelatina) se prepararon en tres proporciones 25:75, 50:50, 75:25, adicionando los siguientes niveles de iones de sodio: 0, 5, 10, 25 y 50 mM Na⁺. Las muestras se colocaron en las cápsulas del DSC y se dejaron reposar entre 9 – 13 horas antes de los barridos de temperatura para asegurar una adecuada hidratación. Los termogramas obtenidos se reportaron como la relación de Flujo de Calor (mW) vs Temperatura (°C).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra la temperatura de transición de los biopolímeros puros, para el caso de la gelatina este valor corresponde a 28°C, mientras que para el biopolímero de la chíá fue de 38°C este en presencia 50mM Na⁺.

Ambos biopolímeros son polielectrolitos, sin embargo la gelatina es de naturaleza catiónica, en tanto que el biopolímero de la chíá es de naturaleza aniónica. Por tal motivo la presencia del Na⁺ tuvo un efecto negativo en la temperatura de transición de la gelatina, debido a la repulsión de cargas; caso contrario a lo sucedido con el biopolímero de la chíá en donde existe una atracción de cargas requiriéndose niveles de hasta 25 mM Na⁺ para detectar temperatura de transición gel-sol. Lo anterior corresponde al comportamiento observado por Rodríguez Cruz¹⁵, quien reportó que el biopolímero de la chíá en presencia de Na⁺ en concentraciones mayores a 20mM se promueven interacciones biopolímero-biopolímero.



Gelatina 1.0% 0 mM Na+

Biopolímero de chíá con 50 mM Na+

Figura 1. Termogramas de biopolímeros puros

La Tabla 1, muestra la temperatura de transición de las mezclas del biopolímero de la chíá y la gelatina, así como de los biopolímeros puros. Las mezclas con valores de temperatura con subíndice “a”, se encuentran dentro del intervalo de temperatura de los biopolímeros puros, lo que es un indicativo de que la ausencia de interacción molecular. Mientras que las mezclas con valores de temperatura fuera del intervalo de los biopolímeros puros (28 - 38 °C) e inferiores al límite inferior (28 °C), presentan una interacción negativa de los biopolímeros (valores con subíndice “b”). Únicamente, se presenta interacción molecular positiva para las mezclas 75:25 (Chía : Gelatina) en presencia de 10mM de Na⁺, así como en ausencia de éste (valores con subíndice “c”) (Ver figura 2).

El biopolímero de chíá favorece la interacción molecular, en todos los casos se observa que la relación 75:25 presenta mayores temperaturas de transición que la relación 25:75.

Tabla 1. Valores de temperatura de transición de Chíá, Gelatina, Mezcla: Chíá: Gelatina a una concentración total de biopolímero de 1% en presencia de iones Na⁺

Concentración	Chía : Gelatina	mM Na ⁺				
		0	5	10	25	50
1%	25:75	30 ^a	20 ^b	24 ^b	42	30 ^a
	50:50	----	30 ^a	32 ^a	25 ^b	34 ^a
	75:25	52 ^c	35 ^a	48 ^c	35 ^a	35 ^a
1%	Chía	----	----	----	24	38
1%	Gelatina	28	---	----	----	----

^a Mezclas que no presentan interacción molecular

^b Mezclas que presentan interacción molecular negativa

^c Mezclas que presentan interacción molecular positiva

A pesar que las temperaturas marcadas con subíndice “a” se considera que no presentan interacción molecular, ya que se presentan dentro del intervalo de 28 - 38 °C, se considera adecuado realizar un análisis más detallado con otras técnicas como FT-IR o reología para determinar la presencia de interacciones moleculares de otra naturaleza.

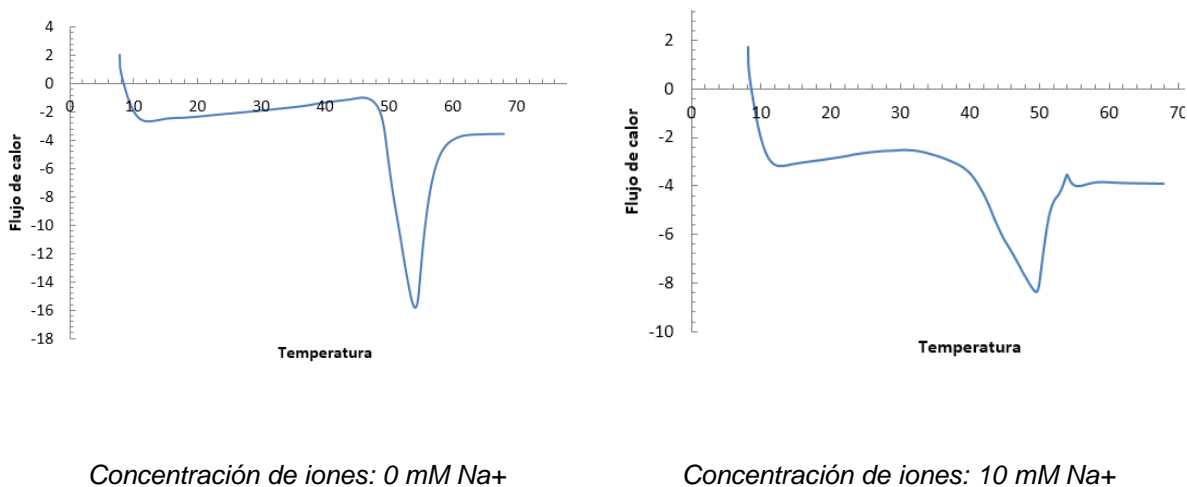


Figura 2. Termogramas de mezclas de biopolímeros en una relación 75:25 (Chía : Gelatina) a una concentración total del 1%

En las mezclas se observa que al mantener constante los niveles de iones e incrementar la relación chíá: grenetina, se incrementa la temperatura de transición en general. Cuando se mantiene la relación chíá: biopolímero constante e incrementar el contenido de iones, parece mostrar una tendencia a disminuir. Los cambios en la temperatura de transición se puede deber al efecto electrostático de los iones Na^+ , a bajas concentraciones los iones neutralizan las cargas que presenta el biopolímero de chíá, a medida que se incrementa la concentración de iones Na^+ saturan las cargas de las moléculas de biopolímero, un exceso adicional hace que se sobrecargue de iones Na^+ ejerciendo una repulsión entre ellas, lo que disminuye la interacción entre los biopolímeros, ésto se manifiesta como un decremento en la temperatura de transición. La temperatura de transición es una medida indirecta de la interacción molecular, a medida que la temperatura incrementa la interacción molecular es mayor.

4. CONCLUSIONES

Los iones Na^+ en la gelatina tiene el efecto de inhibir la presencia de temperatura de transición, mientras que en concentraciones mayores de 20mM Na^+ el biopolímero de chíá presenta interacciones biopolímero-biopolímero. El incremento en la relación chíá: grenetina favorece el aumento de la temperatura de transición. El incremento de la temperatura de transición es una medida indirecta de la interacción molecular de la mezcla de biopolímeros.

BIBLIOGRAFÍA

1. A.D.Paula & J.D. Paula "Química Física". Madrid España: Medica Panamericana, S.A. (2007)
2. H.S. Hentry, P.R. Mittleman and P.R. McCrohan, "Introducción de la Chía y la goma de tragacanto en USA" in *Avances en Cosechas Nuevas*, J. Janick and J.E. Simon, Eds., USA (1990), pp. 252-256
3. R.Cruz-Morfin, Martinez-Tenorio & A.Lopez-Malo, V. "Biopolímeros y su integración con polímeros convencionales como alternativas de empaques en alimentos". Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental Universidad de las Americas Puebla (2013)
4. K.Y. Lin, J.R. Daniel and R.L. Whistler "Structure of chia seed polysaccharide exude", *Carbohydrate Polymers*, vol. 23, pp. 13-18 (1994)
5. Ara, H. D. "The science and practice of pharmacy". New York: Remington. (2000)
6. Costa, J. "Diccionario Física Química" España: Diaz de Santos Ediciones.(2005)
7. R. Ayerza and W. Coates "Chia: rediscovering a forgotten crop of the Aztecs" *The University of Arizona*, vol. 1, pp. 111-120, 2005
8. A.A. Bushway, P.R. Belyea and R.J. Bushway "Chia Seed as a Source of Oil, Polysaccharide, and Protein" *Journal of Food Science*, vol. 46, pp.1349-1350, 1981
9. M. Marin Flores, Flavio de Jesús, J. Acevedo Mascarúa, M.D.S. Tamez Ramirez, j. Nevero Muñoz, Antonio L. Garay y Almada, Antonio, I.T.Y.D.E.S.D. Monterrey, et. Al., "Proceso de obtención del mucílago de Salvia Hispánica L.", México Patent (2008)
10. H. S. Hentry, P.R. Mittleman and P.R. McCrohan, "Introducción de la Chía y la goma de tragacanto en los Estados Unidos" en *Avances en Cosechas Nuevas*, J. Janick and J.E. Simon, Eds., ed Portland Ohio, USA: Prensa de la Madera, 1990, pp. 252-256.
11. M.P. Salgado Cruz, D. Cedillo López and M.C. Beltrán Orozco, "Estudio de las propiedades funcionales de la Semilla de Chía (Salvia hispánica) y de la Fibra Dietaria" *Memorias del VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y Tercer Foro de la Ciencia y Tecnología de Alimentos*, pp. 358-366 (2005)
12. Redondo, Y. P. *Simulación de Montecarlo de Sistemas Complejos en Red*. Santiago de Compostela.: Universidad Santiago de Compostela. (2007)
13. Garibay, M. G., Ramirez, R. Q., & Cortez, A. L.. *Biotecnología Alimentaria*. Mexico DF: Limusa. (1993)
14. R.Cruz-Morfin, Y.Martinez-Tenorio, & A.Lopez-Malo, V. *Biopolimeros y su integracion con polimeros convencionales como alternativas de empaques en alimentos*. Puebla: Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental Universidad de las Americas Puebla. (2013)
15. E. Rodríguez Cruz, J. Solorza Feria, C. Nuñez Santiago, R. Rendón Villalobos, E. Flores Huicochea "Efecto del ion Na⁺ en la viscosidad intrínseca del biopolímero de la chía (*Salvia hispánica L.*)" *Memorias del XXXV Encuentro Nacional de la AMIDIQ* ISBN 978-607-95593-2-8 (2014)

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE *Stevia rebaudiana* Bertoni CONTRA MICROORGANISMOS CARIOGÉNICOS

Viena Maria Cuevas Mancilla¹, Ivonne Pérez Xochipa ¹, Cristián Dionisio Román Méndez¹, Sandra Luz Cabrera Hilerio¹, Gabriel Ríos Cortés ², Minerva Rosas Morales³, Ada María Ríos Cortés³

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla¹, Instituto Tecnológico de Orizaba², Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional³.

RESUMEN

La caries dental es un padecimiento epidemiológico provocado por múltiples factores uno de ellos es la presencia de microorganismos, así como también la ingesta de azúcares que coadyuvan a su crecimiento. En México 9 de cada 10 personas la padecen, por lo que se siguen buscando alternativas que ayuden a la disminución o eliminación de estos microorganismos en la cavidad bucal. Una de las alternativas ha sido el empleo de compuestos naturales obtenidos de plantas tal es el caso de *Stevia rebaudiana* Bertoni, planta que se caracteriza por tener glucósidos de esteviol, los cuales son hasta 300 veces más dulce que el azúcar. Otra característica de *stevia* es que genera caries al no ser fermentado por las bacteria orales y se considera que puede tener propiedades antimicrobianas. Por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar si los métodos de extracción y los glucósidos de esteviol están implicados con el efecto antimicrobiano de *Stevia rebaudiana* Bertoni sobre cepas del género *Streptococcus mutans* GS5, *Streptococcus sobrinus* G715, *Lactobacillus rhamnosus* 9595, *Lactobacillus acidophilus* 314, *Lactobacillus fermentum* y *Candida albicans*, asociadas a la caries.

1. INTRODUCCIÓN

Stevia rebaudiana Bertoni (*stevia*) es una planta herbácea, que crece como arbusto salvaje en el suroeste de Brasil y Paraguay. Cobra un alto valor entre los vegetales nativos de estos países, debido a que contiene glucósidos de diterpeno, llamados comúnmente esteviósidos, cuyo poder edulcorante en estado puro y cristalino puede ser 300 veces mayor que el azúcar de caña (Hearn, 2008)

Stevia ha demostrado tener beneficios múltiples en la salud sistémica y recientemente en la salud oral (Contreras, 2013). Se ha informado que tiene efectos bactericidas sobre *Streptococcus mutans*, responsable de las caries dental al poseer propiedades antibacterianas (Satishkumar *et al.*, 2008).

La caries dental es considerada como una enfermedad localizada que resulta de los procesos metabólicos de la biomasa en contacto con la superficie dental; la dieta proporciona los requerimientos nutricionales y por lo tanto energéticos a los microorganismos de la microbiota bucal (Bascones *et al.*, 2001). *Lactobacillus acidophilus* y el *Streptococcus mutans* se encuentran en casi todas las lesiones de caries, y su proporción en la placa y la saliva está relacionada con el desarrollo de caries (Thylstrup *et al.*, 2000).

La prevención de la caries dental y la enfermedad periodontal se logra con una adecuada actuación sobre todos los factores que contribuyen a su formación, pero es necesario insistir en el cambio de actitud de la población con respecto al consumo de carbohidratos fermentables y el

mantenimiento de una correcta higiene bucal después de la ingestión de los alimentos (Sarabia *et al.*, 2005).

Considerando la importancia de encontrar contribuciones para disminuir el índice de esta enfermedad, esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto antimicrobiano de diferentes extractos de *Stevia rebaudiana* Bertoni sobre algunos microorganismos cariogénicos e identificar si existe alguna relación con los compuestos responsables del dulzor y su método de extracción.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal

Se utilizaron hojas de *Stevia rebaudiana* secas (humedad no mayor al 3%) de la variedad criolla, posteriormente fueron pulverizadas y tamizadas para obtener un tamaño de partícula uniforme (850 μm).

Extracción método convencional

Se realizó extracción con equipo Soxhlet utilizando 10 gramos de pulverizado de hoja el cual fue extraído con metanol y hexano por separado. Para el extracto metanólico se sometió a un método de clarificación con carbón activado (1 g de carbón por cada 50 ml de extracto), después un proceso de filtrado junto con enjuagues de metanol. Pon claves para cada tipo de extracción

Extracción método no convencional

Se utilizaron extractos de glucósidos obtenidos por métodos no convencionales:

- *Método enzimático*: Se pesaron 2.5 g de pulverizado de hoja en un matraz Erlenmeyer y se disolvieron con una mezcla con 12.5 ml de solución buffer de acetato de sodio (0.02 M, pH 5) con 25 ml de metanol. Por otra parte se realizó una mezcla de tres enzimas: celulasa, hemicelulasa y pectinasa. Se realizaron 4 extractos en un tiempo de 60 minutos, a diferentes concentraciones y a diferentes temperaturas, (0.5%/50°, 0.5%/55°, 0.3%/50° y 0.3%/55°).

- *Extracción por ultrasonido*: se utilizó 2.5 g de pulverizado de hoja el cual se disolvió con una mezcla de 12.5 ml de una solución buffer de acetato de sodio (0.02M y pH 5) y 25 ml de metanol. La mezcla se expuso a sonicación en un baño de ultrasonido de alta intensidad por 1 hora a temperatura ambiente. Para el otro extracto se utilizaron 5 g de pulverizado de hoja, 150 ml de agua posteriormente la muestra se expuso a sonicación en un baño de ultrasonido por 6 horas.

- *Extracción por método enzimático asistido por ultrasonido (EAU)*: En un matraz corazón se agrega metanol, solución buffer, 5 gramos de pulverizado de hojaya se agrega por último la concentración de enzima; se lleva el matraz a sonicar durante 6 horas y al terminar el tiempo se deja reposar el matraz para que se separen las fases sonicadas. La fase inferior se lleva a filtración a vacío ocupando un embudo buchner, un matraz kitasato y papel filtro.

Se le agregan 5 ml de metanol, la mezcla se lleva a concentrar en un matraz balón de 250 ml en el rotavapor, utilizando un baño maría a 70 °C hasta obtener la formación de cristales. Se realizaron 8 extractos en la tabla 1 se muestran las condiciones utilizadas.

Se realizaron 4 extractos con Celulasa y 2 con Hemicelulasa a diferentes concentraciones y con dos disolventes: agua y metanol.

Cuantificación por HPLC

La determinación de esteviósido y rebaudiósido "A" se realizó por el método analítico de HPLC con equipo HP 1100 (Módulo de separación DAD) y un sistema cuantificador (Agilent OpenLAB CDS

Chem Station 490 Micro GC Driver v1.9.0. Software). Se utilizó una columna LiChrospher® 100, 250-4 mm RP-18c (5 µm, Agilent) a 20°C. Las muestras (10 µL) fueron eluidas a un flujo de 0.7 mL/min, manteniendo la misma proporción de disolventes durante todo el proceso (fase móvil isocrática): agua (H₂O) y acetonitrilo (CH₃CN) relación 65:35 respectivamente. Los compuestos fueron detectados a 210 nm utilizando un detector de arreglo de diodos (DAD Agilent HP 1100 G1312A). Para la cuantificación de estevósido y rebaudiósido se construyeron curvas de calibración con soluciones estándar de 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/L en agua con los compuestos puros de Estevósido (TCI) Rebaudiósido A (TCI).

Actividad antimicrobiana

Para la determinación de la actividad antimicrobiana se utilizaron cepas: *Streptococcus mutans* GS5, *Streptococcus sobrinus* G715, *Lactobacillus rhamnosus* 9595, *Lactobacillus acidophilus* 314, *Lactobacillus fermentum* y *Candida albicans*. Se realizó de acuerdo al método de difusión en agar de Kirby-Bauer de acuerdo al NCCLS (Cavaleri *et al.*, 2005). Se utilizaron discos de papel filtro de 6mm de diámetro, los cuales fueron impregnados con 10 µl de dilución de los extractos a diferentes concentraciones: 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.13 mg/ml. Como controles positivos se utilizaron discos de ciprofloxacino (10 mg/ml) y clorhexidina al 10% (Marca consepsis) mientras que como control negativo se utilizaron discos de hexano, rebaudiósido "A" y estevósido estándar.

Se utilizaron placas Petri con agar MRS y BHI, las cuales fueron inoculadas con un hisopo estéril, utilizando una suspensión bacteriana ajustada a 0.5 del Nefelómetro de McFarlan de las cepas mencionadas se colocaron 6 discos por placa, posteriormente se incubaron por 24 horas en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, dependiendo la cepa, a 37°C. Se hizo la medición del diámetro de los halos de inhibición obtenidos, cada prueba se evaluó por triplicado.

3. RESULTADOS

Preparación de la materia prima

La pulverización de las hojas fue uniforme, encontrándose tamaños de partícula de 850 µm. No se encontraron cambios en la apariencia del polvo tales como oscurecimiento o humedecimiento.

Cuantificación de extractos

En el presente trabajo logró una separación adecuada de los estándares de estevósido y rebaudiósido, los cuales fueron eluidos a los tiempos de 5.194 min ± 0.036 y 4.915 min ± 0.044 respectivamente Figura 1.

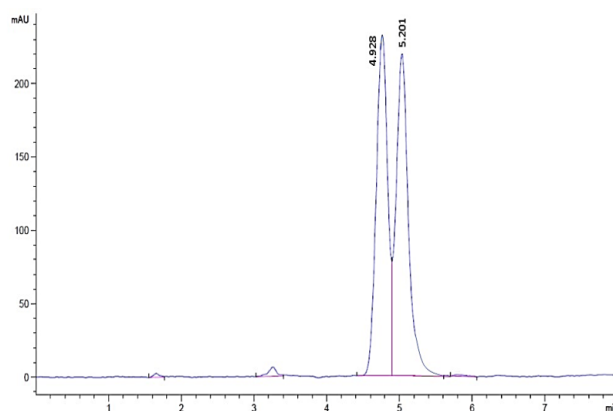


Figura 1. Cromatograma de la mezcla de estevósido (5.201 min) y de rebaudiósido A (4.928 min).

Método convencional

El extracto metanólico fue analizado por HPLC obteniendo 17.39 mg/g de steviósido y 56.72 mg/g de rebaudiósido “A”.

El extracto hexánico (Soxleth/Hexano) realizado no se sometió a la cuantificación ya que es un extracto oleoso el cual no posee los glucósidos de esteviol ya que estos se presentan en la fase polar (Afandi *et al*/2013).

Métodos no convencionales

El método de extracción enzimática (0.5% / 50°) obtuvo los mayores rendimientos, 77.68 mg/g de hoja para rebaudiósido “A”, y esteviósido 23.16 mg/g mientras que en la extracción enzimática asistida por ultrasonido (Hemicelulasa/ metanol/ 6%) se obtuvo una mayor concentración de los glucósidos de esteviol 41.90 mg/g de hoja, en la tabla 2 se muestran los resultados, de los métodos analizados en este estudio.

Tabla 1. Rendimiento de esteviósido y rebaudiósido “A” de los diferentes métodos analizados.

Método de extracción	Esteviósido (mg/g)	Rebaudiósido A (mg/g)
Soxleth/metanol	17.39	56.72
Enzima 0.5% / 50°	23.16	77.68
Enzima 0.5% / 55°C	21.68	72.2
Enzima 0.3% / 50°	21.63	72.36
Enzima 0.3% / 50°	20.56	71.56
Celulasa 10% /metanol	11.55	56.9
Celulasa 6%/ Agua	7.13	40.27
Hemicelulasa 6%/ Metanol	41.90	

El método de extracción ultrasónica presentó menores rendimientos de rebaudiósido “A” en comparación al método enzimático debido a la temperatura, según Liu *et al.*, (2010) también mencionan que la extracción de esteviósido y rebaudiósido “A” se ve favorecida al aumentar la temperatura, de forma que este factor tiene efecto importante en la extracción enzimática.

El método de extracción ultrasónica no se lograron obtener glucósidos según Liu *et al* (2013) mencionan que la extracción de esteviósido y rebaudiósido A se ve favorecida al aumentar la temperatura, de forma que este factor tiene efecto importante en la extracción, por lo que este factor pudo ser el que afectara los resultados.

Actividad antimicrobiana

En cuanto al análisis microbiológico los resultados de este estudio *in vitro* demuestran que los extractos polares en donde se encuentran los glucósidos de esteviol no poseen propiedades antimicrobianas. Mahammadi *et al* (2012), realizaron un trabajo en el que utilizaron extractos obtenidos por método soxhlet utilizando metanol y evaluaron el efecto inhibitorio sobre *Streptococcus mutans* a una concentración de 100 mg/ml, donde reportaron halos de inhibición de

21 mm también, Vitery *et al.*, (2010) al utilizar un extracto metanólico a una concentración de 400 mg/ml reportaron un efecto inhibitorio de 11.5 y 12 mm contra *Streptococcus mutans* y *L. acidophilus* respectivamente. Por lo que se cree que uno de los factores que pudo afectar los resultados fue el proceso de clarificación de los extractos (Soto *et al.*, 2002) en contraste con otros autores que no los someten a este proceso.

El extracto hexánico es el único que presenta actividad antimicrobiana, mostró efecto antimicrobiano significativo o similar a los controles positivos, el máximo halo de inhibición fue de 8mm en los extractos realizados por método EEAU contra *Streptococcus mutans* ATCC 3566, sin embargo este valor no es significativo, en comparación con los controles positivos. En la tabla 2 se muestran los promedios de los halos de inhibición de los extractos obtenidos por método Soxhlet en mm. El extracto metanólico no presentó actividad antimicrobiana, los 6mm que se muestran en la tabla corresponden al tamaño del disco.

Tabla 2. Efecto antimicrobiano de extractos obtenidos por método convencional (mm).

	<i>S. mutans</i> 3566	<i>S. sobrinus</i>	<i>L-</i> <i>Rhamnosus</i>	<i>L.</i> <i>acidophilus</i>	<i>L.</i> <i>fermentum</i>	<i>Candida</i> <i>albicans</i>
Clorhexidina	13.9±0.05	14±0.1	16.1±0.1	15.9±0.10	16±0.05	17.9±0.11
Ciprofloxacino	16±0.05	15.9±0.05	17.9±0.05	19.9±0.06	16±0.06	6
Extracto Metanólico	6	6	6	6	6	6
Extracto hexánico	11.03±0.05	11.06±0.05	13±0.10	12.9±0.05	14.9±0.01	15±0.05

Los valores de inhibición que se obtuvieron para *S. mutans* y *L. acidophilus* son menores a los reportados por Gamboa *et al.*, (2012) los cuales realizaron un extracto similar reportando halos de inhibición de 10 mm, 10.6 mm y 13.6 mm contra *S. mutans*, *S. sobrinus* y *L. acidophilus* respectivamente, a una concentración de 30 mg/ml.

El efecto inhibitorio que tuvo el extracto hexánico sobre *Candida albicans* fue de 15 mm, este efecto fue el mayor en comparación con los otros microorganismos. Sin embargo, no se han reportado publicaciones sobre actividad inhibitoria de *stevia* sobre esta levadura, pero presenta valores similares a los que exhibió nuestro control positivo (clorhexidina 17.9 mm). Este microorganismo no es causante de lesiones cariosas sin embargo, Schulz *et al.*, (2005) reporta que en hábitats orales de niños hay una mayor colonización por *C. albicans* en las lesiones con presencia de caries, reportando frecuencias hasta de 97%, también se ha encontrado la prevalencia de *C. albicans* particularmente en niños, adolescentes y adultos jóvenes (Gabris *et al.*, 1999). Klinkle *et al.*, (2010) realizan un estudio donde indujeron la colonización de *C. albicans* y *S. mutans* sobre ratas las cuales fueron alimentadas con una dieta que contenía 40% de diferentes azúcares, posteriormente evaluaron fisuras de caries y encontraron más lesiones en las ratas que se colonizaron con *C. albicans* y *S. mutans* que con las que se administraron solo con *S. mutans*, por lo que podría ser de gran utilidad el uso de *stevia* no solo para microorganismos principales que causan la caries si no también para levaduras como *Candida albicans* que contribuyen al desarrollo de esta enfermedad.

4. CONCLUSIONES

La extracción enzimática obtuvo el mayor rendimiento de rebaudiósido "A" (77.68 mg) al usar 0.5 % de la combinación de enzimas: celulasa, hemicelulasa y pectinasa.

La extracción enzimática asistida por ultrasonido (Hemicelulasa 6%/ metanol) se obtuvo una mayor concentración de esteviósido 41.90 mg/g de hoja.

Los extractos en donde se encuentran los glucósidos de esteviol no presentan actividad inhibitoria.

Los métodos de extracción de extracción no se relacionan con la actividad inhibitoria pero si con el rendimiento de esteviósido y rebaudiósido "A".

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Instituto Politécnico Nacional por el apoyo otorgado para realizar esta investigación.

Agradecemos al Instituto Tecnológico de Orizaba por las muestras proporcionadas.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Afandi, A., Sarijan S., Kumar-Shaha, R. (2013). Optimization of rebaudioside a extraction from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) and quantification by high performance liquid chromatography analysis. *Journal of Tropical Resources and Sustainable Science*, 1(1): 62-70.
2. Bascones A(2001). Tratado de odontología. Barcelona: Ediciones Avances. tomo 1: 682. 2. Thylstrup A, Fejersko V. Textbook of clinical cariology, Mundsgaard, Denmark; 94. 2ª ed. Copenhagen: Editorial Doyma. 2000; 56-57.
3. Bergs, D., Burghoff, B., Joehnck, M., Martin, G., Schembecker, G. (2012). Fast and isocratic HPLC-method for steviol glycosides analysis from *Stevia rebaudiana* leaves. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 7:147–154.
4. Cavalieri, J., (2005). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. 39-50.
5. Contreras, S. (2013). Anticariogenic properties and effects on periodontal structures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. 158-152.
6. Gamboa F., Chaves M., (2012) antimicrobial potential of extracts from stevia rebaudiana leaves against bacteria of importance in dental caries. *Acta odontol. Latinam*. Vol. 25 N° 2 171/175.
7. Gabris K, Nagy G, Madlena M, Denes Z, Marton S, Keszthelyi G, Banoczy J. (199). Associations between microbiological and salivary caries activity tests and caries experience in Hungarian adolescents. *Caries Res* 1999;33:191– 195.
8. Vitery, G., Escribano, S., Gamboa, F., Chavarria, N & Gómez, R. (2010). Actividad antimicrobiana sobre el *Lactobacillus acidophilus* y el *Streptococcus mutans*. *Revista Nal de Odontología*, 6, pp. 57-63.
9. Hearn, L. and Subedi. (2008). Determining levels of steviol glycosides in the leaves of *Stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy. *J. Food Comp. Anal.* 22(2), 165-168.
10. J. Liu, L. Jin-Wei, J. Tang. "Ultrasonically assisted extraction of total carbohydrates from *Stevia rebaudiana* Bertoni and identification of extracts, short communication". *Food and bioproducts processing*, 88, 2010, pp. 215–221.
11. Klinke, Guggenheim, Klimm, Thurnheer (2010). Dental Caries in Rats Associated with *Candida albicans*. *Caries research*. Vol. 45, No. 2: 2:6.

12. Mahammadi M., Karbasizadeh V., Aghai F and Reza M. (2012). Effect of different extracts of *Stevia rebaudiana* leaves on *Streptococcus mutans* growth. *Journal of medicinal plants, research* Vol 6(32), 4731- 4734.
13. Soto, A., Del Val, S. (2002). Extracción de los principios edulcorantes de la *Stevia rebaudiana*. *Revista de Ciencias Agrarias y Tecnología de los Alimentos*, 20
14. Sarabia, M., Gómez, M., García O. (2005). La dieta y su relación en la caries dental y la enfermedad periodontal. *Archivo medico de Camagüey*, vol 9, ním 1.
15. Sathishkumar, J., Muthu, S., Seethalakshmi, I. (2008). In-vitro Antimicrobial and Antitumor Activities of *Stevia Rebaudiana* (Asteraceae) Leaf Extracts. 1-7.
16. Schulz-Weidner N, Ansari F, Hossain H, Chakraborty E, Domann E, Wetzel WE: Vergleichende PCR-Typisierung von *Candida albicans* aus der Mundhöhle und dem Magen-Darm-Trakt. *Oralprophylaxe Kinderzahnheilkd* 2005;139–143.
17. Thylstrup A, Fejersko V. (2000). *Textbook of clinical cariology*, Mundsgaard, Denmark; 94. 2^a ed. Copenhagen: Editorial Doyma.; 56-57.

PRODUCCIÓN DE BUTANOL A PARTIR DE HIDROLIZADOS LIGNOCELULÓSICOS UTILIZANDO UN CULTIVO MIXTO DE *Clostridium acetobutylicum* Y *Bacillus subtilis*

Oliva R., Alejandra; Ríos G., Leopoldo; Sosa S., Gerardo

Universidad Autónoma de Coahuila

RESUMEN:

La importancia de realizar investigaciones sobre los procesos de producción de biocombustibles es innegable, específicamente sobre los combustibles de segunda generación, ya que provienen de biomasa que no compite con la industria alimenticia.

Recientemente, el butanol está siendo considerado como una opción competitiva y con mucho potencial como biocombustible debido a las ventajas que tiene sobre otros, incluido el etanol. El proceso de producción de butanol por fermentación utilizando *Clostridium sp.* presenta varios factores que incrementan el costo de producción, particularmente el costo de los sustratos y la necesidad de mantener las condiciones estrictamente anaerobias mediante la adición de agentes reductores costosos y el lavado con nitrógeno.

Por lo anterior, en este trabajo se estudia el uso de un cultivo mixto compuesto por *Clostridium acetobutylicum* y una bacteria aerobia: *Bacillus subtilis*, con la intención de que esta última utilice y, eventualmente, agote el oxígeno disponible durante su crecimiento para así desarrollar las condiciones de anaerobiosis necesarias para que *Clostridium* comience la fermentación, sin la necesidad de adicionar ningún agente reductor. Aunado a lo anterior, se utilizan hidrolizados lignocelulósicos con el objetivo de proporcionar un sustrato de bajo costo.

1. INTRODUCCIÓN

El siglo pasado se caracterizó a nivel mundial, entre otras cosas, por una sociedad con un modelo de desarrollo basado en el uso industrial de los recursos fósiles. Sin embargo, el principal inconveniente de este modelo es que estos recursos no son renovables, lo que, aunado a la problemática ambiental, económica y política relacionada, hace que se trate de un problema complejo. En la actualidad, la humanidad enfrenta el desafío de mantener los niveles de actividad, comodidad, seguridad y desarrollo mediante la producción sustentable de energía (1). Tomando en cuenta lo anterior resulta evidente la necesidad de la investigación enfocada a la búsqueda de nuevos procesos y nuevas fuentes de materia prima para la producción de combustibles renovables como una alternativa a los combustibles fósiles.

En este contexto, los biocombustibles están recibiendo cada vez mayor atención debido a su enorme potencial y sus múltiples beneficios. El potencial de la producción de biocombustibles se debe principalmente a que se puede considerar que producen energía con cero o casi cero emisión de gases de efecto invernadero, esto es por su capacidad de contrarrestarlos (2). En otras palabras, la biomasa es utilizada como materia prima para la producción del biocombustible y el CO₂ emitido durante el consumo de éste, se recicla al sintetizar más biomasa. De ahí que el uso del biocombustible actúe como un contrapeso que lleva a la reducción en la emisión de gases de efecto invernadero (3). Por otro lado, algunas de las ventajas de los biocombustibles son: (a) fácil obtención de fuentes abundantes de biomasa, (b) gran potencial ecológico, (c) beneficios para el

medio ambiente, la economía y los consumidores, (d) son biodegradables y contribuyen a la sustentabilidad (4).

Los biocombustibles comprenden una amplia gama de combustibles que son obtenidos principalmente a partir de biomasa, los cuales pueden ser sólidos como el carbón vegetal, líquidos como etanol, butanol y biodiesel, o gaseosos como biogás e hidrógeno (5). En lo particular, los biocombustibles líquidos se utilizan para alimentar vehículos, aunque también pueden usarse en motores o celdas para generar electricidad (4).

Se han investigado varios biocombustibles para su uso en vehículos de transporte, entre los principales se encuentran el biodiesel y los bioalcoholes. De estos últimos, el etanol se ha considerado como una alternativa para los motores de combustión básicamente por ser un combustible que puede obtenerse por fermentación alcohólica de fuentes renovables de biomasa. Sin embargo, el etanol presenta desventajas como su corrosividad, menor punto de ignición con respecto al diesel y mayor potencial de formación de vapor (6). Por ello, en años recientes el butanol, un alcohol más complejo, con mejores propiedades y que también puede obtenerse de fuentes renovables de biomasa por fermentación, está siendo considerado como una opción competitiva y con mayor potencial para su uso en el sector del transporte. (7) Entre algunas de las ventajas que presenta se encuentran: alto contenido de energía debido al mayor número de átomos de carbono, baja volatilidad, alto punto de ebullición, menor corrosividad y mayor facilidad de distribución debida, entre otras razones, a su menor explosividad (8). Lo anterior, aunado a su compatibilidad con los motores de combustión aumenta su potencial para usarse como un reemplazo total de la gasolina (9).

Dependiendo de la materia prima que se utilice, el biobutanol se clasifica como de primera, segunda o tercera generación (8). Para producir butanol de primera generación se utiliza caña de azúcar, semillas y granos de cereales, es decir, proviene de fuentes comestibles (2), por lo que provoca problemas que van desde el impacto negativo en la seguridad alimentaria hasta el incremento en los precios de los alimentos y las pérdidas netas de energía (10). Por otro lado, el butanol de segunda generación se obtiene a partir de biomasa lignocelulósica no comestible proveniente de desechos agrícolas o de plantas no comestibles, la cual presenta como ventaja principal que no compite con la industria alimenticia, además de un alto contenido de carbohidratos, renovabilidad, abundancia, bajo costo, entre otras (3). Finalmente, se ha clasificado como biobutanol de tercera generación al que utiliza algas como materia prima (8).

En México, el uso de biomasa como fuente de energía ha disminuido de 15.3% en 1965 a 5.3% en 2005 (11), por lo que la producción de biocombustibles se encuentra en las primeras etapas de investigación. Sin embargo, México cuenta con una ventaja significativa para su producción debido tiene un alto potencial de biomasa natural, ya que ocupa el tercer lugar en tierras de cultivo en Latinoamérica y el Caribe (12).

Existen varias razones para incrementar el uso de bioenergía en México, entre ellas su potencial de convertirse en una parte fundamental de un sistema de energía sostenible que contribuirá a la reducción de la emisión de gases de efecto invernadero, la generación de nuevos trabajos en las zonas rurales, así como la disminución de importaciones de energéticos (11). Tomando en cuenta lo anterior, surge la interrogante de si es viable producir biocombustibles a partir de hidrolizados lignocelulósicos como una alternativa para el abastecimiento de combustible en nuestro país.

Finalmente, es importante mencionar que el proceso de fermentación para producir butanol utilizando *Clostridium sp.* presenta varios factores que incrementan el costo de producción. En particular, el costo de los sustratos tiene una influencia dramática en el precio final del butanol (7), pues en ocasiones pueden representar hasta el 63% del costo total. Otro factor a considerar es la necesidad de mantener las condiciones estrictamente anaerobias que el microorganismo requiere mediante la adición de agentes reductores costosos y el lavado con nitrógeno (13).

Por lo anterior, en este trabajo se pretende estudiar el uso de un cultivo mixto compuesto por *Clostridium acetobutylicum* y una bacteria aerobia: *Bacillus subtilis*, con la intención de que esta última utilice y, eventualmente, agote el oxígeno disponible durante su crecimiento para así desarrollar las condiciones de anaerobiosis necesarias para que *Clostridium* comience la fermentación, sin la necesidad de adicionar ningún agente reductor. Aunado a lo anterior, se utilizarán hidrolizados lignocelulósicos con el objetivo de proporcionar un sustrato de bajo costo.

2. TEORÍA

Historia de la producción de butanol

La producción de butanol en una fermentación microbiana fue descubierta por el microbiólogo francés Louis Pasteur en 1861 (8). La producción de butanol a través de la fermentación acetona-butanol-etanol (ABE) comenzó entre 1912 y 1916 y es una de las fermentaciones industriales conocidas más antiguas (6). El proceso de fermentación a escala industrial se desarrolló durante la Primera Guerra Mundial impulsado por la demanda química y la escasez. Para 1950 cerca de dos tercios del abastecimiento de butanol a nivel mundial provenía de la fermentación. Sin embargo, debido al incremento de precio de los sustratos (principalmente melazas) y a la disponibilidad de petróleo crudo barato, el proceso de producción pasó de biotecnológico a petroquímico (14). En la Figura 1 se muestra la ruta de producción del butanol por la fermentación ABE. Como puede observarse hay 3 clases de productos principales durante la fermentación: (a) solventes (acetona, etanol y etanol); (b) ácidos orgánicos (ácido acético, láctico y butírico) y (c) gases (dióxido de carbono e hidrógeno) (6).

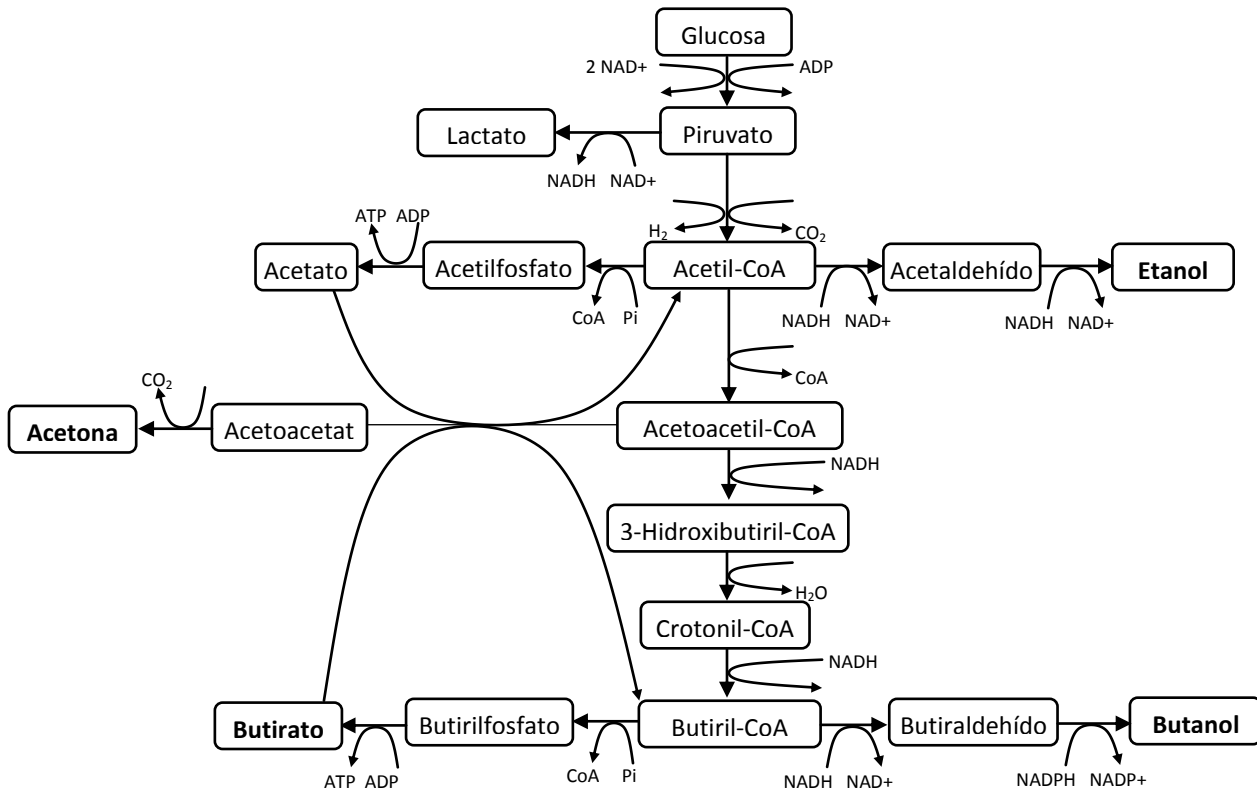


Figura 1. Ruta de fermentación del butanol por *C. acetobutylicum* (9) (11).

Microorganismos productores de butanol

El género Clostridia incluye una gran variedad de bacterias productoras de biobutanol, entre las que se incluyen *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. pasteurianum*, *C. sporogenes*, *C. saccaroperbutylaceticum*, *C. saccharoacetobutylicum*, *C. aurantibutyricum*, *C. cadaveris* y *C. tetanomorphum*. Específicamente *C. acetobutylicum*, *C. saccharoacetobutylicum*, *C. beijerinckii* y *C. saccaroperbutylaceticum* han presentado actividad significativa para la síntesis de butanol con los más altos rendimientos. *C. acetobutylicum* (bacteria formadora de esporas, con forma de bastón, anaerobia obligada y gram positiva) fue el primer microorganismo en ser usado en la fermentación industrial del azúcar y granos amiláceos para la producción de acetona y butanol durante la primera mitad del siglo pasado (3).

Recientemente, se sabe que, debido a su capacidad sacarolítica, las bacterias del género *Clostridium* pueden fermentar biomásas económicas para la producción de biobutanol de segunda generación, como los materiales lignocelulósicos (7). Sin embargo, es necesaria la hidrólisis ácida o enzimática de la biomasa lignocelulósica antes de que pueda ser usada como sustrato en la fermentación ABE. La biomasa lignocelulósica es la fuente renovable más abundante en nuestro planeta para la producción de biocombustibles. (15)

3. PARTE EXPERIMENTAL

Microorganismos

En este proyecto, se usará *Clostridium acetobutylicum* para la fermentación de butanol de de la Colección de Cultivos Microbianos del CINVESTAV-IPN. Para obtener las condiciones anaeróbicas necesarias para fermentación se empleará *Bacillus subtilis* perteneciente también a la colección antes mencionada.

Procedimiento

La parte experimental se llevará a cabo en 4 etapas principales. La primera comprende los ensayos para determinar las mejores condiciones de crecimiento de *Bacillus subtilis* en medio de cultivo estándar (13) y en matraces de 1 L en una incubadora con agitación New Brunswick Scientific. Posteriormente, se realizarán pruebas en un reactor de tanque agitado de 1 litro de capacidad Marca Applikon® (Schiedam, Netherlands) para evaluar el consumo de oxígeno disuelto. La segunda etapa comprende los ensayos de fermentación con *Clostridium acetobutylicum*, los cuales se llevará a cabo en medio estándar (13) en reactores de 120 ml bajo condiciones estrictamente anaeróbicas usando un agente reductor (0.75 g/L L-cisteína-HCl), inyectando nitrógeno para desplazar el oxígeno y sellando con tapones de goma y casquillos de metal y se evaluará la producción ABE (acetona-butanol-etanol). Los factores a estudiar en estas dos etapas serán: temperatura, pH, concentración de inóculo y velocidad de agitación, con 3 niveles cada uno utilizando un diseño ortogonal Taguchi (L9(3⁴)). La tercera etapa es estudiar la producción de butanol con el cultivo mixto de *Clostridium acetobutylicum* y *Bacillus subtilis* sin el uso del agente reductor. Finalmente, la cuarta etapa será evaluar el comportamiento del co-cultivo con hidrolizados lignocelulósicos.

4. CONCLUSIONES

El uso de *Bacillus subtilis* puede representar una alternativa viable para alcanzar y posteriormente mantener las condiciones estrictamente anaerobias que requiere el *Clostridium acetobutylicum* para llevar a cabo la fermentación ABE. Por otro lado, el uso de hidrolizados lignocelulósicos como sustrato, presenta la ventaja de que además de ser de bajo costo, provienen de biomasa no comestible, por lo que no compite con la industria alimenticia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Boudet, Alain Michel. "Editorial: A new era for lignocellulosics utilization through biotechnology", *C. R. Biologies*, vol. 334, 2011, pp.777–780.
2. Morone, Amruta; Pandey, R.A. "Lignocellulosic biobutanol production: Gridlocks and potential remedies", *Renew Sust Energy Rev*, vol. 37, 2014, pp. 21–35.
3. Kumar, Manish; Gayen, Kalyan. "Developments in biobutanol production: New insights", *Appl Energ*, vol. 88, 2011, pp. 1999–2012.
4. Demirbas, Ayhan. "Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections", *Energy Convers Manage*, vol. 49, 2008, pp. 2106–2116.
5. Demirbas, Ayhan. "Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review", *Appl Energ*, vol. 86, 2009, pp. S108–S117.
6. Jin, Chao; Yaoc, Mingfa; Liuc, Haifeng; Leed, Chia-fon F.; Ji, Jing. "Progress in the production and application of n-butanol as a biofuel", *Renew Sust Energy Rev*, vol. 15, 2011, pp. 4080–4106.
7. Ezeji, Thaddeus C.; Qureshi, Nasib; Blaschek, Hans P. "Bioproduction of butanol from biomass: from genes to reactors", *Curr Opin Biotechnol*, vol. 18, 2007, pp. 220-227.
8. Ndaba, B.; Chiyanzu, I.; Marx, S. "n-Butanol derived from biochemical and chemical routes: A review", *Biotechnol Rep*, vol. 8, 2015, pp. 1–9.
9. Jang, Yu-Sin; Malaviya, Alok; Cho, Changhee; Lee, Joungmin; Lee, Sang Yup. "Review: Butanol production from renewable biomass by *Clostridia*". *Bioresource Technol*, vol. 123, 2012, 653–663.
10. Martin, Marshall A. "First generation biofuels compete", *New biotechnol*, vol. 27, 2010, pp. 577–607.
11. Islas, Jorge; Manzinia, Fabio; Maser, Omar. "A prospective study of bioenergy use in Mexico", *Energy*, vol. 32, 2007, pp. 2306–2320.
12. Valdez-Vazquez, Idania; Acevedo-Benítez, Jorge A.; Hernaández-Santiago, Cuitlahuac. "Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in Mexico". *Renew Sust Energy Rev*, vol. 14, 2010, pp. 2147–2153
13. Abd-Alla, Mohamed H.; El-Enany, Abdel-Wahab E. "Production of acetone-butanol-ethanol from spoilage date palm fruits by mixed culture of *Clostridium acetobutylicum* and *Bacillus subtilis*". *Biomass Bioenerg*, vol. 42, 2012, 172-178.
14. Dürre, Peter. "Fermentative production of butanol: The academic perspective", *Curr Opin Biotechnol*, vol. 22, 2011, pp. 331–336.
15. Antoni, Dominik; Zverlov, Vladimir; Schwarz, Wolfgang. "Biofuels from microbes", *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 77, 2007, pp. 23–35.

EVALUACION SENSORIAL DE 12 VARIEDADES DE PIÑA (*Ananas comosus*)

Carmen A. Hernández 1y Laureano Rebolledo Martinez1

1 INIFAP- Campo Experimental Cotaxtla.

RESUMEN

Se realizaron evaluaciones sensoriales de 12 variedades de piña (*Ananas comosus*), La población muestra comprendió 33 personas de tres segmentos de edades 22 a 35, 40 a 55, 56 a 68 años respectivamente, el valor promedio de la edad es de 47 años, dos segmentos representaron 30.3 % de la muestra cada uno y uno el 39.4%, se considera entonces que la población muestra eran adultos y adultos mayores; a los cuales se les presentaron las variedades de piña Hawaii II, III y IV; Lybby; Champaka; MD-1 y 2; Criolla de Guerrero, Perola, Manzana, Kona y Cayena Lisa. La prueba consistió en evaluar la aceptación visual de los frutos de piña; posteriormente en recipientes individuales para cada juez y por cada variedad colocar trozos de piña picada; la evaluación recopiló la aceptación de color de la pulpa, aroma del fruto, sabor, dulzor, acidez, escalda o sobre madurez; así como una percepción global del producto degustado. Los resultados arrojaron visualmente el 39.5 % prefirió la MD-2, un 15.2% la Champaka y 12.1 % la Hawaii III. La percepción global de los frutos también coloca a la Champaka como la que más gusto en la degustación, esto abre la oportunidad para la introducción de nuevas variedades de acuerdo a la aceptación por el consumidor.

1. INTRODUCCIÓN

La piña es un cultivo de importancia en México, se encuentra en el séptimo lugar en producción a nivel mundial (Rebolledo et al, 2011), con 18,960 has cultivadas con un volumen de producción promedio de 817,462 ton de fruta fresca (SIAP, 2016). Las dos variedades que se siembran con MD-2 y Cayena Lisa, a nivel internacional únicamente la MD-2, es la de mayor demanda además de otras variedades. La piña por su exquisito sabor es uno de los frutales de mayor demanda y mejor posicionamiento en el mercado nacional donde es comercializado principalmente en fruta fresca y solamente el 4.3 % de la producción es exportado al mercado internacional. Del 95 % un 70 % se consume en fruta fresca y el resto es procesado en almibares, mermeladas, jugos y otros derivados de la industria.

La introducción de nuevas variedades de piña ha estado a cargo del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en colaboración con empresas privadas e instituciones hermanas de otros países que también destacan en la producción de este cultivo; de manera que el INIFAP, cuenta con un banco de germoplasma y accesiones de 32 variedades de piña. De las cuales durante el ciclo de producción 2015 fueron evaluados 12 materiales, entre un grupo muestra de 33 degustadores. La catación es la apreciación por la vista, gusto y olfato de las cualidades de un producto. Es someter este producto a nuestros sentidos para intentar conocerle y determinarle sus características organolépticas y saber apreciarlo, la degustación en cambio es degustar el producto quien lo bebe y saborea por simple placer, esto es lo que se acerca más al mercado común. En general la población no fácilmente distingue a las dos variedades de piña ofertadas en México, solo por el eslogan colocado a la MD-2 "piña miel",

argumentando su contenido de grados brix $\geq 13^\circ$ Brix mayor al de la Cayena Lisa $\leq 12^\circ$ Brix. Por lo que el mercado prefiere un fruto con mayor dulzor.

Para poner en el mercado nacional una variedad de piña diferente a las conocidas, decidimos partir a nivel experimental con una evaluación sensorial, este es uno de los métodos usados para la aceptación de un nuevo producto comestible; principalmente aspectos visuales, de sabor y olor; se escogen panelistas al azar que no tengan precisamente una experiencia sobre el producto a evaluar. En países latinoamericanos como Ecuador, Colombia y Costa Rica encontramos una producción más diversificada hacia las variedades Hawaiana, la Nacional, Champaca, Perola; sin embargo en esos países también existe un mercado consumidor adaptado y que reconoce esas variedades, a diferencia de México donde solo se produce Cayena Lisa y MD2.

2. TEORÍA

La evaluación sensorial trata de considerar principalmente las características organolépticas al calificar las propiedades de un producto según sean percibidos por los sentidos analizando el color, sabor y olor dentro de los principales, convirtiendo esto en un examen de los caracteres organolépticos de un producto mediante los sentidos este análisis nos permite dar una puntuación a lo que se está degustando. La puntuación es otorgada a parámetros como:

- Apariencia: generalmente se detecta a través de la vista que comprende el color, el brillo, la forma y puede dar una idea de textura.
- Gusto: El gusto se detecta en la cavidad oral, específicamente en la lengua, donde se perciben los cuatro sabores básicos.
- Aroma: El aroma se percibe por medio del olfato, que se encuentra en la cavidad nasal, donde existe una membrana provista de células nerviosas que detectan los aromas producidos por compuestos volátiles.

Algunas de las variedades de piña degustadas se describen a continuación:

La variedad “Champaca”, es un híbrido de cayena lisa que no posee espinas. La forma cilíndrica y el peso varía entre 1.3 y 2.5 kg. La pulpa es amarillenta, fibrosa y dulce.

La piña “perola” (perolera, tachirense, capachera, motilona, lébrija) se distingue por su corto periodo vegetativo y su alta calidad saborizante y aromatizante. Además, es una variedad resistente al manipuleo y transporte, características que le permiten ser la variedad de mayor distribución y consumo en el país (Sinuco *et.al.* 2015).

La variedad MD2, posee una forma cilíndrica y pesa entre 1.3 y 2.5 kg. La pulpa es de color amarillo y contiene altos niveles de azúcares ($15-17^\circ$ Brix) y vitamina C (Cazar, 2015)

3. PARTE EXPERIMENTAL

La evaluación se realizó a un grupo de 33 panelistas no entrenados los panelistas fueron personas adultas de tres grupos de edades 22 a 35, 40 a 55, 56 a 68 años respectivamente. Generalmente todos trabajadores y que aunque pueden o no ser los encargados de las compras de frutas en casa, si habían participado más de una vez en la selección del fruto de piña al momento de la compra. Los panelistas eran un 42.5% del sexo femenino y 57.5% masculino, generalmente de acuerdo con lo reportado se sugieren menos de 50 panelistas por ejercicio. La evaluación se realizó en un cuarto amplio en el que se colocaron las piñas enteras en una misma mesa para que el panelista la que el compraría si la viera en un punto de venta o en el supermercado, basado en su apreciación de la apariencia de los frutos; para después pasar a las muestras degustables colocadas en recipientes plásticos con trocitos de piña pelados de los 12 genotipos diferentes

Hawaii II, Hawaii III, Hawaii IV, Lybby, Champaka, MD-1, MD-, Criolla de Guerrero, Perola, Manzana, Kona y Cayena Lisa; estos se encontraban distribuidos alrededor del cuarto separándolos por variedad; de esta manera los tres degustadores que pasaban en cada bloque quedaban separados al iniciar la degustación. Las pruebas se realizaron en un lugar tranquilo, lejos de ruidos y olores extraños, con buena iluminación natural y se aseguró que los panelistas tomaran agua después de cada degustación. Las muestras de piña fueron tomadas de frutos en estado de madurez tono de trazas de verde en todo el fruto. Los degustadores expresaron su opinión en una ficha de características organolépticas, sensoriales que asignaba valores de 0 a 5, como calificación a el grado de dulzor de cada variedad, el grado de acidez, aroma y grado de color de la pulpa; así también una pregunta más al respecto gusto o no gusto el producto en cuanto a olor, sabor y color escala de 0 a 4 .

De las muestras para degustar se consideró:

- El color de cada muestra de pulpa debe ser uniforme y representativo de la variedad.
- El olor debe ser característico de la fruta sin olor extraño o a moho.
- El sabor debe ser agradable al paladar, no poseer sabores extraños, ni muy simples ni muy dulces normales.

4. RESULTADOS

El parámetro de madurez de las variedades fue color amarillo-naranja en la cáscara, con un promedio de °Brix, que se muestra en la siguiente cuadro:

Cuadro 1. °Brix por variedad en las muestras degustadas

Variedad	°Brix
Hawaii 2	14.0
Lybby	15.9
Champaka	17.1
Hawaii 4	15.0
MD-2	14.4
Criolla de Guerrero	16.2
Perola	15.9
Manzana	16.2
MD-1	12.9
Kona	12.6
Cayena	11.4
Hawaii 3	14.3

Preferencia visual externa, de acuerdo con los panelistas ellos observaron las piñas cortadas el mismo día, y de acuerdo a su tamaño de fruto, tamaño de corona, forma y color de la cascara ellos prefirieron la variedad MD2, que es actualmente en México la más comercial lo que nos indica que está muy posicionada entre el consumidor. La variedad que menos gusto para comprarla por su aspecto externo y las características señaladas fue la “perola”. Aunque a un porcentaje muy mínimo del consumidor mostro interés por otras variedades, fueron tomadas en cuenta “champaca”, “Hawaii III” y “Cayena”, esta última aunque ya no es la principal en el mercado lo fue por mucho tiempo anterior al año 1998.

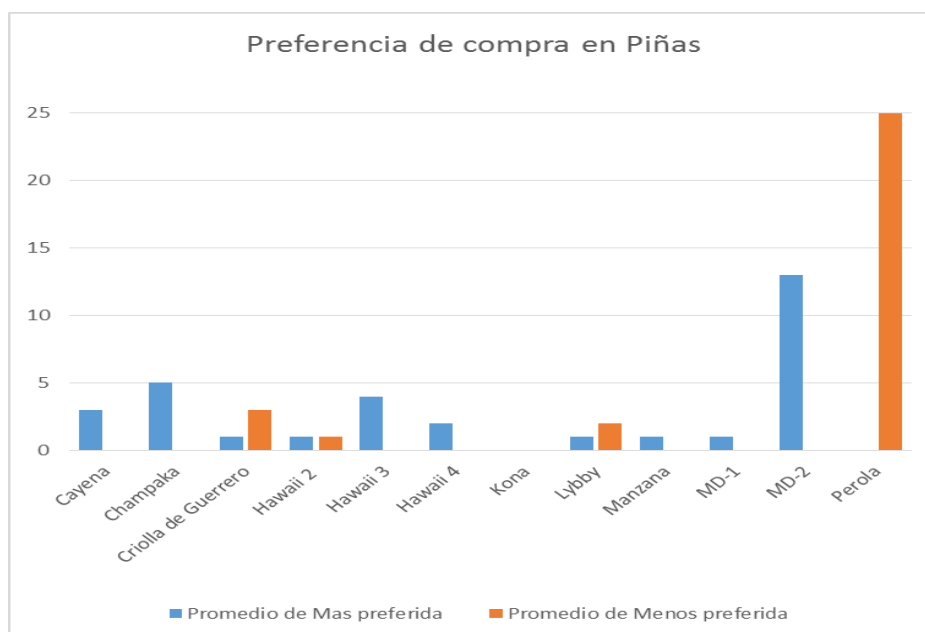


Figura 1. Preferencia de Piña (*Ananas comosus*) al momento de la compra.

Posteriormente del análisis de la preferencia interna y basada en la degustación, los parámetros de color de la pulpa, olor y sabor, se muestran en el cuadro 2.

Sin lugar a dudas la preferencia en el color de la pulpa le correspondió a la MD2, seguida de variedades como Hawaii III, Manzana y Cayena Lisa. El color se midió en 1= No me gusta, 2= Me gusta poco 3= Me gusta 4= Me gusta mucho

Cuadro 2. Comparación de medias por variedad, resultado de la degustación de 33 panelistas

Variedades		Gusto en Color	Gusto en sabor	Gusto en Olor
Hawaii II	Media	3.09	1.81	2.00
	N	33	32	33
	Desviación estándar	.879	1.148	1.118
Lybby	Media	3.21	1.36	2.36
	N	33	33	33
	Desviación estándar	.893	.859	1.194
Champaka	Media	2.97	1.36	2.27
	N	33	33	33
	Desviación estándar	.918	.742	1.232
Hawaii IV	Media	3.36	1.36	2.36
	N	33	33	33
	Desviación estándar	.822	.783	1.295
MD2	Media	3.85	1.91	2.67
	N	33	33	33
	Desviación estándar	.566	1.156	1.190

Criolla de Guerrero	Media	1.76	1.88	2.21
	N	33	33	33
	Desviación estándar	.936	1.166	1.111
Perola	Media	1.06	2.06	2.03
	N	33	33	33
	Desviación estándar	.348	1.171	1.212
Manzana	Media	3.36	1.30	2.30
	N	33	33	33
	Desviación estándar	.699	.684	1.104
MD1	Media	3.12	1.52	2.42
	N	33	33	33
	Desviación estándar	.820	.906	1.062
Cona	Media	1.91	1.22	2.22
	N	32	32	32
	Desviación estándar	.856	.608	1.039
Cayena	Media	3.28	1.66	2.53
	N	32	32	32
	Desviación estándar	.958	1.096	1.077
Hawaii III	Media	2.47	1.41	2.47
	N	32	32	32
	Desviación estándar	.803	.798	1.107
Total	Media	2.79	1.57	2.32
	N	393	392	393
	Desviación estándar	1.120	.973	1.147

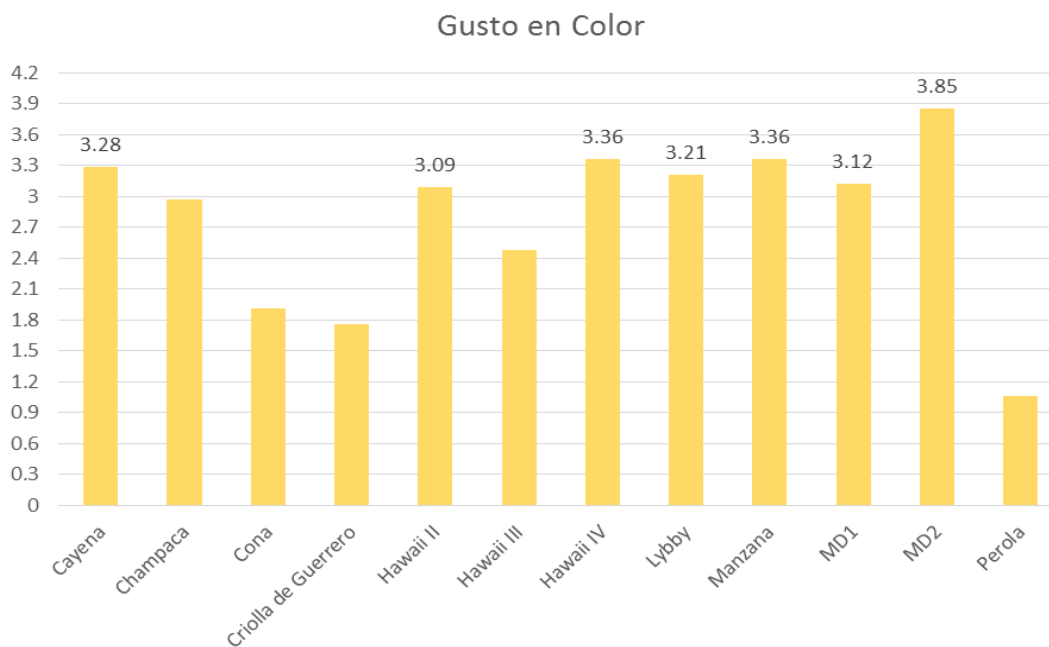


Figura 2. Calificaciones por variedad de el gusto en el color de la pulpa
El color se midió en 1= No me gusta, 2= Me gusta poco 3= Me gusta 4= Me gusta mucho

La preferencia en el sabor de las variedades fue totalmente opuesta a los datos muestran que las variedades que más figuraron fue “perola”.

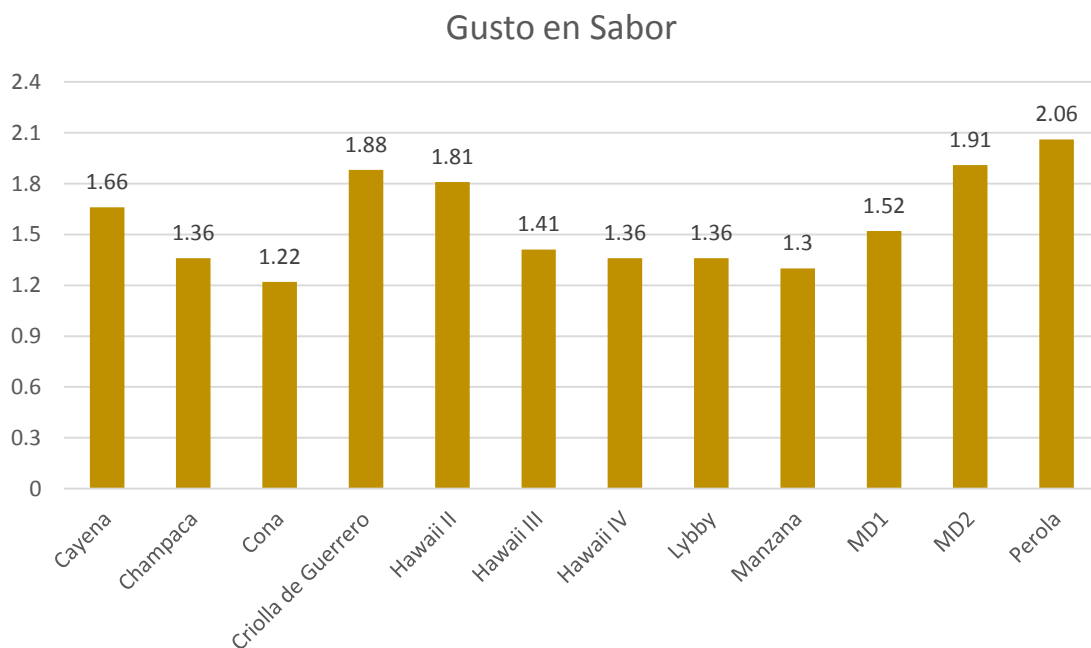


Figura 3. Calificaciones por variedad de el gusto en el sabor

Preferencia en Olor, para este parámetro destaco la variedad MD2, Cayena estas dos se han encontrado en el mercado mexicano desde siempre, pero destacan las variedades Hawaii III y IV.

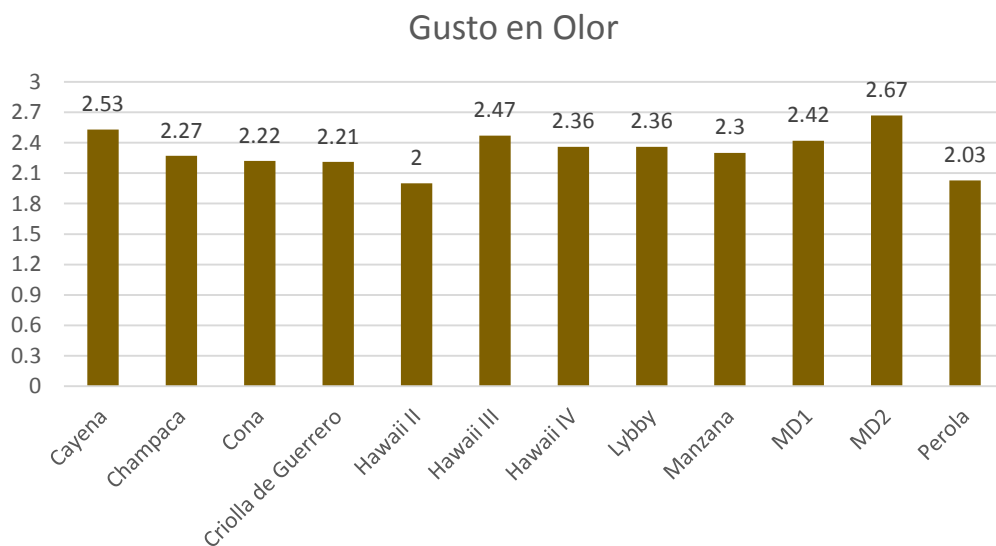


Figura 4. Calificaciones por variedad de el gusto en el Olor

Sin embargo se evaluó de forma global la variedad que más gusto, a los panelistas y de esta destacaba en calificación global la “Champaka”, la cual es una variedad que proviene de la Cayena lisa, a esto puede atribuírsele que el consumidor aunque podría aceptar otra variedad de piña, esta tiene que parecerse a las más posicionadas en el mercado.



Figura 5. Evaluación sobre la variedad que más gusto.

5. CONCLUSIONES

Aunque para cada atributo se pudo destacar la variedad MD2 en color y olor, queda reconocido que la variedad “perola” tiene valores de sabor mejor calificados y novedosos entre los degustantes; sin embargo esto solo deja ver que se requiere mejoramiento genético pues las características físicas de esta variedad desde su apariencia externa no gustan al consumidor, a diferencia de la variedad “champaka” la cual por familiaridad físicamente en su exterior como en el color de la pulpa y aroma es más preferida como variedad a introducir.

BIBLIOGRAFÍA

1. Anzaldúa M. A. 1994. La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y en la práctica. Ed. Acribia S.A. Zaragoza España.
2. Blanco S., E. Pacheco D. y N. Frágenas. 2006. Evaluación física y nutricional de un yogurt con frutas tropicales bajo en calorías. Revista Facultad de Agronomía. 32:131-144
3. Acevedo P. I., O. García. J. Contreras. e I. Acevedo. 2009. Revista UDO Agrícola 9(2):442-448.
4. Elguezabal L., P. Navarro y M. de Daly. 1996. Conservación de tres frutas (piña, parchita y tamarindo) a granel, por métodos combinados. Revista Facultad de Agronomía (LUZ). 13:627-639.

5. Gordillo S. C., N. Guerrero M. N., N. Izáziga L. B. Laguna P. M. Lázaro S. y J. C. Rojas N. 2012. Efecto de la proporción de naranja (*Citrus sinensis*) papaya (*Carica papaya*) y piña (*Ananas comosus*) en la aceptabilidad sensorial de un néctar mixto. *Agroindustrial Science* 2:132-138
6. Ortiz, G. R.A., D. C. Zaldúa G. y M. Tulio M. 2011. Producción y comercialización de mermelada de fruta tropical (maracuyá). Escuela Superior Politécnica de Guayaquil, Ecuador. 8 pag.
7. Saucedo A. S. G., L.E. Ramos G. E. Varas G. y F. Carmigniani C. 2008. Propagación clonal *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merr) variedades Champaka y Hawaiana. *Ciencia y Tecnología* 1:49-54
8. Sinuco, D.C., Morales A.L, y Duque C. 2004. Componentes volátiles libres y glicosídicamente enlazados del aroma de pila (*Ananas Comosus* L.) variedad perolera. *Rev. Colombiana de Química*. 33(1) 47-56.

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA GEOMETRÍA DE NANOPARTÍCULAS DE CARBONO SOBRE EL MECANISMO DE CONDUCTIVIDAD TÉRMICA EN SISTEMAS COMPUESTOS A BASE DE POLIETILENO

E. Carrillo-Zuñiga¹, A.B. Espinoza-Martínez¹, L.F. Ramos-DeValle¹.

¹Departamento de Procesos de Transformación, Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), Enrique Reyna No. 140, Col. San José de los Cerritos, Saltillo.COAH, México. C.P. 25294.

RESUMEN

En la actualidad y desde hace tiempo los sistemas computacionales han generado grandes cantidades de calor el cual, para evitar un mal procesamiento de datos, debe ser extraído por disipadores de calor los cuales, están hechos de materiales altamente conductivos como el aluminio y el cobre. El desarrollo actual de la nanotecnología ha abierto la puerta para éstas aplicaciones a los materiales nanocompuestos, sin embargo, hasta ahora no existe un entendimiento real sobre el cómo se desarrolla el mecanismo de transferencia de calor para sistemas heterogéneos. Son muchos los modelos matemáticos que se han propuesto para predecir la conductividad térmica efectiva, pero pocos los que relacionan la morfología (forma, tamaño, área superficial).

Con el propósito de aumentar la conductividad térmica del polietileno de alta densidad ($\lambda=0.3$ W/mK) y observar el efecto anteriormente mencionado se agregaron 3 tipos de cargas alotrópicas del carbono: Negro de humo (esferas), Nanotubos de carbono de pared múltiple (cilindros) y Grafeno (láminas) las cuales fueron previamente caracterizadas por microscopía electrónica de barrido (SEM).

Se encontró que los nanotubos de carbono de pared múltiple tienen un mejor desempeño para incrementar la conductividad térmica del sistema, debido a su capacidad de generar “cadenas conductoras” según los resultados del calorímetro diferencial de barrido modulado (MDSC). Otros estudios realizados fueron los de dispersión y cristalinidad obtenidos en el microscopio óptico y por la técnica de rayos X a ángulos amplios (WAXD) respectivamente. A partir de ésta información se realizaron cálculos en modelos de predicción de conductividad térmica existentes y no se observó el ajuste de ninguno de éstos con los datos experimentales posiblemente debido a que ninguno de ellos considera el tamaño nanométrico de las partículas.

1. INTRODUCCIÓN

La obtención de nanocompuestos es una de las ramas de mayor actividad actualmente debido a sus propiedades mecánicas, electrónicas, térmicas y químicas únicas, los nanotubos de carbono (CNT), las nanofibras de carbono (CNF), el grafito, el grafeno [1] y el negro de humo son los que han atraído más la atención [2]. Las partículas a base de carbón ofrecen el beneficio de baja densidad y costo comparado con sustancias metálicas usadas también como cargas. Tienen la ventaja de ser inertes y compatibles con la mayoría, si no es que todos los sistemas poliméricos [3]

Al adicionar cargas conductoras a una matriz polimérica se tiene la expectativa de que ésta incremente su capacidad de transferencia de calor convirtiendo al nano compuesto en un

candidato ideal para dispositivos de eficiente disipación de calor con una conductividad igual o mayor a $1 \text{ W} \cdot (\text{m} \cdot \text{K})^{-1}$ [4].

Debido a la naturaleza multi-fase de los compuestos poliméricos, resulta difícil la predicción precisa de la conductividad térmica efectiva con los modelos tradicionales que involucran variables tales como: la fracción volumen de cada uno de los componentes, algunos parámetros físicos e incluso, coeficientes estimados para cada sistema [5] [6] [7]. En consecuencia se deben buscar nuevos métodos para predecir la conductividad térmica de compuestos poliméricos en base a los recientes trabajos en donde se propone que la aportación de las cargas (fillers) es debida a las cadenas conductoras de calor [8] [9].

2. PARTE EXPERIMENTAL

Materiales

Para este trabajo se emplearon las siguientes nanopartículas derivadas del carbono: Para el caso de las nanopartículas de geometría laminar se empleó grafeno HD Plas™ de Cheap Tubes Inc. con un diámetro promedio de 1- 2 μm , una superficie > 700 m^2/g y pureza > 99 % en peso, por otra parte, para la correspondiente geometría cilíndrica se emplearon nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT, por sus siglas en inglés) comprados a Alpha Nano Tech Co. Con un diámetro de 30 a 50 nm y longitud de 5-15 μm y por último, para el caso de las nanopartículas de geometría esférica se utilizó negro de humo VULCAN® XC72 proporcionado por el proveedor Cabot Co. El cual tiene alrededor de 150 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ área superficial BET y densidad de 264 kg/m^3 . Para las mezclas HDPE/NPC se utilizó una resina de HDPE grado comercial PETROTHENE LR 590005 de LyondellBasell Industries con índice de fluidez (MFI) (190°C, 2.16 kg)=0.80 g/10 min y densidad=0.948 g/cm^3 .

Preparación de la muestra

Para la obtención de los nanocompuestos mediante mezclado en fundido, se utilizó una cámara de mezclado interno marca Brabender® con rotores Roller que permiten grandes esfuerzos de corte (cizalla) para lograr homogeneidad y dispersión en las mezclas. Se realizaron 3 conjuntos de mezclas a diferentes concentraciones, desde 0.1 hasta 0.5 con intervalos de 0.1 siendo 3 los tipos de nanopartículas utilizadas: nano láminas de grafeno, nano tubos de carbono de pared múltiple y negro de humo.

Para iniciar la preparación de las muestras las nanopartículas y la resina fueron pesadas y secadas durante 24 horas en una estufa a 100°C; Posteriormente, el mezclador fue alimentado por la resina y nanopartículas a la temperatura de 200°C a 60 RPM hasta la estabilización del torque (aproximadamente por 10 min) para finalizar con la molienda del material en un molino de bolas.

Técnicas de caracterización

Con el fin de estandarizar los resultados para cada una de las muestras con diferente concentración y con diferente tipo de nanopartículas y obtener un mismo historial termo-mecánico, los nanocompuestos obtenidos a partir del mezclado en fundido fueron llevados a un proceso de moldeo por compresión para la elaboración de placas. La metodología es la siguiente: se realiza un precalentamiento de los moldes e insertos (dimensiones: 10x10 mm de longitud y 2mm de espesor) a la temperatura de 180°C con prensado del material durante 5 min. Posteriormente, el molde se enfría a temperatura ambiente, bajo una presión de 16 toneladas por 12-15 min.

Con el propósito de obtener el tamaño y observar la forma de las nanopartículas, se realizó un estudio por medio del SEM JCM-6000 Plus para cada uno de los polvos anteriormente mencionados.

El estudio de las interacciones de la matriz con los diferentes tipos de nanopartículas así como la medición de aglomerados se llevó a cabo por medio de la técnica de microscopía óptica. Para cada una de las muestras obtenidas a partir del mezclado en fundido se adquirieron micrografías en 100 magnificaciones con la finalidad de observar y realizar un análisis cuantitativo de la dispersión y distribución de las partículas. Con la ayuda de un micrótopo Microm HM505N las muestras fueron cortadas a temperatura ambiente para posteriormente ser analizadas en un microscopio óptico Olympus BX-60.

Por medio de la técnica de difracción de rayos x en ángulos amplios (WAXD) se pudo determinar la estructura cristalina así como las mediciones de la cristalinidad de las muestras HDPE/Nanopartículas de carbono, Para esto se utilizó un difractómetro de rayos-X Siemens modelo D5000 operado en modo reflexión. El rango de análisis fue de 10-30° utilizando una velocidad de barrido de 0.06°/min.

Las mediciones de conductividad térmica de los nanocompuestos poliméricos se llevaron a cabo mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido modulada, desarrollada por TA Instruments, y apegados a la norma ASTM E1952-06 [10].

3. RESULTADOS

La obtención de nanocompuestos poliméricos con una mayor conductividad térmica en comparación a la resina primaria, así como el estudio del efecto de la geometría en el mecanismo de conductividad térmica para los sistemas HDPE /Nano partículas de carbono, son el tema principal en esta investigación, por lo cual, en la siguiente sección se presentan y discuten los resultados obtenidos.

La determinación de conductividades y difusividades térmicas para cada uno de los nanocompuestos se llevó a cabo siguiendo la norma ASTM E1952-06 por medio de la técnica de MDSC, los resultados se muestran en la figura 1

Tabla 2 Conductividades y difusividades térmicas para cada uno de los nanocompuestos

Muestra	λ (W/mK)	α (mm ² /s)
HDPE-resina	0.24417	0.17827
HDPE-MWCNT-0.1%	0.40261	0.27657
HDPE-MWCNT-0.2%	0.47253	0.33376
HDPE-MWCNT-0.3%	0.43614	0.29008
HDPE-MWCNT-0.4%	0.47128	0.33784
HDPE-MWCNT-0.5%	0.50166	0.34847
HDPE-G-0.1%	0.32570	0.23172
HDPE-G-0.2%	0.27489	0.12572
HDPE-G-0.3%	0.27837	0.17366
HDPE-G-0.4%	0.30430	0.11822
HDPE-G-0.5%	0.29305	0.17797
HDPE-CB-0.1%	0.33639	0.18760
HDPE-CB-0.2%	0.17576	0.11390
HDPE-CB-0.3%	0.24851	0.17430
HDPE-CB-0.4%	0.26932	0.17771
HDPE-CB-0.5%	0.25426	0.15850

Como puede observarse, la resina de polietileno de alta densidad presenta una conductividad térmica de 0.244 W/m·K. La muestra que presento la más alta de las conductividades y difusividades térmicas fue la de mayor concentración de nanotubos de carbono, etiquetada como HDPE-MWCNT-0.5%, por el contrario la muestra etiquetada como HDPE-CB-0.2% fue la que menor conductividad mostró, inclusive está por debajo de la de la resina sin contenido alguno de nanopartículas, lo cual puede deberse a un efecto contrario en la aportación de conductividad térmica.

Si se toma en cuenta que en este trabajo se manejaron concentraciones bajas, el aumento de conductividad térmica en el sistema HDPE/MWCNT resulta interesante para todas las concentraciones.

Como se señaló con anterioridad, el papel de la geometría de las nanopartículas es muy importante en el fenómeno de la transferencia de calor, los nanotubos de carbono tienen una alta probabilidad de conducir el calor por su facilidad de formar cadenas conductivas debido a su longitud [11] en comparación al negro de humo y al grafeno.

Evaluación de modelos teóricos semi-empíricos

Se realizaron cálculos para 2 de las 3 mezclas obtenidas (HDPE/MWCNT y HDPE/Grafeno) con el objetivo de observar si alguna de las conductividades calculadas se ajusta con los datos experimentales obtenidos

Tabla 3 cálculo de conductividad térmica en modelos teóricos y semi-empíricos. Todos los valores referentes a conductividad térmica están en W/mK.

%Volumen	Maxwell		Bruggeman		Nielsen		Agari		Datos experimentales	
	Grafeno	MWCNT	Grafeno	MWCNT	Grafeno	MWCNT	Grafeno	MWCNT	Grafeno	MWCNT
0	0.2440	0.2442	0.2440	0.2442	0.2440	0.2442	0.2440	0.2442	0.2441	
0.1	0.2447	0.2449	0.2447	0.2449	0.2446	0.2447	0.2459	0.2464	0.3257	0.40261
0.2	0.2455	0.2457	0.2455	0.2457	0.2452	0.2451	0.2479	0.2487	0.27489	0.47253
0.3	0.2462	0.2464	0.2462	0.2464	0.2458	0.2456	0.2498	0.2509	0.27837	0.43614
0.4	0.2469	0.2471	0.2469	0.2471	0.2465	0.2461	0.2518	0.2532	0.3043	0.47128
0.5	0.2477	0.2479	0.2476	0.2479	0.2471	0.2465	0.2538	0.2555	0.29305	0.50166

Como se observa en la tabla 2, los datos calculados no se asemejan a los datos experimentales; Los modelos semi-empíricos de Maxwell, Bruggeman y Nielsen, no toman en cuenta la geometría ni el tamaño de las partículas utilizadas como filler, de hecho, las diferencias entre los resultados de dichos modelos solo se observan más allá del cuarto decimal. Por el contrario, el modelo de Agari se caracteriza por la introducción de 2 parámetros relacionados con la estructura cristalina del polímero así como la facilidad que tienen las partículas de formar cadenas conductivas entre sí. Estos parámetros fueron obtenidos a partir de la literatura [12].

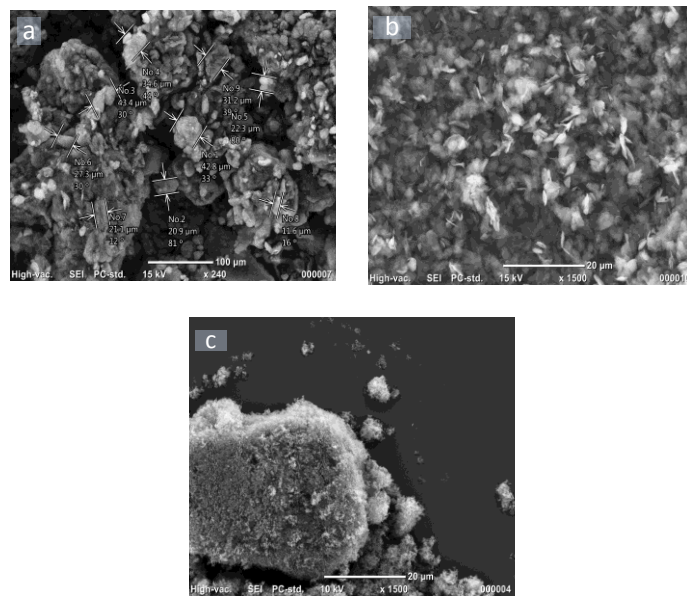


Figura 3 micrografías para nanopartículas de carbono. (a) MWCNT, (b) Grafeno (c) negro de humo

Utilizando la técnica de microscopía electrónica de barrido, todas las nanopartículas fueron caracterizadas antes de ser mezcladas y procesadas para de esta manera, observar el tamaño, forma y las aglomeraciones presentes en los polvos. En la Figura 1 se muestran las micrografías obtenidas.

Para el estudio de la dispersión y el conteo de aglomerados, éste trabajo se basó en los resultados de Kasaliwal [13] en donde, a partir de un análisis de imagen se obtiene cuantitativamente el número de aglomerados para posteriormente mediante una relación del tamaño de la partícula y el área total obtener la densidad de partícula. En la Figura 2 se muestran las micrografía obtenidas por medio de microscopía óptica (OM, por sus siglas en inglés) para la muestras de HDPE/NPC que corresponden a la menor concentración de nanopartículas a partir de las cuales, y mediante un software de análisis y procesamiento de imágenes, siguiendo la norma ASTM D5596-03 [14] se obtuvo un conteo de la dispersión para cada uno de los compuestos. De acuerdo a las imágenes obtenidas es claro observar un aumento en el tamaño y número de aglomerados directamente proporcional al aumento en la concentración de nanopartículas. Como resultado del conteo estadístico de la dispersión y tamaño de partícula, los nanocompuestos formados a partir de nanotubos de carbono son los que más aglomerados presentan en comparación a los demás.

Ésta técnica no permite la visualización de agregados por debajo de 1 μm , pero concede la oportunidad de apreciar la facilidad que tienen las nanopartículas para la formación de cadenas conductoras. Un compuesto formado por fillers con mayor afinidad formará aglomerados lo que significará que las partículas tienen contacto entre sí, es decir, forman cadenas o caminos de conducción térmica. [15]

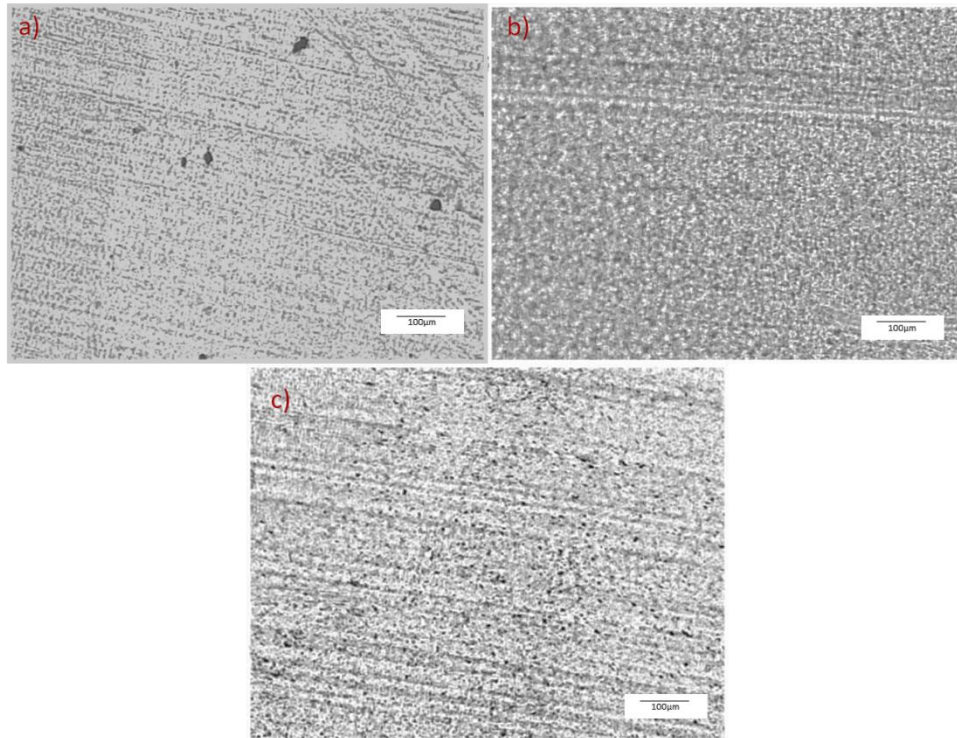


Figura 4 Micrográficas obtenidas por medio de OM para la concentración más baja de los compuestos HDPE/NPC

Con el fin de evaluar el efecto de cada una de las nanopartículas sobre la cristalinidad del polietileno de alta densidad se realizaron análisis de difracción de rayos-X de las muestras. En la tabla número 3 se describen los porcentajes de cristalinidad obtenidos a partir de esta técnica.

Tabla 4 Porcentaje de cristalinidad para los distintos nanocompuestos, todas las cantidades son adimensionales.

Muestra	área total	área cristalinina	% cristalinidad
HDPE-0%	2558	1575	61.57154027
HDPE-MWCNT-0.1%	2538	2279.1	89.79905437
HDPE-MWCNT-0.2%	2963.1	2574.9	86.89885593
HDPE-MWCNT-0.3%	2679.4	2364.7	88.25483317
HDPE-MWCNT-0.4%	2726.6	2407	88.27844202
HDPE-MWCNT-0.5%	3216.1	2914.3	90.61596343
HDPE-G-0.1%	2788.5	2323.1	83.31002331
HDPE-G-0.2%	2671.6	2272.2	85.05015721
HDPE-G-0.3%	2774.4	2569.5	92.61461938
HDPE-G-0.4%	2873.8	2492.3	86.72489387
HDPE-G-0.5%	2606.2	2207.6	84.70570179
HDPE-CB-0.1%	2809.7	2443.9	86.98081646
HDPE-CB-0.2%	2396.7	2046	85.36738015
HDPE-CB-0.3%	2666.4	2187.9	82.05445545
HDPE-CB-0.4%	2348.5	2006.9	85.45454545
HDPE-CB-0.5%	2843.6	2456.2	86.37642425

Como se observa, la mayor cristalinidad obtenida está en la última concentración de nanotubos de carbono. Las nanopartículas de carbono integradas a una matriz de polietileno de alta densidad, pueden favorecer la cristalización homogénea debido a que actúan como agentes de nucleación. En el caso de los polímeros, la linealidad de las cadenas (como es el caso del HDPE) da como resultado una mayor cristalinidad en comparación a cadenas ramificadas, aumentando considerablemente la conductividad térmica de la resina; En este sentido, los resultados conseguidos mediante la técnica del WAXD complementan los del MDSC indicando una mayor conductividad térmica en los compuestos HDPE/MWCNT.

4. CONCLUSIONES

El comportamiento térmico de los nanocompuestos HDPE/nanopartículas de carbono (NPC) está siendo estudiado con un enfoque hacia las diferencias de geometría. A partir de los objetivos planteados y en base a los resultados obtenidos, se puede concluir:

La metodología desarrollada para la preparación de nanocompuestos fue la adecuada.

Las conductividades térmicas obtenidas para los nanocompuestos HDPE/Nanopartículas de carbono presentan un incremento en comparación a la conductividad de la matriz base.

Las conductividad y difusividad térmica más alta se obtuvo en la concentración mayor de nanotubos de carbono (0.5%vol), lo cual coincide con el aumento de cristalinidad obtenido por medio de la técnica de WAXD y tiene como fundamento la facilidad de los nanotubos de carbono de formar cadenas conductivas con respecto a los otros Alótropos de carbono.

El modelo de Agari fue el más próximo a los datos experimentales obtenidos para los nanocompuestos, sin embargo, es necesario un ajuste de los parámetros C1 y C2 para resultados más cercanos a los experimentales

BIBLIOGRAFÍA

1. A. A. Balandin, "Thermal properties of graphene and nanostructured carbon materials," *nature materials*, vol. 10, pp. 569-581, 2011.
2. J. Jang and H. Yoon, "Multigram-Scale Fabrication of Monodisperse Conducting Polymer and Magnetic Carbon Nanoparticles," *Small*, vol. 1, no. 12, pp. 1195-1199, 2005.
3. R. M. Rose, J. Wulff and L. A. Shepard, *The structure and properties of materials*. New York: John Wiley & sons, 1996.
4. B. Carlberg, L.-L. Ye and J. Liua, "Polymer-metal nanofibrous composite for thermal management of microsystems." *Materials Letters*. vol. 75, no. 1, p. 229–232, 2012.
5. D. A. G. Bruggeman, "Berechnung verschiedener physikalischer Konstanten von heterogenen Substanzen. I. Dielektrizitätskonstanten und Leitfähigkeiten der Mischkörper aus isotropen Substanzen," *Annalen der Physik*, vol. 416, no. 7, p. 636–664, 1935.
6. J. C. Maxwell, *Treatise on Electricity and Magnetism*, New York: Dover Publications, 1884.
7. T. B. Lewis and L. E. Nielsen, "Dynamic mechanical properties of particulate-filled composites," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 14, no. 6, p. 1449–1471, 1970.
8. Y. Agari and T. Uno, "Estimation on thermal conductivities of filled polymers," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 32, no. 7, pp. 5705-5712, 1986.
9. H. Zhou, S. Zhang and M. Yang, "The effect of heat-transfer passages on the effective thermal conductivity of high filler loading composite materials.," *Composites science and technology*, vol. 67, no. 1, pp. 1035-1040, 2006.

10. ASTM Standard, E1952 Standard Test Method for Thermal Conductivity and Thermal Diffusivity by Modulated Temperature Differential Scanning Calorimetry, West Conshohocken, PA: ASTM International, 2011.
11. Y. Agari and T. Uno, "Thermal conductivity of polymer filled with carbon materials: Effect of conductive particle chains on thermal conductivity," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 30, no. 5, p. 2225–2235, 1985.
12. D. Kumlutas and I. H. Tavman, "A Numerical and Experimental Study on Thermal Conductivity of Particle Filled Polymer Composites," *Journal of Thermoplastic Composite Materials* 2006, vol. 19, no. 4, pp. 441-455, 2006.
13. G. R. Kasaliwal, S. Pegel, A. Gödel, P. Pötschke and G. Heinrich, "Analysis of agglomerate dispersion mechanisms of multiwalled carbon nanotubes during melt mixing in polycarbonate," *Polymer*, vol. 51, pp. 2708-2720, 2010.
14. ASTM Standard, D 5596 – 03 Standard Test Method For Microscopic Evaluation of the Dispersion of Carbon Black in Polyolefin Geosynthetics, Barr Harbor Dr., W. Conshohocken: ASTM international, 2003.
15. Y. Agari, A. Ueda and S. Nagai, "Thermal conductivities of composites in several types of dispersion systems," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 42, no. 6, pp. 1097-4628, 1991.

EFFECTO ANTIOXIDANTE DE LA FITOALEXINA TRANS-RESVERATROL EN OVOCITOS DE OVINO DOMÉSTICO MADURADOS IN VITRO.

¹Adriana Espinoza Mendoza, ¹Demetrio Ambriz García y ¹María del Carmen Navarro Maldonado

¹Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

RESUMEN

La finalidad de las biotecnologías de la reproducción asistida, es aumentar la eficiencia de la tasa reproductiva de animales y humanos. Ellas permiten la propagación genética de individuos élite para las características productivas o ecológicas de interés, Por otro lado, las biotecnologías de la reproducción asistida enfrentan ciertas limitantes como el estrés oxidativo, en el origen de eventos adversos para la reproducción, ya que dañan las células animales en la integridad de sus componentes estructurales y fisiológicos. Antioxidantes como el Trans-resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno), una fitoalexina producida en plantas en respuesta a condiciones de estrés, ha mostrado una mejor función de los gametos animales, de tal manera que, al ser utilizado durante la maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos de mamíferos, disminuye los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ERO). Por lo que es importante establecer un método capaz de reducir los niveles de ERO durante la MIV mejorando la viabilidad de los embriones producidos *in vitro*, contribuyendo al desarrollo de las biotecnologías de la reproducción animal asistida. En este estudio, se evaluó el efecto de diferentes dosis de resveratrol (0, 0.5, 2 y 5 μM) en la MIV y en la presencia de ERO, en ovocitos de borrego doméstico (*Ovis aries*). Los resultados muestran que a dosis de 0.5 μM ocurrió la mejor tasa de MIV (75.5%, $p < 0.05$), mientras que niveles de 0.5 y 2.0 μM reducen la presencia de ERO ($p < 0.05$). Se concluye que existe un efecto dosis dependiente del resveratrol sobre las concentraciones de ERO en ovocitos de ovino madurados in vitro.

1. INTRODUCCIÓN

La investigación en biología reproductiva ha avanzado aceleradamente, proporcionando métodos y técnicas, cuya finalidad es aumentar las eficiencias de las tasas reproductivas de animales y seres humanos. Éstas son mejor conocidas como biotecnologías de la reproducción asistida, las cuales permiten un mejor aprovechamiento de los recursos biológicos. Para la producción pecuaria, las biotecnologías de la reproducción animal asistida han permitido avances en la búsqueda de la optimización de los aspectos productivos tradicionales, como la producción de leche de mejor calidad y en mayor volumen, y la producción más eficiente de carne y pieles. Así también ha permitido la investigación biomédica, el uso de animales como fuente de proteínas para la medicina humana a través de la tecnología del ADN recombinante y la transgénesis, y la elaboración de modelos para el estudio, control y terapéutica de enfermedades humanas y de interés veterinario. Las biotecnologías reproductivas bien aplicadas son además un complemento a los estudios del valor genético de los animales; y permiten reducir los intervalos generacionales al facilitar la propagación de la genética de animales élite para las características productivas de interés, al permitir la obtención de un mayor número de crías a partir de un individuo. Así mismo el uso de las biotecnologías reproductivas ha aportado nuevas soluciones para facilitar el manejo genético de poblaciones de especies en peligro de extinción, como es el desarrollo de bancos de recursos genéticos que permiten el almacenamiento de semen, ovocitos y embriones congelados, además de otros tejidos.

En el curso normal de eventos, la habilidad del ovocito para desarrollarse en un embrión viable y eventualmente en un feto normal y saludable, es adquirida gradualmente durante su diferenciación progresiva a través de la foliculogénesis, proceso que culmina en un estadio de competencia del desarrollo, denominado “capacitación del ovocito”. Las secuencias detalladas de los eventos que ocurren durante el crecimiento del ovocito in vivo deben imitarse lo máximo posible, mediante técnicas diseñadas para soportar el crecimiento folicular y ovocitario en las condiciones in vitro.

Por tal motivo, el objetivo de la maduración in vitro (MIV) de ovocitos, es producir ovocitos con calidad comparable a los madurados in vivo, ya que la MIV constituye una etapa decisiva en el rendimiento del proceso de producción de embriones in vitro.

Las pruebas in vitro en modelos animales y en estudios clínicos, sugieren que el estrés oxidativo juega un papel de gran importancia en el origen de eventos adversos para la reproducción. El estrés oxidativo se produce cuando la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y otras especies de radicales libres, excede la capacidad de antioxidantes naturales en el organismo. Los antioxidantes (como las vitaminas C y E) y cofactores antioxidantes (como el selenio, zinc y cobre) son compuestos capaces de eliminar la formación de ERO (Córdova et al., 2010).

La pérdida de la funcionalidad de los gametos por la presencia de grandes cantidades de ERO durante manejos hostiles, es motivo de gran interés y preocupación en el tema de la reproducción animal, tanto en hembras como en machos, cuyo objetivo es mantener, mejorar y optimizar la eficiencia reproductiva en las unidades de producción animal. Recientemente se han descubierto en algunos alimentos antioxidantes no nutrientes, como los compuestos fenólicos dentro del cual tenemos al Trans-resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) que es un flavonoide polifenólico que se encuentra en la naturaleza, principalmente en la cáscara de las uvas, el cacahuate y en las frutas tipo bayas. Pertenece a un grupo de moléculas de defensa llamadas fitoalexinas que se producen en respuesta a condiciones de estrés, como en infecciones por patógenos e irradiación UV. Su presencia se reportó por primera vez en el vino tinto (Millán et al., 2008)

El Trans-resveratrol tiene la característica de contener en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas, lo que le confiere una alta capacidad antioxidante (Hung et al., 2002). Se encuentra en dos formas isoméricas: cis y trans, siendo la forma con mayores características antioxidantes en la piel de la uva el Trans-resveratrol. El contenido del isómero Trans-resveratrol que es el mayoritario, se encuentra a concentración de 0.29 a 1.89 mg en 150 mL de vino tinto y una taza de uvas rojas contiene 0.24 – 1.25 mg de dicho compuesto.

El Trans-resveratrol es absorbido y metabolizado rápidamente después de su ingesta oral. Es por esto que se cuestiona su eficacia en mamíferos in vivo. Su biodisponibilidad oral es muy baja y su vida media plasmática es de 8-14 minutos. Investigaciones clínicas reportan que el medio ambiente de los ERO y los antioxidantes en condiciones normales garantizan una mejor función de los gametos. Las pruebas in vitro en modelos animales y en estudios clínicos, sugieren que el estrés oxidativo juega un papel de gran importancia en el origen de los eventos adversos para la reproducción. Por lo tanto, es importante establecer un método de maduración de ovocitos que sea capaz de reducir los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ERO) durante la manipulación, aumentando así la tasa de maduración in vitro (MIV) y mejorando la viabilidad de los embriones producidos, contribuyendo al desarrollo de las tecnologías de la reproducción animal asistida.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los ovarios fueron colectados a partir de hembras *Ovis aries* sacrificadas en rastro y se transportaron al laboratorio dentro de un termo con solución salina al 0.9% con 2% de antifun-

antibac mantenidos a una temperatura de 25 a 30°C, en un periodo no mayor de dos horas. En el laboratorio, los ovarios fueron lavados isotérmicamente tres veces con solución salina al 0.9%.

De acuerdo a la metodología descrita por Robledo *et al.* (2009), la obtención de los ovocitos se hizo mediante punción aspiración folicular de los ovarios. Los ovocitos fueron aspirados de folículos de 3 a 6 mm de diámetro utilizando una jeringa de 10 mL con aguja hipodérmica calibre 18 con 1 mL de TCM-199 con Hepes y Heparina (100 UI/mL). El líquido folicular recuperado se colocó en una caja de Petri de 35 mm, donde con ayuda de un microscopio estereoscópico se realizó la obtención de los complejos ovocito células cúmulus (COCs), seleccionándose aquellos que presentaron citoplasma uniforme y rodeados de al menos 4 capas de células del cúmulus. Se lavaron tres veces en 500 µL de medio de maduración TCM-199 suplementado (4.15 mL de TCM-199, 50 µL de EGF (1%), (Factor de crecimiento epidermal) 1.25 µL (5 UI) de FSH (Hormona foliculo estimulante), 20 µL (5 UI) de CG (gonadotrofina coriónica), 750 µL de SFB (10%) (Suero Fetal bovino), 50 µL (1%) de antifun-antibac).

Los COCs se dividieron en 4 grupos siguiendo la metodología descrita por Kwak (2012) se colocaron en una caja de cuatro pozos. El primer grupo se colocó en 500 µL de medio de maduración TCM-199 suplementado este se utilizó como grupo control. El segundo grupo se colocó en 500 µL de medio de maduración TCM-199 suplementado con Trans-resveratrol a una concentración 0.5 µM. El tercer grupo se colocó en 500 µL medio de maduración TCM-199 suplementado con Trans-resveratrol a una concentración 2 µM y el cuarto grupo se colocó en 500 µL de medio de maduración TCM-199 suplementado con Trans-resveratrol a una concentración 5 µM. cada uno de los pozos se cubrió con aceite mineral. Y se incubaron a 38°C, en una atmósfera de 5% de CO₂ durante 20 a 24 horas.

En cada uno de los grupos de ovocitos madurados con las distintas concentraciones de Trans-resveratrol (0, 0.5, 2.0 µM y 5.0 µM) se evaluó la maduración *in vitro*, considerando la expansión de las células cúmulus, pero además la Metafase II, localizando con ayuda del microscopio estereoscópico la extrusión del primer corpúsculo polar y como inmaduros aquellos en las que el corpúsculo no estaba presente. El porcentaje de maduración se obtuvo mediante la proporción de ovocitos madurados e inmaduros sobre el total de ovocitos evaluados.

Una vez completado el tiempo de MIV, los ovocitos se colocaron en un tubo cónico con 250µL de hialuronidasa (0.5 mg/mL en TCM-199) y se homogenizaron con la micropipeta suavemente, posteriormente se metieron a incubar durante 2 minutos transcurrido este tiempo se sacaron de la incubadora y se colocaron por 5 minutos en el vortex para retirar completamente las células del cúmulo (Robledo et al.,2009).

La solución con los ovocitos se vació en una caja de Petri de 35 mm de diámetro con medio T2 (TCM-199 suplementado con suero fetal bovino al 2%) para inactivar la acción de la hialuronidasa y retirar las células de la granulosa de los ovocitos. A continuación se concentraron los ovocitos en el centro de la caja de Petri con movimientos circulatorios suaves de la caja, se colectaron con micropipeta y se pasaron grupos de 10 ovocitos de cada uno de los tratamientos con Trans-resveratrol a una caja de cuatro pozos en donde el pozo 1 contenía ovocitos sin tratamiento (grupo control); el pozo 2 ovocitos con Trans-resveratrol 0.5 µM, el pozo 3 ovocitos con Trans-resveratrol 2.0 µM y el pozo 4 ovocitos con Trans-resveratrol 5.0 µM. En cada uno de los pozos se adicionaron 200 µL de TCM-199 suplementado más 7.5 µL de Diacetato 2-7-diclorofluoreseina. Este último se adicionó a la caja en cuarto oscuro y la caja se protegió de la luz colocando papel aluminio. Después la caja de se incubó a 37 °C por 30 minutos (Kwak *et al.*, 2012; Mukherjee *et al.*, 2013).

Una vez transcurrido ese tiempo, se procedió a lavar los ovocitos de cada uno de los grupos. Se efectuaron tres lavados a cada grupo de ovocitos en gotas de 50 µL de TCM-199 mas Hepes. Después los ovocitos se colocan en el centro de un porta objetos y alrededor de la muestra se

colocaron cuatro puntos de cera, a continuación se colocó un cubre objetos sobre la muestra teniendo cuidado de no lastimar a los ovocitos. Después por las orillas del cubre objetos se hidrató la muestra con TCM-199 mas hepes y por último se selló la muestra colocando barniz en las orillas del cubre objetos. Se evaluaron las muestras en microscopio de epifluorescencia a 10x, primero en campo claro para la ubicación de los ovocitos y después con fluorescencia con filtros UV de 370 nm. (Kwak et al., 2012). Se tomaron fotografías de las muestras en campo claro y en fluorescencia en formato jpg y se analizaron con el procesador de imágenes "Imagen J" version 1.41. Utilizando la herramienta de Imagen, Color, spit chanel obtuvimos tres imágenes de colores rojo, azul y verde de las cuales descartamos las dos primeras. La imagen del color verde se llevó a la herramienta de imagen, ajustar y threshold, en donde ajustamos el área de fluorescencia, después con la herramienta de analize y measure, se obtuvo finalmente de manera semicuantitativa, el porcentaje de fluorescencia de cada una de las imágenes procesadas.

El análisis estadístico se realizó mediante una ANOVA una vía. Los datos fueron presentados como media \pm SEM. Se consideró como significativa las diferencias si el valor de *P* fue menor de 0.05. Los experimentos se replicaron en 10 ocasiones.

3. RESULTADOS

Este trabajo fue realizado entre los meses de enero y junio, lo cual resulta importante si consideramos que los ovinos son una especie con reproducción activa en la estación de invierno (diciembre a marzo). El total de ovarios obtenidos en promedio por experimento fue de 38.5 de los cuales se colectaron en promedio 108.6 ovocitos, lo que corresponde a 2.8 ovocitos por ovario.

Los porcentajes de maduración in vitro aquí obtenidos (expansión homogénea de las células cúmulus, presentación del primer corpúsculo polar, citoplasma amplio y uniforme en color) fueron mayores para los Ovocitos madurados en 0.5 μ M (75.51%) en comparación con los de 0, 2 μ M y 5 μ M (66.3, 60.8 y 56.06%, respectivamente, $p > 0.05$). Si bien no existieron diferencias significativas entre grupos si existió una clara tendencia de que el Trans-resveratrol a 0.5 μ M, generó mayores porcentajes de MIV (75 vs 66%, 60 y 56% Figura 1 y 2).

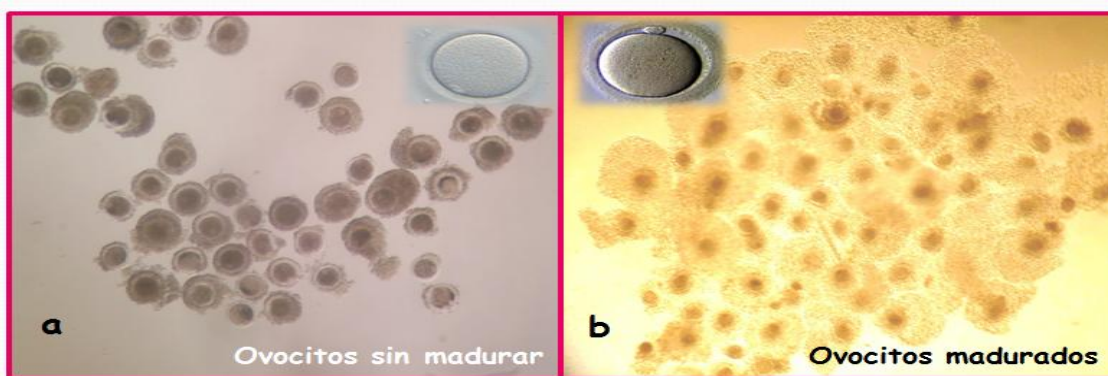


Figura 1. Ovocitos de ovino doméstico (*Ovis aries*). a) No madurados b) Madurados in vitro mostrando la expansión de las células del cúmulo.

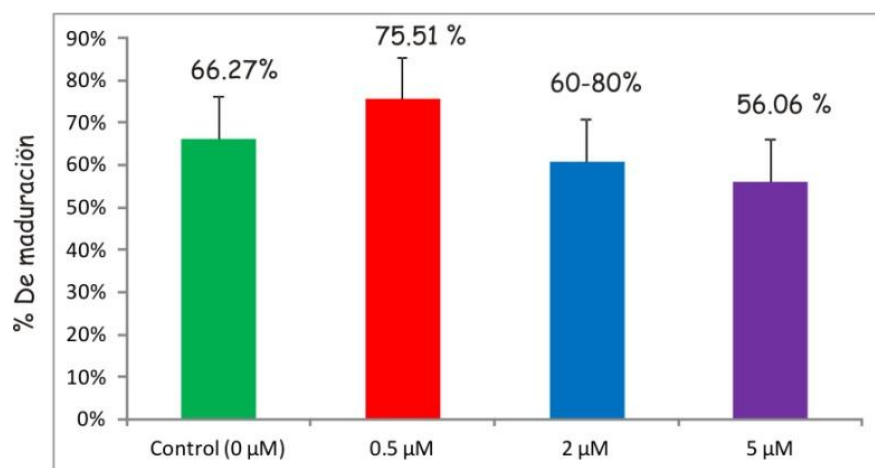


Figura 2. Porcentaje de maduración in vitro de ovocitos de *Ovis aries* tratados con las diferentes concentraciones de T-Resveratrol (0, 0.5, 2 y 5 μM).

Los ovocitos madurados con Trans-resveratrol (0.5 y 2.0 μM) tuvieron menor intensidad de fluorescencia con respecto al grupo control (25% menor) lo que indica que tuvieron menor cantidad de ERO, sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$, Figura 3 y 4).

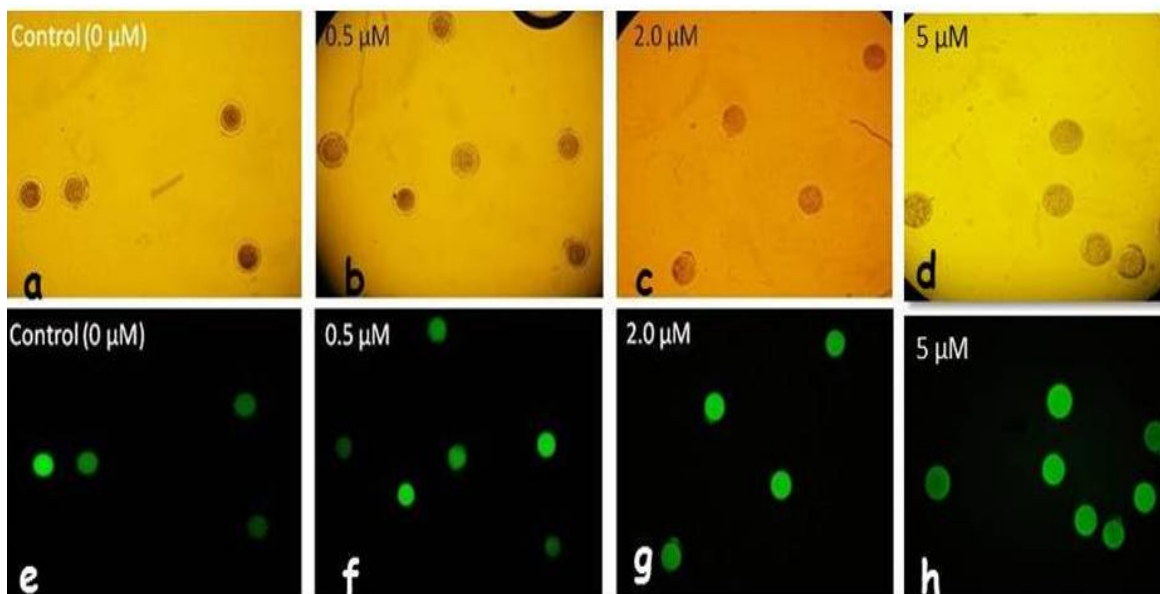


Figura 3. Ovocitos de *O. aries* teñidos con DCF (Diacetato 2-7 diclorofluoresceína) para cuantificar especies reactivas de oxígeno (ERO). Ovocitos madurados in vitro tratados con Trans-resveratrol (a-d) en campo claro, (e-h) en microscopio de epifluorescencia a 370 nm.

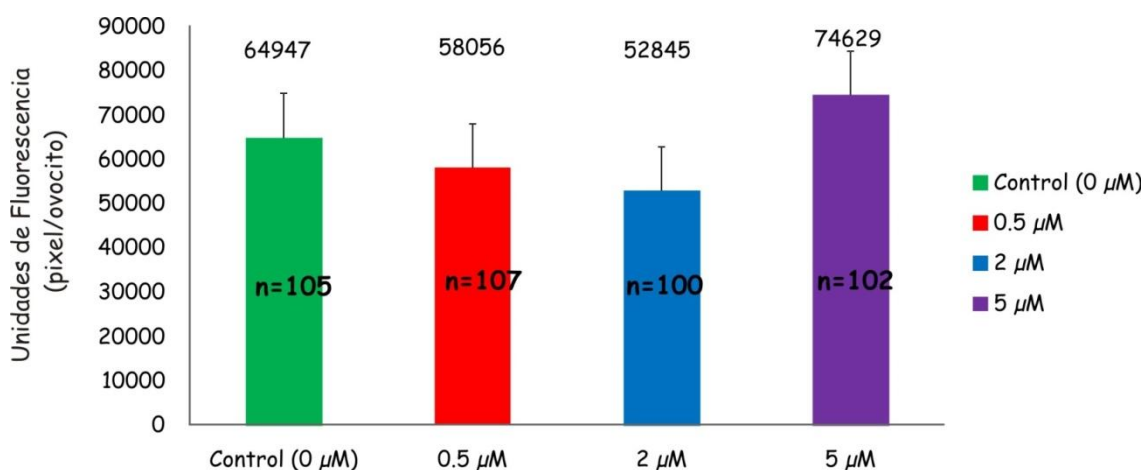


Figura 4. Niveles de ERO en ovocitos de ovino (*O. aries*) madurados *in vitro* con T-Resveratrol (0, 0.5, 2 y 5 μM).

4. DISCUSIÓN

Los avances científicos en torno a las especies reactivas de oxígeno (ERO) y vinculadas a la reproducción, muestran evidencias de importantes efectos positivos, siendo más que solo la ausencia o presencia de los ERO, el balance íntimo de la óxido reducción, la que tiene la mayor trascendencia, jugando aquí un papel preponderante, la velocidad de formación de los ERO (en torno al ámbito mitocondrial), así como su uso o disminución (por sistemas antioxidantes enzimáticos endógenos o productos exógenos como vitaminas, flavonoides, pilofenoles etc.).

En relación al Ovocito, esto resulta especialmente importante si consideramos que es la célula más grande en todo el cuerpo y como tal, posee más de 30,000 mitocondrias así como una capacidad sorprendente de síntesis de enzimas antioxidantes y que es la célula de donde inicia (junto con el espermatozoide) el origen de los mamíferos. Por otro lado, los sistemas de fertilización *in vitro* en animales, que recurren a la maduración *in vitro* del ovocito, consideran la obtención de éstos a partir de ovarios de hembras sacrificadas en rastros. De esos ovarios, los ovocitos son recuperados a partir de punción aspiración, seleccionando para ello, los folículos de mayor tamaño (>5 mm), de donde se presupone que dichos ovocitos tienen una buena calidad. Una vez fuera del folículo los ovocitos alcanzan el mayor estado de madurez a través de MIV en medios suplementados con hormonas (folículo estimulante y luteinizante) así como factor de crecimiento epidermal.

En particular, cuando se trabaja con el modelo ovino, existe además el aspecto de que esta especie cuenta con numerosas razas, que por su origen y mejoramiento genético en territorios euroasiáticos, son marcadamente estacionales (reproducción en meses de menor fotoperiodo, durante el invierno) por lo que los ovocitos recuperados de estas razas de ovinos presentan mayores problemas para su maduración *in vitro* en comparación a las razas de ovinos no estacionales o incluso con otras especies animales tales como bovinos, cerdos o aquellas conocidas como de bioterio.

En el presente trabajo los ovarios fueron obtenidos de un rastro que recibe ovinos procedentes de los estados de Guanajuato, Puebla, Tlaxcala y Estado de México. La mayor parte de los esos

ovinos son de razas mejoradas y marcadamente estacionales. El periodo de obtención de ovarios para el presente trabajo, fue de enero a junio.

Para los fines del presente trabajo fue necesario obtener la mayor cantidad de ovocitos por ovario, razón por la cual no solo se obtuvieron aquellos procedentes de folículos dominantes (>5mm de diámetro) sino que aun los de menor tamaño (3 a 5 mm). Esta resulta ser una importante diferencia frente a la mayoría de los trabajos publicados en este campo, donde probablemente exista amplia disposición de material biológico y solo obtengan ovocitos procedentes de folículos grandes o dominantes.

En el presente trabajo se obtuvieron 3 ovocitos en promedio por ovario, esto desde luego que tiene una repercusión en la calidad de los ovocitos así como en su maduración, sin embargo es importante recordar que este tipo de trabajos de investigación con la especie ovina son complejos, debido a que se trata de una especie monotoca y solo se dispone de un reducido número de folículos dominantes, además de la baja disponibilidad de hembras, lo que reduce las posibilidades de obtener un mayor número y calidad de muestras. Cabe mencionar que la razón prioritaria del uso de esta especie como modelo en este trabajo, reside en la inquietud de hacer investigación posterior con ovinos silvestres, con los cuales ya se tienen en nuestro laboratorio avances en el área de obtención de células somáticas y clonación.

Con esto en mente, es importante puntualizar que la maduración *in vitro* de los ovocitos para ser utilizados posteriormente para técnicas de reproducción asistida como son la fertilización *in vitro* y la clonación, tienen que tener la mayor calidad posible, razón por la cual se decidió en el presente trabajo utilizar una fitoalexina de conocido potencial reductor, el Trans-resveratrol, a dosis que han demostrado tener influencia sobre la calidad de la maduración ovocitaria, fertilización y el posterior desarrollo embrionario en otras especies.

Con respecto a la tasa de maduración *in vitro* observamos, en el presente trabajo, que se ve favorecida a una concentración de 0.5 μM de Trans-resveratrol, como se muestra en la Fig.1, en donde se obtuvo un 75.51% de ovocitos madurados, seguido del grupo control con 66.27%, 60.80% en el grupo de 2.0 μM y por último el 56.06% en el grupo de 5.0 μM , lo que pone de manifiesto que el Trans-resveratrol puede favorecer la maduración de ovocitos *in vitro* siempre y cuando se utilice a la concentración adecuada (Fig. 1 y 2). Es importante considerar para este proceso, el balance preciso de oxidación-reducción en cada especie de interés. Kwak et al. (2012) en cerdos, reportó una reducción en los porcentajes de MIV de ovocitos cuando fueron expuestos a una dosis de 10 μM de Trans-resveratrol.

Con respecto al patrón de fluorescencia que da evidencia de la presencia de ERO, los resultados de la Fig. 3 y 4, demuestran que, a las concentraciones de Trans-resveratrol evaluadas (0.5 y 2.0 μM), tuvieron una disminución de la presencia de ERO en ovocitos de ovino madurados *in vitro*, con respecto al control y a la concentración de 5 μM . Siendo más marcada esta disminución a una concentración de 2.0 μM (152,845 Unidades de Fluorescencia), pero no mostrando diferencias significativas con respecto a concentración de 0.5 μM (58,056 Unidades de Fluorescencia) ($P>0.5$). La reducción relativa en unidades de fluorescencia de los ovocitos con Trans-resveratrol comparativa frente a la obtenida en el grupo control fue de un 25%.

Esto indica que el Trans-resveratrol si muestra un efecto antioxidante sobre los ovocitos de ovino sometidos a MIV, como lo señalaron Kwak *et al.* (2012) quienes obtuvieron una reducción de las ERO del 45% y el 55% en MIV de ovocitos de cerdo a concentraciones de 0.5 y 2.0 μM respectivamente., en tanto que en cabra, Mukherjee et al, (2014) obtuvieron reducciones de 16 y 38% respectivamente. Lo que confirma que es importante el conocer el efecto de esta fitoalexina en las dosis y en la especie de interés, dado que es evidente que existe un efecto dosis dependiente del Trans-resveratrol sobre las concentraciones de ERO en ovocitos madurados *in vitro* que repercuten en su calidad posterior y que debe ser previamente estudiados.

5. CONCLUSIÓN

Se concluye que en este trabajo de maduración *in vitro* de Ovocitos de ovino doméstico, lo más conveniente resultó ser la utilización de Trans-resveratrol a una dosis de 0.5 μ M.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. G. Evans, "Perspectiva on the development of high-toughness ceramics", J. Am. Ceram. Soc., Vol. 73, 2, 1990, pp. 187-206.
2. T. Kreis, "Speckle Metrology," in *Holographic Interferometry* (Akademie Verlag Inc., New York, NY, 1996), Chapter 4, pp. 125-149.
3. A. Córdova, Saltijeral J., Ruiz G., Xolalpa V., Cortés S., Peña D., Córdova M., Méndez M., Huerta R., Juárez M., Guerra E.,. Estrés Oxidativo en Gametos. Revista Electrónica de Veterinaria, Vol 11, 7. 2010, pp- 1-32.
4. H. Chow., Garland LL., Hsu CH., Vining DR., Chew WM., Miller JA., Perloff M., Crowell JA., Alberts DS. Trans-resveratrol modulates drug and carcinogen metabolizing enzymes in a healthy volunteer study. Cancer Prevention Research. Vol 3, 9. 2010, pp. 1168-75.
5. L.M. Hung,, Su M.J., Chu W.K., Chiao, C.W., Chan W.F., Chen J.K. The tective effect of Trans-resveratrol on ischaemia-reperfusion injuries of rat hearts is correlated with antioxidant efficacy. British J. Pharmacol. Vol 135. 2002, pp. 1627-33.
6. S. Kwak, Cheong S, Jeon Y., Leeb E., Choi K., Jeung E., Hyuna S., The effects of Trans-resveratrol on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. Theriogenology Vol 7, 2012, pp. 86-101.
7. F. Millán, Serrano G., Expósito I. Trans-resveratrol, Nuevos retos en el tratamiento antienvjecimiento, 2008. *dossier:66-70*.
8. A. Mukherjee, Malik H., Ambika P., Dubey A., Kumar D., Boateng S., Saugandhika S., Kumar S., De S., Guha S., Malakar D. Trans-resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression. Gamete Biology. Vol 31, 2013, pp. 229–239.
9. J.M. Robledo, Herrera J., Cajero M, Navarro M.C., García A. Evaluación de dos medios de maduración *in vitro* para la producción de embriones ovinos. Tropical and Subtropical Agroecosystems. Vol 10, 2009, pp. 95-9.
10. E. Wang, Tian X., Zhang L., He C., Ji P., Li Y., Tan D., Liu G. Beneficial effect of Trans-resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after *in vitro* fertilization. Fertil Steril. Vol 101, 2014, pp. 577-86.

ELABORACIÓN DE RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES A BASE DE MUCÍLAGO DE LINAZA (*Linum usitatissimum*) Y QUITOSÁN PARA EXTENDER LA VIDA DE ANAQUEL DE MELÓN (*Cucumis melo*) FRESCO CORTADO

Ruth Correa-Cerón¹, Mayra Treviño-Garza¹, Ma. del Socorro Flores González¹, Katiushka Arévalo-Niño¹

¹ Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue el evaluar el efecto de recubrimientos comestibles a base de mucílago de linaza y quitosán sobre la vida de anaquel del melón fresco cortado. Para ello se realizó la extracción del mucílago de semillas de linaza por extracción etanólica. Posteriormente se elaboraron formulados para recubrimientos de quitosán (Q), mucílago de linaza (ML) y mucílago de linaza con quitosán (QML) en los cuales se midió pH, viscosidad y actividad antimicrobiana por inhibición en placa. El mucílago de linaza presentó un rendimiento de 6% así como actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *E. aureus*. Para evaluar su efecto como recubrimientos comestibles se evaluaron parámetros microbiológicos, fisicoquímicos y sensoriales cada 3 días durante 18 días. La aplicación de los recubrimientos redujo la carga microbiana de mesófilos aerobios por 2.08, de coliformes totales por 3.24 y de hongos y levaduras por 1.87 Log UFC/g con respecto al control. Se disminuyeron la pérdida en peso (3.45%), el ablandamiento de la fruta y la pérdida de sólidos solubles en aquéllas recubiertas con Q y ML. No se encontró efecto en los valores de vitamina C. En análisis sensoriales, los recubrimientos de ML y Q mejoraron el sabor, mientras que en tratados con QML éste fue rechazado. El color y sabor fueron mantenidos por los recubrimientos, mientras que no se encontró efecto en la textura sensorial. La aceptación general aumentó hasta 6 días en frutas recubiertas con respecto al control, y se redujo el índice de decaimiento (IDC) en un 25%. Finalmente, se estableció que los recubrimientos aumentaron la vida de anaquel del melón hasta los 15 días.

1. INTRODUCCIÓN

La fruta mínimamente procesada es un producto que ha ganado popularidad en los establecimientos de alimentos. Sin embargo, frutas frescas como el melón (*Cucumis melo*) sufren durante su almacenamiento una serie de cambios (fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales) que afectan la calidad y disminuyen la vida útil del producto. Es por ello que se han buscado alternativas para conservar las propiedades de un producto fresco desde lavados con sanitizantes como cloro, peróxido de hidrógeno e incluso hasta la irradiación¹. Sin embargo, éstos no han sido satisfactorios por lo que se han desarrollado métodos como los recubrimientos comestibles (RC) a base de biopolímeros como alternativa para mantener estas cualidades y así extender la vida de anaquel de la fruta fresca cortada. Entre los biopolímeros más utilizados se pueden encontrar el quitosán, las gelatinas, pectinas, almidones y los mucílagos y exudados de plantas y semillas².

El quitosán es obtenido de la desacetilación de la quitina obtenida del caparazón de crustáceos, siendo de los polímeros más abundantes en la naturaleza. Es un compuesto altamente viscoso parecido a las gomas por lo que ha sido usado como recubrimiento para alimentos ya que presenta

propiedades cohesivas y al formar filmes transparentes, además de propiedades antimicrobianas y antifúngicas³.

El mucílago de linaza es una sustancia altamente viscosa, incolora y con propiedades plastificantes, puede retener su viscosidad en rangos de pH de 5 a 9⁴. Actúa como reserva de polisacáridos, agua, minerales y proteínas necesarias para la germinación de la planta, además inhibe la entrada de oxígeno y provee adherencia a las semillas⁵. El mucílago de linaza ha sido usado anteriormente como emulsificante en bebidas chocolatadas y se han buscado nuevas aplicaciones de éste en la industria alimentaria⁴. Las propiedades polimerizantes, plastificantes, de barrera y antimicrobianas del mucílago de linaza y el quitosán los muestran como una buena opción para la elaboración de recubrimientos comestibles para frutas, ya que proveen una alternativa natural y biodegradable para la manutención de la frescura, brillo y calidad de fruta cortada.

2. PARTE EXPERIMENTAL

El mucílago de linaza fue extraído por precipitación con etanol⁴. Se elaboraron recubrimientos comestibles a base de Q (1%), ML (2%) y QML (0.5% Q + 1% ML). Se evaluó el efecto antimicrobiano de estos formulados por la técnica de inhibición en placa⁶ contra los patógenos *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en Agar Infusión Cerebro Corazón. El melón fue obtenido en un mercado local teniendo las características deseadas de olor, color y madurez comercial (9° Brix madurez) óptimas para su consume. Éste posteriormente fue desinfectado con hipoclorito de sodio (250 ppm) y cortado en cubos de 5 cm. Los recubrimientos fueron aplicados a la fruta cortada por el método de inmersión, como control se utilizaron frutas sin recubrimiento (CSR). La fruta fue almacenada en recipientes de plásticos con tapa (1L), en refrigeración (4°C) por un periodo de 18 días. Durante ese lapso se evaluaron parámetros microbiológicos (recuento de coliformes totales, mesófilos aerobios y, hongos y levaduras) usando el método de vaciado en placa siguiendo las normas NOM-110-SSA1-1994, NOM-093-SSA1-1994, y NOM-113-SSA1-1994; fisicoquímicos (pérdida en peso, sólidos solubles, ablandamiento, vitamina C, acidez y pH) y sensoriales (color, olor, sabor, textura, índice de decaimiento y aceptación general). Las evaluaciones sensoriales fueron realizadas por panelistas no entrenados. Finalmente, los resultados de los análisis microbiológicos y fisicoquímicos fueron sometidos a un ANOVA y prueba de Tukey y los sensoriales a pruebas de Kruskal-Wallis y Mann Whitney en el programa SPSS 19.0.

3. RESULTADOS

Se encontró inhibición tanto para *E. coli* y *S. aureus* en los formulados de ML pero no para *L. monocytogenes* ni *S. typhi*. No se detectó inhibición en Q para *S. aureus*. Los mayores halos de inhibición contra todas las cepas utilizadas se encontraron en los formulados de QML.

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el recuento microbiológico entre tratamientos y durante el almacenamiento. Las frutas control presentaron significativamente mayor ($p < 0.05$) desarrollo microbiológico respecto a las frutas recubiertas, en las cuales se encontró una disminución de 0.43-2.13 Log en el desarrollo de mesófilos aerobios, 1.59-3.24 Log en coliformes totales y 1.27-1.87 Log en hongos y levaduras, respectivamente.

Los formulados inhibieron la carga microbiana presente en las frutas antes de ser tratadas, esto al observar la ausencia o cuentas menores de microorganismos en las frutas tratadas con respecto a los controles durante los primeros días de almacenamiento. Se encontró que hubo un aumento de los microorganismos presentes en la fruta durante el almacenamiento tanto en controles como en frutas tratadas, presentándose una mayor incidencia de mesófilos aerobios, seguida por coliformes totales y finalmente de hongos y levaduras. Durante el almacenamiento se encontró que los recubrimientos comestibles retrasaron el desarrollo de microorganismos mesófilos aerobios,

coliformes totales y, hongos y levaduras de manera significativa ($p < 0.05$), presentando una eficiencia de la actividad antimicrobiana en el orden $Q > QML > ML$. Finalmente, se observó que la aplicación de los formulados tuvo un efecto positivo en mantener las cualidades microbiológicas del melón cortado hasta el día 9 en ML y QML y al 18 en Q, mientras que en los controles éstas se perdieron desde el día 1 de almacenamiento.

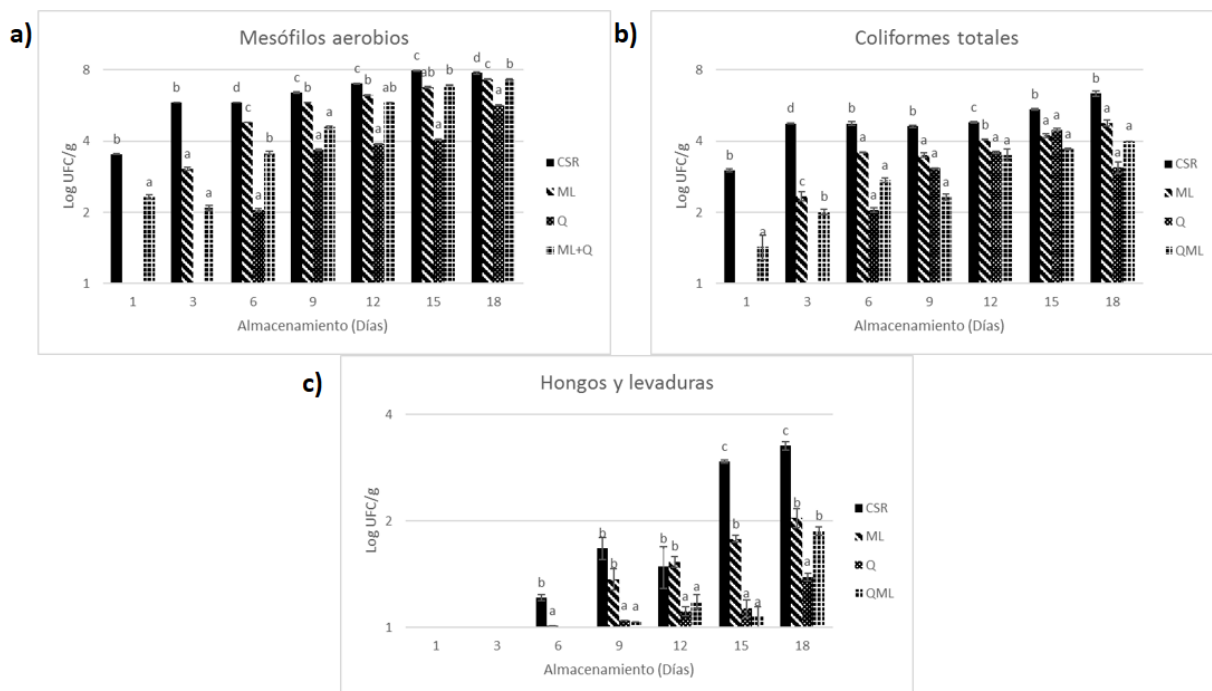


Figura 1. Cuenta en placa de a) Mesófilos aerobios, b) Coliformes totales y c) Hongos y levaduras en Log UFC/g de frutas controles (CSR) y tratadas con mucílago de linaza (ML), quitosán (Q), y quitosán con mucílago de linaza (QML) durante 18 días de almacenamiento a 4°C.

En las evaluaciones fisicoquímicas, la aplicación de los recubrimientos comestibles disminuyó significativamente ($p < 0.05$) el deterioro de la fruta dado por diversos factores. La pérdida de peso fue reducida hasta 3.45 g/100g al actuar los recubrimientos como una barrera contra la pérdida del agua. Ésta misma disminución de la pérdida del agua retrasó los cambios en el contenido sólidos solubles en frutas recubiertas con ML. La aplicación de los recubrimientos comestibles de Q y ML confirió también mayor firmeza a las frutas tratadas, previniendo el ablandamiento de la fruta (7-39%), sin embargo en el recubrimiento comestible de QML no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) en este parámetro con respecto al control. En cuanto al contenido de vitamina C y acidez, no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) durante el almacenamiento entre las frutas tratadas y el control. Por el contrario, la aplicación de los RC incrementó significativamente ($p < 0.05$) el pH de la fruta recubierta con Q y QML al inicio del almacenamiento debido a la formulación del recubrimiento.

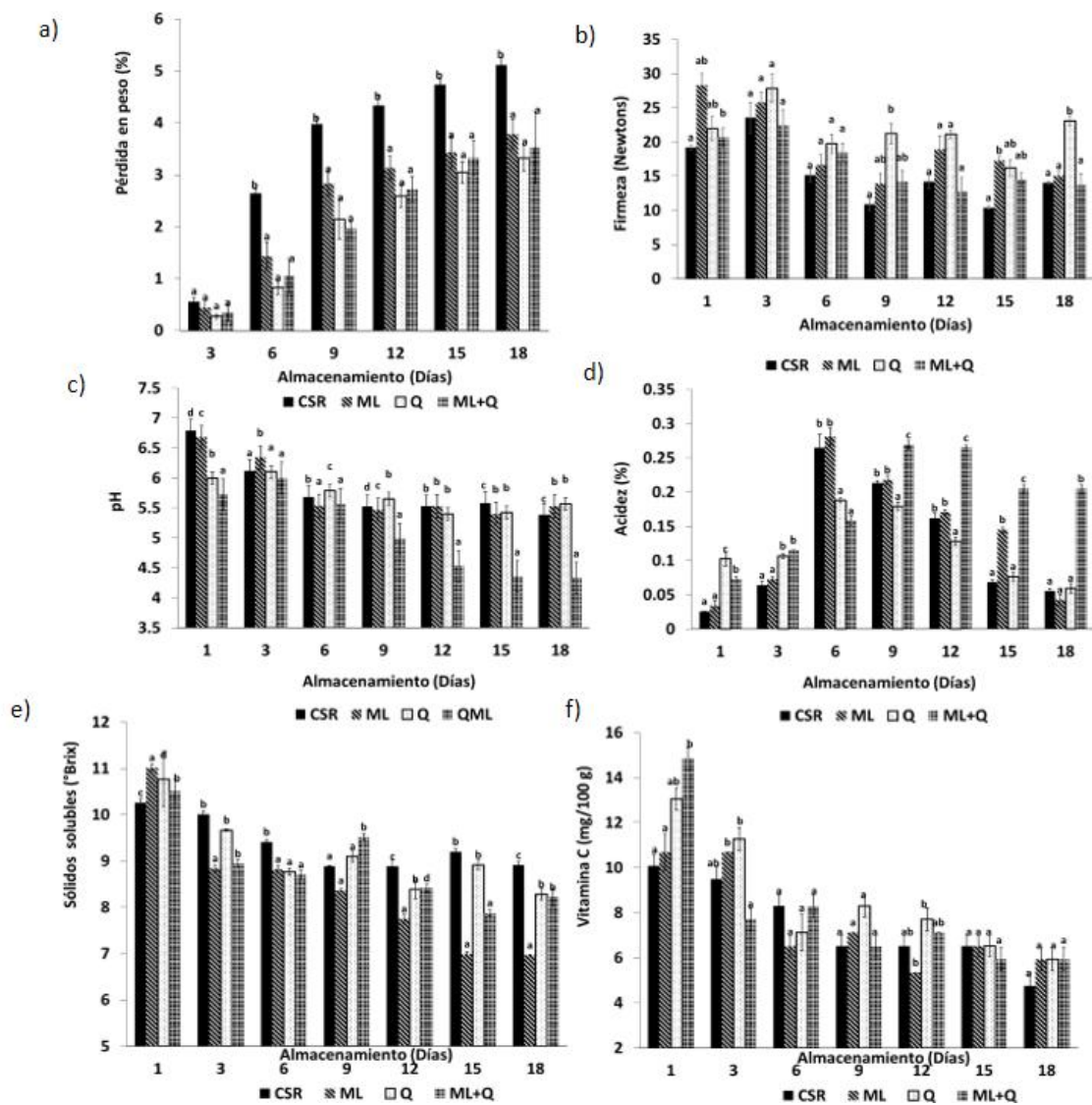


Figura 2. Efecto de recubrimientos comestibles en a) pérdida en peso, b) firmeza, c) pH, d) acidez, e) sólidos solubles y f) vitamina C, en melón fresco cortado y almacenado a 4 °C por 18 días. Las letras en las graficas indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

En los análisis sensoriales no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) en el parámetro de textura. Por el contrario, la adición de los recubrimientos comestibles mejoró significativamente ($p < 0.05$) los atributos de color, olor y sabor, excepto en las frutas cubiertas QML, en las cuales se modificó significativamente ($p < 0.05$) el sabor del producto, obteniéndose en este las evaluaciones más bajas. En cuanto a IDC, se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las frutas recubiertas y el control, debido a que en este último se encontró un 25% de daño causado por hongos a partir del día 15 de almacenamiento. Finalmente, hubo una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la aceptación general, las frutas recubiertas con Q y ML tuvieron mayor aceptación respecto a las frutas recubiertas con QML y al control.

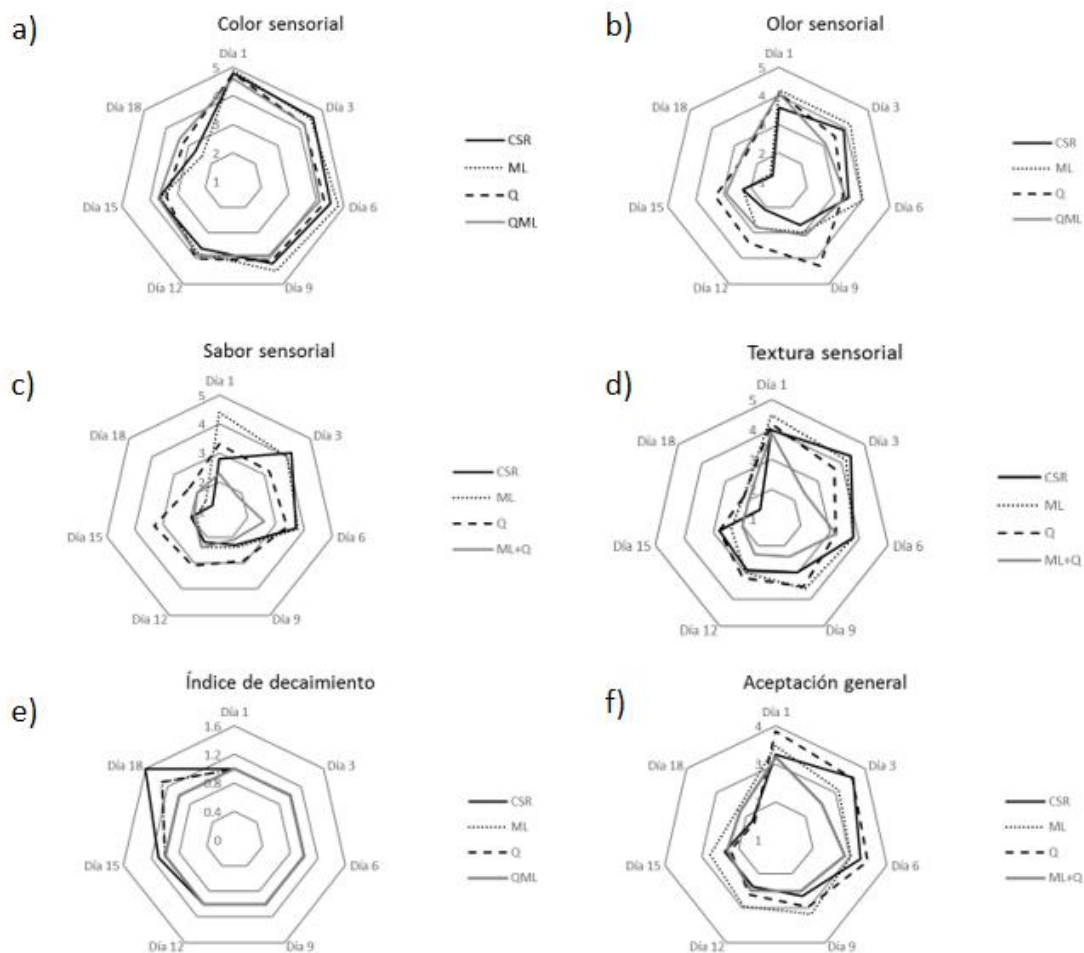


Figura 3. Evaluación de a) color sensorial, b) olor sensorial, c) sabor sensorial y d) textura sensorial e) índice de decaimiento (IDC) y f) aceptación general realizada por panelistas de frutas control y recubiertas con mucílago de linaza (ML), quitosán (Q) y quitosán con mucílago de linaza (QML) almacenadas durante 18 días a 4°C.

4. CONCLUSIONES

Se demostró la presencia de actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *S. aureus* en el mucílago de linaza, y contra *E. coli* y *S. typhi* en el quitosán así como su posibilidad de ser aplicado como recubrimiento comestible en melón fresco cortado.

Se comprobó que la combinación de quitosán y mucílago de linaza (QML) pierde actividad antimicrobiana con respecto a la de Q, además de conferir un sabor desagradable para el consumo, haciéndola no apta para la aplicación de recubrimientos comestibles.

La aplicación de recubrimientos comestibles de ML, Q y QML contribuyó a reducir la carga microbiana de mesófilos aerobios, coliformes totales y hongos y levaduras, los recubrimientos con Q mostraron la mayor inhibición, seguidos por ML y QML respectivamente.

La aplicación de recubrimientos comestibles de Q, ML y QML disminuyó la pérdida en peso, la reducción de sólidos solubles y el ablandamiento de la fruta sin embargo, éstos no tuvieron efecto en la oxidación de vitamina C.

Los recubrimientos de ML y Q ayudaron a mejorar el sabor, sin modificar textura, olor o color después de su aplicación. Sin embargo lograron mantener estas características y tener una mayor aceptación general durante el almacenamiento.

Estos recubrimientos ayudaron a extender la vida de anaquel microbiológica de 2 (ML y QML) a 4 (Q) días y la sensorial hasta por 6 días (ML) según estándares por USDA.

Se estableció que los recubrimientos de Q y ML en melón cortado confieren una vida de anaquel de hasta 15 días, dando así de 5 a 9 días más obtenidos con los procesos de sanitización actuales.

BIBLIOGRAFÍA

1. T. Solomos, "Principles underlying modified atmosphere packaging". Minimally processed refrigerated fruits and vegetables. New York: Chapman and Hall, 1997, pp. 183-233.
2. A. Durango, N. Soares, M. Arteaga, "Filmes y revestimientos comestibles como empaques activos biodegradables en la conservación de alimentos" Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial. Vol. 9, 1, 2011, pp.112-118.
3. O. Skurtys, C. Acevedo, F. Pedreschi, J. Enrione, F. Osorio, J. Aguilera, "Food Hydrocolloid Edible Films and Coatings". Department of Food Science and Technology. Universidad de Santiago de Chile. Santiago, Chile., 2010.
4. R. Fedeniuk, C. Biliaderis, "Composition and physicochemical properties of linseed (*Linum usitatissimum*) mucilage". Journal of agricultural food chemistry. Vol. 42, 1, 1994, pp. 240-247.
5. H. Dorman, S. Deand, "Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils". Journal of applied microbiology. Vol. 88, 2, 2000, pp.308-316
6. K. M. Gengler, "The function of flax mucilage in flax". Tesis de maestría. College of St. Benedict and St John University, Minnesota, EUA. 1993, pp. 40-50. Disponible en <http://cdm.csbsju.edu/utills/getfile/collection/Honors/id/78/filename/78.pdf> Revisado el 12 de noviembre de 2013
7. Z. Ayhan, G. W. Chism, "The shelf-life of minimally processed fresh cut melons" Journal of Food Quality. Vol. 21, 1, 1997, pp. 29-40

CONTENIDO Y ACUMULACIÓN DE SODIO EN FRUTOS DE GENOTIPOS NATIVOS DE TOMATE TRATADOS CON NaCl

Peter Ladewig², Libia I. Trejo -Téllez¹, Fernando C. Gómez-Merino², Roselia Servín-Juárez² y Víctor García-Gaytán¹

¹ Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Texcoco 56230, Estado de México. ² Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, Amatlán de los Reyes 94946, Veracruz, México.

RESUMEN

En un experimento factorial, se evaluó el efecto en la concentración y contenido de Na en frutos, de la adición de cuatro concentraciones de NaCl (0, 30, 60 y 90 mM) en la solución nutritiva para la producción de cuatro genotipos nativos de tomate colectados en los estados de Campeche, Oaxaca, Puebla y Veracruz; así también se incluyó un híbrido comercial (Vengador). Los efectos principales del NaCl y de los genotipos así como su interacción, fueron significativos tanto en concentración como en contenido de Na en frutos. La mayor concentración de Na se tuvo en el genotipo de Campeche ($3750.5 \text{ mg kg}^{-1}$); mientras que la menor en el genotipo de Veracruz ($2297.1 \text{ mg kg}^{-1}$). Por otra parte, con la adición de 60 mM NaCl se registró la mayor concentración ($4289.7 \text{ mg kg}^{-1}$) y contenido ($87.9 \mu\text{g}$) de Na en frutos. El híbrido comercial Vengador, acumuló mayor contenido de Na ($94.0 \mu\text{g}$) que los genotipos nativos, siendo el genotipo Veracruz el de menor acumulación ($5 \mu\text{g}$) debido al menor tamaño de frutos que presenta. Estos resultados permiten evidenciar diferencias en capacidad de transporte y acumulación de Na entre estos genotipos nativos, factores que influyen tanto en tolerancia a NaCl como en la calidad del fruto.

1. INTRODUCCIÓN

La salinidad es una de las causas más comunes de degradación de suelos y de limitación del rendimiento (Ladeiro, 2012; Munns y Tester, 2008). Alrededor de 6% de la superficie terrestre global, lo que representa 780 millones de hectáreas, está afectada por la acumulación de sales en la rizosfera, siendo el cloruro de sodio (NaCl) la sal soluble más común (Munns y Tester, 2008). Además para 2014 se habían identificado 46 acuíferos mexicanos, lo que representa 7% del total, con problemas de salinidad (CONAGUA, 2015). Acuíferos con presencia de suelos salinos y agua salobre predominan en las cuencas centrales del norte y la región Río Bravo por baja precipitación pluvial y alta evaporación en combinación con aguas congénitas y minerales evaporíticos de fácil disolución. En la península de Baja California y en la región noroeste los acuíferos presentan intrusiones marinas en la zona costera (CONAGUA, 2014). Además los suelos están en riesgo de procesos de salinización cuando el manejo de éstos y del agua no es adecuado y por tanto 13% de la tierra irrigada en México está afectada por salinidad (Flowers, 1999; SEMARNAT *et al.*, 2010).

Por otra parte, el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los productos agrícolas mexicanos más importante y el 85% de su producción tiene origen en sistemas con irrigación (SIAP, 2016). El tomate es considerado como planta moderadamente sensible a salinidad y sus rendimientos disminuyen a valores de CE altos (Maas y Hoffman, 1977). Los ancestros de la tomate están ubicados en la región Andina y su domesticación ocurrió en México (Blanca *et al.*, 2012). Por eso México tiene una gran diversidad de recursos genéticos del tomate, criollo y silvestre, que permite la posibilidad de encontrar caracteres que ofrecen resistencia a factores abióticos como la salinidad (Lobato Ortiz, 2012).

Actualmente hay una tendencia creciente a producir tomate en agricultura protegida. La superficie dedicada a la agricultura protegida para la producción de tomate ha pasado de unas 250 ha en el año 2000, a más de 15,000 ha en 2015, y el rendimiento se ha incrementado de unas 120 t ha⁻¹ en 2000, a más de 200 t ha⁻¹ en 2015 (Perea, 2015). Para este tipo de hortalizas se utilizan invernaderos o malla sombra, en sistemas de cultivo sin suelo o hidropónico, los cuales hacen uso de soluciones nutritivas. Dado el incremento en la superficie destinada a la agricultura protegida y al amplio uso de sales minerales para la preparación de soluciones nutritivas, también se ha observado un incremento en la salinidad de aguas de riego.

En este contexto, el objetivo de este estudio lo constituye la evaluación de concentración y contenido de Na en frutos de genotipos nativos de tomate colectado en cuatro estados de México en respuesta a la salinidad por NaCl.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se desarrolló bajo condiciones de invernadero en Montecillo, Estado de México, con cuatro genotipos nativos de tomate colectado en los estados de Oaxaca, Puebla, Veracruz y Campeche, y con la variedad comercial Vengador, tipo Saladette. Las plantas de éstos fueron obtenidas a partir de la germinación de las semillas en almácigo con turba como sustrato.

Se evaluaron cuatro concentraciones de NaCl en la solución nutritiva de Steiner (Steiner, 1984): 0, 30, 60 y 90 mM, mismas que fueron suministradas mediante riego por goteo. Cada tratamiento tuvo 10 repeticiones y fueron distribuidas en un diseño completamente al azar. Cada unidad experimental consistió en una planta de aproximadamente 40 días de edad trasplantada en una bolsa de polietileno negro de 10 L de capacidad, y como sustrato se utilizó tezontle con un tamaño de partícula entre 1 y 20 mm.

Después de 17 semanas de cultivo, se cosecharon cinco frutas de cada tratamiento y 12 frutas del genotipo Veracruz para el análisis de concentración y contenido de Na. La concentración de Na fue determinada en el extracto resultante de la digestión húmeda ácidos (sulfúrico y perclórico) con la adición de peróxido de hidrógeno. La lectura de concentración de Na fue realizada en un se leyeron en un equipo de espectroscopia de emisión óptica de inducción por plasma acoplado (ICP-OES Agilen® modelo 725-ES) (Alcántar y Sandoval, 1999). El contenido de Na fue estimado en frutos individuales considerando la concentración de Na y el peso de biomasa seca de éstos.

Con los resultados obtenidos se realizaron análisis de varianza y pruebas de comparación de medias mediante Tukey ($\alpha=0.05$) con el software Statistical Analysis System (SAS, 2002).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Entre genotipos existieron diferencias estadísticas significativas tanto en la concentración como en el contenido de Na (**Figura 1**). El genotipo Campeche mostró la mayor concentración de Na con 3750 mg kg⁻¹; por el contrario, el genotipo Veracruz la menor con 2297 mg kg⁻¹. El mayor contenido de Na se registró en la variedad comercial Vengador con 94.1 µg y el menor contenido en el genotipo Veracruz con 5.3 µg de Na; lo anterior es debido a la diferencia en el tamaño de las frutas. La absorción de Na por la planta y la distribución en los órganos de la planta son indicadores de tolerancia a salinidad y parientes silvestres del tomate son utilizados para incrementar la tolerancia a salinidad en variedades comerciales (Asish y Anath, 2005; Cuartero *et al.*, 2006).

La concentración de NaCl en la solución nutritiva afectó significativamente la concentración y contenido de Na en fruto (**Figura 2**). Plantas tratadas con solución nutritiva sin NaCl registraron concentraciones de Na en fruto de 970 mg kg⁻¹ y contenidos de este elemento de 22.3 µg. Destaca de manera importante que la concentración y el contenido más altos se observaron cuando las plantas fueron tratadas con 60 mM de NaCl. De manera coincidente a lo aquí observado, Del Amor

et al. (2001) mostraron que la concentración de NaCl en la solución nutritiva afecta la concentración de Na en frutas de tomate significativamente.

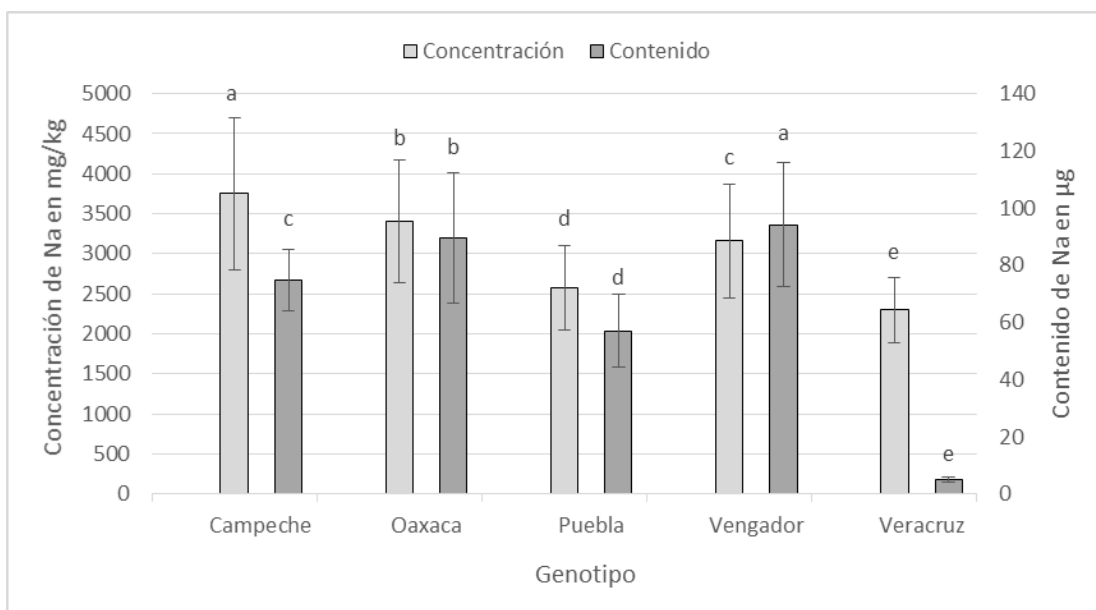


Figura 1. Efecto principal del genotipo en la concentración y contenido de Na en frutos de tomate tratados con diferentes concentraciones de NaCl en la solución nutritiva. Barras \pm DE con letras distintas para cada variable, indican diferencias estadísticas significativas entre genotipos (Tukey, $P \leq 0.05$).

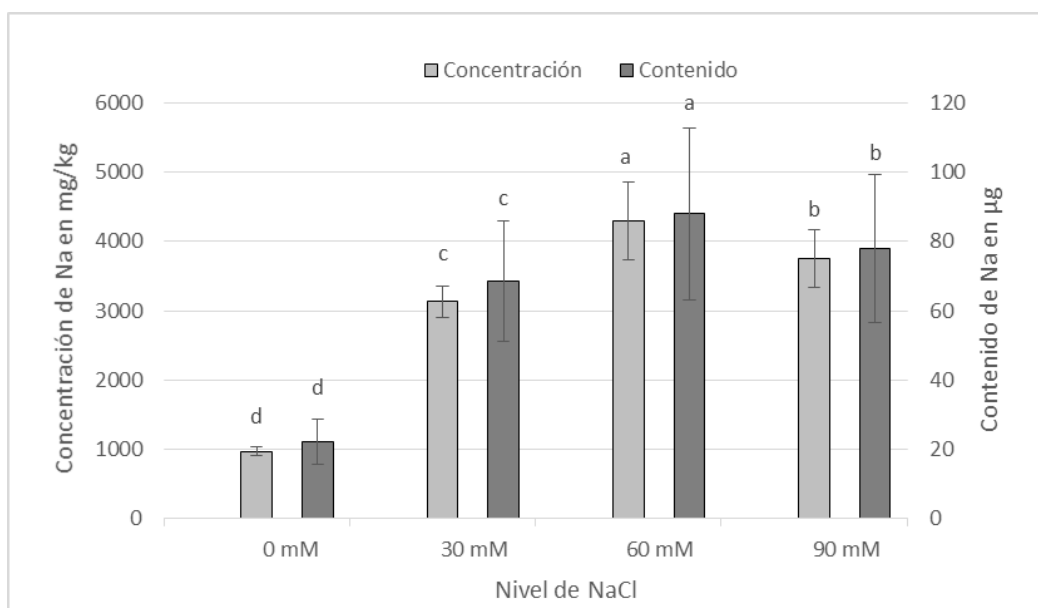


Figura 2. Efecto principal de NaCl en la concentración y contenido de Na en frutos de genotipos nativos de tomate tratados. Barras \pm DE con letras distintas para cada variable, indican diferencias estadísticas significativas entre concentraciones de NaCl (Tukey, $P \leq 0.05$).

4. CONCLUSIONES

El tratamiento con 60 mM de NaCl impacta en mayor magnitud la concentración y el contenido de Na en los frutos de los genotipos de tomate evaluados. Los diferentes genotipos y la variedad comercial muestran un espectro amplio de concentración y contenido de Na en los frutos por el efecto de NaCl en la solución nutritiva, con el genotipo Campeche mostrando las más altas concentraciones de Na y el genotipo Veracruz las más bajas.

BIBLIOGRAFIA

1. Asish, K. y Anath B. 2004. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60 (2005) 324–349
2. Blanca, J., Cañizares, J., Cordero, L., Pascual, L., Diez, M. J., Nuez, F. 2012. Variation Revealed by SNP Genotyping and Morphology Provides Insight into the Origin of the Tomato. *PLOS ONE* 7(10). e48198. doi:10.1371/journal.pone.0048198
3. CONAGUA. 2014. Estadísticas del agua en México-Edición 2014. Comisión Nacional del Agua. SEMARNAT. México, D. F. 47 pp. Acceso al internet 25.02.2016, México. <http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Publicaciones/Publicaciones/EAM2014.pdf>
4. CONAGUA. 2015. Atlas del Agua en México 2015. Comisión Nacional del Agua. SEMARNAT. México, D.F. 52 pp. Acceso al internet 25.02.2016, México. http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Noticias/ATLAS_ALTA.pdf
5. Cuartero, J., Bolarín, M., Asins, M. y Moreno V. 2006. Increasing salt tolerance in the tomato. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 57, No. 5, pp. 1045–1058, 2006 *Plants and Salinity Special Issue*.
6. Del Amor, F., Martínez, V. y Cerdá A. 2001. Salt Tolerance of Tomato Plants as Affected by Stage of Plant Development. *HORTSCIENCE* 36(7):1260–1263. 2001.
7. Flowers, T. J. 1999. Salinisation and horticultural production. *Scientia Horticulturae*. 78. 1-4 pp.
8. Ladeira, B. 2012. Saline Agriculture in the 21st Century: Using Salt Contaminated Resources to Cope Food Requirements. *Journal of Botany*. Volume 2012. Article ID 310705. doi:10.1155/2012/310705.
9. Lobato Ortiz, R., Rodríguez Guzmán, E., Carillo Rodríguez, J. C., Chávez Servia, J. L., Sánchez Peña, P., Aguilar Meléndez, A. 2012. Exploración, colecta y conservación de recursos genéticos de jitomate: avances en la Red de Jitomate. SINAREFI, SAGARPA y COLPOS. Texcoco, México.
10. Maas, E. V. y Hoffman, G. J. 1977. Crop salt tolerance – current assessment. *J. Irrig. Drain. Div. Am. Soc. Civ. Eng.* 103. 115–134 pp.
11. Munns, R. y Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:651-681.
12. Perea, E. 2015. Agricultura bajo protección. <http://imagenagropecuaria.com/2015/agricultura-bajo-proteccion/>
13. SAS. 2002. SAS High-Performance Forecasting 2.2: User's Guide, Volumes 1 and 2. Cary, NC: SAS Institute Inc. Ver. 9. 652p. SAS. 2002. SAS High-Performance Forecasting 2.2: User's Guide, Volumes 1 and 2. Cary, NC: SAS Institute Inc. Ver. 9. 652 pp.
14. SEMARNAT, SAGARPA, Fundación Produce Nayarit, A.C., Subsecretario de Desarrollo Rural, Instituto Mexicano de Tecnología del agua. 2010. Salinidad del Suelo. 9 pp. Acceso al internet 26.02.2016, México. <http://www.cofupro.org.mx/cofupro/images/contenidoweb/indice/publicacionesnayarit/FOLLETOS%20Y%20MANUALES/FOLLETOS%20IMTA%202009/folleto%206%20salinidadelsuelo.pdf>

15. SIAP. 2016. Cierre de la producción agrícola por cultivo - Tomate. Acceso al internet 26.02.2016, México. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>
16. Steiner, A. 1984. The universal nutrient solution. In: ISOSC Proceedings 6th International Congress on Soilless Culture. The Netherlands. 633-649.

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS PROTEÍNAS EXTRAÍDA DE MAÍCES CRIOLLOS EN SU ESTADO NATIVO E HIDROLIZADO

Brenda Carolina Pluma Villicaña¹, Esther Bautista Ramirez¹, Germán Gutiérrez Hernandez¹, Yolanda de las Mercedes Gómez y Gómez¹ y Luis Jorge Corzo Rios^{*1}

1 Instituto Politécnico Nacional- Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Av. Acueducto de Guadalupe, La Laguna Ticomán, Del GAM 07340, Ciudad de México, México.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN.-El maíz, alimento de consumo popular en México, contiene proteínas de tipo prolaminas a las que se le atribuyen propiedades biofuncionales. El **OBJETIVO** de este trabajo fue determinar los cambios en la actividad antioxidante de las prolaminas de diferentes maíces criollos pigmentados en su estado nativo e hidrolizado. **PARTE EXPERIMENTAL.**- Se obtuvieron extractos proteicos de los diferentes maíces criollos pigmentados mediante solubilización con etanol. Los extractos fueron sometidos a una hidrólisis extensiva con el sistema secuencial pepsina-pancreatina y se evaluó la capacidad antioxidante (métodos ABTS y DPPH) utilizando acetona y agua en la disolución de las muestras. **RESULTADOS.**-La capacidad antioxidante los 4 diferentes hidrolizados proteicos se incrementó (94-97%) respecto del extracto proteico (71-81%) en porcentaje de inhibición ($P \leq 0.05$) en los hidrolizados con ABTS y DPPH utilizando agua como disolvente mientras que cuando se utilizó acetona, los extractos proteicos presentaron mayor porcentaje de inhibición (71-93%) que los hidrolizados proteicos (33-47%) ($P \leq 0.05$). Por otra parte el extracto proteico de la variedad de maíz rojo presentó la mayor capacidad antioxidante (86.4 y 93.0%). **CONCLUSIONES.**- La hidrólisis enzimática de los diferentes extractos proteicos de maíz provocó un incremento significativo de la capacidad antioxidante.

1. INTRODUCCIÓN

El alimento de consumo popular en México por excelencia es el Maíz. Las variedades criollas de maíz se reconocen como aquellas que se pueden identificar por un mismo nombre o unidad de acuerdo con el agricultor (Louette 1995). En México se cultivan distintas variedades de maíces criollos de manera tradicional que contribuyen con la conservación de la diversidad de cultivos. Los productores que cultivan estas razas tradicionales mantienen las variedades reproduciéndolas de una generación a otra pudiendo llegar a formar nuevas variedades (Herrera y col., 2004).

Después de los hidratos de carbono, las proteínas son el siguiente componente químico de mayor importancia del grano. En las variedades comunes, el contenido de proteínas puede oscilar entre 6 y 18%, encontrándose en su mayor parte en el endospermo. Los tipos pisingallo y dulce en general presentan mayor contenido de proteínas que los tipos colorado duro y dentado (Lawton y Wilson 2003). Las proteínas de los granos del maíz están formadas al menos por cinco fracciones distintas según el esquema de Osborne (Hoseney 1994): albúminas y globulinas ($\approx 5\%$), prolaminas ($\approx 44\%$), glutelinas ($\approx 28\%$) y proteínas residuales ($\approx 17\%$), cantidades que son muy variables, dependiendo del tipo o variedad, además del método de separación utilizado.

Las prolaminas son un tipo de proteínas, solubles en alcohol, contenidas en diferentes cereales que reciben un nombre diferente dependiendo del grano en el que se encuentren, se denominan prolaminas porque tienen un gran contenido en prolina y glutamina. En el caso del Maíz, se le

conoce como Zeínas (Liu y col., 2005, Hernández-Espinosa y col., 2015). A las prolaminas en general se les atribuyen propiedades biofuncionales (Hoseney, 1994). Estas propiedades son influenciadas por el tipo de maíz del que proviene la proteína y puede ser modificada mediante hidrólisis enzimática (Gallegos-Tintoré y col., 2013).

La hidrólisis de las proteínas tiene como finalidad la ruptura de enlaces peptídicos dentro de la proteína originando péptidos de menor tamaño o bien aminoácidos libres lo que propician una mayor absorción por el cuerpo humano. La hidrólisis enzimática presenta ventajas como la selectividad en la ruptura de enlaces peptídicos que evita la aparición de productos de degradación. Además las condiciones de este tipo de hidrólisis no suelen dañar a la proteína ya que se da en condiciones de pH entre 5 y 9 y temperatura que oscila entre 40 y 60 °C manteniendo así el valor nutritivo de la proteína (Megías y col., 2004).

Las proteínas son polímeros lineales de α y L- aminoácidos que desempeñan una gran cantidad de funciones como estructurales, transportadoras y catalíticas (Badui Dergal, 2006), derivado de las proteínas encontramos a los péptidos bioactivos que presentan un impacto positivo o negativo en las células que pueden presentarse de manera natural o como producto de modificaciones enzimáticas, independientemente de su función nutricional, es decir, modulan la fisiología celular a través de interacciones a receptores específicos en células blanco (Madureira y col., 2010).

En general los péptidos bioactivos tienen entre 3 y 20 aminoácidos y actúan como moduladores y reguladores, la función de estos péptidos depende de la composición y secuencia de los aminoácidos que lo conforman. Por ejemplo, los péptidos antioxidantes tienen alto contenido en histidina y aminoácidos hidrófobos, los antitrombóticos son constituidos mayormente por isoleucina, lisina y ácido aspártico, en péptidos con capacidad hipercolesterolémica se encuentra en baja concentración la metionina-glicina y lisina-arginina pero con un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos a diferencia de los antitumorales que requieren de péptidos de cadena larga para su acción (Shoemaker y col., 2000).

Por lo anterior en este trabajo se propuso determinar los cambios en la actividad antioxidante de las proteínas extraídas en los diferentes maíces criollos pigmentados en su estado nativo e hidrolizado.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Se utilizaron 4 variedades criollas de maíz (*Zea mays* L.) provenientes de las siguientes regiones:

- Maíz Amarillo (MA): El Oro, Estado de México, altitud de 3300 metros sobre el nivel del mar y temperatura media anual de 14 °C.
- Maíz Morado (MM): El Oro, Estado de México, altitud de 3300 metros sobre el nivel del mar y temperatura media anual de 14 °C.
- Maíz Rojo (MR): Jiquilpan, Michoacán: altitud de 1560 metros sobre el nivel del mar y temperatura media anual de 20 °C.
- Maíz Rojo (MRT): Tlaxcala, altitud de 2200 metros sobre el nivel del mar y temperatura media anual de 22 °C.

Partiendo de harina de maíz previamente desgrasada de MA, MM, MR y MRT se realizó la extracción de zeína hasta obtener un extracto proteico para cada una de las muestras de las que se obtuvo el rendimiento, para los extractos CA, CM, CR Y CRT, se determinó la composición química proximal así como la capacidad antioxidante por los métodos ABTS DPPH. Se sometió a los 4 diferentes concentrados a una hidrólisis enzimática con pancreatina y pepsina

denominándolos ZA, ZM, ZR y ZRT. A Los hidrolizados proteicos se determinó actividad antioxidante por los métodos anteriormente mencionados.

Determinación de la composición proximal de la harina de maíz y extractos proteicos.

La composición proximal de las muestras fue determinada de acuerdo con la Association of analytical communities (AOAC, 1997) utilizando los métodos internacionales siguientes.

La determinación de humedad se llevó a cabo a 70 °C durante 4 horas y se calculó por diferencia de peso la humedad presente en la muestra utilizando el método 925.09.

La determinación de grasa (920,39) se realizó luego de 4 horas de extracción, utilizando hexano como disolvente. Partiendo de harina desgrasada y seca se determinó el contenido de nitrógeno utilizando el método de la AOAC 920.87, una vez establecido el contenido de nitrógeno total se utilizó como factor 6.25 para el cálculo de proteína.

La determinación de cenizas (923.03) se llevó a cabo a 600 °C hasta lograr la calcinación total de la muestra. Los carbohidratos, reportados como extracto libre de nitrógeno (ELN) se calculó por diferencia al 100%.

Extracción de zeínas

Las zeínas fueron extraídas según el método reportado por Dickey y col., (1998). El cual parte de muestras de harina de maíz criollo desgrasado, la cual fue suspendida con etanol al 70% en una relación de harina:disolvente 1:4 (p/v) a 60°C por un tiempo de 2h con agitación vigorosa, al término del cual se centrifugó a 3200g a 25°C/15 min, se separó el sobrenadante y se mantuvo en refrigeración, se realizaron 2 extracciones más al precipitado, para asegurar que se suspendiera la mayor cantidad de zeína contenida en la harina y al término de estas extracciones se reunieron los sobrenadantes, los cuales se secaron en estufa de vacío Shel-Lab, VWR Scientific, a 50 °C a 20 mbar.

Hidrólisis enzimática secuencial Pepsina-Pancreatina

Se obtuvieron los hidrolizados proteicos mediante la metodología reportada por Corzo-Rios y col. (2014) y para obtener grados de hidrólisis mayores al 10% se procedió de la siguiente manera: Se prepararon dispersiones del concentrado proteico en relación con su contenido de proteína al 4% (p/v) y se mantuvieron a 37 °C durante 10 minutos en un baño PolyScience de APSACOM con agitación constante. La dispersión del concentrado fue ajustada con HCl 1N a pH 2.5 y se agregó el volumen de pepsina necesario para mantener una relación E:S, 1:50 (v/v), teniendo la enzima concentrada al 4%.

La reacción se llevó a cabo durante 30 minutos, una vez transcurrido el tiempo se reajustó el pH a 7.5 con NaOH 1N para detener la acción de la pepsina (Sigma). Una vez ajustado el pH se procedió a la adición de la segunda enzima (pancreatina de páncreas de cerdo, P 32292) en relación E:S de 1:50 (v/v) a la misma temperatura y tiempo (37 °C, 30 minutos). La reacción enzimática fue detenida con un aumento de temperatura en la solución proteica a 80 °C durante 20 minutos. Los hidrolizados fueron secados en la estufa de vacío Shel-Lab, VWR Scientific, a 50 °C a 20 mbar.

Determinación de capacidad antioxidante. Método de 2,2-Difenil-1-picrihidrazilo (DPPH)

Se preparó una solución con el radical 2,2-difenil-1-picrihidrazilo (DPPH) $6 \cdot 10^{-5}$ M en metanol, protegiéndolo contra la luz; posteriormente se midió la absorbancia del radical a 517nm. Para realizar la prueba se añadió 2ml del radical DPPH y 50 μ l de la muestra para harina y extracto proteico, para la proteína hidrolizada se realizó una dilución 1:1; se agitó y a los 30 minutos se

leyeron las muestras a una longitud de 517nm. La curva tipo se realizó con Trolox con concentraciones de 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 y 1.1 mM.

Determinación de capacidad antioxidante con el radical 2,2'-Azinobis 3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico. ABTS

Se preparó una solución con el reactivo ABTS 7 mM con agua destilada y se mezcló 1:1 con una solución de persulfato de potasio 2.45mM; se dejó reposar 16 horas en la oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se diluyó con etanol hasta obtener una absorbancia de 0.7 (\pm 0.01) a una longitud de 754nm. Se tomaron 980 μ l del radical ABTS y 20 μ l de la muestra de harina y extracto proteico, para la proteína hidrolizada se diluyó 1:1 y se tomaron 20 μ l y se midió su absorbancia. Se realizó una curva tipo con Trolox a las concentraciones de 0.1, 0.24, 0.5, 0.75, 1 y 1.25 mM.

3. RESULTADOS

Análisis químico proximal

El contenido proteico del maíz según la FAO (1993) para variedades comunes se encuentra entre 8 y 11% del peso del grano en base seca, White y Johnson (2003) reportaron el porcentaje de proteínas en maíz entre 8.10 y 11.50%. Guzmán y Andrés (2000) determinaron un intervalo de contenido proteico entre 8.34 y 12.88 % en base seca, similarmente Bressani y col. (1990), reporta para variedades híbridas de maíz de alta calidad proteica el 10% en peso del grano de proteína. Ortiz (2006) analiza la composición química proximal de variedades de maíz reportando para variedades azules un rango en contenido proteico entre 8.85 y 11.50%, para especímenes rojos entre 11.27 y 11.87% y para variedades blancas 11.23 y 11.56%.

La extracción de prolaminas en las variedades de maíz rojo (MRT y MR) se encuentra dentro de los valores reportados por Pérez (2009), ya que los porcentajes proteicos que indica se encuentran entre 55 y 60% semejantes a los encontrados para maíces rojos del 56 y 57%, sin embargo, para las variedades de maíz morado y amarillo (MM y MA) se encuentra en 46.45% y 48.40% respectivamente, los porcentajes reportados se encuentran por debajo de lo encontrado por Pérez (2009) ya que éste reporta un contenido de 60 a 70 % de proteína y en este trabajo se extrajo entre el 46.45% y el 48.40%. Lo anterior puede deberse a las diferencias genéticas del grano en cuanto a la composición de su proteína total.

Cuadro 2. Composición química proximal de maíces criollos en porcentaje en base seca (g/100 g).

Muestra	Humedad	Extracto etéreo	Proteína	Cenizas	ELN
MRT	5.29 \pm 0.22	7.57 \pm 0.33	16.75 \pm 0.33	1.31 \pm 0.05	69,08
MR	5.99 \pm 0.33	7.49 \pm 0.31	14.90 \pm 0.03	1.45 \pm 0.35	70,17
MM	4.99 \pm 0.25	5.26 \pm 0.04	11.50 \pm 0.48	1.30 \pm 0.16	76,95
MA	4.52 \pm 0.08	6.54 \pm 0.16	10.84 \pm 0.40	1.07 \pm 0.08	77,03

Capacidad antioxidante

En las figuras 1 a 4, se presentan los resultados en porcentaje de inhibición para las diferentes harinas, extractos proteicos e hidrolizados. Si bien, los valores entre cada determinación son diferentes, las condiciones de extracción fueron iguales en todos los casos. La capacidad antioxidante los 4 diferentes hidrolizados proteicos se incrementó (94-97%) respecto del extracto proteico (71-81%) en porcentaje de inhibición ($P \leq 0.05$) en los hidrolizados con ABTS y DPPH utilizando agua como disolvente mientras que cuando se utilizó acetona, los extractos proteicos presentaron mayor porcentaje de inhibición (71-93%) que los hidrolizados proteicos (33-47%) ($P \leq 0.05$).

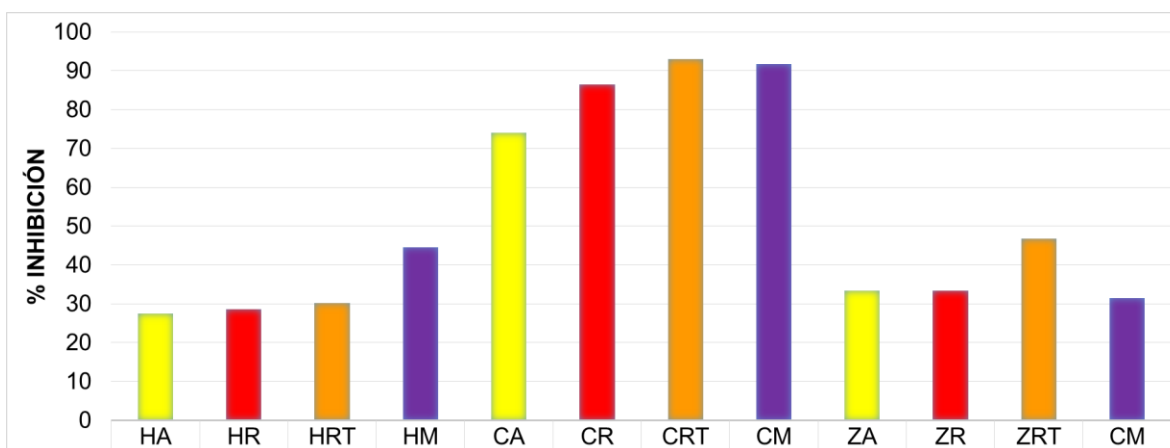


Figura 1. Capacidad antioxidante reportada como % de inhibición de ABTS para muestras extraídas con acetona.

En las determinaciones de la capacidad antioxidante utilizando ambos radicales (ABTS y DPPH) cuando las muestras fueron extraídas con acetona para la determinación de captación de radicales libres (figura 1 y 3), se observa que las harinas (HA, HR, HRT Y MH) presentan la menor captación de radicales libres, seguidas de los hidrolizados proteicos (ZA, ZR, ZRT Y ZH) y presentando mayor capacidad antioxidante se encuentran los extractos proteicos de maíz (CA, CR, CRT, CM).

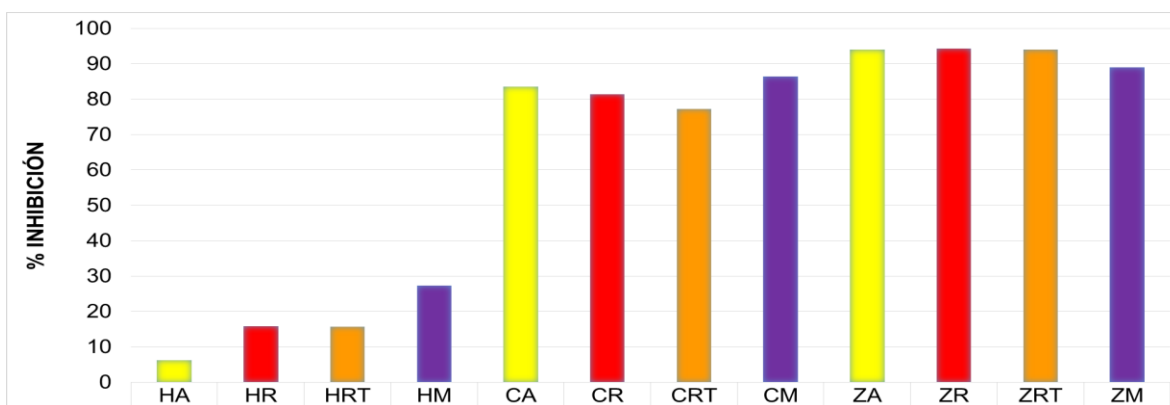


Figura 2. Capacidad antioxidante reportada como % de inhibición de ABTS para muestras extraídas con agua.

Este comportamiento difiere de las determinaciones donde se utilizó agua para solubilizar las diferentes muestras, se puede observar en las figuras 2 y 4 que los hidrolizados son los de mayor captación de radicales libres, seguidos de los extractos proteicos y finalmente las harinas.

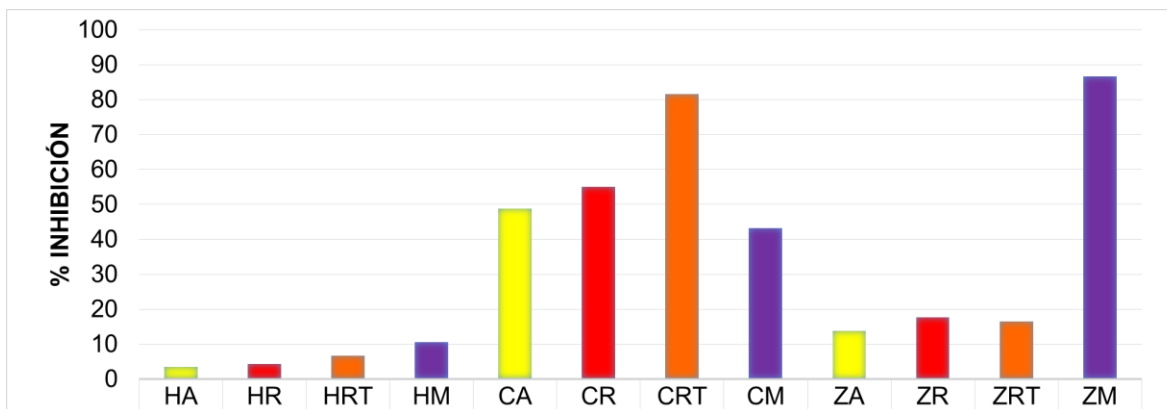


Figura 3. Capacidad antioxidante reportada como % de inhibición, determinado con DPPH para muestras extraídas en acetona.

El uso de acetona en los ensayo tenía el objetivo de preservar los pigmentos a extraer, sin embargo, durante el proceso de la hidrólisis enzimática fue necesario elevar la temperatura a 80 °C, temperatura que daña los compuestos que imparten color en el maíz como antocianinas, carotenoides y zeaxantinas (Badul Dergal 2006), aunado a esto, la hidrólisis enzimática redujo la solubilidad de los hidrolizados en acetona debido al aumento de propiedades elásticas y de formación de geles, motivo por el cual la captación de radicales se veía limitada. López y García-Galindo (2009), evaluaron la capacidad antiradical mediante el uso de ABTS y DPPH, utilizando metanol y agua como disolventes para las determinaciones, ellos reportan un comportamiento similar, los solubilizados en metanol presentan una actividad aproximadamente menor en 50% respecto de las solubilizadas en agua.

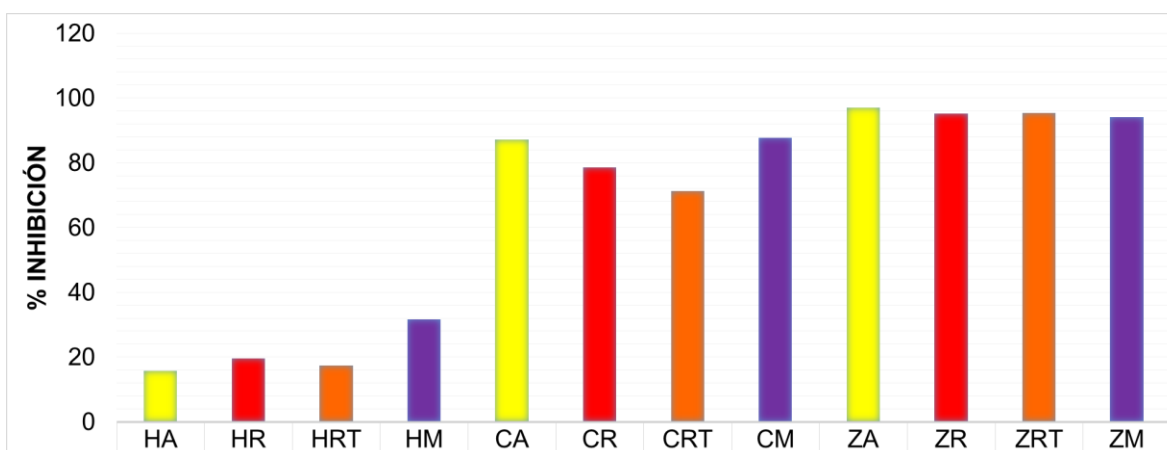


Figura 4. Capacidad antioxidante reportada como % de inhibición determinado con DPPH, para muestras extraídas con agua.

En el caso del hidrolizado de maíz morado (ZM), el porcentaje de inhibición no se ve afectado por la solubilidad en este estudio en concordancia con el citado anteriormente, debido al contenido superior de antocianinas respecto de los otros. La solubilidad del extracto proteico de maíz disminuye al ser sometido a una hidrólisis.

4. CONCLUSIONES

Los hidrolizados proteicos presentan capacidad antioxidante superior al 90% mientras que los extractos proteicos de maíz oscilan entre 84-88% y las harinas integrales presentan una actividad por debajo del 30%, en su extracción acuosa.

La captación de radicales libres de la proteína hidrolizada de maíz amarillo presentó un mayor porcentaje (96.97) de inhibición seguida de las variedades rojas (95.2% para ZR y 95.34% para ZRT), la variedad morada fue la de menor captación de radicales libres en solución acuosa.

Agradecimiento: Al Instituto Politécnico Nacional por el apoyo económico mediante Beca BEIFI de la SIP a Pluma-Villicaña Brenda Carolina

BIBLIOGRAFÍA

1. Badui Dergal, S. (2006). *Química de los Alimentos*. (Cuarta Edición). México: Pearson Educación.
2. Bressani, R., Benavides, V., Acevedo, E. and Ortiz, MA., 1990. Changes in select nutrient contents and in protein quality of common and quality – protein maize during rural tortilla preparation. *Cereal Chem.* 67 (6): 515–518.
3. Corzo-Rios, L. J., Solorza-Feria, J., Betancur-Ancona, D. A., & Chel-Guerrero, L. A. (2014). Rheological properties and gel strength of Phaseolus lunatus protein/carboxymethylated flamboyant gum systems. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(6), 1513–1521.
4. Dickey LC., Dallmer MF., Radewonuk ER., Parris, N., Kurantz, M. and Craig, JnbC., 1998. Zein bath extraction from dry-milled corn cereal disintegration by dissolving fluid shear. *Cereal Chem.* 75, 443 – 356.
5. Gallegos-Tintoré, S., Chel-Guerrero, L., Corzo-Rios, L. J., & Martínez-Ayala, A. (2013). Péptidos con actividad antioxidante de proteínas vegetales. In M. Segura-Campos, L. Chel-Guerrero, & D. Betancur-Ancona (Eds.), *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* (pp. 111–122). Barcelona: OmniaScience
6. Guzmán, LB., Andrés GJ. 2000. Comparación de la calidad de maíces criollos y sus versiones genéticamente mejorados por recruza limitada. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. México.
7. Hernández-Espinosa N, Reyes-Reyes M, González-Jiménez F.E., Núñez-Bretón L.C., Cooper-Bribiesca B.L. 2015. Importancia de las proteínas de almacenamiento en cereales (prolaminas). *VERTIENTES Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 18(1):3-7, 2015.
8. Herrera C., Castillo G.F., Sánchez GJ., Hernández CJ., Ortega PR. y Major GM.; 2004. Diversity of chalqueño maize; *Agrociencia*. 38: Pág. 191-206.
9. Hosney RR. 1994. Protein of cereals. En: *Principles of Cereal Science and Technology*, American Association of Cereal Chemists Inc. St. Paul, Minnesota, Pág 65-79
10. Lawton JW y Wilson CM. 2003. Proteins of the kernel. En: White PJ y Jonson LA, editores. *Corn: Chemistry and Technology*. Segunda Edición. St. Paul, Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists. Pág. 313-354

11. Liu X., Sun Q., Zhang, L., Wang J.Y. (2005) "Microspheres of corn protein, zein, for an ivermectin drug delivery system." *Biomaterials*. Pág. 109-115
12. López Martínez, Leticia Xochitl; García-Galindo, H. Sergio Actividad antioxidante de extractos metanólicos y acuosos de distintas variedades de maíz mexicano *Nova Scientia*, vol. 2-1, núm. 3, noviembre-abril, 2009, pp. 51-65
13. Louette, D. 1995. Intercambio de semillas entre agricultores y flujo genético entre variedades de maíz en sistemas agrícolas tradicionales. En: J.A. Serratos, M.C. Willcox y F. Castillo G. (eds.). *Memoria del Foro: Flujo Genético entre Maíz Criollo, Maíz Mejorado y Teocintle: Implicaciones para el Maíz Transgénico*. INIFAP CIMMYTCNBA. El Batán, Estado de México. Pág. 60-71.
14. Madureira, A. R., Tavares, T., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2010). Invited review: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 93(2), 437–455.
15. Megías, C., Yust, M. M., Pedroche, J., Lquari, H., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F. y Vioque, J. (2004). Purification of an ACE inhibitory peptide after dydrolisis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1928 – 1932
16. Ortiz PS. 2006. Determinación de la composición química proximal y fibra dietaria de 43 variedades criollas de maíz de 7 municipios del sureste del estado de Hidalgo. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. Pág. 50-54.
17. Rangel-Meza E., Muñoz OA., Vázquez-Carrillo G. Cuevas-Sánchez J., Merino- Castillo J. y Miranda-Colín S. 2004. Nixtamalización, Elaboración y Calidad de Tortilla de Maíces de Ecatlán, Puebla, México. *Agrociencia*, Vol. 38, Número 001, pp. 53-61
18. Shoemaker W. C., Ayres M. S., Grenvik A., Holbrook P. R. 2000. *Tratado de medicina crítica y terapia intensive*, Cuarta edición, Editorial Panamericana, Uruguay, Pág. 508-510.
19. Vázquez CM., Guzmán BL., Andrés GJ. Márquez SF. y Castillo MJ. 2003. Calidad de Grano y Tortillas de Maíces Criollos y sus Retrocruzas. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 26 (4): 231-238.
20. White PJ y Johnson LA. 2003. *Corn chemistry and technology*, second edition. American Association of cereal chemists, Inc. St. Paul, Minnesota, USA. Pág. 128-129

PRODUCCIÓN DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS A PARTIR DE HONGOS AISLADOS DE MUESTRAS AMBIENTALES DE CUATRO CIÉNEGAS, COAHUILA.

Dafne Hebe Ramírez Lozano¹, Alma Soria Ortiz², Baltazar Gutiérrez Rodríguez², Erika Yanneth Acosta Cruz², Yolanda Garza García¹ y José Gerardo Gaona Lozano¹.

^{1,2}Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, CP 25280.

RESUMEN

La celulosa es el polímero más abundante en la naturaleza y en la actualidad una fuente de energía promisoría. Su transformación biológica es posible gracias a la acción de microorganismos capaces de producir diferentes tipos de celulasas. El objetivo del presente trabajo se centra en la reactivación de cepas fúngicas aisladas a partir de muestras ambientales de Cuatro Ciénegas, Coahuila y la evaluación de su actividad celulolítica para determinar su potencial para degradar celulosa con la finalidad de producir estas enzimas para su aplicación Biotecnológica. Para explorar la diversidad fúngica se realizaron estudios macroscópicos y microscópicos de 24 cepas de la colección de hongos del departamento de Biotecnología, la actividad celulolítica de estas cepas fue evaluada cualitativamente mediante el revelado de halos de hidrólisis con rojo-congo en medio Carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato y cuantitativamente mediante la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), se seleccionaron siete cepas fúngicas que presentaron actividad celulolítica. La identificación de las cepas seleccionadas se realizó empleando técnicas moleculares mediante el análisis de la secuencia nucleotídica del gen 18S SSU ARNr, predominando los géneros *Penicillium*, *Alternaria* y *Phaeosphaeria*.

1. INTRODUCCIÓN

La lignocelulosa es el polímero más abundante en la naturaleza, constituido principalmente por celulosa. La descomposición de la celulosa se da naturalmente por microorganismos como: protozoarios, bacterias y hongos (1). Los hongos tienen la facilidad de colonizar rápidamente el sustrato produciendo diferentes complejos enzimáticos, entre ellos el complejo enzimático celulasa, que interviene en la descomposición de la celulosa, constituido principalmente por tres tipos de enzimas hidrolíticas; endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas; estas actúan sinérgicamente en la degradación de la celulosa liberando moléculas de glucosa (2). Las endoglucanasas atacan las regiones amorfas de la fibra de celulosa, creando así sitios para las exoglucanasas las que entonces proceden hacia las regiones cristalinas de la fibra. Las β -glucosidasas llevan a cabo el último paso de la hidrólisis e impiden la acumulación de la celobiosa, la que inhibe a las exoglucanasas (3). Los procesos de obtención de celulasas consisten en la utilización de un microorganismo que tenga la habilidad de sintetizar fácilmente las enzimas y un sustrato inductor que promueva la formación del complejo enzimático. Entre los hongos más utilizados en la producción de azúcares fermentables se encuentran las especies *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* y *Penicillium* (4,5). Actualmente las celulasas pueden ser empleadas en diferentes industrias como alimentos, textiles, papel, con la finalidad obtener un producto con mejores propiedades y características, aumentando su valor agregado, reduciendo los costos y sin contaminar el ambiente (6).

Cuatro Ciénegas, como componente del ecosistema del Desierto de Chihuahua, forma parte del complejo de grandes desiertos de Norteamérica. El estudio micológico de la zona es muy limitado, ya que solo corresponden a taxones fúngicos entre el 1 al 2.5 % de los filotipos identificados en los sustratos terrestres y acuosos estudiados (7).

2. PARTE EXPERIMENTAL

Estudios macroscópicos y microscópicos de las cepas en estudio.

Para explorar la diversidad fúngica se realizó la reactivación de 24 cepas de la colección de hongos provenientes de muestras ambientales de Cuatrociénegas, Coahuila, las cuales fueron reactivadas por siembra por picadura, en cajas Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA) y Agar Dextrosa Saboreaud (SDA). Se realizaron estudios macroscópicos que consistieron en evaluar el color de la colonia, textura y tasa de crecimiento. Para los estudios microscópicos se realizaron preparaciones en fresco con azul de algodón lactofenol para su observación al microscopio a 10x y 40x.

Evaluación cualitativa de la actividad celulolítica de las cepas de hongos en estudio.

La evaluación de la producción de enzimas celulolíticas se llevó a cabo mediante la observación de una zona clara formada alrededor de la colonia de hongos por reacción entre las enzimas secretadas por los hongos y los sustratos cromogénicos, de acuerdo a la técnica descrita por Yoon y colaboradores utilizando el medio Agar Rojo-Congo a base de Carboximetil-celulosa al 0.5 % (8).

Identificación Molecular de las cepas fúngicas seleccionadas.

Para llevar a cabo la identificación molecular se realizaron ensayos de acuerdo al método descrito por James Borneman y R. Jack Hartin (9), que incluye la extracción de ADN genómico utilizando el kit comercial NucleoSpin Plant II (Macherey Nagel), siguiendo las recomendaciones del proveedor con algunas modificaciones realizadas en el laboratorio. La verificación de la concentración e integridad del ADN extraído se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.9%; posteriormente la amplificación por PCR de un fragmento de 422 pb del gen 18S ARNr SSU (small subunit 18S RNA) a partir del ADN genómico extraído, seguido de la secuenciación de los productos de PCR mediante un servicio externo (Macrogen, USA) y finalmente se realizaron alineamientos (BLAST) con cada una de las secuencias obtenidas de los amplificadores (422 pb) empleando la base de datos "Standar Nucleotide" del NCBI.

3. RESULTADOS

Estudios macroscópicos y microscópicos

La morfología macroscópica mostro diversidad de color en cada una de las colonias, que va desde el color café oscuro, a verde oscuro, blanco, crema y algunas con pigmentos rojos, presentan apariencia algodonosa, aterciopelada y pulverulenta, su tasa de crecimiento alcanza alrededor de los 4 a 7 días. La morfología microscópica muestra hifas septadas y en algunas cepas no septadas, hialinas, con conidias redondas, elípticas y hialinas, el aparato reproductor es conidióforo que en algunas cepas es recto y en otras es ramificado. La Figura 1 presenta las imágenes macroscópicas y microscópicas observadas en 7 de las 24 cepas estudiadas.

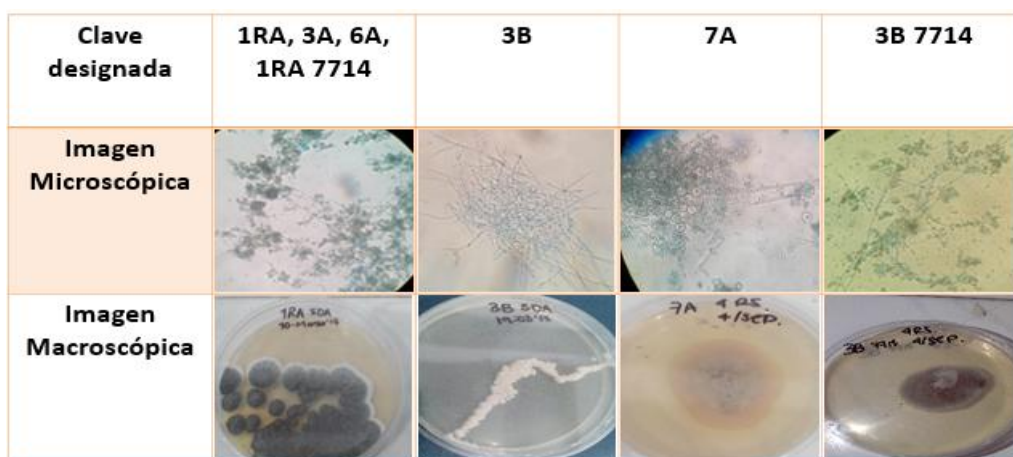


Figura 1.- Descripción de las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de las cepas fúngicas.

Cepa	3B	1RA 7714	3A	1RA
Diámetro (cm)	3.2	3.1	2.7	2.6
Imagen				
Cepa	6A	3B 7714	7A	2C 7714
Diámetro (cm)	2.5	2.05	1.05	-
Imagen				

Figura 2.- Cepas fúngicas con Actividad Celulolítica.

Actividad Celulolítica.

A partir de las 19 cepas sometidas a la evaluación de la producción de enzimas celulolíticas, se seleccionaron 7 cepas productoras de celulasas. Durante la evaluación estas cepas fueron las que presentaron halos de hidrólisis alrededor de la colonia del hongo indicando la presencia del complejo celulolítico, ya que la prueba de rojo-congo se basa en que este colorante interacciona con los polisacáridos que tienen unidades D-glucopiranosil contiguas unidas por enlaces β -(1-4). La ventaja de este sistema deriva del intenso color del complejo colorante-glucano el cual permite la diferenciación visual entre organismos que utilizan celulosa y los que no. En la Figura 2 se muestran las cepas que presentaron halos de hidrólisis y el diámetro alcanzado al finalizar los 5 días de incubación, la cepa 2C 7714 se usó como testigo ya que esta no muestra actividad celulolítica.

Identificación Molecular de las cepas fúngicas seleccionadas.

Después de seleccionar las cepas que presentaron actividad celulolítica, se llevaron a cabo pruebas moleculares para su identificación. La figura 3 presenta la imagen obtenida después del procedimiento de la PCR en el cual se obtuvieron los fragmentos amplificados de ADN de cada cepa (422 pb). Se identificaron los siguientes géneros de hongos, *Penicillium*, *Alternaria* y *Phaeosphaeria* con los alineamientos correspondientes de las secuencias obtenidas.

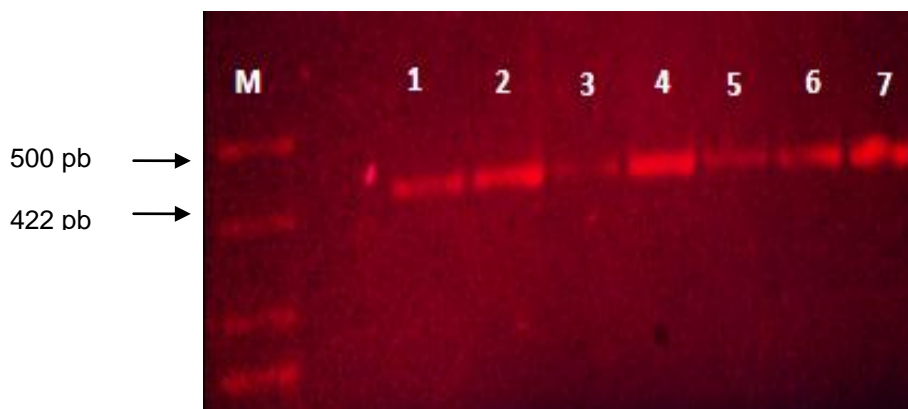


Figura 3.- Gel de agarosa al 1.8% mostrando los amplicones obtenidos por PCR. M) Marcador Hyperladder V 500 pb; 1) 1RA; 2) 3A; 3) 3B; 4) 6A; 5) 7A; 6) 1RA 7714; 7) 3B 7714

4. CONCLUSIONES

De las 24 cepas de la colección de muestras ambientales de Cuatrociénegas, Coahuila se logró reactivar un total de 19 cepas fúngicas de las cuales no se tenían registros macroscópicos y microscópicos. La actividad celulolítica se evidenció mediante la evaluación cualitativa con el revelado de zonas de aclaramiento utilizando rojo-congo, se seleccionaron 7 cepas fúngicas que presentaron actividad celulolítica de un total de 19 cepas. Mediante técnicas moleculares, se obtuvo la identificación de las cepas en estudio, obteniendo tres géneros de hongos, que se compararon con la identificación descrita anteriormente en la morfología microscópica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gupta Pratima, Samant Kalpana and Sahu Avinash. Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria and Determination of their Cellulolytic Potential. International Journal of Microbiology. Article ID 578925, 5 pages. doi:10.1155/2012/578925. 2012
2. Dashtban Mehdi, Schraft Heidi and Qin Wensheng. "Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives". International Journal of Biological Sciences. Vol. V, No. 6:578-595. 2009.
3. Arroyo Cruz José. "Selección de microorganismos fúngicos productores de enzimas celulolíticas para hidrolizar bagazo de agave (*Agave tequilana*)". Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 2010.

4. Suesca Díaz Adriana. Producción de enzimas celulolíticas a partir de cultivos de *Trichoderma* sp. con biomasa lignocelulósica. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental. Bogotá D.C., Colombia. 2012.
5. Pérez Valiente Ramiro Andrés. Screening efectivo de actividad Celulolítica Microbiana. Universidad de la Republica Uruguay. 2013.
6. Chacon O., Waliszewski. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y ciencia*. Vol: 21 (42) p 111-120. 2005.
7. Hendrickson D., Marks C., Moline B., Dinger C, Cohen E. Combining ecological research and conservation: a case study in Cuatro Ciénegas, Mexico. In: Stevens L., Meretsky V.J. (eds). *Every last drop: ecology and conservation of North American desert springs*. University of Arizona Press, Tucson, pp 127–157. 2008.
8. Ji Hwan Yoon, Ji Eun Park, Dong Yeon Suh, Seung Beom Hong, Seung Ju Ko and Seong Hwan Kim. Comparison of Dyes for Easy Detection of Extracellular Cellulases in Fungi. *Mycobiology* 35(1): 21-24. 2007.
9. James Borneman and R. Jack Hartin. PCR Primers That Amplify Fungal rRNA Genes from Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 66, No. 10, p. 4356-4360. 2000.

VALIDAR MEDIANTE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS LOS TIEMPOS Y LAS TEMPERATURAS MÍNIMAS DE COCIMIENTO REQUERIDOS PARA INACTIVAR LAS ENZIMAS DESCARBOXILADORAS EN ATÚN ALETA AMARILLA (*Thunnus albacares*)

Irma Lorena Sánchez-Humarán¹, Gabriela del C. Suárez-Lizárraga¹, Sergio Saúl Osuna-Peraza¹,
Alma V. Suárez-Lizárraga²,

¹ Instituto Tecnológico de Mazatlán, ²Colegio de Bachilleres del Estado de Sinaloa No. 95,
Mazatlán, Sin.

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó microbiológicamente el músculo del atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) durante la etapa de cocimiento hasta el enfriamiento, con el fin de encontrar bacterias formadoras de enzimas descarboxiladoras de histidina. A todas las muestras seleccionadas se le realizaron análisis microbiológicos sembrando en medio selectivo Niven. Las muestras de pescado crudo fueron tomadas antes de la entrada a los cocedores y de pescado cocido después de la salida de cocedores, todas las muestras fueron tomadas por triplicado. Los métodos utilizados fueron los recomendados por NOM-242-SSA1-2009 bienes y servicios. Productos de la pesca. Pescados frescos-refrigerados y congelados. Especificaciones sanitarias. NOM-056-SSA1-1993. Requisitos sanitarios del equipo de protección personal. NOM-109-SSA1-1994. Procedimiento para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para sus análisis microbiológicos y NOM-110-SSA1-1994. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico y las guías de la FDA. Los resultados microbiológicos obtenidos permitieron llevar un control sobre los tiempos y temperaturas mínimas de cocimiento del atún aleta amarilla (AAA) de cada una de las tallas muestreadas y ver que las enzimas se inhiben al aplicar la formulación correcta (tiempo-temperatura). Se estableció que la metodología actual para seleccionar la pieza más crítica (más fría y con mayor peso) durante el proceso, la correcta inserción de los sensores y la ubicación en la zona fría, fue efectiva para el monitoreo de este estudio. La técnica microbiológica propuesta para los análisis cumplió con las expectativas planteadas para este método.

1. INTRODUCCION

La alimentación adecuada es una pieza importante para la salud del ser humano y una calidad de vida apropiada, como bien es sabido, los alimentos son portadores de energía e importantes nutrientes que ayudan a tener un buen funcionamiento en nuestro cuerpo. Uno de los problemas de mayor índole en la pérdida de salud para el ser humano y para cualquier organismo en general es causado por la ingesta de alimentos contaminados, ya sea por microorganismos patógenos o toxinas que alteran sus propiedades nutricionales (Anders *et al.*, 2009). En el caso particular del pescado, los microorganismos presentes varían de la zona superficial y del contenido intestinal. La microflora que posee el pescado no es homogénea y dependerá del ambiente, lugar y del sistema de captura, de igual forma la contaminación que provoque el hielo utilizado para su conservación y de los tratamientos a bordo, así como también la mala manipulación que tenga el personal que tiene contacto directo con el pescado (Gingerich *et al.*, 2000). En el presente estudio, se evaluó el efecto de los tiempos y temperaturas del pescado en las etapas de descongelado a enfriamiento y su repercusión de la formación de histamina en producto en proceso.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Plan de muestreo: se tomaron las tallas más críticas del pescado atún aleta amarilla antes de entrar al cocedor para determinar la presencia o ausencia de enzimas descarboxiladoras. Se muestrearon distintas tallas de pescado a temperaturas mayores o iguales a 0°C en la etapa de descongelado y después de la etapa de cocimiento.

Determinación de bacterias formadoras de enzimas descarboxiladoras de histidina: para determinar la presencia de bacterias formadoras de enzimas descarboxiladoras de histidina se utilizó la técnica de estría cruzada. Esta técnica de estría en placa permitió el reconocimiento de bacterias descarboxiladoras de histidina para la producción histamina de acuerdo con Niven *et al.*, (2005).

Determinación de tiempos y temperaturas mínimas de cocimiento: se deben observar los resultados para la prueba de bacterias formadoras de enzimas descarboxiladoras de histidina después del cocimiento, si existen resultados positivos implementar medidas correctivas y ajustar los tiempos y temperaturas y proceder a realizar los análisis correspondientes para confirmar la ausencia de estos microorganismos.

3. RESULTADOS

En la figura 1 se puede observar el cambio en la coloración del medio de cultivo Niven por la presencia de bacterias que producen enzimas descarboxiladoras (cajas con coloración morada) y el color permaneció intacto en las cajas donde hay ausencia de bacterias que producen enzimas descarboxiladoras (cajas con coloración amarilla).



Figura 1. Medio Niven con desarrollo colonial de **bacterias productoras** de enzimas descarboxiladoras (**parte superior**) y **bacterias no productoras** de enzimas descarboxiladoras (**parte inferior**)

En las siguientes tablas (1 a 5) se muestran los resultados de los análisis microbiológicos realizados al atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*).

Tabla 1. Número de muestreos, fecha de realización de análisis y resultados de análisis microbiológicos (Pruebas 1-6).

No. de muestreo	Fecha de muestreo	Cocedor	Cocida	Barco	Talla	Rack	Resultados análisis microbiológicos (Presencia/Ausencia)
1	27/08/13	4	1	Clipperton	3	C0052	Presencia
2	27/08/13	4	1	Clipperton	3	C0052	Presencia
3	27/08/13	4	1	Clipperton	3	C0051	Presencia
4	28/08/13	4	1	Clipperton	3	C0052	Ausencia
5	28/08/13	4	1	Clipperton	3	C0052	Ausencia
6	28/08/13	4	1	Clipperton	3	C0051	Ausencia

Tabla 2. Número de muestreos, fecha de realización de análisis y resultados de análisis microbiológicos (Pruebas 7-12)

No. de muestreo	Fecha de muestreo	Cocedor	Cocida	Barco	Talla	Rack	Resultados análisis microbiológicos (Presencia/Ausencia)
7	03/09/13	5	1	Ma Isabel	2	C0046	Presencia
8	03/09/13	5	1	Ma Isabel	2	C0046	Presencia
9	03/09/13	5	1	Ma Isabel	2	C0047	Presencia
10	04/09/13	5	1	Ma Isabel	2	C0046	Ausencia
11	04/09/13	5	1	Ma Isabel	2	C0046	Ausencia
12	04/09/13	4	1	Ma Isabel	2	C0047	Ausencia

Tabla 3. Número de muestreos, fecha de realización de análisis y resultados de análisis microbiológicos (Pruebas 13-18)

No. de muestreo	Fecha de muestreo	Cocedor	Cocida	Barco	Talla	Rack	Resultados análisis microbiológicos (Presencia/Ausencia)
13	10/09/13	3	1	2	C0075	Presencia	
14	10/09/13	3	1	2	C0075	Presencia	
15	10/09/13	3	1	2	C0076	Presencia	
16	10/09/13	3	1	2	C0075	Ausencia	
17	10/09/13	3	1	2	C0075	Ausencia	
18	10/09/13	3	1	2	C0076	Ausencia	

Tabla 4. Número de muestreos, fecha de realización de análisis y resultados de análisis microbiológicos (Pruebas 19-24)

No. De muestreo	Fecha de muestreo	Cocedor	Cocida	Barco	Talla	Rack	Resultados análisis microbiológicos (Presencia/Ausencia)
19	19/03/14	6	3	Azteca 10	9-10	C0680	Ausencia
20	19/03/14	6	3	Azteca 10	9-10	C0680	Ausencia
21	19/03/14	6	3	Azteca 10	9-10	C0680	Ausencia
22	19/03/14	6	3	Azteca 10	9-10	C0680	Ausencia
23	19/03/14	6	3	Azteca 10	9-10	C0680	Ausencia
24	19/03/14	6	3	Azteca 10	9-10	C0680	Ausencia

Tabla 5. Número de muestreos, fecha de realización de análisis y resultados de análisis microbiológicos (Pruebas 25-30)

No. de muestreo	Fecha de muestreo	Cocedor	Cocida	Barco	Talla	Rack	Resultados análisis microbiológicos (Presencia/Ausencia)
25	26/03/14	7	4	Azteca 7	8-9	C0677	Presencia
26	26/03/14	7	4	Azteca 7	8-9	C0677	Presencia
27	26/03/14	7	4	Azteca 7	8-9	C0677	Presencia
28	26/03/14	7	4	Azteca 7	8-9	C0677	Ausencia
29	26/03/14	7	4	Azteca 7	8-9	C0677	Ausencia
30	26/03/14	7	4	Azteca 7	8-9	C0677	Ausencia

4. CONCLUSIONES

El comportamiento de temperatura en los cocedores no fue uniforme al presentar una diferencia de hasta 6°F en un punto y otro, sin embargo esto no impactó en las pruebas realizadas, ya que se tomaron estas zonas frías como críticas a la hora de realizar los muestreos. Se estableció que la metodología actual para seleccionar la pieza más crítica (más fría y con mayor peso) durante el proceso, la correcta inserción de los sensores y la ubicación en la zona fría, fue efectiva para el monitoreo de este estudio. La técnica microbiológica propuesta para los análisis cumplió con las expectativas planteadas para este método. De acuerdo a los muestreos del 1 al 18 y 25 al 30, los resultados de los análisis microbiológicos de la prueba de Niven fue positivo (presencia de enzimas descarboxiladoras) para pescado crudo durante todo el periodo de investigación, confirmando que la materia prima trae inherente enzimas descarboxiladoras. Esto se observó por un cambio de pH debido a la descarboxilación de histidina, excepto en el muestreo 19-21 que en pescado crudo mostro un resultado negativo que quiere decir que ahí no existió un cambio de pH que indique que existen enzimas descarboxiladoras. En pescado cocido nunca se presentó un cambio de coloración en el medio (no existió cambio de pH) esto indica que se inhibió a la enzima descarboxiladora en la etapa de cocimiento. No se le recomendó a la empresa Pescado Industrializados S.A. de C.V. que estableciera medidas correctivas en esta etapa del proceso (descongelado-cocimiento) debido a que se cumplió satisfactoriamente con los objetivos planteado al inicio de la investigación.

BIBLIOGRAFIA

1. Acuff, G., A.L. Izat and G. Firme (2001). "Microbial flora on pond-reared tilapia (*Tilapia aurea*) held on ice". *J. FoodProt.* 47, 778-780
2. Addison, R.F. and J.E. Stewart. (2003). "Domoic acid and the Eastern Canadian molluscan shellfish industry". *Aquaculture* 77, 263–269.

3. Anders, A. y Brekken, B. (2009). "La degradación del tejido, liberación y descomposición microbiana de los aminoácidos del capelán almacenado a granel". *J. Sci Food Agric.* 4 (5): P. 56-60.
4. Anders Aksnes and Bjorn Brekken. (1990). "*Tissue degradation, Amino Acid Liberation and Bacterial descomposition of Bulk Stored Capelin*". *J. Sci Food Agric.* 45:56–60, 990.
5. Eglee, Ruiz. (2012). Histamina en el pescado. Estac. Exp. Dtto. Federal pag 1
6. Elika. (2013). "Histamina". [en línea]. Arkaute: España. [Consulta: 10 de abril de 2014]. Disponible en: http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/Documento100/13.Histamina.pdf
7. FAO.(2000)."Las negociaciones comerciales multilaterales sobre la agricultura, manual de referencia". Roma. [Consulta: 12 de enero de 2014]. Disponible en: <http://www.fao.org/DOCREP/003/X7354S/X7354S00.HTM>
8. Food and Drug Administration. (2011). "Fish and fishery products hazards and controls guidance". fourth edition.Chapter 12: pathogenic bacteria growth and toxin formation (other than clostridium botulinum) as a result of time and temperature abuse.
9. Food and Drug Administration (FDA). (2012). "Bad Bug Book. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook". 2nd Edition.Gram, L. 2010. Identification, characterization and inhibition of bacteria isolated from tropical fish. Ph. D. Thesis. The Technological Laboratory of the Danish Ministry of Fisheries and The Royal Veterinary and Agricultural University.
10. Galleguillos, M. (2000). "Aminas biogénicas nuevos indicadores químicos utilizados como criterios de calidad en harinas de pescado. Control de calidad de insumos y dietas acuícolas, documento preparado por el proyecto: Apoyo a las actividades regionales de Acuicultura en América Latina y el Caribe". *Aquila II*: 187-190.
11. Gingerich, T., Lorca, T., Flick, G., Pierson, M. y Mcnair, H. (2000). "Biogenic amine survey and organoleptic changes in fresh, stored, and temperature-abused bluefish (*Pomatomus saltatrix*)". *Journal of Food Protection.* P.1033-1037.
12. Niven, C. F. JR.; Jeffrey, M. B. y Corlett, D.A. JR. (2005). "Differential Plating Medium for Quantitative Detection of Histamine-Producing Bacteria". *Del Monte Research Center, Walnut Creek, California* P.78-80

PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE COMPUESTOS DERIVADOS DEL 2-AMINOBENZIMIDAZOL Y 2-AMINOBENZOTIAZOL

Bautista Ramírez María Esther¹, Gómez y Gómez Yolanda¹, Cruz Alejandro²,

Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Departamento de Bioprocesos¹, Departamento de Ciencias Básicas².

RESUMEN

Los radicales libres son especies químicas que contienen electrones no apareados, por lo cual son altamente inestables y causan daño a otras moléculas debido a su reactividad. Producen peroxidación lipídica, daño a proteínas y DNA por lo cual son causantes de un gran número de enfermedades. Los benzimidazoles y benzotiazoles son moléculas de gran interés debido a su gran diversidad de actividades biológicas que presentan tales como antioxidantes, anti-inflamatorias, hipoglucemiantes y anticancerígenas por lo que en este trabajo determinamos la actividad antioxidante *in vitro* de compuestos derivados del benzimidazol y benzotiazol (fig1) utilizando varios ensayos tales como la captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), decoloración del β-caroteno y se determinó la actividad quelante del ion ferroso. De los compuestos probados el que presento mejor actividad fue el compuesto **1** a una concentración de 10 mg/ml teniendo una captación del 15% con el H₂O₂, una actividad quelante del 24.5%, inhibió la peroxidación del ácido linoleico en emulsión un 53.28% y tuvo una captación del radical DPPH del 67% que comparado con el control presento una actividad del 31.37%, 93.58%, 60% y 70% respectivamente, siendo mayor que la de los compuestos probados. Por lo que sólo el compuesto **1** (derivado del benzotiazol) pudiera utilizarse como antioxidante.

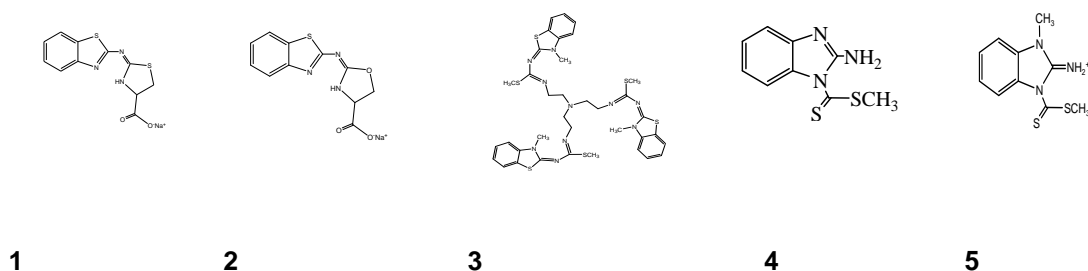


fig.1 compuestos probados

1. INTRODUCCIÓN

La oxidación es uno de los procesos más importantes que producen radicales libres en alimentos, productos químicos y en los sistemas vivos. Los radicales libres tienen un importante papel en el deterioro de alimentos, degradación de medicamentos y contribuyen a la generación de un gran número de enfermedades en los seres humanos. Los antioxidantes son sustancias que a bajas

concentraciones retrasan significativamente o previenen la oxidación de sustratos fácilmente oxidables. Las aplicaciones de los antioxidantes en la industria incluyen prevención en la degradación oxidativa de polímeros, autooxidación de grasas, fibras sintéticas y pigmentos naturales y su utilización con fines médicos en la prevención y tratamiento de enfermedades. (Szaboo, 2007).

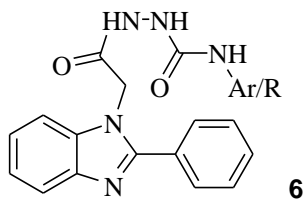
La oxidación es la transferencia de electrones de un átomo a otro y representa una parte esencial de la vida aeróbica ya que el oxígeno es el último aceptor de electrones. Sin embargo cuando el flujo de electrones se desacopla se generan los radicales libres de oxígeno conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS) que incluyen los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilo (OH^{\cdot}), peróxido (ROO^{\cdot}), alcoxilo (RO^{\cdot}) y óxido nítrico (NO^{\cdot}), adicionalmente tenemos otros (ROS) no radicales como el singulete de oxígeno (O_2), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y ácido hipocloroso ($HOCl$) que se producen continuamente con la respiración y son necesarios como parte de la defensa inmune primaria. Los ROS son requeridos para funciones fisiológicas normales, pero también son capaces de producir daños a biomoléculas como los ácidos nucleicos, lípidos, proteínas, ácidos grasos poliinsaturados y carbohidratos que finalmente producen enfermedades tales como daño al corazón, arteroesclerosis, diabetes y cáncer (Gulcin, 2012)

La actividad antioxidante debe ser determinada por varios métodos antioxidantes para ser concluyente en cuanto a la actividad de una sustancia. Existen varios ensayos *in vitro*, entre los cuales están los que permiten determinar la captación de radicales libres como el DPPH y ABTS que son métodos rápidos, simples y de bajo costo. La decoloración del β -caroteno que se basa en el principio de que el ácido linoleico se oxida por los ROS formando productos que inician la oxidación del β -caroteno disminuyendo su absorbancia a 434 nm. La captación del H_2O_2 se determina midiendo la disminución de la absorbancia a 230 nm y la actividad quelante se determina formando un complejo con Fe^{2+} ferrozina reacción que se ve inhibida por la presencia de sustancias quelantes. (N. Alam, 2012)

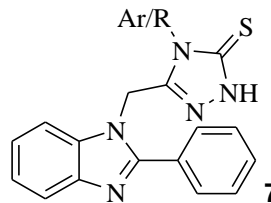
Benzimidazoles como antioxidantes

Los fármacos que poseen captación de radicales libres y actividad antioxidante se han implicado en el tratamiento de diversas enfermedades como cáncer, que están directamente relacionados con la falta de capacidad antioxidante de organismo. En 1974 se reportó que el 5-hidroxi-benzimidazol y el 5-hidroxi-2-metilbenzimidazol como antioxidantes eficaces. La incorporación de tiadiazoles, triazoles y sus homólogos de cadena abierta, es decir, tiosemicarbazidas en posición la 1 del benzimidazol incurre actividad antioxidante, colocar grupos arilos o alquilo en estos núcleos incrementa la actividad antioxidante 5 y 6. Recientemente, la ciclación de dialquilaminoetil en la posición 1 y 4-sustituidas han sido investigados para actividad antioxidante. Recientemente, se ha encontrado que bases de Schiff de benzimidazol con alta actividad inhibidora de la peroxidación lipídica que aumenta con la lipofilia. (Y. Bansa, 2012)

Algunos compuestos que poseen dihidrocloruros también han sido reportado que poseen actividad antioxidante, estas sales también actividad anticoagulante. En otro enfoque, se descubrió que el uso de grupo trimetil con benzimidazol también agrega la propiedad antioxidante por acción inhibidora de la 5-lipoxigenasa. (Ramanpreet et al. 2011)



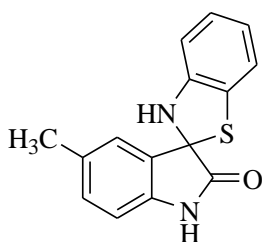
6



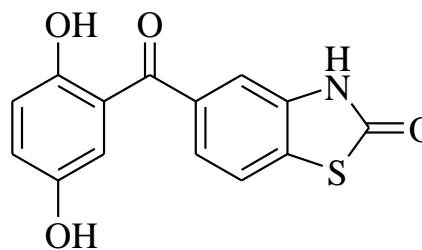
7

Benzotiazoles como antioxidantes

Karali reportó que conjugados espiro [benzotiazol-indol] presentan actividad antioxidante en los sistemas Fe^{3+} /ascorbato, inhibición de lipoperoxidación, captación del radical DPPH y poder reductor, el compuesto 8 mostró mayor potencia antioxidante al introducir un grupo metilo o halógeno. Tzanova reportó una serie de 5-hidroxibenzoil-benzotiazolonas como compuestos antioxidantes determinados por los métodos *in vitro* con poder antioxidante para la reducción del hierro (FRAP). Aminobenzotiazoles que tienen ácidos tiosulfónicos presentaron actividad antioxidante usando el DPPH y ABTS. El compuesto 9 mostró fuertes propiedades antioxidantes, las aminas y amidas derivadas de este compuesto no presentaron actividad antioxidante. Otros compuestos como los benzotiazol-tiazolodindiona-2-acetamidas, 2-hidrazino-benzotiazoles, bis-benzotiazol-pirazolininas, cumarin-benzotiazoles y pirazolil-benzotiazoles, benzotiazol-hidrazonas se evaluaron usando diferentes métodos antioxidantes como DPPH, captación del superóxido e inhibición de la lipoperoxidación, presentando gran actividad antioxidante. (R.S. Keri, 2015)



8



9

Los benzimidazoles y benzotiazoles son moléculas de gran interés debido a sus propiedades antioxidantes, por lo que en este trabajo determinamos la posible actividad antioxidante *in vitro* de compuestos derivados del benzimidazol y benzotiazol.

2. METODOLOGIA

Captación del H_2O_2

La capacidad de captar el peróxido de hidrógeno puede medirse utilizando el método de Ruch et al. (1989). Se prepara una solución de peróxido de hidrógeno (40 mM) en un buffer de fosfatos (50 mM pH 7.4). Se determina la absorbancia a 230 nm. Los extractos y el control BHT tenían una concentración de 1.0 mg/ml. El % de captación = $[(\text{Ac}-\text{Am})/\text{Ac}] \times 100$ donde Ac es la absorbancia del control y Am es la absorbancia de la muestra.

Actividad quelante

La ferrozina forma un complejo violeta a rojo formando quelatos con el Fe^{2+} . Esta reacción se inhibe en la presencia de otros agentes quelantes, disminuyendo la absorbancia de la muestra. La actividad quelante se determina usando el método de Dinis et al. (1994), se añade 0.1 ml de la muestra a una concentración de 1 mg/ml a 0.5 ml de una solución de cloruro férrico (0.2 mM). La reacción comienza por la adición de ferrozina (5 mM) dejando reposar a temperatura ambiente por 10 min y se determina la absorbancia a 562 nm. Se utilizó EDTA como control. El % de inhibición del complejo Fe^{2+} -ferrozina fue calculado como sigue:

% de efecto quelante del Ion $Fe^{2+} = (1 - Am/Ac) \times 100$ donde Am absorbancia de la muestra y Ac absorbancia del control (T.C. Dinis, 1994)

Decoloración del β -caroteno

Se disolvieron 2.0 mg de β -caroteno en 10 mL de cloroformo y 1 mL de esta solución se introdujo con una pipeta en un frasco de fondo redondo que contenía 20 mg de ácido linoléico y 200 mg de Tween 40. Tras retirar el cloroformo por evaporación, se añadieron 50 mL de agua destilada al frasco mientras se removía enérgicamente. Después se introdujeron con una pipeta 5 mL de la mezcla en tubos de ensayo que contenían 0.2 mL del extracto (100 μ g/mL a 1000 μ g/mL) y se agitaron. En una muestra se midió la absorbancia inmediatamente con el espectrofotómetro a 470 nm, y en las demás se midió la absorbancia tras 10 min, 20 min, 30 min y 90 min de incubación a baño María a 50 °C. Cada una de las muestras se comparó con una emulsión preparada de la forma descrita pero sin β -caroteno (blanco). La lectura de absorbancias de las mezclas, en cada lapso de tiempo, se realizó con un espectrofotómetro. La actividad antioxidante es calculada como porcentaje de inhibición (%) relativo al control usando la siguiente ecuación:

$I\% = [1 - (Am_i - Am_{90}) / (Ac_i - Ac_{90})]$ Donde Am_i es la absorbancia de la muestra inicial, Am_{90} es la absorbancia de la muestra a los 90 min, Ac_i es la absorbancia del control inicial y Ac_{90} es la absorbancia del control a los 90 min (A. Kabouche, 2007 y R.M. Pérez, 2003)

Determinación de la Capacidad antioxidante con el radical ABTS.

Se preparó una solución con el reactivo ABTS a 7 mM con agua destilada y se mezcló 1:1 con una solución de persulfato de potasio a 2.45 mM; se dejó reposar 16 horas en la oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se diluyó con alcohol hasta una absorbancia de 0.7 (± 0.01) a una longitud de 754 nm. Se tomó 980 μ l del radical ABTS⁺ y 20 μ l de la muestra previamente diluida 1:10 y se midió su absorbancia. Se realizó una curva tipo con Vitamina C a las concentraciones de 0.02, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 y 0.2 mg/ml. (Y. Choy, 2007).

Determinación de la capacidad antioxidante con el radical DPPH.

Se preparó una solución con el radical 2-2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) a 6×10^{-5} M en metanol, protegiéndolo de la luz, posteriormente se midió la absorbancia del radical a 517 nm. Para realizar la prueba se añadió 2 mL del radical DPPH y 50 μ L de la muestra previamente diluida 1:10 se agito y se esperó durante 30 minutos para finalmente medir la absorbancia a una longitud de 517 nm. La curva tipo se realizó con vitamina C a las concentraciones de 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125, 0.015625, 7.8125×10^{-3} mg/mL.

3. RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran los compuestos derivados del benzotiazol **1,2** y **3** y los derivados del benzimidazol **4** y **5** a los que se les determinó la actividad antioxidante *in vitro*.

En la tabla 2 y gráfica 2 se muestran los resultados obtenidos con los diferentes métodos para evaluar la actividad antioxidante de los compuestos probados. Todos los compuestos mostraron baja captación del H₂O₂ el compuesto 1 fue el que presentó la mayor captación (15.2%) y el compuesto 3 la menor (0.0%), para los radicales DPPH y ABTS el compuesto 4 fue el que presentó mayor % de captación (67% y 55.14%) respectivamente, el radical DPPH es útil para probar la actividad antioxidante para moléculas lipófilas como es el caso de los compuestos probados, en el % de inhibición para la actividad quelante y la decoloración del β -caroteno el compuesto que presentó mayor inhibición fue el compuesto 1 (24.6% y 53.28%), el compuesto 4 derivado del benzimidazol es capaz de captar los radicales DPPH y ABTS pero no el H₂O₂ además no inhibe la actividad quelante ni la decoloración del β -caroteno. El control utilizado fue el BHT (Butilhidroxitolueno) que capta el H₂O₂ (31.4%) y los radicales DPPH y ABTS (70% y 90%), para la

actividad quelante se utilizó el EDTA (ácido etilendiamino-tetracético) que presenta una gran actividad quelante (93.6%). Las diferencias estructurales entre el compuesto 1 y 2 hacen que el compuesto 2 pierda la actividad antioxidante al cambiar el azufre por el oxígeno.

Tabla 1. Compuestos derivados del benzimidazol y benzotiazol

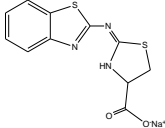
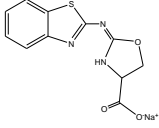
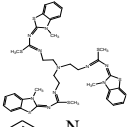
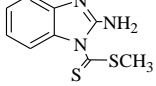
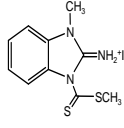
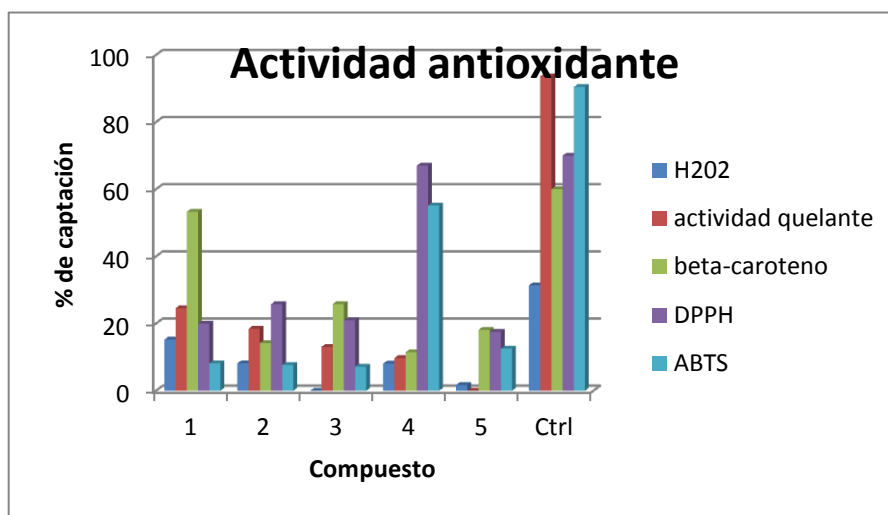
Compuesto	Estructura
1	
2	
3	
4	
5	

Tabla 2. % de captación o inhibición con los diferentes métodos utilizados para determinar la actividad antioxidante

Compuesto	H ₂ O ₂ (%)Captación	Actividad quelante (%) de Inhibición	β-caroteno (%) Inhibición	DPPH (%) Captación	ABTS (%) Captación
1	15.2	24.6	53.28	19.99	8.13
2	8.1	18.4	14.16	25.76	7.64
3	0.0	13.0	25.8	20.97	7.14
4	8.1	9.7	11.44	67.0	55.14
5	1.7	0.0	18.12	17.5	12.5
Ctrl	31.4	93.6	60.0	70.0	90.45



Gráfica 1. Actividad antioxidante con los diferentes métodos utilizados

4. CONCLUSIONES

El compuesto **1** fue el que presentó mejor actividad en la captación del H₂O₂ y en la inhibición de la actividad quelante y del β-caroteno por lo que se considera que tiene propiedades antioxidantes, el compuesto es un derivado del benzotiazol. El compuesto **4** presentó la capacidad de captar los radicales ABTS y DPPH sin actividad en las demás pruebas realizadas, el compuesto es derivado del benzimidazol.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. Kabouche, Z. Kabouche, M. Ozturk, U. Kolal, G. Topcu, "Antioxidant abietane diterpenoids from salvia berrieli". Food Chem.102, 2007, pp 1281-1287.
2. I. Gülcing, " Antioxidant activity of food constituents: an overview". Arch Toxicol.,86, 2012, pp 345-391.
3. M.R. Szaboo, C. Iditoiu, D. Chambre, A.X. Lupea, "Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay" Chem. Pap.,61,3,2007, pp 214-216.
4. N. Alam, N.J. Bristi, Md. Rafiquzzaman,"Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity" Saudi Pharm J, 21,2013, pp 143-152.
5. R.M., Pérez, R.Vargas, F.J Martínez, E.V García, B. Hernández, "Actividad antioxidante de los alcaloides de Bocconia arborea. Estudio sobre seis métodos de análisis". Ars Pharmaceutica, 44, 2003, pp 15-21.
6. R.S. Keri, M.R. M. R. Patil, S.A. Patil, S. Budagumpi,"A comprehensive review in current developments of benzothiazole-based molecules in medicinal chemistry", Eur J of Med Chem, 89,2015, pp 207-251.
7. Ruch, R.J.,Cheng, S.J., Klauning, J.E., 1989. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. Carcinogen 10,1003-1008.

8. T.C. Dinis, V.M.C Madeira, L.M. Almeida, "Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyradical scavengers". Arch. Biochem. Biophys. 315, 1994, pp 161-169.
9. W. Ramanpreet, Md. Hedaitullah, S. Naaz, K. Iqbal and HS. Lamba. (2011). Benzimidazole Derivatives- An Overview. Int J Of Res In Pharm and Chem. ISSN: 2231-2781.
10. Y. Bansal, Om Silakari, "The therapeutic journey of benzimidazoles: A review". Bioorg & Med Chem, 20, 2012, pp 6208–6236.
11. Y. Choy , H.S. Jeong , J. Lee J, Antioxidant activity of methanolic extracts from some grains consumed in Korea. Food Chem 103, 2007, pp130-138.

EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE ORIGEN MICOBACTERIANO

Susana Flores-Villalva¹, E. Rodríguez¹, Anaya EA¹.

¹CENID Fisiología, INIFAP. Ajuchitlán, Colón, Qro.,

RESUMEN:

El uso de la tecnología de ADN recombinante para la expresión de proteínas es actualmente una práctica de rutina. En la última década la variedad de vectores y huéspedes usados para la expresión de proteínas recombinantes ha aumentado sustancialmente; sin embargo, *E. coli* sigue siendo la primera opción para la producción de proteínas en el laboratorio, debido a su rápido crecimiento y procedimientos sencillos de cultivo. Además, en la mayoría de los casos, es posible obtener cantidades suficientes de proteína para las aplicaciones deseadas. La principal desventaja de este sistema de expresión, es la formación de cuerpos de inclusión; esto ha sido particularmente desalentador en el caso de la expresión de proteínas de *M. tuberculosis*. Para esta especie, el éxito en la expresión soluble, incluso con la mejor estrategia de expresión en *E. coli* rara vez ha superado el 30%. Diversos factores pueden influenciar en la expresión de proteínas solubles en *E. coli*; se cree que uno de los principales motivos es la diferencia en el contenido de G+C en el genoma de *M. tuberculosis* (65.6%) y *E. coli* (50.8%), requiriendo así diferente maquinaria para la traducción de genes micobacterianos. Por otra parte, una gran proporción de las proteínas micobacterianas sufren modificaciones post-transcripcionales, como glicosilación y lipidación, las cuales pueden influenciar las evaluaciones inmunológicas de las proteínas. *E. coli* no puede realizar modificaciones post-transcripcionales a las proteínas de interés, esto ha motivado el desarrollo de sistemas de expresión alternativos, los cuales incluyen el uso de levaduras, células de insecto y micobacterias no patógenas como *M. smegmatis*. En este trabajo, pretendemos exponer las principales estrategias empleadas para la expresión de proteínas micobacterianas.

1. INTRODUCCIÓN

A mediados de 1970 se inició el desarrollo de la ingeniería genética basada en la tecnología de ADN recombinante que marcó a su vez, el comienzo de la industria biofarmacéutica actual. Mediante la tecnología de ADN recombinante ha sido posible modificar genéticamente diversos tipos de células que actúan como "reactores" biológicos, capaces de sintetizar biofármacos con aplicaciones terapéuticas basados en proteínas recombinantes (1). A diferencia de las proteínas de origen natural, las proteínas recombinantes pueden ser producidas en grandes cantidades lo que ha permitido cubrir la creciente demanda actual. En contraste con las proteínas no humanas obtenidas de animales como por ejemplo la insulina de cerdo, las proteínas recombinantes son idénticas o difieren ligeramente respecto a las proteínas nativas de origen humano, por lo que las reacciones inmunológicas adversas disminuyen significativamente (2). La fase inicial de producción de biofármacos consiste en el diseño del sistema de expresión que implica la elaboración mediante ingeniería genética, del vector de clonación del gen que codifica la proteína de interés en la célula hospedera adecuada. La segunda fase se enfoca al proceso de purificación, evaluación del control de calidad y validación de dicho producto. Los vectores más conocidos son plásmidos bacterianos que se caracterizan por replicarse en forma independiente al cromosoma de la bacteria. El diseño del vector basado en técnicas de ingeniería genética y la elección de la célula hospedera determinan en gran parte, las características de la proteína recombinante, las estrategias de su

purificación, rendimiento y el costo de su producción (3). Para la expresión de proteínas recombinantes es posible emplear sistemas de expresión procarióticos *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp*, *Streptomyces lividans*, *Lactobacillus latis*, *Mycobacterium smegmatis* etc., y sistemas eucarióticos como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) y células de mamíferos como la línea celular CHO (Chinese Hamster Ovary) y BHK (Baby Hamster Kidney) (4). Para la selección de un sistema de expresión adecuado para la síntesis de una proteína recombinante se tiene que tener en consideración el origen biológico y las propiedades químicas y biológicas de la proteína de interés, su aplicación posterior y el proceso que se empleará para su producción (Tabla 1).

Tabla 1. Factores determinantes en la selección de un sistema de expresión de proteínas recombinantes. (Tomado y modificado de Guerrero-Olazarán, 2004 (5)).

Origen de la proteína	<ul style="list-style-type: none"> • Procariota • Eucariota 	
Propiedades de la proteína	<ul style="list-style-type: none"> • Secuencia nucleotídica • Propiedades químicas • Estabilidad • Toxicidad • Destino celular • Grado de pureza 	<ul style="list-style-type: none"> • Uso de codones preferenciales • Tamaño • pI • Modificaciones postraduccionales • Proteólisis • pH • Temperatura • Extracelular • Intracelular
Aplicación	<ul style="list-style-type: none"> • Biomedicina • Alimentos • Otros 	<ul style="list-style-type: none"> • Agente terapéutico • Vacunas • Diagnóstico • Procesos industriales • Suplementos alimenticios
Bioproceso	<ul style="list-style-type: none"> • Tipo • Condiciones de cultivo • Escala • Costo 	

Dentro de las bacterias, *E. coli* ha sido la más empleada para estos fines, debido a que este organismo ofrece varias ventajas respecto a otros hospederos: mayor velocidad específica de crecimiento, fácil manipulación genética, no posee requerimientos costosos asociados a medios de cultivo o equipamiento a diferencia de las células de organismos superiores; existencia de gran variedad de vectores de expresión estables, y ser un microorganismo aprobado por las entidades reguladoras para su utilización como hospedero en la producción de biofármacos. Sin embargo, el empleo de *E. coli* también tiene desventajas, tales como la formación de cuerpos de inclusión de proteína insoluble, lo que ha sido particularmente desalentador en el caso de la expresión de proteínas de *M. tuberculosis*. Para esta especie, el éxito en la expresión soluble, incluso con la mejor estrategia de expresión en *E. coli* rara vez ha superado el 30%. Diversos factores pueden influenciar en la expresión de proteínas solubles en *E. coli*; se cree que uno de los principales motivos es la diferencia en el contenido de G+C en el genoma de *M. tuberculosis* (65.6%) y *E. coli* (50.8%), requiriendo así diferente maquinaria para la traducción de genes micobacterianos.(6). Por otra parte, *E. coli* es incapaz de realizar modificaciones post-transcripcionales como glicosilación y lipidación, las cuales pueden influenciar las evaluaciones inmunológicas de las proteínas.

2. ESTRATEGIAS EMPLEADAS PARA MEJORAR LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MICOBACTERIANAS RECOMBINANTES EN *E. COLI*

En *E. coli* el uso de codones es manifestado por el nivel de RNAt aminoacilados en el citoplasma. Los codones principales están generalmente presentes en genes que se expresan a un alto nivel, mientras que los codones raros son comúnmente encontrados en genes que se expresan en niveles bajos. La expresión de genes heterólogos que albergan codones raros, como el caso de la mayoría de las proteínas micobacterianas, pueden resultar en errores de traducción, debido al estancamiento del ribosoma en posiciones en las que han de incorporarse los aminoácidos a los RNAt de codones raros. De la misma forma puede haber mutaciones en el marco de lectura, terminación prematura de la traducción o bien sustituciones de aminoácidos (7). Los codones raros más problemáticos son: AGA, AGG, CGG, CGA, CGG (arginina), AUA (isoleucina), GGA (glicina), CUA (leucina) CCC (prolina) y AAG (lisina) (8). Se han empleado varias estrategias para eludir el problema del sesgo de codones, como la mutagenesis directa del gen heterólogo para generar codones que reflejen el pool de *E. coli*; sin embargo, este procedimiento puede resultar muy costoso. Lo más común es la co-transformación de las cepas de *E. coli* con un plásmido que alberga los genes que codifican para el RNAt afín al codón raro. Existen varios plásmidos comerciales, como el plásmido pRARE; además, existen varias cepas comerciales que albergan plásmidos para codones raros (Tabla 2).

Tabla 2. Cepas de *E. coli* que mejoran la expresión y solubilidad de las proteínas recombinantes. (Tomada y modificada de Baeschen M, 2015 (7)).

Marca comercial	Cepa de <i>E. coli</i>	Características
Stratagene	BL21 CodonPlus, BL21 CodonPlus (DE3)-RIL, BL21 CodonPlus-RP, BL21 CodonPlus (DE3)-RP-X BL21 CodonPlus (DE3)-RILP	Las cepas contienen copias extras para los genes de RNAt argU, ileY, leuW, que reconocen los codones raros AGA/AGG (arginina), AUA (iso-leucina) y CUA (leucina), respectivamente. Por lo que su uso, aumenta la expresión de las proteínas heterólogas.
Novagen	Origami, Origami B	Mejora la formación de puentes disulfuro en el citoplasma.
Novagen	Rosetta Rosetta pLysS Rosetta-gami-pLysS	Las cepas contienen RNAt para los codones raros AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA. Mejoran la expresión de proteínas eucarióticas. Ayudan en la formación de puentes disulfuro.
Lucigen	C41 (DE3) C43 (DE3)	Eficientes en la expresión de proteínas de membrana. Contienen mutaciones que evita la muerte por la expresión de proteínas toxicas.
NEB	Shuffle T7 Express	Expresa constitutivamente la isomerasa de enlaces disulfuro (DsbC). Promueve el correcto plegamiento de las proteínas recombinantes y es deficiente en las proteasas Lon y OmpT.
Genlantis	SoluBL21	Optimizada para la expresión de proteínas solubles. Y es eficiente para la expresión de proteínas toxicas.

Como se mencionó anteriormente, uno de los principales problemas en la expresión de proteínas micobacterianas en *E. coli*, es la acumulación de agregados de proteína insolubles conocidos como cuerpos de inclusión. La extracción de la proteína recombinante a partir de estos agregados es un proceso lento y engorroso que requiere varios pasos de desnaturalización y renaturalización para obtener una proteína soluble y correctamente plegada. Una estrategia que se ha empleado es el uso de chaperonas, estas se unen a la cadena polipeptídica nascente para evitar su agregación durante el plegamiento. Las chaperonas más comúnmente usadas son DnaK, DnaJ, GrpE, GroEL y GroES, éstas se pueden usar solas o en combinación para mejorar la solubilidad de la proteína recombinante. Las combinaciones más efectivas son GroEL-GroES, DnaK-DnaJ-GrpE (7).

Otra estrategia para aumentar la solubilidad de las proteínas micobacterianas consiste en la disminución de la temperatura de crecimiento de *E. coli*. El crecimiento a bajas temperaturas disminuye la tasa de la síntesis proteica y por lo tanto evita la acumulación de intermediarios de plegado en el citosol. Además, también reduce la agregación de la proteína mediante la prevención de interacciones hidrofóbicas inter e intra moleculares, minimizando de esta forma la formación de cuerpos de inclusión.

Diversos estudios muestran que modificaciones postranscripcionales como la glicosilación, lipidación, fosforilación de las proteínas micobacterianas son necesarias para la inducción de una adecuada respuesta inmune (12). *E. coli* carece de la maquinaria necesaria para realizar estas modificaciones; no obstante, se ha reportado la exitosa transferencia de la vía de N-glicosilación de *Campylobacter jejuni* en *E. coli* (9) demostrando así que es posible expresar proteínas glicosiladas en *E. coli* (10). Hasta el momento, esta estrategia no ha sido aún explorada para la expresión de proteínas de origen micobacteriano.

3. SISTEMAS DE EXPRESIÓN ALTERNATIVOS

Streptomyces sp. es una bacteria Gram positiva, que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, cuyos miembros son comúnmente conocidos por su papel en la producción de antibióticos. Su membrana externa simple, combinada con su habilidad intrínseca de secretar proteínas al medio extracelular en una conformación nativa la ha convertido en un sistema de expresión de proteínas recombinantes alternativo bastante atractivo, pues esta bacteria tiene la habilidad de glicosilar sus propias proteínas y las proteínas heterólogas. De las 650 especies descritas, *S. lividans* es usada casi exclusivamente para la expresión de proteínas exógenas (11).

La glicosilación es una modificación covalente de las proteínas muy importante, mientras que las glicoproteínas eucarióticas han sido estudiadas en detalle, la información sobre la estructura y función de las glicoproteínas bacterianas es escasa. Hasta el momento, se ha confirmado la glicosilación de dos proteínas micobacterianas, la proteína de 45/47 kDa y MPB83. Existen varios reportes sobre la expresión de genes micobacterianos en *Streptomyces*, en particular genes de *M. bovis* BCG y *M. leprae*. Así mismo, se ha reportado la expresión de la proteína de 45/47 kDa, 38 y 19 kDa en *S. lividans*. (12)

Finalmente, también se ha usado especies micobacterianas no patógenas como sistemas de expresión de proteínas micobacterianas de *M. tuberculosis*. La especie más empleada es *M. smegmatis*, esta bacteria en un principio puede proveer de chaperonas, factores o un ambiente más propicio para la producción de proteínas micobacterianas solubles y funcionales. Actualmente, se han desarrollado varios sistemas micobacteria-*E. coli* compatibles, como el vector pMV261 y pMycFos. Estos vectores pueden ser propagados en *E. coli*, mientras que la expresión del gen blanco puede ser inducido en *Mycobacterium spp* (11).

La principal desventaja del uso de huéspedes micobacterianos es su dificultad para ser transformados, por lo que se usa la electroporación como el método más exitoso para la introducción de DNA foráneo, aunque los plásmidos también pueden ser introducidos por

conjugación o a través de micobacteriofagos (11). Un aspecto interesante de las micobacterias, aunque poco explorado es su capacidad de secretar proteínas directamente al medio de cultivo a través de su sistema de secreción especializado tipo VII; sin embargo, este sistema de secreción no ha sido totalmente caracterizado por lo que el entendimiento de esta maquinaria de secreción es de vital importancia tanto para entender la patogenia de la infección como para explotarlo como una vía de secreción para proteínas recombinantes.

4. CONCLUSIONES

Para la producción de proteínas recombinantes, se han desarrollado diversas fábricas celulares las cuales pueden ser empleadas con diferentes propósitos cada una con sus propias ventajas y desventajas. La elección del sistema de expresión dependerá de la proteína de interés, su aplicación posterior y el proceso que se empleará para su purificación y producción. La producción de proteínas heterólogas en *E. coli* es siempre preferible debido a su fácil manipulación genética, la disponibilidad de diversos vectores plasmídicos y cepas de expresión, el costo-beneficio y el alto nivel de expresión comparado con otros sistemas. No obstante, se han descrito otros sistemas procarióticos de expresión los cuales pueden ser mejores que *E. coli* para ciertas clases de proteínas como el uso de *Streptomyces* y *Mycobacterium smegmatis*. Sin duda, la investigación en estos sistemas de expresión alternativos incrementará sus papeles en la expresión de proteínas heterólogas de diversos orígenes.

BIBLIOGRAFÍA

1. M.E. Drago, et al., "Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes", Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 2006, 37 (1):38-44.
2. Steinberg F.M., Raso J. "Biotech Pharmaceuticals and Biotherapy: An Overview", Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 1998, 1 (2):48-59.
3. Werner RG. "Economic aspects of commercial manufacture biopharmaceuticals". Journal of Biotechnology, 2004, 113 (1-3): 171-182.
4. Friesen J.D., An G. "Expression vehicles used in recombinant DNA technology". Biotechnology Advances. 1983, 1(2):205-227.
5. Guerrero-Olazarán M., Cab-Barrera E.L, et al., "Biotecnología de proteínas recombinantes para la aplicación en acuicultura", in: Avances en Nutrición Acuicola VII. Memorias del VII Simposium International de Nutrición Acuicola. 16-19 de noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.
6. Mustafa A.S. "Biotechnology in the Development of New Vaccines and Diagnostic Reagents Against Tuberculosis". Curr Pharm Biotechnol. 2001, 2 (2): 157-73.
7. Baeshen, M.N, Al-Hejin, A.M. "Production of biopharmaceuticals in *E. coli*: Current Scenario and Future Perspectives". J. Microbiol. Biotechnol. 2015, 27 (5): 953-962.
8. Yarian C, Marszalek M, et al. "Modified nucleoside dependent Watson-Crick and wobble codon binding by tRNA LysUUU species". Biochemistry. 2000, 39: 13390-13395.
9. Wacker M, Linton D, et al. "N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*". Science, 2002. 298: 1790-1793.
10. Valderrama-Rincon JD, Fisher AC, et al. "An engineered eukaryotic protein glycosylation pathway in *Escherichia coli*". Nat. Chem. Biol. 2012, 8: 434-436.
11. Gómez, S. López-Esteva M., "Protein Complex Production in Alternative Prokaryotic Host". Adv Exp Med Biol. 2016, 896: 115-33.
12. Lara, M., Servín-González L., "Expression, Secretion, and Glycosylation of the 45 and 47 kDa Glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans*". Appl Environ Microbiol. 2004, 70 (2): 679-685.

ESTUDIO DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO DE PLANTAS AISLADAS DE ZONAS NATURALES PROTEGIDAS DEL ESTADO DE GUANAJUATO (CERRO DEL CULIACÁN)

Blanca Estela Gómez Luna¹, Juan Carlos Ramírez Granados¹, Rafael Alejandro Veloz García¹, Israel Enrique Herrera Díaz¹, María Isabel García Vieyra¹, César Díaz Pérez¹, Silvia del Carmen Delgado Sandoval¹

¹Universidad de Guanajuato

RESUMEN

Las Áreas Naturales Protegidas (ANP) constituyen una gestión ambientalmente responsable de los gobiernos y la sociedad en su conjunto para la conservación de la biodiversidad, con esto se busca asegurar el equilibrio ecológico para la continuidad de los procesos evolutivos y ambientales de los ecosistemas. En la actualidad se está deforestando en el estado de Guanajuato las especies de mezquite (*Prosopis laevigata*) y encino (*Quercus rugosa*) utilizarse como leña y carbón. Las bacterias promotoras de crecimiento en plantas conocidas por sus siglas PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) son un grupo de géneros de bacterias que pueden incrementar el crecimiento vegetal. En el presente trabajo se realizó el aislamiento de bacterias promotoras de crecimiento en suelos árboles de mezquite (*Prosopis laevigata*) y encino (*Quercus rugosa*) del cerro de Las Cruces, Salvatierra. Se aislaron 100 cepas de las cuales se seleccionaron 21 aislados para pruebas en el desarrollo de plántulas de cilantro (*Coriandrum sativum*), germinación con semilla de pepino (*Cucumis sativus*) y confrontación con hongos fitopatógenos. Las cepas que presentaron un mejor efecto en altura de la planta y en la confrontación con el hongo fitopatógeno fueron las UG-V-023 y UG-V-01(1). En la prueba de germinación la cepa UG-V-01(1) obtuvo un 100% de germinación.

1. INTRODUCCIÓN

Áreas naturales protegidas

Las Áreas Naturales Protegidas son las zonas del territorio nacional y aquellas sobre las que la nación ejerce su soberanía y jurisdicción en donde los ambientes originales no han sido significativamente alterados por la actividad del ser humano o que requieren ser preservadas y restauradas [1]. Los cerros el Culiacán y la Gavia presentan especies vegetales de bosque de encino, selva baja caducifolia y matorral crasicauale, y cumplen una importante función en la recarga del sistema acuífero por la presencia de material altamente permeable constituido por basaltos fracturados a través de los cuales se originan flujos horizontales que alimentan los valles contiguos, satisfaciendo las necesidades de agua para los diferentes usos de la población. Uno de los principales problemas en el área es la deforestación, causada principalmente por cambios de uso de suelo, uso de árboles para leña y elaboración de artesanías, ganadería extensiva, afectaciones por plagas e incendios forestales [2].

Bacterias promotoras de crecimiento

Los cambios que a enfrenado México en tecnología para la obtención de mejora en la productividad y mejora de nuevos cultivos vegetales, una alternativa para la mejora de la producción es el uso de biofertilizantes, estos son preparados de microorganismos aplicados a suelo y/o planta con el fin de sustituir totalmente la fertilización sintética. Dentro de los microorganismos utilizados en los biofertilizantes se encuentran las bacterias promotoras de crecimiento vegetal y son aquellas que inoculadas a la siembra de la semilla inducen su germinación para luego colonizar la raíz, en donde al transformar sus exudados radicales en sustancias promotoras de crecimiento vegetal causan un efecto similar a las fitohormonas, esto quiere decir que a mayor proliferación de los pelos radiculares se incrementa una mejor y eficiente absorción mineral como Nitrógeno, Fosforo, Hierro, Potasio, etc [3].

Los microorganismos asociados con las raíces de las plantas mejoran, estimulan y facilitan el sano desarrollo de la planta a dosis inferiores de un fertilizante nitrogenado, fosforado u otros necesarios para un rendimiento rentable. Protegen las raíces de ataque fitopatógenos [4].

2. PARTE EXPERIMENTAL

Muestreo de suelo

Se seleccionaron dos árboles mezquite (*Prosopis laevigata*) y encino (*Quercus rugosa*) para la toma de muestra de suelo de la rizosfera, ubicada en la comunidad "Las Cruces" con coordenadas geográficas, 200° 55' 5" latitud Norte, 100° 58' 38" longitud Oeste, con una altura promedio sobre el nivel del mar de 2160 metros, en Salvatierra, Guanajuato. En cada uno de los árboles se tomaron 2 muestras de suelo, el muestreo se realizó el día 20 de Junio de 2015.

Aislamiento y purificación de bacterias promotoras de crecimiento de plantas.

Las muestras de suelo se utilizaron para aislar bacterias en medio selectivo para actividad de la encima ACC (1-acido carboxílico, -1- aminociclopropano) desaminasa (Penrose y Glick, 2003), el cual contiene las sales minerales del medio Dworkin y Foster cuya composición por litro es la siguiente: 4 g KH_2PO_4 , 6 g NaHPO_4 , 0.2 g MgSO_4 , 1 mg FeSO_4 , 10 mg H_3BO_3 , 10 mg MnSO_4 , 50 mg CuSO_4 , 10 mg MoO_3 , 70 mg MgSO_4 , glucosa 0.2%, ácido glucónico 0.2%, ácido cítrico 0.2% y agar bacteriológico al 2% y ACC 3 mM (Sigma) como única fuente de nitrógeno. Se incuban a 28°C por 5 días. Las bacterias que presentaron actividad de ACC desaminasa se procedió a purificarla en medio PDA (Papa Dextrosa Agar), por la técnica de estría cruzada y se caracterizaron por Tinción de Gram.

Prueba de desarrollo de la planta

Se probaron 21 cepas de las bacterias aisladas en el efecto del crecimiento en plántulas de cilantro (*Coriandrum sativum*), a la cual se le midió la altura de la planta y el número de hojas.

Prueba de control biológico

A los 21 aislados seleccionados se les realizó una prueba de antibiosis contra hongos fitopatógenos. En este caso usamos *Bipolaris sp.* La prueba duro 6 días y se monitoreaba cada 24 horas.

Prueba de germinación

Se probó el efecto de las 21 cepas sobre la germinación de semillas de pepino.

3. RESULTADOS

Aislamiento de bacterias promotoras de crecimiento de plantas

De los 100 aislados con actividad ACC desaminasa seleccionamos 21 cepas a las cuales del realizamos tinción de Gram, de los cuales obtuvimos: Gram (+) UG-V-091, UG-V-054, UG-V-104, UG-V-093, UG-V-056, UG-V-104(P.G), UG-V-10(1), UG-V-097, UG-V-06, UG-V-07, UG-V-023, UG-V-043, UG-V-043, UG-V-051, UG-V-024(P.G), UG-V-019, UG-V-091, UG-V-024(P.CH), UG-V-10(2) y Gram (-) UG-V-032, UG-V-035

Prueba de desarrollo de la planta

Se calculó el promedio de crecimiento de 10 réplicas de cada tratamiento para la planta Cilantro (*Coriandrum sativum*). La altura de la planta fue para el control (agua) de 6.2 cm, el control (fertilizante) de 6.5 cm, en el caso de las cepas UG-V-023 de 7.2 cm y UG-V-01(1) de 7.7 cm la altura fue mayor la comparado con el control agua y el fertilizante, las cepas UG-V-010(1) de 6.5 cm, UG-V-019 de 6.5 cm, UG-V-056 de 6.7cm, UG-V-06 de 6.6 cm, UG-V-07 de 6.7 cm, presentaron altura similar al fertilizante. La cepa UG-V-024 (P.CH) de 6.2 cm obtuvo el mismo valor que el control agua.

Prueba de control biológico

Los resultados obtenidos en esta prueba nos demuestran que la mayoría de los 21 aislados seleccionados presentaron características que ayudan a inhibir o prevenir el efecto de los hongos fitopatógenos [Imagen 1].

Los resultados para el hongo *Bipolaris* sp. fueron los siguientes:

Las cepas con mayor actividad contra el hongo fitopatógeno fueron: UG-V-01(1), UG-V-023, UG-V-037 y UG-V-032.

Las cepas con actividad media de inhibición fueron: UG-V-024, UG-V-07, UG-V-06, UG-V-10(2), UG-V-024(P.G), UG-V-019, UG-V-056, UG-V-051, UG-V-054, UG-V-035(1), UG-V-104(P.G), UG-V-091(1), UG-V-104, UG-V-097 y UG-V-091.

Las cepas sin ningún efecto contra el hongo fitopatógeno fueron: UG-V-043 y UG-V-035

En el caso del promedio de hojas por plántula la cepa que más efecto tuvo fue la UG-V-06 con un promedio de 7 comparado con el control agua que fue de 2 y el control fertilizante de 4.

Prueba de germinación

Se obtuvo un mejor efecto en las semillas inoculadas con las cepas seleccionadas en comparación con las semillas control que solo fueron inoculadas con caldo estéril, después de 24 horas se obtuvo un 100% de germinación en las semillas inoculadas con la cepa UG-V-01(1), donde el control solo obtuvo un 80% de germinación.

4. CONCLUSIONES

En la actualidad la microbiología del suelo ha tomado gran relevancia debido a su aplicación en la conservación de Áreas Naturales Protegidas y sus aportaciones en relación con la disponibilidad de nutrientes para el crecimiento de la plantas, capacidad de degradación de la materia orgánica, la solubilización de sustancias que promueven el desarrollo eficiente de las plantas, así como la simbiosis entre bacterias y plantas u hongos y plantas, que a veces se vuelve obligada para ambos organismos. El uso de bacterias promotoras de crecimiento de plantas resulta una alternativa muy eficiente y sustentable para mejorar la producción de plantas mediante el uso de biofertilizantes, así como la aceleración del crecimiento, mejoramiento de la germinación y el control biológico de plagas o enfermedades por microorganismos fitopatógenos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dirección de Comunicación y Cultura para la Conservación, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP), 17 de Julio de 2015 <http://www.conanp.gob.mx/regionales/>
2. Instituto de Ecología del Estado de Guanajuato, 17 de Julio de 2015, <http://ecologia.guanajuato.gob.mx/sitio/areas-naturales-protegidas>
3. Jorge Arnoldo Villegas-Espinoza¹, Edgar Omar Rueda-Puente², Bernardo Murillo-Amador³, María Esther Puente³, Francisco Higinio Ruiz-Espinoza¹, Sergio Zamora-Salgado¹ y Félix Alfredo Beltran Morales^{1§}, Revista mexicana de ciencias agrícolas, Rev. Mex. Cienc. Agríc vol.5 no.6 Texcoco ago./sep. 2014, http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342014000600011&script=sci_arttext
4. Hidalgo Villagómez, 2014, Análisis de Compuestos Involucrados en la Promoción de Crecimiento de Plantas por Rizobacterias de Guayaba, Salvatierra, Gto.

CAMBIOS EPIGENÉTICOS EN EL HOSPEDERO EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN CON *M. Tuberculosis*

Elba Rodríguez-Hernández¹, Susana Flores Villalva¹, Ana María Anaya Escalera¹, Germinal Cantó Alarcón², Feliciano Milián²

¹CENID Fisiología y Mejoramiento Animal-INIFAP, ²Universidad Autónoma de Querétaro.

RESUMEN

La epigenética se refiere a cualquier cambio heredable en la expresión de los genes; pero no implica mutaciones del ADN; por lo tanto es un proceso de regulación que no involucra cambios en la secuencia. Estos cambios del fenotipo suceden por varios factores como: estrés, infección, nutrientes, drogas, agentes toxicológicos, etc. Reportes recientes indican que algunos microorganismos causan cambios epigenéticos en el hospedero después de su invasión. En este trabajo resumiremos los estudios sobre la modulación del epigenoma en el hospedero en respuesta a la infección con *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Debido a que se trata de un patógeno intracelular, ha desarrollado mecanismos de secuestro de diferentes procesos celulares para evadir la respuesta inmune; *Mtb* toma ventaja de los cambios epigenéticos que ocurren en el hospedero para producir una infección latente. Esos cambios hacen que se adapte al ambiente celular, favoreciendo su crecimiento y sobrevivencia. En un estudio se identificaron los perfiles diferenciales de metilación de las células dendríticas antes y después de la infección con *Mtb*, en los cuales encontraron regiones diferencialmente metiladas, estos cambios fueron observados en islas CpG; interesantemente casi un tercio de esos genes que cambiaron su expresión, están cerca de regiones diferencialmente metiladas. En otro estudio, mediante el uso de microarreglos los autores observaron una modulación en el estatus de la metilación del ADN después de la infección, encontrando alteraciones en los niveles de metilación de genes involucrados en la respuesta inflamatoria en macrófagos humanos infectados. En el futuro el enfoque terapéutico del epigenoma podría ser útil en el tratamiento de la infección por *Mtb*.

1. INTRODUCCIÓN

Mycobacterium tuberculosis es el agente causal de la tuberculosis humana, la cual tiene un gran impacto en la salud pública mundial, uno de los principales problemas es que causa una infección latente en un tercio de la población mundial (1), si no se trata puede persistir durante muchos años en el huésped infectado; en ese tiempo la bacteria podría modificar los patrones de expresión génica para adaptarse a las nuevas condiciones ambientales dentro del hospedero. Sin embargo, se conoce poco acerca de los mecanismos moleculares a través de los cuales se activan los cambios epigenéticos. Recientemente se han reportado diversos trabajos caracterizando este fenómeno en la expresión génica y el fenotipo; lo que ha permitido el progreso en diversos campos como en el cáncer (2). Por otro lado, sabemos poco sobre la importancia de la variación en la interacción hospedero-patógeno. Estos mecanismos epigenéticos son responsables de que la cromatina sea tan dinámica y que se puedan regular diversos mecanismos moleculares como la reparación del DNA, la recombinación y la expresión de genes; es interesante que algunas ocasiones estos cambios epigenéticos puedan heredarse establemente a través de la división celular. Por otra parte esos cambios pueden ser borrados o modificados durante la diferenciación, desarrollo y bajo diferentes estímulos ambientales (Figura 1).

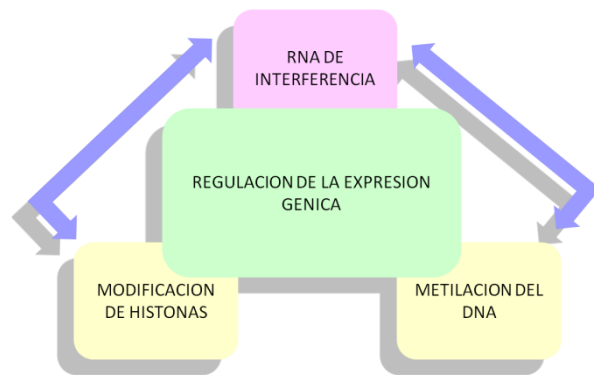


Figura 2. Mecanismos epigenéticos. Existen varios mecanismos epigenéticos involucrados en la regulación de la expresión génica (Adaptado de Yadav et al, 2015).

En una infección el fenotipo del hospedero se altera rápida y drásticamente en respuesta a un patógeno, en algunos casos el fenotipo parasitado es heredado a nuevas generaciones (3). También ocurre co-adaptación entre el hospedero y el patógeno en un tiempo muy corto por lo que las modificaciones epigenéticas pueden proveer una fuente de respuesta rápida reversible y variación fenotípica fácilmente disponible que pueda crearse por la presión de selección del hospedero y el patógeno (4, 5). La metilación del DNA es un mecanismo por medio del cual los procariontes aseguran la herencia epigenética. Estos cambios del fenotipo son consecuencia de la acción de factores como: estrés, infección, nutrientes, drogas, agentes toxicológicos, etc. Investigaciones recientes demuestran que algunos microorganismos causan cambios epigenéticos en el hospedero después de su invasión. Existen estudios sobre la modulación del epigenoma en el hospedero en respuesta a la infección con *Mtb*. A través de la evolución y como un mecanismo adaptativo de *Mycobacterium* ha desarrollado mecanismos de secuestro de diferentes procesos celulares para evadir la respuesta inmune y toma ventaja de los cambios epigenéticos que ocurren en el hospedero para producir una infección latente. Los cambios permiten que *Mtb* se adapte al ambiente celular, favoreciendo su crecimiento, sobrevivencia y latencia (Figura 2).

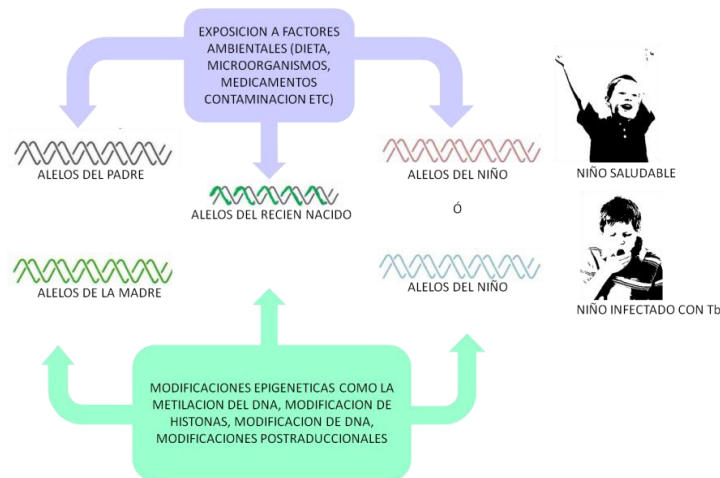


Figura 2. El rol de los cambios epigenéticos en la tuberculosis humana. La genética del huésped y los cambios epigenéticos provocados por diferentes factores permiten una reacción específica en respuesta a una infección por tuberculosis (Adaptado de Yadav et al 2015).

En un estudio reciente se identificaron los perfiles diferenciales de metilación de las células dendríticas antes y después de la infección con *Mtb*, en los cuales encontraron regiones diferencialmente metiladas, estos cambios fueron observados en islas CpG; interesantemente casi un tercio de esos genes que cambiaron su expresión, están cerca de regiones diferencialmente metiladas. En otro estudio, mediante el uso de microarreglos los autores observaron una modulación en el estatus de la metilación del ADN después de la infección, encontrando alteraciones estadísticamente significativas en los niveles de metilación de genes involucrados en la respuesta inflamatoria en macrófagos humanos infectados con *Mtb*.

2. MODIFICACIONES EPIGENETICAS DEBIDAS A LA INFECCION CON TUBERCULOSIS

La metilación de DNA es un mecanismo de regulación génica que puede darse en respuesta a infecciones por microorganismos. Por lo general en los organismos eucariotas la activación de este mecanismo está asociado a la represión de la expresión de genes. En un estudio se identificó una metiltransferasa involucrada en la infección de *Mtb* a la que llamaron MamA. Los resultados de este estudio indican que la pérdida de MamA reduce la expresión de diversos genes y que existen diferentes patrones de actividad ADN metiltransferasa en diferentes cepas de *Mtb* lo que se asocia con diferencias para distintos ambientes hospederos y diferente curso de la enfermedad en los humanos (8).

Durante la infección en el humano *Mtb* inhibe la expresión de diversos genes que codifican proteínas de la respuesta inmune inducidos por el interferón γ , a través de la acetilación de histonas (7) lo que explica la persistencia de las infecciones por tuberculosis de forma crónica en algunos pacientes. En la tabla 1 se describen algunos ejemplos recientes de estudios basados en la relación huésped-patógeno donde se han identificado la participación de procesos epigenéticos específicos con la participación de diferentes microorganismos entre los que se encuentran *Mtb*.

Tabla 1. Cambios epigenéticos del hospedero en respuesta a infección con patógenos

Organismo	Mecanismo epigenéticos	Función
<i>M. tuberculosis</i>	hPTM y remodelación de la cromatina	Inmunosupresión del hospedero
Virus de la influenza	Hptm y metilación de DNA	Inmunosupresión del hospedero
<i>Listeria monocytogenes</i>	hPTM y remodelación de la cromatina	Inmunosupresión del hospedero
<i>Toxoplasma gondii</i>	hPTM y remodelación de la cromatina	Inmunosupresión del hospedero

hPTM: modificaciones postraduccionales de las histonas

3. CONCLUSIONES

Mycobacterium tuberculosis a co-evolucionado con su hospedero humano lo que le ha dado la habilidad de sobrevivir y persistir por muchos años en un ambiente desfavorable dentro del cuerpo humano. Por lo tanto, esta micobacteria ha desarrollado mecanismos de adaptación a los ambientes estresantes, uno de esos mecanismos es la regulación de la expresión de genes a través de mecanismos epigenéticos. *Mtb* tiene estrategias únicas para modular los mediadores

epigenéticos y reprimir la expresión de genes de la respuesta inmune. La investigación a este respecto ha demostrado que los cambios en la metilación del DNA y las modificaciones postraduccionales de las histonas son indispensables para la supervivencia en condiciones estresantes y adversas a las que se enfrenta el microorganismo y que la metilación del DNA afecta la expresión de varios genes, en contraste con los sistemas de regulación de metilación en otros organismos. Es importante determinar cuáles son los alcances en términos funcionales de la regulación epigenética en la patofisiología de la tuberculosis. Los estudios sobre cambios o marcas epigenéticas que se expresan en respuesta a la infección con tuberculosis permitirán a futuro conocer los mecanismos de *Mtb* para causar la infección.

BIBLIOGRAFÍA

1. C. H. Waddington. The epigenome. *Endeavour*, 1942, 1, 18–20.
2. M. Esteller. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone modification maps. *Nature Reviews in Genetics*, 2007, 8, 286–298.
3. R. Poulin, F. Thomas. Epigenetic effects of infection on the phenotype of host offspring: parasites reaching across host generations. *Oikos*, 2008, 117, 331–335.
4. R. Bonduriansky, T. Day. Nongenetic inheritance and its evolutionary implications. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 2009, 40, 103–125.
5. O. J. Rando, K. J. Verstrepen. Timescales of genetic and epigenetic inheritance. *Cell*, 2007, 128, 655–668.
6. Y. Vinod, P. D. Ved, B. Debapriya, M. Ashwani, M. Prashini and D. Gobardhan. Understanding the Host Epigenetics in *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *J Genet Genome Res*, 2015, 2, 1.
7. M. E. Pennini, R. K. Pai, D. C. Schultz, W. H. Boom, C. V. Harding. *Mycobacterium tuberculosis* 19-kDa lipoprotein inhibits IFN- γ -induced chromatin remodeling of MHC2TA by TLR2 and MAPK signaling. *The Journal of Immunology*, 2006, 176, 4323–4330.
8. S. Scarlet, G. Prestwich, B. Seung-Hun, R. Rupal, M. S. Christopher, C. D. Peter, M. F. Sarah. DNA Methylation Impacts Gene Expression and Ensures Hypoxic Survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *Plos pathogen*, 2013 9, 7e1003419.

EVALUACIÓN EN HEMBRAS HOLSTEIN DESCENDIENTES DE TOROS SELECCIONADOS INMUNOGENÉTICAMENTE PARA TRANSMITIR MAYOR INMUNIDAD ADAPTATIVA

Sonia Vázquez Flores^a, Mayra Isabel González Paredes^a.

^aESIABA Tecnológico de Monterrey Campus Querétaro, Querétaro, Qro.

RESUMEN

A partir de los 22,000 genes del genoma bovino (*Bos taurus*), se han identificado algunas características epigenéticas basadas en genes relacionados con inmunidad innata y adaptativa. Estas epimutaciones se manifiestan en el fenotipo de la descendencia permitiendo la reducción de mastitis (44%) y 25% menos de neumonías (Mallard, 2015). El objetivo del proyecto fue determinar cómo la descendencia de toros genéticamente seleccionados presenta mayor inmunidad adaptativa disminuyendo enfermedades en becerras en lactancia. Se seleccionaron hijas y nietas nacidas de seis toros convencionales (C) (grupo testigo) (n= 93), ocho toros seleccionados para heredar características relacionadas con resistencia a enfermedades (HS) (n= 128) y ocho toros de alta respuesta inmunológica (I) (n = 50). Se evaluó: calidad de calostro, inmunidad pasiva, peso y altura al nacimiento, y frecuencia de enfermedades respiratorias y digestivas en becerras de 0 a 60 días de edad. No se identificaron diferencias en calostro, ni inmunidad pasiva en los diferentes grupos de estudio. Las hijas C presentaron mayor variabilidad en peso ($41.7 \pm 5.7\text{Kg}$), en comparación con hijas I ($40.6 \pm 4.2\text{Kg}$), las alturas al nacimiento fueron similares. En cuanto a diarreas y neumonías el grupo C presentó mayor número de casos (valor $p < 0.05$). En conclusión, bajo los mismos sistemas de inmunidad, nutrición y ambiente, las hijas y nietas de toros inmunogenéticamente seleccionados demostraron una mayor inmunidad adaptativa en becerras en lactancia con menor número de enfermedades. Este estudio se extenderá por dos años más para abarcar producción láctea, mastitis y metritis continuando con este mismo grupo cohorte.

1. INTRODUCCIÓN

A partir de los 22,000 genes del genoma bovino (*Bos taurus*), se han identificado ciertas características epigenéticas basadas en genes relacionados con inmunidad innata y adaptativa. La inmunidad innata está dada por la piel, mucosas, saliva y lágrimas, es una inmunidad inespecífica, sin memoria. Las células fagocíticas como neutrófilos y macrófagos se desarrollan hasta la parte final de la gestación. La capacidad de los neutrófilos comienza a la semana de vida del becerro y la ingestión de calostro permite incrementar esta capacidad (Chase et al., 2008). Esta inmunidad se disminuye por efecto de estrés, puesto que la secreción de cortisol tiene un efecto negativo sobre estos leucocitos. Los becerros recién nacidos representan agammaglobulinémicos, y con una inmunidad celular inmadura donde los linfocitos B presentan el 4% de los linfocitos totales en comparación con 30% del ganado adulto y de 1 a 2% de linfocitos T. Estos linfocitos B llegan al 20% en los becerros de 4 a 6 semanas de edad. Esta inmunidad adaptativa se va generando conforme la cría se enfrenta a diferentes retos inmunológicos, con microorganismos patogénicos y no patogénicos, así como a ciertas proteínas generadoras de inmunidad (Tizard, 2013; Chase et al, 2008). La respuesta inmunológica está relacionada con múltiples factores como: nutrición, higiene, instalaciones, temperatura y humedad ambientales, así como a la biodiversidad de patógenos en la población adulta, e interacciones con otras especies animales.

2. TEORÍA

En la actualidad, la presencia de enfermedades en becerros neonatos implica el uso de sistemas nutricionales y de protección inmunológica innata desde la madre que permitan mejorar la salud integral del becerro. Comienza con una dosificación eficiente de calostro de buena calidad inmunológica y bacteriológica desde las dos primeras horas del nacimiento y repitiendo el proceso dos veces más durante las primeras 24 h de vida (Chase et al., 2008). El trabajar con la identificación de progenitores (sementales y vacas) inmunológicamente más competentes, implica el análisis de diferentes células y substancias relacionadas con el sistema inmune que permita la selección de caracteres genéticos con mayor eficiencia en el control de enfermedades. Estas son conocidas como epimutaciones que se manifiestan en el fenotipo de la descendencia permitiendo por ejemplo, la reducción de mastitis (44%) y 25% en el caso de neumonías en siguiente generación (Mallard, 2015). Existen 186 marcadores genéticos, y 11 rutas genéticas que identifican a grupos de vacas con mejores respuestas de anticuerpos, así como 21 marcadores genéticos que permiten una respuesta celular más eficiente. Estos marcadores genéticos permiten la clasificación de los bovinos de leche en alta, promedio y baja respuesta inmune. La identificación de los sementales con alta respuesta inmune (High Immune Response), permite tener líneas genéticas de mayor resistencia a enfermedades (Thompson-Crispi y Mallard, 2012). Esto incrementa el valor de la cría desde el punto de vista genético (valor genético estimado), aunque la heredabilidad genética no es mayor al 30% en la actualidad (Mallard, 2015).

El objetivo del proyecto fue determinar cómo la descendencia de toros genéticamente seleccionados presenta mayor inmunidad adaptativa disminuyendo enfermedades en becerras en lactancia.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Sitio de estudio

El análisis fue llevado a cabo en un rancho lechero ubicado en el Estado de Querétaro donde, desde el 2013, se ha utilizado semen con características genéticas particulares para transmitir a las crías una mayor inmunidad adaptativa. Los toros seleccionados como Immunity+™ por la compañía Semex, a través de la tecnología HIR (High Immunity Response) (Semex.com, 2015). Asimismo, se ha inseminado con semen de toros denominados HealthSmart™, que prometen hijas con menores tamaños corporales al nacimiento, mayor fertilidad y mayor resistencia a enfermedades infecciosas (Semex.com, 2014). Además, se ha implementado semen proveniente de animales que, para propósito de este estudio se denominaron como “Convencionales”, cuyas características heredables se miden a través de la herencia de las siguientes generaciones, y no necesariamente son seleccionados por sus diferencias genómicas relacionadas con salud.

Animales de estudio

Los grupos de estudio fueron constituidos por animales descendientes de cada una de las líneas genéticas: Immunity+™ (I), HealthSmart™ (HS) y Convencionales (C) como grupo testigo. Los toros analizados con sus características genómicas se identifican en la Tabla 1. El criterio de inclusión para el estudio fueron aquellas becerras cuya información de proteínas totales del suero estuviera disponible. Se seleccionaron hijas y nietas nacidas de seis toros convencionales (C) (grupo testigo) (n= 93), ocho toros seleccionados para heredar características relacionadas con resistencia a enfermedades (HS) (n= 128) y ocho toros de alta respuesta inmunológica (I) (n = 50).








Parámetros evaluados

Los parámetros evaluados fueron: calidad del calostro administrado, proteínas totales del suero, peso y altura al nacimiento, así como persistencia y grado de severidad de enfermedades

infecciosas (neumonía y diarrea). Se analizaron las poblaciones estratificadas en hijas y nietas de los toros, además de las poblaciones totales para cada uno de los parámetros medidos.

Adicionalmente un subgrupo de muestras de calostro de las vacas en estudio y del suero sanguíneo de las beceras estudiadas fueron analizados en el laboratorio de Diagnóstico Molecular del Tecnológico de Monterrey-campus Querétaro por sus inmunoglobulinas G comparándose descendientes de toros HealthSmart™ (HS) y Convencionales (C). La determinación de las inmunoglobulinas G (IgG) en suero se realizó por medio del sistema de radioinmunodifusión radial (MP Biomedicals) a partir de una muestra tomada de vena yugular en beceras de 48 h de nacidas y 14 días después. La información de producción, salud e inmunidad pasiva se obtuvo tanto de los registros del programa Afimilk™, como de las bitácoras del área de recría del establo. La determinación de la calidad de calostro se realizó por medio de un calostrómetro de Krusse, donde el nivel mínimo aceptado fue de 1050. La determinación de peso fue por báscula electrónica, y la altura con una regla tomando la medida a la cadera de la becerra. El análisis en campo de inmunidad pasiva se realizó por medio de refractometría tomando la muestra de la yugular con tubo vacutainer sin anticoagulante a las 48 h. La caracterización de la duración y severidad de las enfermedades las realizó el personal clínico de campo en un estudio doble ciego.

Tabla 1. Características de los Toros Immunity+™ (I), HealthSmart™ (HS) estudiados para determinación de parámetros de producción y salud.

							
	IMMUNITY+	HEALTH	GENOMAX	REPROMAX	ROBOTREADY	CALVING EASE	SHOWTIME
NOMBRE							
Sammy	X	X	X		X		
Unix	X	X	X				
Envious	X	X	X		X		X
Teddy	X	X	X			X	
Facebook	X	X		X		X	
Impression	X	X		X	X		
Seaver	X	X		X			X
Doorman	X	X	X				
Fever		X			X	X	X
Jett Air		X				X	
Shadow		X		X			X
Stanley Cup		X		X			
Enforcerer		X	X	X	X		
Chance		X	X	X	X	X	
Jordan		X				X	
Jerrick		X		X		X	

La prevalencia de enfermedades infecciosas fue evaluada de forma binaria (0=ausencia, 1=presencia) y, a su vez, estratificada de acuerdo a la severidad de los signos. Para neumonía se consideró como N1 la presencia de tos, N2 representa neumonía infecciosa y N3 neumonía con

fibrosis. Similarmente en el caso de diarreas D1 se consideró como una afección mecánica, D2 infecciosa y D3 como coccidiosis. De la base de datos obtenida, se realizó el análisis estadístico de la información de medias, desviación estándar, además de pruebas paramétricas y no paramétricas mediante el programa JMP versión 11.0.

4. RESULTADOS

Al evaluar la calidad del calostro se encontró que los tres grupos presentan una media con desviaciones estándares muy similares. Para el grupo (HS) la media fue de 1057.34 ± 5.6 , para el grupo (I) fue de 1056.5 ± 5.56 y para el grupo (C) se obtuvo una media de 1057.0 ± 6.13 . De lo anterior se infiere que no existe una diferencia significativa entre la calidad del calostro suministrado a los distintos grupos. Para el análisis de proteínas totales se hizo una comparación de medias utilizando la prueba de Hsu MCB. Los valores de las medias fueron los siguientes: (HS): 6.3 ± 0.7 , (I): 6.2 ± 0.6 , (C): 6.2 ± 0.7 . De la prueba se obtuvieron valores de $p > 0.05$, por lo que se puede asegurar que son grupos virtualmente idénticos y no existen diferencias cuanto a proteínas totales en sangre. En cuanto a IgG se obtuvieron en calostro 158.5 g/dl en (C) y 159.3 g/dl (H), mientras que en el suero de las becerras a 48 h se obtuvieron 1709.8 mg/dl (C) y 1734.2 mg/dl (H) y a los 14 días en ambos grupos tuvieron 1650 mg/dl, no hubo diferencias estadísticas en ninguno de los grupos en cuanto a inmunidad pasiva.

Tabla 2. Medias y rangos de peso al nacimiento de la población total y estratificada

Tabla 1. Medias y rangos de peso al nacimiento de la población total y estratificada

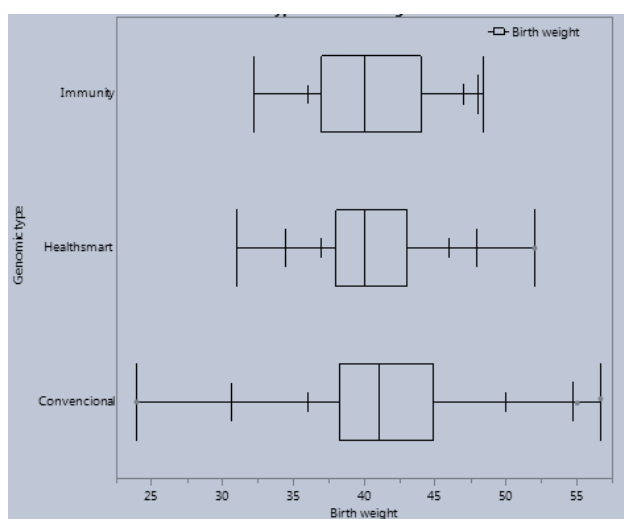
PESO KG	POBLACIÓN	INTERVALO	HIJAS	INTERVALO	NIETAS	INTERVALO NIETAS
	TOTAL	POBLACIÓN TOTAL		HIJAS		
CONVENCIONAL	41.7 +- 5.7	23.9-56.9	40.6 ± 3.8	31-52	-	-
HEALTHSMART	40.6 +- 3.7	31-52	40.7 ± 3.8	31-52	40.8+-2.4	37-43.8
IMMUNITY+	40.6 +- 4.2	32.2-48.4	39.5 ± 3.9 ^a	32.2-48.4	43.4+-3.7 ^b	36.7-47

a. Analyzing with Tukey Kramer (p-Value < 0.05)

b. Analyzing with Wilcoxon/ Kruskal-Wallis (p-Value<0.05)

En relación al peso al nacimiento, la Tabla 2 se muestra que, con la prueba de Tukey Kramer, se obtuvo un valor de $p < 0.05$ al comparar a las hijas de los toros del grupo I con los grupos (HS) y (C), lo cual indica que éstas son más ligeras (Gráfica1). Por otro lado, se analizaron las nietas del grupo (I) y se las comparó con el grupo (HS) y se obtuvo en la prueba de Wilcoxon/ Kruskal-Wallis un valor $p < 0.05$, lo cual indica que las nietas descendientes de toros Immunity+™ tienen un menor peso al nacer que las nietas de toros HealthSmart™. En el análisis también se encontró que las poblaciones del grupo (I), así como del grupo (HS) son poseen una menor variabilidad en cuanto al peso al nacimiento, además se comprobó que esta variabilidad disminuye al incrementar una generación, es decir, la población compuesta por las nietas de los grupos (I) y (HS) son más uniformes.

En cuanto a altura al nacimiento, se evaluaron los datos de la población en general y de la población estratificada, las medias y los rangos de cada grupo están expuestos en la Tabla 3.



Gráfica 1. Peso al nacimiento en becerras comparando toros (I), (H9 y (C)

Tabla 3. Medias y rangos de altura al nacimiento de la población total de becerras y estratificada

ALTURA CM	POBLACIÓN TOTAL	INTERVALO POBLACIÓN TOTAL	HIJAS	INTERVALO HIJAS	NIETAS	INTERVALO NIETAS
CONVENCIONAL	80.6±3.7	70-90	81.06±3.6	72-89.5	-	-
HEALTHSMART	81.0±3.7	72-89.5	81.1±3.6	72-89.5	80.3±4.5	75-88
IMMUNITY+	80.6±3.3	75-88	81.04±3.2	75-88	79.4±3.1	75-83

Después de realizar diferentes pruebas paramétricas y no paramétricas, no se encontró ninguna diferencia entre los grupos, tanto en la población total como en la estratificada en cuanto a ganancia de pesos durante el.

Al realizar la prueba Hsu MCB para evaluar la frecuencia de diarrea de forma binaria, los valores de p ($p < 0.05$) muestran que las becerras hijas de toros convencionales tiene una mayor prevalencia de diarreas que los otros dos grupos. Sin embargo no se muestran diferencias entre el grupo (HS) y el grupo (I) ($p > 0.05$). Por otro lado, al estudiar los datos estratificados en función de la severidad de los signos, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

La misma prueba fue utilizada para evaluar la persistencia de neumonía en los grupos determinándose que el grupo (I) presenta neumonías menos frecuentemente que el grupo

convencional ($p < 0.05$). Posteriormente se analizaron los datos estratificándolos según el tipo de neumonía y se obtuvieron resultados muy similares.

5. CONCLUSIONES

Como se estableció anteriormente, la respuesta inmunológica está determinada por distintos factores genéticos, ambientales y de manejo. Uno de ellos es la adecuada proporción de calostro a los becerros recién nacidos, así como la exposición de éstos a distintos patógenos en el entorno que los rodea. Dado que se encontró que tanto el grupo (C) como el (H) y el (I) son idénticos en cuanto a calidad de calostro proporcionado y las proteínas totales en el suero, se puede afirmar que no existe un sesgo relacionado con deficiencias en la administración, calidad y absorción del calostro. La naturaleza aleatoria del proyecto establece que los animales se desarrollaron en el mismo contexto ambiental y de manejo, por lo que las diferencias que éstos muestran en cuanto a prevalencia de enfermedades como diarrea y neumonía realmente se debe a una respuesta inmune superior heredada de sus progenitores.

Por otro lado, el que exista menos variabilidad en cuanto a peso y estatura al nacimiento cuando se emplea semen seleccionado como HealthSmart™ o Immunity+™, y que el tamaño de la cría al parto sea más reducido implica que la vaca al parto requerirá menos asistencia, la probabilidad de distocia se reduce, y la vitalidad de la cría al parto es mayor. A medida que avancen las generaciones, se obtendrán crías con pesos más homogéneos, evitando así el nacimiento de animales de menos de 35 Kg, o de más de 55 Kg, lo cual representa un factor de riesgo para su supervivencia en el hato (Moore et. al, 2002).

Diversos autores concuerdan con que la selección genética enfocada al aumento de la producción lechera, está directamente asociada con un aumento en la frecuencia de enfermedades (Neuenschwander, et al., 2012; Thompson-Crispi, et al, 2011). Lo anterior impacta negativamente en los aspectos sanitarios, económicos y de bienestar animal de cualquier hato lechero. El grupo de investigación dirigido por la Dra. Mallard, generó un sistema de evaluación como la HIR, que permite identificar a aquellos individuos que presenten una mayor respuesta inmunológica con el fin obtener crías con mejores mecanismos de defensa. En consecuencia la intención es aumentar la vida productiva de la vaca lechera con menor impacto en su salud. Entre las ventajas de un hato con una mejor inmunología innata, están la reducción de gastos derivados del tratamiento de animales, la disminución de bajas en producción ocasionadas por estrés, ocasionado por enfermedades y la obtención de calostros de mejor calidad que provea a los becerros de una mayor inmunidad pasiva (Neuenschwander, et al., 2012; Dhakal, 2014; Mallard, 2011).

No obstante, sin importar el avance tecnológico o la precisión que ofrezca un producto, siempre será necesaria la evaluación del mismo en contextos productivos reales. De esta manera es posible medir el verdadero impacto que las nuevas tecnologías tienen en campo. Es por lo anterior que el presente estudio se extenderá por dos años más para analizar áreas como: producción láctea, impacto en los componentes lácteos (grasa y proteína), y frecuencia de problemas en glándula mamaria y reproductivos, continuando con este mismo grupo cohorte. Por el momento, si se puede concluir que hay una disminución de la prevalencia en hijas de toros HealthSmart™ en cuanto a diarreas y de grupo Immunity+™ en cuanto a neumonías bajo las mismas condiciones de inmunidad pasiva, nutrición y ambiente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dhakal, K. (2014). Phenotypic and genetic aspects of health events and production traits in dairy cattle (Order No. 3647611). Available from ProQuest Dissertations & Theses Global. (1642719349).
2. Mallard BA, Atalla H, Cartwright S, Hine BC, Hussey B, Paibomesai M, Thompson-Crispi KA, Wagter-Lesperance L. Genetic and epigenetic regulation of the bovine immune system: Practical implications of the high immune response technology. In Proc. National Mastitis Council 50th Annual Meeting (1) 2011 (pp. 53-63).
3. Mallard, B.A., Emam, M., Paibomesai, M., Thompson-Crispi, K. and Wagter-Lesperance, L., 2015. Genetic selection of cattle for improved immunity and health. Japanese Journal of Veterinary Research, 63(Supplement 1), pp.S37-S44.
4. Moore, D. A., W. M. Sischo, D. M. Festa, J. P. Reynolds, E. R. Atwill, and C. A. Holmberg. 2002. Influence of arrival weight, season and calf supplier on survival in Holstein beef calves on a calf ranch in California, USA. *Prev. Vet. Med.* 53:103–115.
5. Neuenschwande, T. O., Miglior, F., Jamrozik, J., Berke, O., Kelton, D. F., & Schaeffer, L. R. 2012. Genetic parameters for producer-recorded health data in Canadian Holstein cattle. *Animal*, 6(04), 571-578.
6. Semex. 2014. HealthSmart: Healthy and Feed Efficient. Recuperado el 08/09/2015 de: <http://www.semex.com/images/catalogue/HealthSmartProdsheet.pdf>
7. Semex. 2015. Immunity+: Disease Resistant Genetics. Recuperado el 08/09/2015 de: <http://www.semex.com/images/catalogue/HealthSmartProdsheet.pdf>
8. Thompson-Crispi, K.A., Sewalem, A., Miglior, F. and Mallard, B.A., 2012. Genetic parameters of adaptive immune response traits in Canadian Holsteins. *Journal of dairy science*, 95(1), pp.401-409.
9. Tizard, I.R., 2013. *Veterinary immunology*. Elsevier Health Sciences.
10. Chase, C.C., Hurley, D.J. and Reber, A.J., 2008. Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24(1), pp.87-104.
11. Thompson-Crispi, K.A. and Mallard, B.A., 2012. Type 1 and type 2 immune response profiles of commercial dairy cows in 4 regions across Canada. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 76(2), pp.120-128.

REPROGRAMACIÓN DE CARIOPLASTOS CON EXTRACTOS DE OVOCITOS COMO ESTRATEGIA DE PRODUCCIÓN DE EMBRIONES POR HANDMADE CLONING EN *O. Aries*

Roberto Vazquez Avendaño¹, Ernesto Hernández Pichardo², Ambríz García Demetrio Alonso y Navarro Maldonado María del Carmen.

¹ Departamento de Biología de la Reproducción. División de CBS. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Ciudad de México. ² Departamento de Producción Agrícola y Animal. División de CBS. UAM-Xochimilco. Ciudad de México.

RESUMEN

En este estudio se analizó el efecto de la exposición de fibroblastos de piel de *Ovis aries* a extractos de ovocitos en MII homólogos, utilizados como carioplastos para la producción *in vitro* de embriones por clonación manual. Los estadios de desarrollo embrionario alcanzados fueron 3-8, 10-12 células y mórulas. No hubo diferencia significativa ($P < 0.05$) entre grupos con respecto a la etapa de desarrollo embrionario. Sin embargo, se observó una mayor tasa de desarrollo de 3-8 células del grupo de embriones partenogénicos con respecto al grupo tratado y control (33% vs 18%, 10%). Los grupos de embriones tratados y partenogénicos presentaron mejor tasa de desarrollo en etapa de 10-12 células en comparación con el grupo control (18%, 17% vs 10%). Sin embargo, el grupo control presentó mayor porcentaje de embriones en estadio de mórula (80%) en comparación con el grupo tratado con extractos (64%) y partenogénicos (50%). En relación a la fragmentación del citoplasma no hubo diferencia significativa entre los diferentes grupos. Sin embargo, al analizar la proporción de núcleos y blastómeros, se encontró una relación favorable para los embriones clonados obtenidos con fibroblastos.

1. INTRODUCCIÓN

Existen diferentes técnicas para asistir la reproducción de humanos y animales domésticos o silvestres, entre estas se encuentran la Inseminación Artificial (IA), la Fecundación *In Vitro* (FIV), Inyección Intracitoplasmática del Espermatozoide (ICSI) y la Transferencia Nuclear de Células Somáticas (TNCS) o clonación artificial, en la cual no se requiere de la participación del espermatozoide, en su lugar se utiliza una célula somática diploide que se fusiona con un ovocito enucleado para originar a un organismo idéntico al de la célula somática (Ogura *et al.*, 2012).

En un principio se pensó que era imposible obtener animales clonados a partir de células terminalmente diferenciadas, se tenía la idea de que las características de especialización que adoptan las células durante el proceso de diferenciación eran irreversibles. Sin embargo, con la obtención del primer mamífero clonado a partir de células de glándula mamaria se demostró que las células especializadas pueden regresar a un estado indiferenciado (Jullien *et al.*, 2011). Desde entonces, se han clonado diferentes animales utilizando diversos tipos celulares, no obstante, son pocos los animales clonados recién nacidos que se han generado, lo cual se debe a varios factores entre los que se encuentra la falta o inadecuada reprogramación nuclear de la célula somática, que implica borrar las características especializadas y llevarla a un estado totipotencial.

Ante esta condición se han implementado diferentes métodos de reprogramación nuclear de las células somáticas previo a su utilización en TNCS, entre estos métodos se encuentra la reprogramación celular con extractos de ovocitos homólogos o heterólogos, es decir, de la misma

especie al de la célula somática o diferente a esta (Miyamoto *et al.*, 2007; Xiong *et al.*, 2013). El citoplasma de los ovocitos posee distintas moléculas que interviene en los procesos de reprogramación nuclear y que al ser expuestas a una célula somática donadora de núcleo, puede mejorar el desarrollo de embriones clonados.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Se derivaron fibroblastos fetales de *Ovis aries* a partir de una biopsia de piel de la oreja de una hembra de 5 meses de gestación. Los fibroblastos se cultivaron en una caja Petri de 35 mm con 3 ml de medio DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium) suplementado (2% de antibiótico-antimicótico, 2.6% de Bicarbonato de sodio y 10% de Suero Fetal Bovino) y se incubaron a 37° C, 5% de CO₂ en aire y humedad relativa durante 7 días. Transcurrido este tiempo se realizó un pasaje celular, para lo cual se retiró el medio DMEM-S y se realizó dos lavados con DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺. Se adiciono 700 µL de tripsina-verseno (0.05%, en DPBS) y se incubó bajo las condiciones antes mencionadas por 5 min. Una vez que las células se desprendieron se detuvo la reacción enzimática con la adicción de 1 mL de DEME-S. La solución que contenía las células se centrifugo a 150x g durante 4 min, se decantó el sobrenadante y la población celular se dividió entre dos caja de Petri de 35 mm y se continuo con el cultivo bajo las mismas condiciones hasta que se alcanzó el 5° pasaje celular, en el cual los fibroblastos fueron expuestos a los extractos de ovocitos (Navarro *et al.*, 2015).

Para la preparación de los extractos y la formación de citoplastos, se obtuvieron ovocitos de ovarios de ovejas domésticas (*Ovis aries*) tipo criollo, colectados de un rastro del Edo. de México, los ovarios se transportaron al laboratorio en solución salina al 0.9% a 30° C en un lapso no mayor a una hora. Con base al método descrito por Robledo-Verduzco *et al.* (2009) y Soberano-Martínez *et al.* (2011), los complejos ovocito-cúmulo (COC) se obtuvieron por aspiración de folículos de entre 2 a 8 mm de diámetro con una aguja hipodérmica calibre 18, el medio de aspiración empleado fue TCM-199 (Tissue Culture Medium) con Hepes, suplementado con 100 UI/mL de heparina. El líquido folicular recuperado se colocó en una caja Petri de 55 mm, de donde se seleccionaron aquellos COC de mejor calidad con base en la morfología citoplasmática y número de capas de células de la granulosa (Grado 1: ovocitos con múltiples capas de células cúmulos compactas; Grado 2: ovocitos parcialmente desnudos; Grado 3: ovocitos con células cúmulos expandidas y Grado 4: ovocitos desnudos). Los COC grado 1 y 2 se lavaron dos veces en medio de maduración *in vitro*, MIV (8.3 mL de TCM-199, 10% de SFB, 5 UI/mL de hCG, 5 µg/mL de FSH, 10 ng/ml de EGF y 65 µl de antibac-antifun). En una caja de cuatro pozos (Nunc) previamente equilibrada con 400 µL de medio MIV y cubiertos bajo aceite mineral, los COC se dejaron incubar de 20 a 24 hrs a 38 °C con 5% de CO₂ en aire y de humedad relativa.

Una vez completado el tiempo de maduración *in vitro*, los ovocitos con células del cúmulo expandidas se denudaron de éstas con 500 µL de hialuronidasa (0.5 mg/mL en TCM-199) y se resuspendieron varias veces con la micropipeta, después se agitaron en vórtex por 3 min. Después se seleccionaron aquellos ovocitos en MII, los cuales presentaron extrusión del 1^{er} cuerpo polar, a partir de estos se prepararon los extractos de ovocitos, para lo cual se les disgregó la zona pelúcida con pronasa (2 mg/mL, en TCM-199 con 10% de SFB). Los ovocitos libres de zona pelúcida se equilibraron en un sistema regenerativo de energía (1 mM ATP, 10 mM fosfocreatina y 25 µg de creatina cinasa) (Xiong *et al.*, 2013) y posteriormente se resuspendieron en 5 µL del sistema regenerativo de energía dentro de un tubo cónico de microcentrífuga (0.3 ml) y se centrifugo a 21,000 x g por 20 min. El sobrenadante resultante se almacenó a -80 °C hasta el momento de su utilización. El procedimiento se repitió hasta obtener una cantidad considerable de extractos.

Antes de exponer los extractos de ovocitos a los fibroblastos, se les permeabilizo la membrana plasmática con 10 U/mL de estreptolisina-O por 30 min a 38° C, con agitación ocasional de las células. Al finalizar el tiempo, los fibroblastos permeabilizados se incubaron con los extractos de

ovocitos por 30 min a 38° C. Posteriormente los fibroblastos se cultivaron en DMEM suplementado con 2 mM de CaCl₂ y 20% de SFB para resellar la membrana plasmática y después se cultivaron en DMEM-S por 15 días. Estas células se utilizaron como carioplastos para la transferencia nuclear por clonación manual (Halley-Stott *et al.*, 2010). Para la técnica de clonación de embriones se siguió el método descrito por Vajta *et al.*, (2001, 2006). Una vez completado el tiempo de maduración *in vitro*, los ovocitos se les retiró las células de la granulosa expandidas de igual manera que para los extractos de ovocitos. De los ovocitos desnudos se seleccionaron aquellos en MII. Estos se colocaron en una solución de demecolcina (0.5 µg/mL) y se incubaron a 38° C, 5% de CO₂ en aire y humedad relativa por una hora.

Una vez finalizado el tiempo de incubación en demecolcina, los ovocitos se transfirieron a una solución de pronasa (2mg/mL en medio T10) por 3 min o hasta que la zona pelúcida se disgregó por completo, inmediatamente después los ovocitos libres de zona pelúcida se colocaron en medio T20 (TCM-199 suplementado con 20% SFB) para inactivar la acción de la pronasa. Se colocaron los ovocitos libres de zona pelúcida en medio T10 (TCM-199 suplementado con 10% de SFB) y se prosiguió con su enucleación con ayuda de una micronevaja (Bioniche), cortando la protuberancia del citoplasma que se encontraba a nivel de membrana, la cual contenía el material genético del ovocito. Los ovocitos enucleados (citoplastos) se colectaron en medio T20.

Posteriormente los citoplastos se tomaron uno por uno y se fueron sumergiendo en una solución de fitohemaglutinina (5 mg/mL en TCM-199 con Hepes) de 3 a 4 seg, después se transfirieron en medio T2, el cual contenía una baja densidad de carioplastos (fibroblastos de *O. aries*) y a continuación se formaron los tripletes. Para ello, se unió un carioplasto con dos citoplastos colocando al primero entre los dos citoplastos. Los tripletes así formados se equilibraron en medio de fusión (0.3 M de D-Mannitol y 1 mg/ mL de Polivinil alcohol) y se transfirieron a una cámara de fusión (BTX microslide, 0.5 mm de apertura, modelo 450). Se dejó pasar una corriente de 4 AC para alinear los tripletes al electrodo positivo, después se incrementó la corriente a 9 AC y se aplicó un solo pulso de 100 V de DC por 9 µseg. Los tripletes se colocaron en medio T20 y el procedimiento se repitió con los demás carioplastos y citoplastos. Una vez que los tripletes se reconstruyeron en una sola célula, se incubaron 3 horas para la reprogramación nuclear en medio SOF1 (Synthetic Oviductal Fluid) con 5% de SFB a 38 °C y 5% de CO₂ en aire y humedad relativa.

A los tripletes reconstruidos se les indujo la activación químicamente, para lo cual se incubaron en medio T2 con 8 µM de Ionóforo de Ca²⁺ durante 5 min a 30° C, 5% de CO₂ en aire y humedad relativa. Posteriormente los tripletes reconstruidos se lavaron tres veces en medio T20 y se colocaron de manera individual en microgotas de medio SOF1 (5% de SFB) con 2 mM de 6-dimetilaminopurina (6-DMAP). Los tripletes se dejaron incubar por espacio de 4 h a 30° C, 5% de CO₂ en aire y de humedad relativa. Al finalizar el tiempo de incubación, los tripletes reconstruidos se lavaron tres veces en medio SOF1 con 5% de SFB por espacio de 3 min en cada lavado. Los tripletes reconstruidos se cultivaron en el sistema WOW (Well of the Well) o de micropozos, el cual consistió en realizar micropozos en cada celda de una caja de cuatro pozos. A cada celda se le agregó 100 µL de SOF1 con 15% de SFB y se dejó equilibrar el medio por 4 hrs, después se transfirieron cuidadosamente los tripletes reconstruidos activados a cada uno de los micropozos, incubándolos a 38 °C y 5% de CO₂ en aire por 7 días.

Para determinar el desarrollo embrionario, se desarrollaron al mismo tiempo que los embriones clonados, ovocitos partenogénicos, los cuales se activaron y cultivaron de igual manera que los embriones clonados. A los 7 días de cultivo se evaluó el desarrollo embrionario, para lo cual se consideró la etapa de segmentación en que se encontraban los embriones basado en el número de blastómeros observados (embriones de 8-células, mórulas, mórulas compactas y blastocistos) bajo el microscopio estereoscópico a aumento de 20X. Posteriormente, los embriones fueron fijados con paraformaldehído al 4% durante 1 hora, se lavaron con 1 ml de DPBS y se incubaron con Hoechst (5 mg/ml de Hoechst, SIGMA B-2883, disuelto en DPBS con 1g/L de polivinil alcohol) durante 5 min. Finalizado el tiempo de incubación se realizó un lavado en DPBS y se montaron

sobre un portaobjetos con medio de montaje (1:1 de glicerol y DPBS), se cubrieron con un cubreobjetos y las orillas se sellaron con barniz de uñas. Los embriones montados se observaron a 400 aumentos con un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E600) con un filtro UV-2A: Standard filter block for UV. Ex. 330-380 nm. En base al conteo de núcleos de los embriones teñidos con Hoechst se clasificaron en: *No fragmentados*, aquellos embriones donde el número de núcleos correspondía con el número de blastómeros y cada uno de ellos poseía solo un núcleo. *Fragmentados*, embriones donde el número de blastómeros era mayor al número de núcleos. *Polinucleares*, cuando los embriones presentaban más de un núcleo en el mismo blastómero.

3. RESULTADOS

El desarrollo de los embriones clonados y partenogénicos se evaluó a las 96 horas de cultivo in vitro. Los embriones se clasificaron en grupos de 3 a 8 células, 10 a 12 células y estadio de mórula, como se muestra en la Tabla 1 y Figura 1.

Tabla 1 Desarrollo de embriones clonados de *Ovis aries*

	Experimento	Reconstruidos	Embriones n (%)		
			3-8 células	10-12 células	Mórulas
Sin Extractos	1	5	-	1 (20)	4 (80)
	2	5	1 (20)	-	4 (80)
	Totales	10	1 (10)^a	1 (10)^a	8 (80)^a
Con Extractos	1	5	1 (20)	1 (20)	3 (60)
	2	6	1 (31.5)	1 (31.5)	4 (67)
	Totales	11	2 (18)^a	2 (18)^a	7 (64)^a
Partenogénéticos	12	-	4 (33)^a	2 (17)^a	6 (50)^a

Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente significativos (Chi-cuadrada, P<0.05).

Con respecto a la etapa de desarrollo embrionario, no se observó diferencia estadísticamente significativa ($P<0.05$) entre los diferentes grupos (Tabla 1). Sin embargo, el grupo de embriones partenogénicos presentó un mayor porcentaje de desarrollo embrionario a la etapa de 3 a 8 células (33%) con respecto al grupo tratado con extractos de ovocitos (18%) y al grupo control (10%). Por otra parte, el grupo de embriones clonados a partir de fibroblastos tratados con extractos de ovocitos y el grupo de embriones partenogénicos, presentaron una mejor tasa de desarrollo a la etapa de 10 a 12 células en comparación con el grupo control (18%, 17% vs 10%). Sin embargo, el grupo control presentó un mayor porcentaje de embriones en etapa de mórula (80%) en comparación con el grupo de embriones clonados a partir de fibroblastos tratados con extractos de ovocitos (64%) y el grupo de embriones partenogénicos (50%). Se encontró que los embriones clonados con o sin exposición de fibroblastos a extractos de ovocitos presentaron fragmentación del citoplasma y 40% de cada uno de estos grupos mostraron blastómeros polinucleares (Figura 2). Solo en el grupo de embriones partenogénicos, se obtuvo un embrión (12.5%) cuyo número de núcleos correspondía con el número de blastómeros, de los demás embriones el 63% exhibieron fragmentación, en tanto que el 25% presentó blastómeros polinucleares. Los embriones clonados con blastómeros polinucleares también mostraron fragmentación citoplasmática, mientras que los embriones partenogénicos fragmentados no exhibieron blastómeros polinucleares. Además, en el grupo de embriones partenogénicos, los embriones polinucleares se caracterizaron por poseer pocos blastómeros.

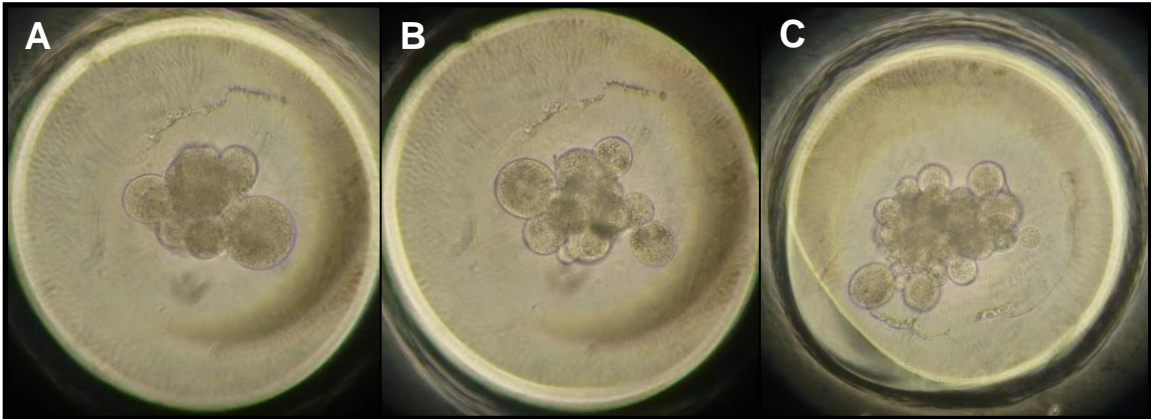


Figura 1. Diferentes etapas del desarrollo de embriones clonados de *Ovis aries* a partir de fibroblastos tratados con extractos de ovocitos en MII. A) Embrión de 6-blastómeros, B) Embrión de 12-blastómeros, C) Embrión en estadio de mórula. (Aumento 20X).

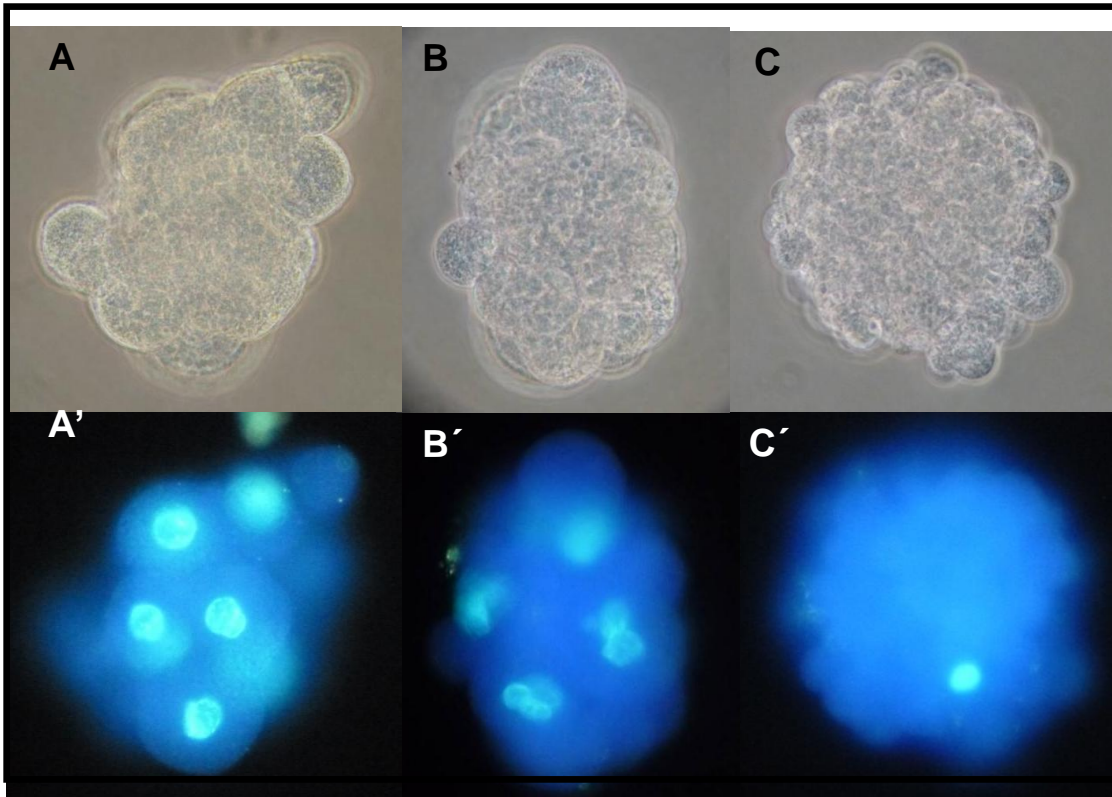


Figura 2. Embriones clonados de *Ovis aries* teñidos con Hoechts. (A-C) Campo claro. (A'-C') microscopía de fluorescencia, filtro de excitación de UV 350 nm; Aumento a 40X. (A, A') Embrión de 17B/12N. (B, B') Embrión de 12B/18N en 5 blastómeros. (C, C') Embrión fragmentado.

No se observó diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) entre los diferentes grupos con respecto al número de embriones que presentaron o no fragmentación citoplasmática y blastómeros polinucleares (Tabla 2).

Al analizar la relación del número de núcleos por blastómeros presentes en los embriones de cada grupo, sin considerar a los embriones polinucleares debido a que presentaron más de un núcleo en un mismo blastómero, se observó una relación favorable para los embriones cuyos fibroblastos fueron tratados con extractos de ovocitos en comparación con aquellos no tratados (0.58 vs 0.45), y ambos fueron mejores que los embriones partenogénicos (0.38).

Lo que podría indicar alguna bondad de la utilización de los extractos de ovocitos homólogos a pesar de lo reducido de la muestra disponible en el presente trabajo. Por otro lado, si consideramos los embriones clonados sin exposición de los fibroblastos a extractos de ovocitos homólogos (exceptuando los polinucleares), en dos de los tres embriones restantes (66%) no hubo división nuclear. En los partenogénicos esta condición se presentó en dos de los seis embriones divididos (33%). En tanto que en los clonados a partir de fibroblastos sometidos a extractos de ovocitos homólogos no existió esta condición, es decir que este tratamiento favoreció la división nuclear.

Finalmente, sobresalta el hecho de que los embriones partenogénicos con mayor división nuclear, no lleguen al 50% de los núcleos esperados considerando el número de blastómeros presentes, mientras que algunos de los embriones clonados donde los fibroblastos fueron sometidos a extractos de ovocitos homólogos llegan al 60 y 70%. Esto de nueva cuenta señala el beneficio que puede tener la exposición a los extractos de ovocitos homólogos.

Tabla 2 Fragmentación citoplasmática de embriones clonados

Tratamiento	Embriones	Sin fragmentación No. (%)	Con fragmentación No. (%)	Polinucleares No. (%)
Control	5	0	5 (100) ^a	2 (40) ^a
Extractos	5	0	5 (100) ^a	2 (40) ^a
Partenogénicos	8	1 (12.5)	7 (87.5) ^a	2 (25) ^a

Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente significativos (Chi-cuadrada, $P < 0.05$).

4. DISCUSIÓN

Los embriones procedentes de fibroblastos no expuestos a extractos, alcanzaron aparentemente un mejor desarrollo (80% de mórulas), en comparación con los sometidos a extractos (64%) y estos dos fueron mayores a los partenogénicos (50%). Dada la reducida cantidad de embriones, la prueba estadística ($p > 0.05$) no logró mostrar diferencias significativas. Pareciera ser entonces que, en este trabajo, la utilización de extractos de ovocitos homólogos para reprogramar los fibroblastos, no tuviera utilidad, sin embargo, al analizar la calidad embrionaria mostró una clara tendencia de mejorarla. Por su parte, Xiong *et al.* (2013) quienes utilizaron fibroblastos obtenidos de yak expuestos a extractos de ovocitos heterólogos fusionados con ovocitos de vaca, reportaron un aumento del doble en la formación de blastocistos (28.6%) frente a los no expuestos a extractos (13.6%), también se observó que cuando se colocaron 10 o 50 μ L del extracto, no hubo diferencias en el porcentaje de desarrollo embrionario. Rathbone *et al.* (2010), trabajando la reprogramación de fibroblastos ovinos con extractos de ovocitos heterólogos (*Xenopus laevis*), no reportaron

diferencias entre el grupo de fibroblastos control y el expuesto a los extractos de ovocitos sobre el desarrollo embrionario de 2 células y blastocistos (84.4 vs 83.9% y 18.6 vs 21.3%, respectivamente). Sin embargo, si hubo diferencias significativas en etapas posteriores a la transferencia embrionaria, de manera que los expuestos a extractos tuvieron cuatro veces más blastocistos, que llegaron a crías nacidas comparados con los no expuestos (14.7% vs 3.1%).

Es evidente que, la utilización de extractos de ovocitos ha resultado benéfica para la técnica de clonación de embriones de mamífero, sin embargo, resulta de interés que se utilicen “extractos”, sin que a la fecha se hayan identificado todas las moléculas que posee el citoplasma del ovocito, las cuales intervienen en la reprogramación nuclear de la célula somática (fibroblasto) a pesar de las diferentes técnicas actuales utilizadas para la identificación de moléculas de manera más sensible. Lo que se ha observado es la diferente capacidad de reprogramación nuclear que poseen los extractos, de acuerdo al grado de madurez alcanzado por el ovocito, por ejemplo, en estudios donde se han utilizado ovocitos en estadio de vesícula germinal o en metafase II (Rathbone *et al.*, 2010).

Poco se conoce en relación al mecanismo de acción preciso por parte de las moléculas de los extractos de ovocitos sobre la expresión nuclear de la célula somática expuesta, lo que ha tratado de explicarse en relación a los mecanismos de metilación del ADN y las modificaciones postraduccionales de las histonas, relacionados con los genes que interviene durante el desarrollo embrionario temprano. Al respecto Rathbone *et al* (2010) reportaron una disminución en la metilación de las citosinas del ADN (5MeC), así como en la tri-metilación de lisina 9 en la histona 3 (TriH3K9Me) de fibroblastos de ovino sometidos a extractos de ovocitos de *Xenopus laevis* y medido a través de anticuerpos específicos fluorescentes. En el caso de 5MeC, la reducción fue de casi 13% en tanto que para la TriH3K9Me fue de 25% en comparación con los fibroblastos no expuestos.

Por su parte, Xiong *et al* (2013), reportaron el efecto de la exposición de fibroblastos de yak a dos cantidades de extractos de ovocitos de vaca (10 y 50 μ L) sobre la acetilación de la lisina en la histona tres, encontrando que, a baja cantidad de extractos, la acetilación se duplicó, en tanto que a cantidades altas se triplicó, evidenciando un efecto dependiente de la cantidad de extractos y obviamente de la concentración de moléculas que intervienen en la reprogramación nuclear. En ese mismo estudio reportaron resultados de la metilación del ADN de genes pluripotentes (Oct4 y Nanog) a través de la secuencia de bisulfito en los promotores de los genes. Observaron una menor metilación en el promotor de Oct-4 y Nanog en aquellas células expuestas a 10 y 50 μ l de extracto (76.4, 72.2 y 35.6, 27.9%) en comparación con las células sin exposición a extractos (92.1 y 47.8%). Concluyendo que una mayor cantidad de extractos tiene un mejor efecto sobre la reprogramación nuclear.

En ese mismo estudio, se analizaron los transcritos (por RT PCR) de otros genes relacionados con el desarrollo embrionario (HDAC-1, HDAC-2, Dnmt-1 y Dnmt-3a), los cuales en todos los casos tuvieron regulación a la baja, con la utilización de los extractos de ovocitos.

Por otro lado, se ha señalado como una limitante en el desarrollo de los embriones *in vivo* e *in vitro* (FIV, ICSI y TNCS) la fragmentación citoplasmática, la cual se ha descrito como la presencia de porciones citoplasmática rodeadas de membrana que carecen de núcleos y se presentan durante el desarrollo embrionario (Fujimoto *et al.*, 2011; Kawahara *et al.*, 2002). En el presente trabajo, los embriones clonados mostraron fragmentación citoplasmática y algunos blastómeros polinucleares, en tanto que, de los embriones partenogénicos solo uno (12.5%) no mostró estas condiciones. El proceso por el cual se presenta la fragmentación citoplasmática no se ha comprendido del todo, sin embargo, se ha observado que acontece una vez que el ovocito se activa para iniciar la segmentación y ocurre específicamente durante la fase de citocinesis del ciclo celular en los blastómeros en división, como respuesta a una inadecuada sincronización entre los microtúbulos del huso y los microfilamentos corticales (Alikani *et al.*, 2005).

Se relacionó el número de núcleos con el número de blastómeros de cada embrión, descartando a los polinucleares, y se comparó entre los tres grupos con extractos, sin extractos y partenogénicos, encontrándose que esta relación fue favorable para los embriones clonados obtenidos con fibroblastos expuestos a extractos de ovocitos homólogos (0.58), en tanto que los no expuestos (0.45) y los partenogénicos (0.35) fueron menores. Esto nos indica que casi la mitad de los blastómeros presentes en un embrión clonado o partenogénico carecen de núcleo (fragmentados), en el caso de los embriones clonados, es probable que lo anterior se deba a un inadecuado acoplamiento del citoesqueleto entre los dos citoplastos con el carioplasto después de la fusión celular, de tal manera que el carioplasto se sincroniza con solo uno de los citoplastos para generar blastómeros nucleados mientras que el otro citoplasto se fragmenta. Sin embargo, este fenómeno de fragmentación también se presenta en los embriones partenogénicos lo cual sugiere más de un origen para la fragmentación.

Se ha correlacionado la fragmentación con la pobre competencia citoplasmática y nuclear del ovocito, también se ha observado que el contenido de ADN mitocondrial está relacionado con este fenómeno (Fujimoto *et al.*, 2011). Sin embargo, en los embriones clonados la presencia de fragmentación se ha relacionado a los pulsos eléctricos durante la fusión celular y la activación de los embriones reconstruidos, los cuales desestabilizan los microfilamentos de actina promoviendo la fragmentación citoplasmática (Kawahara *et al.*, 2002). Para disminuir el daño ocasionado al citoesqueleto se emplean diferentes químicos en la clonación, tales como la citocalasina B y la demecolcina, que evitan la polimerización de los microfilamentos corticales y los microtúbulos del huso, respectivamente (Alikani *et al.*, 2005).

Se observó la presencia de blastómeros polinucleares en los embriones fragmentados obtenidos por clonación con o sin exposición a extractos (40%) y en los embriones partenogénicos (20%), solo que estos no presentaron fragmentación. Esta condición puede indicar una mitosis anormal, en la cual los cromosomas no se alinearon adecuadamente durante la metafase, quedando repartidos en múltiples núcleos.

5. CONCLUSIONES

La exposición de extractos de ovocitos en MII mejoró la relación entre el número de núcleos y el número de blastómeros de los embriones clonados de *Ovis aries* que presentaron fragmentación del citoplasma, con lo cual se incrementa la probabilidad de que estos embriones se desarrollen a etapas más avanzadas. Es necesario investigar las causas que propician la fragmentación del citoplasma de los embriones generados por clonación para mejorar su calidad y de ser transferidos a una hembra receptora, logren implantarse para generar una gestación y posiblemente una cría recién nacida.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. G. Evans, "Perspectiva on the development of high-toughness ceramics", J. Am. Ceram. Soc., Vol. 73, 2, 1990, pp. 187-206.
2. A. Ogura, K. Inoue, T. Wakayama, "Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer", Philosophical Transactions of The Royal Society of London, series B, Biological Sciences Vol. 368, 1609, 2012, pp. 1-12.
3. J. Jullien, V. Pasque, R. Halley-Stott, K. Miyamoto, B. Gurdon, "Mechanisms of nuclear reprogramming by eggs and oocytes: a deterministic process?", Nature Reviews, Molecular Cell Biology, Vol. 12, 7, 2011, pp. 453-459.

4. K. Miyamoto, T. Furusawa, M. Ohnuki, S. Goel, T. Tokunaga, N. Minami, M. Yamada, K. Ohsumi, H. Imai, "Reprogramming events of mammalian somatic cells induced by *Xenopus laevis* egg extracts", *Molecular Reproduction and Development*, 74,10, 2007, pp. 1268-1277.
5. X.R. Xiong, J. Li, M. Fu, C. Gao, Y. Wang, J. C. Zhong, "Oocyte extract improves epigenetic reprogramming of yak fibroblast cells cloned embryo development", *Theriogenology*, 79, 3, 2013, pp. 462-469.
6. M.C. Navarro-Maldonado, S. Hernández-Martínez, J.R. Vázquez-Avendaño, J.L. Martínez-Ibarra, N. L. Zavala-Vega, B. Vargas-Miranda, A. Rivera-Rebolledo, D. A. Ambríz-García, "Deriva de células epiteliales de tejido de piel descongelado de *Ovis canadensis mexicana* para la formación de un banco de germoplasma", *Acta Zoológica Mexicana*, 31, 2, 2015, pp. 275-282.
7. R. P. Halley-Stott, V. Pasque, C. Astrand, K. Miyamoto, I. Simeoni, J. Jullien, J. B. Gurdon, "Mammalian nuclear transplantation to germinal vesicle stage *Xenopus* oocyte- A method for quantitative transcriptional reprogramming", *Methods*, 51,1, 2010, pp. 56-65.
8. G. Vajta, I. Lewis, P. Hyttel, G. Thouas, A. Trounson, "Somatic cell cloning without micromanipulators", *Cloning* 3,2, 2001, pp. 89-95.
9. A.J. Rathbone, P. A. Fisher, J. H. Lee, J. Craigon, K. Campbell, "Reprogramming of ovine somatic cells with *xenopus laevis* oocyte extract prior to SCNT improves live birth rate", *Cellular Reprogramming*, 12, 5, 2010, pp. 609-616.
10. M. Alikani, T. Schimmel, S. M. Willadsen, "Cytoplasmic fragmentation in activated eggs occurs in the cytokinetic phase of the cell cycle, in lieu of normal cytokinesis, and in response to cytoskeletal disorder", *Molecular Human Reproduction*, 11, 5, 2005, pp. 335-344.
11. V. Y. Fujimoto, R. W. Browne, M. S. Bloom, D. Sakkas, M. Alikani, "Pathogenesis, developmental consequences, and clinical correlations of human embryo fragmentation", *Fertility and Sterility*, 95, 4, 2011, pp. 1197-1204.
12. M. Kawahara, T. Mori, H. Tanaka, H. Shimizu, "The suppression of fragmentation by stabilization of actin filament in porcine enucleated oocytes", *Theriogenology*, 58, 6, 2002, pp. 1081-1095.

RADIACIÓN GAMMA DE SEMILLAS Y POTENCIAL OSMÓTICO DE LA SOLUCIÓN NUTRITIVA EN LA CONCENTRACIÓN FOLIAR DE HIERRO EN CHILE CHILHUACLE

Víctor García-Gaytán^a, Fernando C. Gómez-Merino^b, Gustavo A. Baca-Castillo^a, Libia I. Trejo-Téllez^a, Soledad García-Morales^a y Olga Tejeda-Sartorius^a

a Colegio de Postgraduados Campus Motecillo, Texcoco 56230, Estado de México. b Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, Amatlán de los Reyes 94946, Veracruz, México

RESUMEN

El Fe es indispensable para la integridad estructural y funcional de las membranas del tilacoide, es requerido para la ferredoxina y la biosíntesis de la clorofila, lo que explica la especial sensibilidad de los cloroplastos y tilacoides a la deficiencia de este micronutriente. El objetivo de este trabajo fue evaluar la concentración foliar de Fe por efecto de la radiación gamma de las semillas y del potencial osmótico (PO) de la solución nutritiva. Se evaluaron cuatro dosis de radiación: 0, 10, 80 y 120 Gy y cuatro niveles de PO: -0.036, -0.072, -0.092 y -0.108 MPa, respectivamente. La cuantificación del Fe se realizó en el extracto resultante de una digestión diácida empleando un equipo de espectroscopia de emisión atómica de inducción con plasma acoplado. Los resultados muestran que la radiación de las semillas con dosis iguales o superiores a 80 Gy afectan en forma negativa la concentración foliar de Fe. La solución nutritiva con un PO de -0.072 MPa originó mayor concentración foliar de Fe (278.57 mg kg⁻¹). Las semillas no irradiadas con PO de -0.036 y -0.092 MPa y aquellas irradiadas con dosis bajas (10 Gy) con PO de -0.036 y -0.072 MPa presentan los valores medios más altos de concentración foliar de Fe. Se concluye que la radiación gamma en altas dosis, afecta negativamente la concentración foliar de Fe y que el PO óptimo para Chile chilhuacle es de -0.072 MPa.

1. INTRODUCCIÓN

México es el segundo exportador de chiles verdes en el mundo y octavo en chiles deshidratados, con una producción de 2.7 millones de toneladas de chiles verdes, lo que genera divisas por cerca de 560 millones de dólares (SAGARPA, 2015). Pese a ello, para abastecer el consumo nacional, en 2014 México importó más de un millón de toneladas de Chile provenientes de China y Perú por su bajo precio, aunque era de mala calidad. Por lo anterior, existe una necesidad urgente de incrementar la producción de chiles tanto a nivel local como nacional. Para ello, se requiere generar los paquetes tecnológicos que permitan aprovechar la biodiversidad de México en términos de especies vegetales de importancia agroalimentaria como los chiles (Aguilar-Meléndez *et al.*, 2009).

El factor más importante del bajo rendimiento en la producción de los cultivos, es la falta de variedades de alto rendimiento (Malek *et al.*, 2012). Por tanto, aprovechar los recursos genéticos potencialmente económicos como el Chile Chilhuacle puede jugar un papel muy significativo en la reducción de importaciones.

La mutación a través de rayos gamma se ha utilizado ampliamente en el desarrollo de plantas con características mejoradas en la agricultura (Kumar *et al.*, 2006). El mejoramiento por mutación es un método eficaz para inducir variabilidad genética en los cultivos en un periodo de tiempo corto (Bolbhat y Dhumal, 2009). Pero una vez que se genere la variabilidad, es necesario probar la

adaptabilidad de los materiales en ambiente diversos y condiciones de cultivo. De igual manera la nutrición es factor importante en los procesos de rendimiento de los cultivos (Steiner, 1961). Además, de acuerdo con Maity *et al.* (2010) la radiación ionizante puede repercutir en alteraciones metabólicas, transporte y acumulación de nutrimentos en los tejidos vegetales. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la concentración foliar de Fe por efecto de la radiación gamma de las semillas y del potencial osmótico (PO) de la solución nutritiva.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en invernadero y laboratorio (Laboratorio de Nutrición de Cultivos “Salvador Alcalde Blanco”) en el Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México. Semillas de chile Chilhuacle provenientes de la región Cañada del estado de Oaxaca una vez lavadas y desinfectadas fueron irradiadas en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) a dosis de 10, 80 y 120 Gy con el isótopo ^{60}Co en lotes de 100 semillas por tratamiento, más un lote testigo sin irradiar. Posteriormente se utilizó turba para germinar las semillas. Una vez que las plántulas emergieron, fueron desarrolladas en un sistema hidropónico, utilizando tezontle como sustrato, con diámetro de 3 a 10 mm. La composición química de la solución nutritiva utilizada fue la de Steiner (Steiner, 1984) en las concentraciones siguientes ($\text{mol}_{(+)}\text{m}^{-3}$): 12 NO_3^- , 1 H_2PO_4^- , 7 SO_4^{2-} , 7 K^+ , 9 Ca^{2+} y 4 Mg^{2+} . El pH de la solución se ajustó a 5.8 con H_2SO_4 concentrado y la CE (dS m^{-1}) se midió diariamente. La solución fue preparada con reactivos grado analítico.

Los tratamientos se realizaron en un experimento factorial 4 x 4 (dosis de radiación en las semillas y potencial osmótico de la solución nutritiva), con 8 repeticiones, distribuidas completamente al azar, el potencial osmótico de la solución nutritiva tuvo cuatro niveles: -0.036, -0.072, -0.092 y -0.108 MPa. Para la determinación foliar de Fe, las hojas se secaron hasta peso constante a 70 °C en una estufa de aire forzado, posteriormente fueron molidas. La cuantificación de la concentración foliar de Fe se realizó con una digestión diácida y las determinaciones de los extractos obtenidos después de la digestión y filtrado se leyeron en un equipo de espectroscopia de emisión óptica de inducción por plasma acoplado (ICP-OES Agilen® modelo 725-ES) (Alcántar y Sandoval, 1999).

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza (GLM) y comparación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) con el programa SAS (SAS, 2011).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La radiación de semillas iguales o superiores a 80 Gy afectó negativamente la concentración de Fe en las hojas de chile Chilhuacle (**Figura 1A**). El potencial osmótico de la solución nutritiva de -0.072 MPa dio lugar a una mayor concentración de Fe ($278.57 \text{ mg kg}^{-1}$), a medida que el potencial osmótico disminuyó, la concentración de Fe fue menor (**Figura 1B**). A pesar de que la mayor concentración de Fe fue con el potencial osmótico de -0.072 MPa, todos los tratamientos estuvieron dentro del rango óptimo.

De acuerdo con Kalra (1997) la concentración óptima de Fe en hojas de pimiento dulce es de 205 mg kg^{-1} , por su parte Hochmuth *et al.* (1991) indican que los niveles óptimos de Fe en hojas de pimiento oscilan de 30 a 150 mg kg^{-1} , en tanto que Jones (2004), menciona que el rango de suficiencia de Fe en hojas para la mayoría de las plantas es de 50 a 100 mg kg^{-1} . Por lo anterior, podemos decir que es amplio el rango de suficiencia de Fe en hojas de chile, aunque también dependerá de la etapa fenológica, especie o variedad. La empresa HAIFA reporta que los niveles óptimos de Fe en hoja para pimiento de la variedad Maor oscilan de entre 200 y 300 mg kg^{-1} (www.haifa-group.com/files/Guides/Pepper/Pepper.pdf).

En el **Cuadro 1** se observa que los valores medios más altos en la concentración de Fe en hojas ($379.68 \text{ mg kg}^{-1}$) se registraron en el tratamiento sin irradiar y con un potencial osmótico de -0.092 MPa, así también en los tratamientos que fueron sometidos a 10 Gy y potenciales osmóticos de -

0.036 y -0.072 MPa (311.11 y 350.70 mg kg⁻¹, respectivamente). Nuestro resultado anterior contrastan con los rangos de Fe en hojas pimiento sugeridos por Kalra (1997) (205 mg kg⁻¹) y

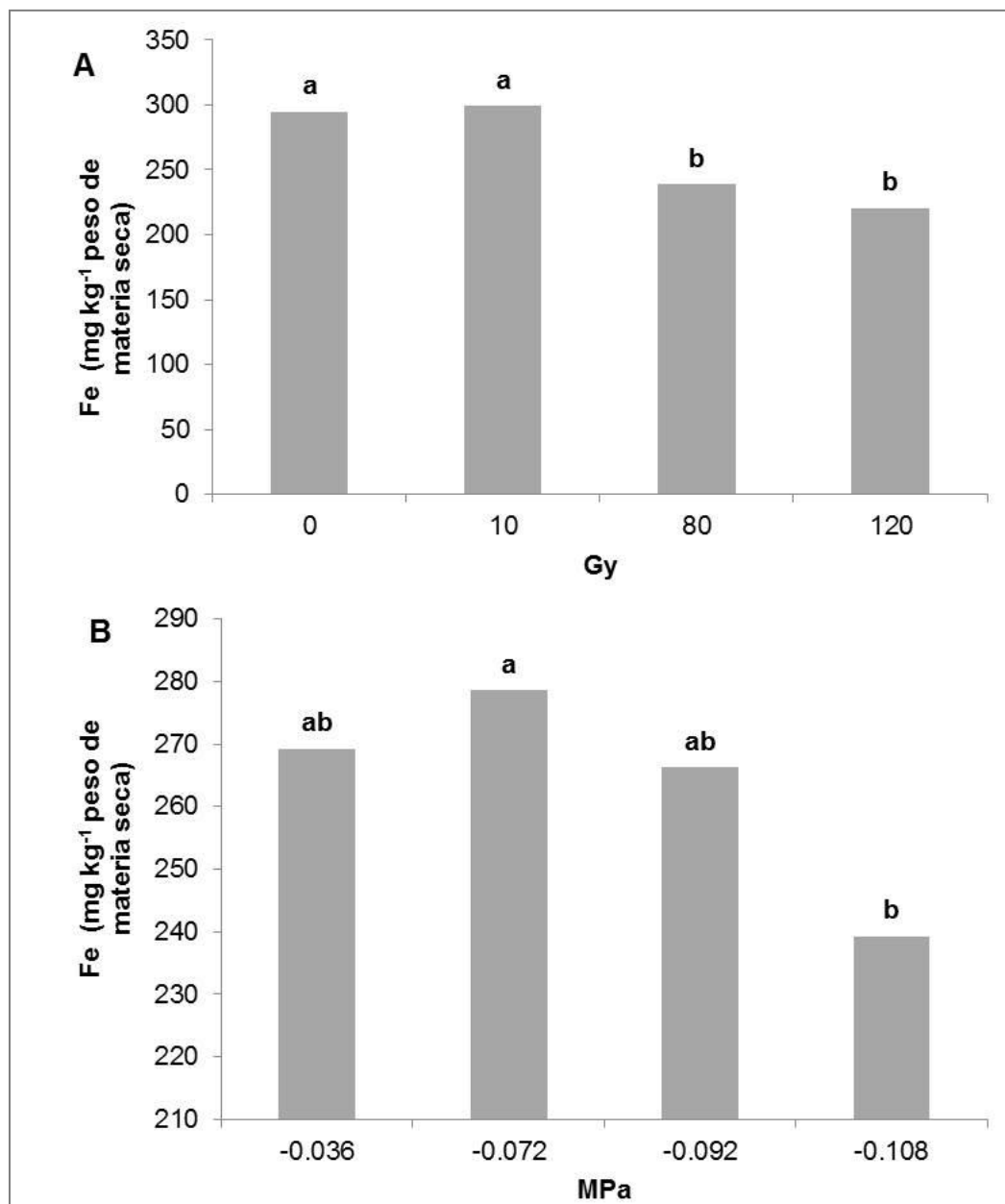


Figura 1. Concentración de Fe en hojas de plantas de chile Chilhuacle. **A)** Efecto principal de la dosis de radiación gamma (Gy) en semillas. **B)** Efecto principal del potencial osmótico (MPa) en la solución nutritiva. Medias con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$) entre tratamientos.

Hochmuth *et al.* (1991) (30 a 150 mg kg⁻¹) para pimiento, lo anterior puede deberse al manejo y condiciones del cultivo.

Singh *et al.* (2013) reportaron un mayor incremento de Fe en hojas de trigo cuando los granos se irradiaron con 25 Gy, por lo que se hipotetizó que los granos producidos podrían ser ricos en este micronutriente; cuando la dosis de radiación se incrementó a 100 Gy hubo una reducción en la concentración de K, P, Mg, Fe y Zn.

Cuadro 1. Concentración de Fe en hojas de chile Chilhuacle, por efecto de la interacción de la dosis de radiación y del potencial osmótico de la solución nutritiva.

Dosis (Gy)	PO (MPa)	Fe (mg kg ⁻¹ peso de materia seca)
0	-0.036	298.32 ± 44.16 abcd
0	-0.072	250.21 ± 2.26 cdef
0	-0.090	379.68 ± 33.33 a
0	-0.108	250.78 ± 5.73 cdef
10	-0.036	311.11 ± 45.49 abc
10	-0.072	350.70 ± 32.35 ab
10	-0.090	282.84 ± 54.50 bcde
10	-0.108	252.31 ± 14.82 cdef
80	-0.036	270.40 ± 25.13 bcdef
80	-0.072	258.85 ± 6.79 cdef
80	-0.090	213.40 ± 20.53 def
80	-0.108	212.79 ± 6.53 def
120	-0.036	196.96 ± 31.27 ef
120	-0.072	254.51 ± 32.28 cdef
120	-0.090	189.32 ± 44.31 f
120	-0.108	241.20 ± 11.99 cdef

Medias con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$) entre tratamiento

4. CONCLUSIONES

La radiación gamma de semillas a altas dosis, repercute negativamente la concentración foliar de Fe. El potencial osmótico de la solución nutritiva óptimo para el chile Chilhuacle es de -0.072 MPa.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. Aguilar-Meléndez, P. L. Morrell, M. L. Roose, and S. C. Kim, "Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chiles (*Capsicum annuum*; Solanaceae) from Mexico", *Am. J. Bot.*, Vol, 96, 6, 2009, pp. 1190-1202.
2. G. G. Alcántar, y V. M. Sandoval, "Manual de análisis químico de tejido vegetal. Guía de muestreo, preparación, análisis e interpretación". (Publicación Especial No. 10. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Chapingo, México, 1999).
3. B. Singh, S. Ahuja, R. K. Singhal and P. V. Babu, "Effect of gamma radiation on wheat plant growth due to impact on gas exchange characteristics and mineral nutrient uptake and utilization", *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, Vol. 298, 1, 2013, pp. 249-257.
4. S. N. Bolbhat, and K. N. Dhumal, "Induced macromutations in horsegram [*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc]", *Legume Res.*, Vol. 32, 4, 2009, pp. 278-281.

5. G. Hochmuth, D. Maynard, C. Vavrina, E. Hanlon and E. Simonne, "Plant tissue analysis and interpretation for vegetable crops in Florida", Fla. Coop. Ext. Serv., *Special Series SS-VEC-42*, 1991. p. 48.
6. J. B. Jones Jr. "Hydroponics: a practical guide for the soilless grower", (CRC press, Boca Raton, 2004), p. 439.
7. Y. Kalra, "Handbook of reference methods for plant analysis", (CRC Press, Boca Raton, 1997), p. 291.
8. S. Kumar, K. V. Prasad, and M. L. Choudhary, "Detection of genetic variability among chrysanthemum radiomutants using RAPD markers", *Curr. Sci.*, Vol. 90, 8, 2006, pp. 1108-1113.
9. J. P. Maity, S. Kar, A. Chakraborty, M. Sudershan and S. C. Santra, "Study on trace elements (using energy dispersive X-ray fluorescence technique) of edible seeds from *Cicer arietinum* L. plants developed from gamma irradiated seeds and variation of yielding capacity", *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, Vo. 283, 1, 2010, pp. 225-230.
10. M. A. Malek, H. A. Begum, M. Begum, M. A. Sattar, M. R. Ismail and M. Y Rafii, "Development of two high yielding mutant varieties of mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern.] through gamma rays irradiation", *Aust. J. Crop. Sci.*, Vol. 6, 5, 2012, pp. 922-927.
11. SAS. SAS Institute Inc. 2011. SAS/STAT Users Guide. Version 9.3. SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA.
12. A. A. Steiner, "A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition", *Plant Soil.*, Vol. 15, 2, 1961, pp. 134-154.
13. A. A. Steiner, "The universal nutrient solution," In *Sixth International Congress on Soilless Culture*. (Proceedings International Society for Soilless Culture. Lunteren, The Netherlands, 1984), pp: 633-650.
14. SAGARPA. 2015. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimento. <http://sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2015B721.aspx#>.

FOSFITO Y ÁCIDO SALICÍLICO EN CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE COL

Óscar R. Pérez-Durán¹, Libia I. Trejo-Téllez¹, Fernando C. Gómez-Merino¹, Adriana Contreras-Oliva¹, Nadia I. Torres-Flores¹

¹Colegio de Postgraduados

RESUMEN

En esta investigación se evaluaron los efectos principales del tratamiento vía radical de distintas concentraciones de fosfito (0, 0.15 y 0.30 mM) y de ácido salicílico (0, 0.05 y 0.10 mM) suministrados a partir de ácido fosforoso y ácido acetilsalicílico, respectivamente, en parámetros de crecimiento de plántulas de dos variedades comerciales de col: Copenhagen Market y Sanda. En ambas variedades el área foliar fue reducida significativamente con la adición de fosfito a la solución nutritiva; por otra parte, la adición ácido salicílico solo redujo el área foliar en Copenhagen Market y no tuvo efectos en Sanda. Los resultados obtenidos en área foliar se relacionaron en forma positiva con el peso fresco de hojas. Ambos factores de estudio redujeron de manera significativa el peso seco de las hojas. En general, se concluye que, en fase de plántula, la adición de fosfito y de ácido salicílico tiene efectos negativos en el crecimiento de las dos variedades de col evaluadas.

1. INTRODUCCIÓN

En la búsqueda de potenciar e innovar la producción de cultivos hortícolas ante la amenaza del cambio climático global y el deterioro de los recursos naturales, se ha considerado pertinente ahondar en los agentes que puedan presentar una influencia en el crecimiento y desarrollo de éstos. Si bien en el ámbito de la nutrición vegetal se ha atendido a las interrogantes sobre las necesidades que plantean las especies agrícolas, es importante conocer qué otras especies químicas pueden tener efectos sinérgicos, antagónicos o aditivos en pro de la calidad y producción de las cosechas de interés para el hombre.

2. TEORÍA

El fósforo se encuentra dentro de los elementos esenciales, forma parte de compuestos estructurales y está inmiscuido en procesos metabólicos de gran importancia para mantener el correcto funcionamiento en la planta. La deficiencia de este elemento en hortalizas puede ser traducida en menor desarrollo radicular, menor floración y menor cuajado de los frutos (Martínez, 2003). Las plantas superiores absorben el fósforo en dos formas: como fosfato ($H_2PO_4^-$) y como fosfito (HPO_4^-) (Moreno, 2007). El fosfito es un isómero que suele utilizarse en la industria agroalimentaria como fertilizante. Pese a que no hay consenso concluyente de sus efectos, existe evidencia que puede tener efectos biocidas e inductores de las de las respuestas metabólicas benéficas en la mejora de rendimiento y calidad de distintas especies hortícolas. (Gómez-Merino y Trejo-Téllez, 2015). Por otra parte, como bien es conocido, el ácido salicílico en plantas forma parte de una serie de fitohormonas que intervienen en las reacciones de defensa en contra de patógenos. El ácido salicílico participa en procesos como la germinación de semillas, crecimiento celular, respiración, cierre de estomas, expresión de genes asociados a senescencia, repuesta a estrés abiótico y de forma esencial en la termogénesis, así como en la resistencia a enfermedades

(Rangel *et al.*, 2010). En el contexto anterior, el estudio de ambas moléculas se justifica para documentar sus efectos en hortalizas.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal

Las variedades de col seleccionadas fueron: *Brassica oleracea* var. *Capitata* cv. Copenhagen Market y *Brassica oleracea* var. *Gemmifera* cv. Sanda.

Tratamientos

En este experimento se utilizaron nueve soluciones nutritivas completas (Cuadro 1), con niveles óptimos de macro y micronutrientes, de las cuales tuvieron variaciones solamente en la concentración de ácido fosforoso y del ácido acetilsalicílico. El fosfito fue suministrado a partir de ácido fosforoso (H_3PO_3) grado analítico (Sigma-Aldrich), y el ácido acetilsalicílico ($C_9H_8O_4$) fue también en grado analítico (Sigma-Aldrich).

Las soluciones nutritivas se formularon tomando como referencia la solución nutritiva de Steiner (Steiner, 1984) al 50% de su concentración, preparada con reactivos grado analítico utilizando: 0.53 g de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ L^{-1} , 0.15 g de KNO_3 L^{-1} , 0.13 g de K_2SO_4 L^{-1} , 0.25 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ L^{-1} y 0.07 g de KH_2PO_4 L^{-1} . Las concentraciones de micronutrientes empleadas en las soluciones nutritivas fueron: Mn: 1.6 mg L^{-1} ; Cu: 0.11 mg L^{-1} ; Zn: 0.86 mg L^{-1} ; y Mo: 0.048 mg L^{-1} . El hierro fue abastecido como Fe-EDTA a una concentración de 5 mg L^{-1} , según lo descrito por Steiner y Van Winden (1970). El pH de las soluciones nutritivas se mantuvo en un rango de 5.1 y 5.2, el cual se ajustó adicionando H_2SO_4 1 N y NaOH 1 N.

Cuadro 1. Tratamientos de fosfito y ácido acetilsalicílico evaluados en hidroponía.

Tratamiento	Factor fosfito (mM)	Factor ácido acetilsalicílico (mM)
T1	0.00	0.00
T2	0.15	0.00
T3	0.30	0.00
T4	0.00	0.05
T5	0.15	0.05
T6	0.30	0.05
T7	0.00	0.10
T8	0.15	0.10
T9	0.30	0.10

El presente trabajo se realizó en un invernadero tipo túnel del área de Nutrición Vegetal-Edafología, del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, localizado a 19° 29' latitud norte,

98° 53' longitud oeste y una altitud de 2250 m. El sustrato utilizado fue una mezcla de tezontle con perlita expandida (50:50 v/v).

La unidad experimental fue un recipiente de polietileno con una medida de 5.5 cm y una capacidad de 60 cm³, conteniendo una plántula de col, misma que fue colocada en charolas metálicas en grupos de diez y distribuidas conforme a los tratamientos de las soluciones nutritivas empleadas descritas en el **Cuadro 1**.

Condiciones experimentales

Las plántulas se desarrollaron en condiciones controladas con ciclos de luz/oscuridad de 15 h/9 h, temperatura de 29 °C/14 °C y humedad relativa constante de 70%; cuarenta y un días después a la exposición de los tratamientos, las plántulas se recolectaron para realizar las evaluaciones correspondientes.

VARIABLES EVALUADAS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El área foliar se determinó utilizando un integrador electrónico de área foliar (LI-300, LICOR, Estados Unidos).

La determinación del peso fresco de hojas se realizó inmediatamente después del corte, mientras que el peso seco después de 48 h de secado a 70 °C en una estufa de aire forzado (Riosa, Monterrey, México). En ambos pesados se empleó balanza analítica (Adventurer Pro AV213C, Ohaus, Estados Unidos). Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias por Tukey ($\alpha=0.05$) empleando el software SAS (SAS, 2011).

4. RESULTADOS

En la **Figura 1** se presentan los resultados obtenidos en la variable área foliar, con ambos factores de estudio. En el caso del fosfito, se observa que su concentración en la solución nutritiva se relacionó de manera negativa con el área foliar en ambas variedades. En el caso del ácido acetilsalicílico, su efecto fue diferencial entre variedades. En la variedad Copenhagen Market, su suministro a la solución nutritiva redujo el área foliar; mientras que en la variedad Sanda, no tuvo efecto.

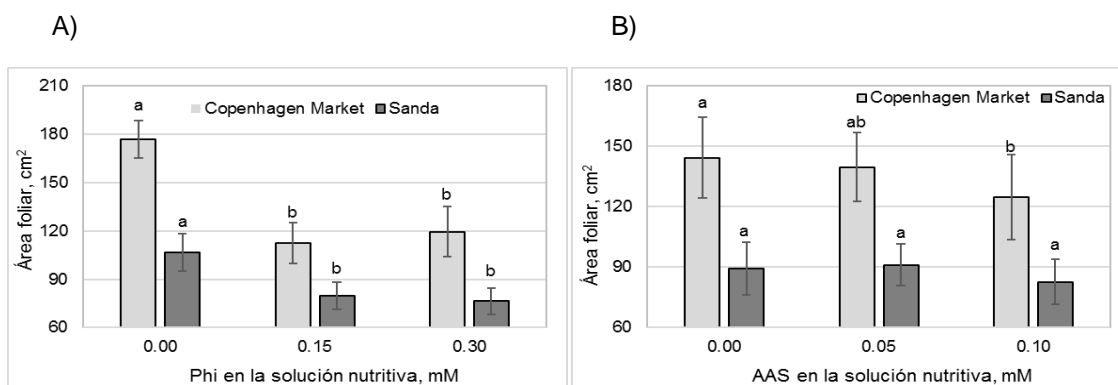


Figura 1. Efectos principales del fosfito (A) y del ácido acetilsalicílico (B) en el área foliar de dos variedades comerciales de col (*Brassica oleracea*). Medias \pm DE con letra distinta en cada subfigura para cada variedad, indican que existen diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

Los resultados de peso fresco de hojas son coincidentes con los registrados en la variable área foliar. Es decir, se observan efectos negativos del fosfito en el área foliar; mientras que, el ácido acetilsalicílico solo afectó de manera negativa el peso fresco de hojas de la variedad Copenhagen Market (**Figura 2**).

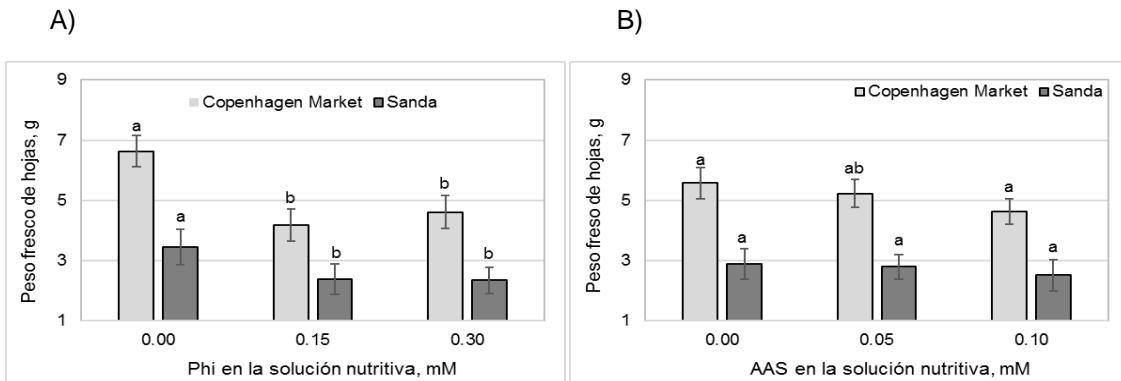


Figura 2. Efectos principales del fosfito (A) y del ácido acetilsalicílico (B) en el peso fresco de hojas de dos variedades comerciales de col (*Brassica oleracea*). Medias \pm DE con letra distinta en cada subfigura para cada variedad, indican que existen diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

Tanto el fosfito como el ácido acetil salicílico redujeron los pesos secos de hojas en ambas variedades de col (**Figura 3**).

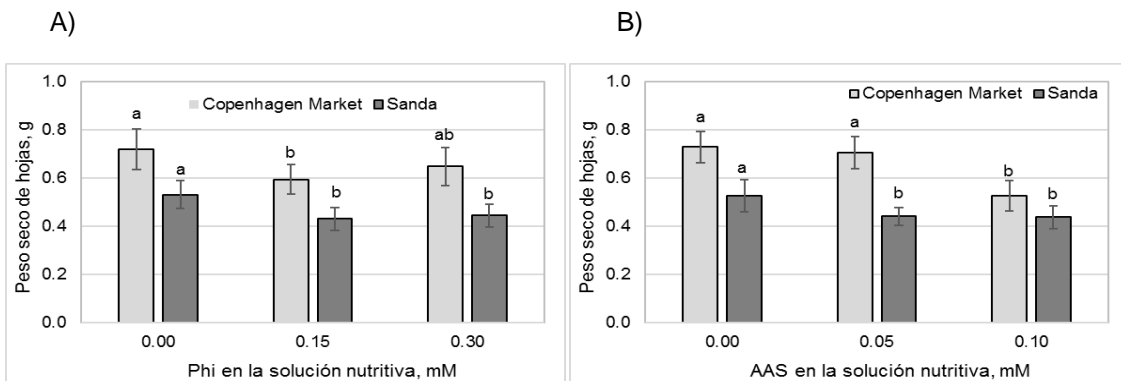


Figura 3. Efectos principales del fosfito (A) y del ácido acetilsalicílico (B) en el peso seco de hojas de dos variedades comerciales de col (*Brassica oleracea*). Medias \pm DE con letra distinta en cada subfigura para cada variedad, indican que existen diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

En concordancia con los efectos del fosfito aquí observados, Ratjen y Gerendás (2009) observaron una disminución drástica del crecimiento y de materia seca de plantas de calabacita, al aplicar fosfito en plantas con sustrato deficiente de P. Diversos estudios sugieren el uso de fosfito bajo condiciones de suficiencia de fósforo en forma de fosfato; cuando se usa como única fuente de P o en deficiencia de éste las respuestas son negativas, entre los efectos perjudiciales influenciados por fosfito se encuentran la inhibición del crecimiento de la raíz primaria, la clorosis en láminas foliares jóvenes y acumulaciones irregulares de antocianinas en hojas viejas.

Contrario a los efectos del ácido acetilsalicílico aquí observados, Larqué-Saavedra (2010) reportó el aumento en las variables área foliar, perímetro foliar y longitud de raíz en plántulas de tomate con concentraciones de AS de 0.01 a 0.1 μ M.

5. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en las variables área foliar, peso fresco y seco de hojas se tiene evidencia para concluir que la adición de fosfito en concentraciones 0.15 mM y 0.30 mM, y de ácido salicílico en concentraciones 0.05 mM y 0.10 mM tiene efectos adversos, al menos en fase de plántulas de las variedades de col estudiadas. De ello se deduce que cuando se suministra fosfito (Phi) en concentraciones equivalentes a las de fosfato (Pi), esta última representa una fuente pobre de Pi. También se concluye que se obtienen bajos rendimientos en concentraciones altas de fosfito en la solución nutritiva dentro de las primeras semanas o meses del ciclo en hortalizas como la col. Por otro lado, pese a que en los tratamientos de ácido acetilsalicílico no se observaron cambios significativos y sólo hubo reducción en peso seco de hojas en comparación con el testigo, la literatura reporta beneficios ante situaciones de estrés por sequía y estrés salino, por lo que se sugiere continuar la investigación en la línea del estrés abiótico.

* **Agradecimiento:** A la LGAC-1 en Eficiencia y Sustentabilidad en la Producción Primaria de Sistemas Agroalimentarios del Postgrado en Innovación Agroalimentaria Sustentable del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. Larqué-Saavedra, R. Martín-Mex, Á. Nexticapan-Garcéz, S. Vergara-Yoisura, M. Gutiérrez-Rendón, Efecto del ácido salicílico en el crecimiento de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Revista Chapingo Serie Horticultura, Vol. 16, 2010, no. 3, pp. 183-187.
2. A. Moreno, "Elementos nutritivos. Asimilación, funciones, toxicidad e indisponibilidad en suelos" (Libros en red., México, 2007), pp. 14-17.
3. A. Ratjen M., J. Gerendás. 2009. A critical assessment of the suitability of phosphite as a source of phosphorus. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, Vol. 172, 2009, no. 6, pp. 821-828.
4. A. Steiner, The universal nutrient solution. In: Proceedings Sixth International Congress on Soilless Culture, ISOSC. Lunteren, Wageningen, The Netherlands. 1984, pp. 633-650.
5. A. Steiner, H. Van Winden, "Recipe for ferric salts of ethylenediaminetetraacetic acid", Plant Physiol. Vol. 46, 1970, pp. 862-863.
6. F. C. Gómez, L. I. Trejo. "Biostimulant activity of phosphite in horticulture", Scientia Horticulturae., Vol. 196, 2015, pp. 82-90.
7. G. Rangel, E. C. Mercado, H. R. de la Cruz & E. G. Pineda, "El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. Biológicas" Revista de la DES

Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 2013, vol. 12, no 2, pp. 90-95.

8. J. Martínez, "Fertilización en hortalizas", Facultad de agronomía UANL., Nuevo León, 2003, Capítulo 2, pp. 1-20.
9. SAS. SAS Institute Inc., SAS/STAT Users Guide, Version 9.3. 2011. SAS Institute Inc. Cary, N. C., USA.

DEGRADACIÓN DE BOLSAS OXO-DEGRADABLES A PARTIR DE PEROXIDASA DE *Raphanus savitus* Y *Pseudomonas aeruginosa*

Jiménez-Cruz B^a, Villeda-Gutiérrez E. A^a, Quezada Cruz M^a.

^aLaboratorio de Biotecnología Ambiental. Área A5-Químico-Biológicas. Universidad Tecnológica de Tecámac.

RESUMEN

Las bolsas de plástico son un desecho polucionante para la sociedad, afectando fauna, suelo y agua. Por lo cual se favoreció la degradación de bolsas oxo-degradables por *Pseudomonas aeruginosa*, mediante pre-tratamiento a partir de extracto enzimático de rábano (peroxidasa) y fotodegradación. Inicialmente se trituraron rábanos con K_2HPO_4 y se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min, el extracto enzimático (peroxidasa) obtenido fue incorporado a bolsas oxo-degradables previamente expuestas a la intemperie durante 1,008 horas, pasadas 168 horas, el Polietileno de Alta Densidad (PEAD) oxo-degradable fue triturado e incorporado a un medio de enriquecimiento con los nutrientes esenciales para el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, se dejó incubar durante 336 horas y enseguida se realizó una reinoculación en otro medio enriquecido con el mismo plástico y se dejó incubar un tiempo de 1,680 horas. Finalmente se midió la degradación por medio de espectrofotometría UV-VIS y peso constante del polímero; como resultado el adicionar extracto enzimático a bolsas oxo-degradables previamente fotodegradadas reduce a tan solo un tercio de tiempo la degradación total del PEAD oxo-degradable, ya que este se hizo más susceptible al ataque bacteriano como lo fue con *Pseudomonas aeruginosa* que al tener un metabolismo tan diverso utilizó el polímero como única fuente de carbono, alcanzando una degradación total del 38.67 %.

1. INTRODUCCIÓN

“Un millón de bolsas son consumidas por minuto en el mundo, y más de 500 billones anualmente” (Rojas-Valencia & Huitzil-Solórzano, 2011) Donde México es uno de los países que gracias a su rápido incremento poblacional ha traído como una consecuencia la expansión de supermercados que dan para el transporte de mercancía bolsas oxo-degradables y día con día se van acumulando sin control. El uso excesivo de estas bolsas ha generado un problema de residuos, convirtiéndose en un foco de contaminación ambiental que presenta grandes desafíos a los sistemas de tratamiento de desechos, ya que sobrepasa por mucho la capacidad de reciclamiento energético, químico o mecánico existentes en la actualidad además argumentan que la utilización excesiva de bolsas oxo-degradables, ha traído como consecuencia la contaminación de ecosistemas, cuerpos de agua, bosques, playas, calles, terrenos baldíos, parques, ríos, mares, entre otros; además de la muerte de una gran cantidad de animales que mueren por asfixia al consumir bolsas de plástico, ya que las llegan a confundir continuamente con comida. Las bolsas de plástico obstruyen drenajes urbanos y naturales en tiempos de precipitación e impiden el crecimiento adecuado de flora ya que no permite la absorción adecuada de nutrientes. Lo que afecta drásticamente a México, ya que es uno de los principales productores agrícolas a nivel internacional.

Las bolsas oxo-degradables son PEAD con aditivos pro-degradantes que están hechos principalmente de metales de transición. El proceso degradativo de las bolsas oxo-degradables se puede resumir en dos etapas: una oxidación abiótica y un ataque biótico indica Quiroz *et al* (2010)

y aunque existen diversas propuestas para degradar las bolsas de plástico y disminuir el impacto ambiental, son de un alto costo. Por lo cual se propuso favorecer la degradación de bolsas oxo-degradables por *Pseudomonas aeruginosa*, mediante pre-tratamiento a partir de extracto enzimático de rábano (peroxidasa) y fotodegradación.

2. TEORÍA

De acuerdo a Remesario & Molina (2010) “Un millón de bolsas plásticas son consumidas por minuto en el mundo, y más de 500 billones anualmente. Los plásticos y particularmente las bolsas representan el residuo más polucionante de las ciudades y campos, perjudica la vida animal y estropea drenajes naturales y urbanos”. Se ha estudiado que desde mediados del siglo XX, se sugirió que con pre-tratamientos (UV, exposición al calor, entre otros) o con el uso de aditivos pro-oxidantes que actúen como iniciadores de una foto-oxidación se podría promover la fragmentación del polímero para facilitar el ataque microbiano posterior, informa Quiroz y Cadena, *et al* (2009); sin embargo, “Las bolsas de plásticos nombradas oxo-degradables o biodegradables, se degradan parcialmente y se fragmentan en trozos pequeños, pero realmente tardan mucho tiempo en culminar ese proceso” menciona Ayala-Aceves (2013). En la intemperie, la sedimentación de la materia en partículas sobre la superficie del material, puede producir capas protectoras que impidan el acceso del oxígeno ambiental y disminuyan la absorción de radiación solar, lo que genera resistencia a la iniciación de reacciones degradativas (Quiroz *et al*, 2009).

Existen dos tipos de plásticos utilizados para lo que es la fabricación de las bolsas plásticas, las cuales se pueden crear con material como es el polietileno y el propileno en donde las bolsas de plástico no sólo tienen la función de cargar o transportar objetos sino que también ayudan a resguardar objetos o alimentos para que no sufran cambios o defectos por el ambiente. El polipropileno es un polímero termoplástico que es utilizado principalmente para la fabricación de empaques y películas transparentes. El polietileno es una resina termoplástica, ofrece una excelente resistencia al impacto, peso ligero, baja absorción a la humedad y alta fuerza extensible, además de que no es tóxico (Encarnación, 2009).

“Las peroxidasas son enzimas que controlan el crecimiento fisiológico de las plantas y su diferenciación y desarrollo. Es bien conocido que esta enzima participa en la construcción y lignificación de la pared celular, la biosíntesis de etileno a partir del ácido 1-aminociclopropanocarboxílico y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), la regulación de niveles de auxina, la protección contra el deterioro de tejidos e infección por microorganismos patógenos, la oxidación de ácido indolacético, entre otros. Por otro lado, hoy en día existe un gran interés por la Peroxidasa debido a sus múltiples aplicaciones prácticas en la industria (Vela *et al*, 2003)”. Las reacciones que cataliza la peroxidasa se asocian con cuatro tipos de actividades: la peroxidación, oxidación, catalización e hidrolización de acuerdo a Saunders (2004).

La degradación de bolsas oxo-degradables puede verse influenciada por diversos factores, los cuales se pueden dividir en dos grandes etapas: 1) Fase enzimática; por acción de las peroxidasas y 2) Fase microbiana; por acción de *Pseudomonas aeruginosa*.

El mecanismo mediante el cual se realiza la degradación en ambas fases no está del todo dilucidado y aunque existen algunos resultados a cerca de la degradación de bolsas oxo-degradables en ambas fases, no hay hasta este momento resultados que involucren una degradación de bolsas que implique el tratamiento enzimático (peroxidasas) y microbiológico (*P. aeruginosa*). Además de estos factores, se involucró un tercer factor que es la fotodegradación.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Obtención del extracto enzimático. Se selecciona la materia prima, posteriormente se lava con agua y jabón de uso común, una vez lavado se pone a secar a temperatura ambiente; en seguida se coloca en una licuadora (Osterizer clásica) con una solución de fosfato dibásico de potasio

(K₂PO₄) al 0.1 M donde se trituran los rábanos, en intervalos de 30 seg, durante 5 minutos para obtener una mezcla homogénea. Posteriormente se filtra la mezcla con ayuda de gasas y un embudo de vidrio. El extracto obtenido se somete a centrifugación en tubos Ependorf (Centrifuga Hermle Mod. Z233 MK-2) a 4000 rpm durante 20 min y por último se deja en refrigeración a 4°C hasta su posterior utilización. Pre-tratamiento de las bolsas. Se recolectan bolsas oxo-degradables y se dejan durante 6 semanas al intemperie, posteriormente se fragmentan las bolsas en un molino triturador modelo M20 de 20 HP y una vez trituradas los fragmentos de estas se colocan en un matraz y se le adiciona el extracto enzimático de *Raphanus savitus* en una concentración de 5 ml/g de PEAD en su versión oxo-degradable.





Degradación microbiana. Se toma una azada de una cepa anóxica de *Pseudomonas aeruginosa* y se coloca en agua destilada, llegando a una dilución de 1:100. Se prepara un medio de cultivo enriquecido con las composiciones que se muestra en la tabla 3, a diferentes concentraciones de PEAD oxo-degradable con distintos pre- tratamientos; se esteriliza, vacía en cajas Petri de plástico esterilizado y se deja solidificar. Posteriormente se inocula con estriado masivo y se incuba a 33 °C hasta que haya crecimiento bacteriano. Y se realizan las pruebas de identificación correspondientes. Que de acuerdo a Madigan *et al* (2004) son, RM-VP (Rojo de Metilo-Vogues-Paskauer), SIM (Sifihidrina, Indol, Movilidad), Prueba de Catalasa y Tinción Gram. Se prepara el mismo medio enriquecido, solo que sin fuente de carbono, en este caso sin PEAD en su versión oxo-degradable, el cual se utilizara como blanco negativo, ya que en él, no habrá ningún tipo de crecimiento bacteriano. Como blanco positivo se utilizara agar nutritivo (Ver Tabla 2). En ambos medios se inoculara una azada de *Pseudomonas aeruginosa* de la dilución 1:100 con estriado simple, se incubara a 33°C, hasta observar crecimiento y se le realizaran las pruebas de identificación correspondientes. Para la segunda siembra se realiza una vez más el medio de cultivo enriquecido con las mismas características de la tabla 3, a excepción que se le agrega la concentración de PEAD oxo-degradable que tuvo el mayor crecimiento bacteriano en el primer medio de cultivo con una muestra bacteriana del mismo medio. Además de realizar un medio enriquecido sin polietileno; ya que a este se le colocan tiras de plástico oxo-degradable con diversos pre-tratamientos, todo se incuba a 33°C hasta observar crecimiento, se realizan las mismas pruebas de identificación y se mide el crecimiento bacteriano. Pasadas 1,680 horas de incubación se recupera el polímero oxo-degradable, filtrándolo en papel whatman de 45 µm de tamaño de poro, se lava y se deja secar durante 24 horas en una incubadora a 35°C, finalmente se pesa el polietileno para saber la cantidad que las *Pseudomonas aeruginosa* son capaces de degradar en 1,680 horas.

4. CONCLUSIONES

Como se observa en la tabla 1 la bolsa oxo-degradable que no estuvo al intemperie aunque tuvo un tratamiento con extracto enzimático no se observó un cambio significativo en cuanto a su aspecto; ya que sus características cualitativas son iguales en comparación con la bolsa que no tuvo ningún tipo de pre-tratamiento. La bolsa oxo-degradable con tan solo exposición al intemperie tuvo un cambio drástico de color en comparación con las dos bolsas antes mencionas; sin embargo, la bolsa que mayor cambios tuvo fue a la que se le realizó un pre-tratamiento de 1,008 horas de fotodegradación y 168 horas con extracto enzimático de *Raphanus savitus*, una de las posibles reacciones puede ser que el polímero que constituye a las bolsas oxo-degradables gracias al aditivo echo a base de metales en presencia de luz inicia su oxidación lo que va a generar un radical libre alcoxi en algunos de sus monomeros donde el extracto enzimático al ser una fuente de enzima peroxidasa puede catalizar reacciones de oxidación que va a reaccionar con el monomero que tiene el radical alcoxi de esta manera va a favorecer la formación de radicales libres, principalmente peroxidos e hidropoxidos los cuales van a ocasionar una reacción en cadena oxidativa que producirán productos de bajo peso molecular como cetonas, aldehídos, alcoholes, lactonas, ácidos carboxílicos y dicarboxílicos, alcanos y alquenos de bajo peso y otros que en su conjunto son susceptibles al ataque enzimático de los microorganismos argumenta Quiroz *et al* (2010). Cabe mencionar que el proceso de degradación de las bolsas no se alteró solo

se aceleró ya que cumple con las mismas características de la fotodegradación descrita por Quiroz *et al* (2010).

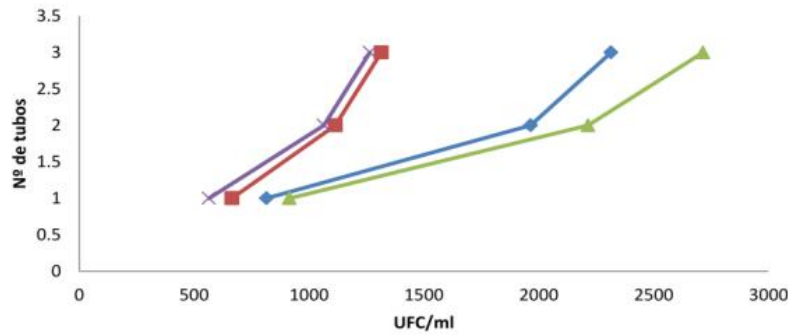
Tabla 1. Determinación del nivel de deterioro de las bolsas oxo-degradables sometidas a diferentes tratamientos

Tratamiento	Nivel de deterioro*	Imagen
Con extracto enzimático y H ₂ O ₂	X	
Exposición a la intemperie	XX	
Exposición a la intemperie, extracto enzimático y H ₂ O ₂	XXX	
Sin tratamiento	X	

“La especie *Pseudomonas aeruginosa*, es una bacteria capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustratos para crecer, capacidad que le permite colonizar nichos y ambientes inhóspitos en los que son escasos los nutrientes y que otros organismos no pueden asimilar” (Pérez-Silva, 2007); por lo cual al restringir las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* de cualquier otra fuente de carbono diferente al polietileno e incubarlo a 35°C, ya que es su temperatura óptima según Gómez Romero *et al* (2008) éstas comenzaron a utilizar dicho plástico como fuente principal de carbono y al cabo de 1,680 horas alcanzaron a degradar hasta un 38.67% de PEAD oxo-degradable con pre-tratamiento de extracto enzimático y fotodegradación.

A partir de la curva estándar que se muestra en la gráfica 1 se calculó la concentración de biomasa de cada caldo enriquecido con PEAD oxo-degradable sometido a distintos pre-tratamientos que se muestra en la gráfica 2 donde se aprecia que a pesar de que tuvieron las mismas diluciones y mismas condiciones de operación, la concentración de biomasa al cabo de 1,680 horas de incubación que se encontraban en el caldo con PEAD oxo-degradable con extracto enzimático y exposición a la intemperie superó notablemente en crecimiento bacteriano al demás polímero. Lo que indica que a mayor concentración de *Pseudomonas aeruginosa* mayor degradación; mientras que la bolsa oxo-degradable que no tuvo ningún tipo de pre-tratamiento mostró más resistencia al ataque bacteriano; sin embargo, la pura adición de extracto enzimático no es efectiva para hacer el polímero más susceptible al ataque microbiano, el crecimiento de biomasa es muy similar a la bolsa semi-nueva, el plástico que estuvo expuesto a fotodegradación fue más susceptible al ataque bacteriano, llegando a tener un crecimiento de 2,315 UFC/ml. Por lo que la incorporación de extracto enzimático de *Raphanus sativus* y *Pseudomonas aeruginosa* reduce significativamente el tiempo de degradación de las bolsas de plástico en su versión oxo-degradable.

Gráfica 1. Concentración de *Pseudomonas aeruginosa* al cabo de 1,680 horas a diferentes diluciones.



Tipo de pre-tratamiento	Color de línea	Biomasa alcanzada (UFC/ml)
Sin ningún pre-tratamiento	—	1,265
Con extracto enzimático (peroxidasa)	—	1,315
Con exposición a la intemperie	—	2,315
Con exposición a la intemperie y extracto enzimático	—	2,715

El extracto enzimático de *Raphanus sativus* es fuente de enzima peroxidasa la cual ayudo a catalizar reacciones de oxidación en el polímero oxo-degradable previamente expuesto a la intemperie, así se aceleró la degradación de las bolsas oxo-degradables ya que con tan solo 6 semanas de exposición a la intemperie fue el suficiente tiempo para que liberar los radicales libres necesarios que reaccionaron con el extracto enzimático y así el plástico se hizo más susceptible al ataque microbiano de *Pseudomonas aeruginosa*.

El deterioro de las bolsas fue muy notable en el tono de su color al someter a fotodegradación y un pre-tratamiento de 8 días con extracto enzimático de rábano.

El medio de cultivo enriquecido con PEAD en su versión oxo-degradable, con distintos pre-tratamientos y diferentes concentraciones fue el adecuado para el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ya que aunque tardo un poco en adaptarse fue capaz de crecer y utilizar el polímero como única fuente de carbono.

Es necesario tener en constante agitación los caldos enriquecidos para optimizar la degradación del polímero.

La bolsa oxo-degradables con pre-tratamiento de extracto enzimático y *Pseudomonas aeruginosa* fue la de más susceptible al ataque bacteriano alcanzo una degradación total del 38.67% en 1680 horas lo que constato que el extracto enzimático reducción a tan solo un tercio de tiempo la degradación total del polímero.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gomes Romero, S. E.; Gutiérrez Busto, D.C.; Hernández Marín, A. M.; Hernández Rodríguez, C. Z.; Losada Cazallas, M.; Mantilla Vargas, P.C. (2008). Factores bióticos y

abióticos que condicionan la bioremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos.. *NOVA - Publicación Científica en ciencias biomédicas* - ISSN: 1794-2470. (6)9. 74-86.

2. Pérez Silva, R. M.; Camacho Pozo, M. I.; Gomes Montes, J. M.; Avalos Rodríguez, A.; Cantero Moreno, D. (2008). Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* (39)1. 44-50.
3. Quiroz, F.; Cadena, F.; Sinche, F.; Chango, I. y Aldás, M. (2009). Estudio de la degradación en polímeros oxo-biodegradables. *Revista Politécnica: Centro de Investigaciones Aplicadas a Polímeros (CIAP) Y Departamento de Alimentos y Biotecnología (DECAB)*. 30(1). 179–191.
4. Rojas Valencia, N. M. & Huitzil Solórzano, A. (2011). Bolsas biodegradables ¿Cuánto hemos avanzado? Disponible en <http://www.cyd.conacyt.gob.mx/254/articulos/bolsas-biodegradables.html> Fecha de consulta: 30 de agosto de 2015.

BORO EN PLÁNTULAS DE COL TRATADAS CON FOSFITO Y ÁCIDO SALICÍLICO EN LA SOLUCIÓN NUTRITIVA

Óscar R. Pérez-Durán¹, Libia I. Trejo-Téllez¹, Fernando C. Gómez-Merino¹, Adriana Contreras-Oliva¹, Héctor E. Sentíes-Herrera¹

¹Colegio de Postgraduados

RESUMEN

Se determinó la concentración y contenido de B en tejido foliar de plántulas de dos variedades de col (Copenhagen Market y Sanda); después de ser tratadas con fosfito (0, 0.15 y 0.30 mM) y ácido salicílico (0, 0.05 y 0.10 mM), mismos que se adicionaron a la solución nutritiva. En ambas variedades la concentración de B se redujo significativamente cuando se adicionó fosfito; la adición de 0.30 mM la redujo en 29% en Copenhagen Market y en Sanda en 9%, en ambos casos en comparación con los testigos correspondientes. Este efecto negativo del fosfito se observó también en los contenidos de B. Por el contrario, la adición de ácido salicílico a la solución nutritiva, independientemente de su concentración incrementó la concentración foliar de B; el suministro de 0.10 mM la aumentó en 28 y 11%, en Copenhagen Market y Sanda, respectivamente, en comparación con sus respectivos testigos. El contenido de B en respuesta a la adición de ácido salicílico fue diferencial entre especies; en Copenhagen Market solo la concentración 0.05 mM superó en forma significativa al resto de los tratamientos; mientras que en Sanda no hubo efectos estadísticos.

1. INTRODUCCIÓN

La producción de especies vegetales de interés para el hombre, entre ellas las de carácter hortícola, han abierto un nuevo panorama en la investigación agronómica, que tiene como finalidad mejorar los rendimientos de calidad y producción; la nutrición vegetal brinda lucidez en ésta empresa indaga cómo los requerimientos nutricionales y rendimientos son beneficiados en combinación de otras especies químicas.

2. TEORÍA

Debido a sus características fisicoquímicas el boro está clasificado como metaloide, es aprovechable en distintas formas por las plantas, pero la especie química más abundante es en forma de H_3BO_3 no disociado, algunas de las funciones vinculadas con el boro son el metabolismo y transporte de azúcares, síntesis en la pared celular, metabolismo de ARN, y estructura celular (Alarcón, 2010).

El fosfito es un isómero del anión fosfato, que puede ser absorbido por plantas superiores desde suelos con presencia de microorganismos que lo oxidan a fosfato. Existe evidencia de los efectos bioestimulantes e inductores de las respuestas metabólicas benéficas del fosfito que se ven traducidas en la mejora de rendimiento y calidad de distintas especies hortícolas (Gómez-Merino y Trejo-Téllez, 2015).

Por otra parte, el ácido salicílico tiene parte en los procesos de germinación de semillas, crecimiento celular, respiración, cierre de estomas, expresión de genes asociados a senescencia,

repuesta a estrés abiótico y de forma esencial en la termogénesis, así como en la resistencia a enfermedades (Rangel *et al.*, 2010).

En esta investigación se planteó como objetivo la evaluación que los efectos principales de la adición de fosfito y de ácido acetilsalicílico en la solución nutritiva empleada en el riego, en la concentración y el contenido de boro en plántulas de dos variedades comerciales de col.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal

Las variedades comerciales de col evaluadas fueron *Brassica oleracea* var. *Capitata* cv. Copenhagen Market y *Brassica oleracea* var. *Gemmifera* cv. Sanda.

Tratamientos

En este experimento se evaluaron nueve tratamientos, consistentes en nueve soluciones nutritivas completas, con niveles óptimos de macro y micronutrientes, de las cuales tuvieron variaciones solamente en la concentración de ácido fosforoso y del ácido acetilsalicílico (Cuadro 1).

La fuente de fosfito fue el ácido fosforoso (H_3PO_3). El ácido acetilsalicílico ($C_9H_8O_4$) y el ácido fosforoso empleados fueron grado analítico (Sigma Aldrich).

Las soluciones nutritivas se formularon tomando como referencia la solución nutritiva de Steiner (Steiner, 1984), preparada al 50% de su concentración con reactivos grado analítico utilizando (en $g L^{-1}$): 0.53 de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 0.15 de KNO_3 , 0.13 de K_2SO_4 , 0.25 de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 0.07 de KH_2PO_4 ; y complementada con las siguientes concentraciones de micronutrientes (en $mg L^{-1}$): 1.6 de Mn, 0.11 de Cu, 0.86 de Zn, y 0.048 de Mo. El hierro fue abastecido como Fe-EDTA a una concentración de $5 mg L^{-1}$ según lo descrito por Steiner y Van Winden (1970).

Cuadro 1. Tratamientos evaluados

Tratamiento	Factor fosfito (mM)	Factor ácido acetilsalicílico (mM)
T1	0.00	0.00
T2	0.15	0.00
T3	0.30	0.00
T4	0.00	0.05
T5	0.15	0.05
T6	0.30	0.05
T7	0.00	0.10
T8	0.15	0.10
T9	0.30	0.10

El sustrato utilizado fue una mezcla de tezontle con perlita expandida (50:50 v/v), La unidad experimental fue un recipiente de polietileno con una medida de 5.5 cm y una capacidad de $60 cm^3$, conteniendo una plántula de col; misma que fue colocada en charolas metálicas en grupos de

diez y distribuidas conforme a los tratamientos de las soluciones nutritivas empleadas, descritas en el **Cuadro 1**.

Condiciones experimentales

El presente trabajo se realizó en un invernadero tipo túnel del área de Nutrición Vegetal-Edafología, del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo; localizado a 19° 29' latitud norte, 98° 53' longitud oeste, a 2250 m de altitud. Las plántulas se desarrollaron con ciclos de luz/oscuridad de 15 h/9 h, temperatura de 29 °C/14 °C y humedad relativa constante de 70%.

Variables evaluadas

Cuarenta y un días después a la exposición de los tratamientos, las plántulas se recolectaron para determinar el peso de biomasa seca de hojas y la concentración de B en éstas. El análisis de la concentración foliar de B se realizó mediante digestión húmeda del material seco con una mezcla de ácidos perclórico y nítrico (Alcántar y Sandoval, 1999). La lectura de los extractos obtenidos después de la digestión y filtrado se determinó con el equipo de espectroscopia de emisión atómica de inducción por plasma (ICP-OES, Agilent 725-OES, Australia). Considerando la materia seca de hojas se estimó la acumulación foliar de B.

Análisis estadístico

Los resultados de concentración y contenido de B en hojas fueron analizados estadísticamente usando el software SAS (SAS, 2011), realizando un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$).

4. RESULTADOS

El rango crítico de B, expresado como mg B kg⁻¹ de materia seca, es de 20 a 70 en la mayoría de las especies dicotiledóneas (Domagala-Swiatkiewicz y Sady, 2010). Los resultados de concentración foliar de B aquí registrados, se encuentran dentro del intervalo antes referido, por tanto, las plantas presentan suficiencia de B. El fosfito suministrado a la solución nutritiva en dosis de 0.15 y 0.30 mM redujo la concentración foliar de B en ambos cultivares comerciales de col; en Copenhagen Market en 19 y 29%, respectivamente; mientras que en Sanda las reducciones fueron del 15 y 9%, respectivamente; en ambos casos en comparación con el testigo (**Figura 1.A**).

De la misma manera, los efectos del fosfito en la acumulación de B en hojas fueron negativos. La adición de fosfito en la variedad Copenhagen Market redujo en promedio la acumulación de B en 35%, mientras que en Sanda en 27%, respecto a sus respectivos testigos (**Figura 1.B**).

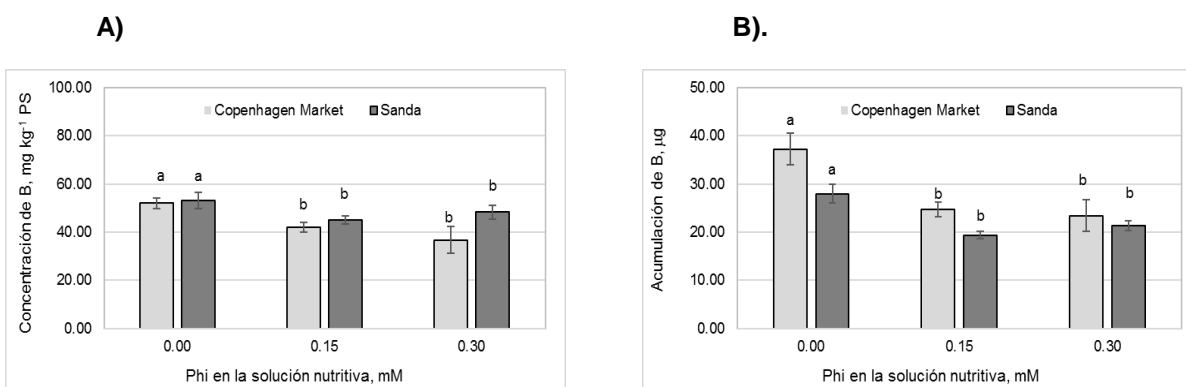


Figura 1. Efectos principales del fosfito en la concentración foliar de B (A) y la acumulación foliar de B (B) en plantas de dos variedades comerciales de col (*Brassica oleracea*). Medias \pm DE con letra distinta en cada subfigura para cada variedad, indican que existen diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

Contrario a los efectos negativos del fosfito en la concentración de B, el ácido acetilsalicílico incrementa su concentración en hojas. Particularmente en la variedad Copenhagen Market los incrementos fueron mayores; del orden del 28% en comparación con el testigo (Figura 2.A). En el caso de la acumulación de B, solo en la variedad Copenhagen Market se registraron diferencias estadísticas significativa, con la mayor acumulación con la dosis baja de ácido salicílico, tratamiento que superó en 25% al testigo (Figura 2.B).

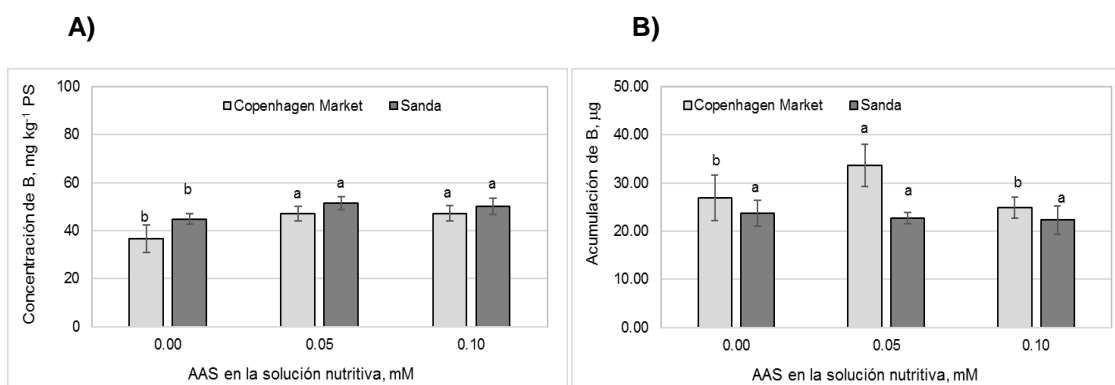


Figura 2. Efectos principales del ácido acetilsalicílico en la concentración foliar de B (A) y la acumulación foliar de B (B) en plantas de dos variedades comerciales de col (*Brassica oleracea*). Medias \pm DE con letra distinta en cada subfigura para cada variedad, indican que existen diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

5. CONCLUSIONES

Las concentraciones 0.15 mM y 0.30 mM de fosfito en ambas variedades de col presentaron un decremento significativo por lo que se puede inferir efectos antagónicos entre dichas concentraciones de fosfito y la absorción del boro; empero, existieron niveles de suficiencia de este elemento. Por otra parte, se ha reportado que las crucíferas son más exigentes en cuanto a nutrición con boro y en correspondencia con nuestros resultados se conoce que el ácido acetilsalicílico puede regular y mejorar el metabolismo del boro evitando concentraciones tóxicas, por lo que es probable un efecto sinérgico.

* **Agradecimiento:** LGAC Eficiencia y Sustentabilidad en la Producción Primaria de Sistemas Agroalimentarios del Postgrado en Innovación Agroalimentaria Sustentable del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. L. Alarcón, "El boro como nutriente esencial", *Horticultura: Revista de Industria, Distribución y Socioeconomía Hortícola: fruta, hortalizas, flores, plantas, árboles ornamentales y viveros*, España, No. 155, 2000, pp. 36-47.
2. A. Steiner. The universal nutrient solution. In: *Proceedings Sixth International Congress on Soilless Culture*, ISOSC. Lunteren, Wageningen, The Netherlands. 1984, pp. 633-650.
3. A. Steiner, H. Van Winden, "Recipe for ferric salts of ethylenediaminetetraacetic acid", *Plant Physiol.* Vol. 46, 1970, pp. 862–863.
4. F. C. Gómez, L. I. Trejo. "Biostimulant activity of phosphite in horticulture", *Scientia Horticulturae.*, Vol. 196, 2015, pp. 82-90.
5. G. Rangel, E. C. Mercado, H. R. de la Cruz & E. G. Pineda, "El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. Biológicas" *Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, 2013, Vol. 12, no 2, pp. 90-95.
6. G. G. Alcántar, y Sandoval M. "Manual de Análisis Químico de Tejido Vegetal. Guía de muestreo, preparación, análisis e interpretación", *Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo A.C.*, Chapingo, México, No. 10, 1999, pp. 156.
7. I. Domagala-Swiatkiewicz, W. Sady, Effect of nitrogen fertilization on Cu, Mn, Zn, Fe, B and Mo availability in commercially grown white head cabbage, *J. Elementol*, Vol. 15, 2010, no. 3, pp. 455-465.
8. SAS. SAS Institute Inc., *SAS/STAT Users Guide*, Version 9.3. 2011. SAS Institute Inc. Cary, N. C., USA.

EL JITOMATE SILVESTRE (*Solanum lycopersicum* Var. *Cerasiforme*) DE JALISCO, NAYARIT Y MICHOACAN, COMO UNA ALTERNATIVA ALIMENTICIA, NUTRICIONAL, Y SOCIOECONOMICA

Ma. Cruz Arriaga Ruiz; Eduardo Rodríguez Guzmán; Cecilia Jiménez Plascencia; Jorge Hernández Góborá; Adriana Avendaño López; Miguel Padilla García; Ángel Cordero Jiménez.

Departamento de Producción Agrícola. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA). Universidad De Guadalajara.

RESUMEN

México, centro de diversidad biológica y domesticación de maíz, frijol, calabaza, chile, además de especies como jitomate, originaria de la vertiente de los Andes. Cultivo hortícola producto de exportación nacional, importante componente de la dieta de los mexicanos, junto con el chile, empleados en la elaboración de salsas y guisos típicos con alto valor nutritivo y antioxidante con aportaciones de vitamina A, y C, licopeno, minerales, carotenoides y fenoles, auxiliar en la prevención y curación de cáncer de próstata y en enfermedades cardiovasculares. Mesoamérica y la región Andina cuentan con materiales criollos y silvestres, altamente cotizados en mercados locales o regionales con potencial para generar variedades de uso local, cocina gourmet, materiales con características ortodoxas y fuente de novedosos caracteres agronómicos y hortícolas, no existentes en programas de conservación y mejoramiento. Se colectaron semillas de plantas silvestres en 11 localidades de: Jalisco, Michoacán y Nayarit. A partir de estas semillas se desarrollaron plantas bajo condiciones de invernadero, en CUCBA-UDG. Cosechados los frutos, se realizaron las siguientes determinaciones: tamaño, composición química en pulpa y en semillas. A pesar de la importancia de este fruto, no se tiene mucha información en cuanto a sus propiedades, especialmente creciendo en condición silvestre, por lo que en este trabajo se presentan datos sobre la variación en la composición química de este jitomate, resaltando su importancia nutricional, alimenticia y socioeconómica de estas poblaciones silvestres.

1. INTRODUCCIÓN

El jitomate cultivado (*Solanum lycopersicum* sinónimo *Lycopersicon esculentum*) es la hortaliza más difundida y de mayor importancia en el mundo (Nuez et al., 2004). A nivel mundial, la superficie anual sembrada con jitomate es de cuatro millones de hectáreas; en México, en 2009 la superficie sembrada alcanzó 52,783 ha con una producción nacional de 2 millones de toneladas y un rendimiento promedio de 39.8 ton ha⁻¹. Sinaloa contribuyó con una producción promedio de 796,226 t, seguido por Baja California y Michoacán con 229,541 toneladas y 188,543 t, respectivamente. Querétaro destacó con un rendimiento promedio de 78.3 t ha⁻¹, seguido de Baja California con 47.6, Jalisco con 43.2 y Sinaloa con 38.4 t ha⁻¹. (Rodríguez et al. (2015).

Cultivos como el jitomate generan importante número de empleos por su alto uso de mano de obra (alrededor de 500 jornales por ha, (Villarreal, 1982), son primordialmente un producto para exportación y tecnológicamente tiene alto uso de tecnología e insumos (Muñoz et. al., 1994). Además son una fuente importante de carotenoides (licopeno, fitoflueno, luteína, fitoeno, gama-caroteno, neurosporeno, beta-criptóxantina, all-trans-beta caroteno, cis - beta-caroteno, beta-caroteno, alfa-caroteno y zeaxantina), vitaminas (A y C), los cuales actúan como antioxidantes, además minerales (macroelementos: Mg, S, Ca, P, y K, microelementos: Cu, Fe, Zn y Mg, otros

elementos Na y Se), ácidos orgánicos (ácido cítrico), y compuestos fenólicos (ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cafeíco, mirecetina y naringenina) y azúcares. (Chávez et al., 2011). En México se prefiere consumir el jitomate fresco, pero también se utiliza industrializado para elaborar pastas, salsas, purés, jugos, etc.



Jitomate silvestre: Lycopersicon esculentum var. Cerasiforme (foto Dr. E. R.G)

Aunque existen evidencias de la gran diversidad genotípica de jitomate en México y de sus propiedades nutricionales (Juárez et al., 2010; Crisanto-Juárez et al., 2010), poco se ha documentado la variabilidad genética, el origen filogenético, distribución geográfica y aún menos acerca del aprovechamiento en el consumo, comercio local o como fuente de genes para la generación de variedades mejoradas. No obstante, existen variedades nativas o locales, algunas de formas arriñonadas, que son muy populares regionalmente (Carrillo-Rodríguez et al., 2010) algunos de ellos altamente cotizados en los mercados locales o regionales con un gran potencial para generar variedades de uso local y variedades para cocina gourmet (Lobato et al., 2010). También se pueden usar como fuente de nuevos y novedosos caracteres agronómicos y hortícolas, resistencia a factores bióticos y abióticos no existentes en los programas de conservación y mejoramiento. Por lo que, como un paso previo al aprovechamiento de esta especie, se requiere de un estudio exhaustivo mediante su colecta y caracterización, a diferentes niveles y con múltiples enfoques metodológicos, para determinar su potencial actual y futuro.

Su importancia se manifiesta en primer lugar en el valor alimenticio que posee y que le permite ser consumido de diferentes formas, ya sea cocinado o crudo en la elaboración de ensaladas, puré, jugo, deshidratado o enlatado; además de que es fuente importante de vitaminas, minerales y antioxidantes (Villarreal, 1982). En segundo lugar, su cultivo ha generado toda una industria que ha activado la economía de muchos países del mundo (Sánchez-Peña, 2005), constituyendo la principal agroindustria en el ámbito agroalimentario (Causse, et al., 2003). Se distingue entre las hortalizas por la generación de divisas, al ser para México un producto primordialmente para exportación; en la generación de empleos presenta alto uso de mano de obra (Villarreal, 1982), y tecnológicamente es uno de los cultivos con mayor uso de tecnología e insumos (Muñoz et al., 1995). En México se cultivan diferentes variedades de jitomate, como el tomate rojo saladette y bola, de exportación, cherry, roma, industrial, jitomate verde y tipo criollo o acostillado y el silvestre, (SIAP, 2010). En el contexto agroindustrial, la última década ha sido un periodo expansivo para el sector exportador del jitomate fresco, sin embargo las reglas de mercado y técnicas de producción

se desarrollan constantemente, por lo que resulta importante adaptarse a estas condiciones (González et al., 2000). Como sucede en los mercados internacionales, los cuales evolucionan hacia una mayor calidad de los productos hortofrutícolas, obligando a una constante mejora general en la producción de frutos y hortalizas con la finalidad de competir con éxito en los diferentes mercados que son cada vez más selectivos y que exigen en los productos mejores atributos tales como sabor, tamaño, presencia, valor nutritivo, color, sin residuos de pesticidas, entre otros, (González et al., 2000). Bajo el concepto de "calidad" se engloban un gran número de parámetros que en conjunto determinan que un fruto sea apto para el consumo; comúnmente, se admiten los siguientes: sabor, color, aroma, calibre, firmeza, sólidos solubles (°Brix), acidez titulable (i.e. ácido cítrico), (Casas et al., 1997). De los diversos parámetros de calidad de los productos hortícola comestibles, el consumidor (quien es el destinatario final de los mismos), valora algunos de ellos antes de realizar la compra (color, forma, tamaño, consistencia, estado de madurez, presentación, por lo que se agrupan como "parámetros de calidad externa". Posteriormente, otras propiedades son apreciadas por el comprador (aroma, sabor y textura) y se denominan "parámetros de calidad interna". Sin embargo, los efectos sanitarios y nutritivos (que son parámetros de calidad interna), solo son estimados mediante métodos físicos y químicos a través de la determinación de la composición química del fruto. La creciente demanda de mayor calidad en los productos hortícola, en un mercado prácticamente saturado durante buena parte del año, impone la adecuación de la oferta a dichos niveles de calidad (González et al., 2000).

Los actuales programas de mejoramiento genético sobre todo en especies hortícolas buscan además de mejorar productividad y adaptación, incorporar alta calidad nutricional y resistencia a patógenos a las variedades, a través de introgresión, retrocruzamientos y otros esquemas de mejoramiento empleando germoplasma silvestre, el cual por ejemplo se inició en Estados Unidos desde 1930, pero poco se hace en México al respecto. Es así que antes de promover la utilización del germoplasma mencionado existente en México en el mejoramiento del jitomate, se hace necesario conocer la variabilidad genética que se conserva in situ, así como su composición química y su calidad nutricional (Carrillo y Chávez, 2010).

En el contexto señalado la importancia de este trabajo radica en el estudio de la variación en peso y tamaño, así como en la composición química de la pulpa y de la semilla del jitomate silvestre *Solanum lycopersicon* = *Solanum lycopersicum* variedad cerasiforme, mostrada por 11 poblaciones diferentes, pertenecientes a los Estados de Jalisco, Michoacán y Nayarit, a partir de ser cultivadas en invernadero, cuyas semillas provienen de plantas silvestres. Así como el análisis de las distintas investigaciones de los últimos años, orientadas a valorar el beneficio por el consumo del jitomate silvestre, el cual debido a su composición química, y la aportación de una serie de nutrientes, en donde se analiza su valor alimenticio, nutricional, medicinal, y socioeconómico.

2. PARTE EXPERIMENTAL

I).- Colecta de la semilla.- Se hizo la colecta directamente en las 11 localidades seleccionadas en este estudio de los estados de Jalisco, Michoacán y Nayarit; utilizando un muestreo aleatorio. Se eligieron al azar a 10 plantas por localidad y se tomaron 10 frutos maduros de cada una, a los que se les extrajo la semilla, mediante licuado, los frutos se colocaron en una licuadora durante 30 segundos, con suficiente agua eliminando el sobrenadante (pulpa y cáscara del fruto).

Las semillas que se decantaron en el fondo del vaso de la licuadora se colocaron en papel germinador a la intemperie y en sombra para su secado durante un periodo 24 - 48 h, las semillas que presentaron buenas condiciones se colocaron en un frasco de vidrio previamente identificado, y se almacenaron en un refrigerador a una temperatura aproximadamente de 10°C.

II).- Cultivo del jitomate.- Posteriormente las semillas se sembraron en los invernaderos ubicados en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de

Guadalajara. Se sembraron en invernadero. El tamaño de muestra fue de 30 plantas por localidad y se realizó durante tres ciclos de cultivo agrícola primavera-verano.

III).- Análisis.- Los frutos colectados fueron llevados al laboratorio donde se les realizaron las siguientes determinaciones:

A).- Selección del fruto. Se seleccionaron de cada localidad, tomando 10 jitomates de cada una de ellas.

B).- Peso del fruto (total en gramos).- El peso se determinó con una balanza que tiene decimos de gramos.

C).- Medición del diámetro polar y diámetro ecuatorial.-Con un vernier se midió el largo de la base al ápice y el ancho en la parte ecuatorial del fruto.

D).- Determinación Química de la pulpa.- Se partieron los frutos a la mitad y se les quitó la cáscara, frotándola suavemente en una coladera y la pulpa se colectó en un recipiente.

A la pulpa se le determinó:

a).- Sólidos solubles totales. Se empleó un refractómetro de mano, los resultados se expresaron en grados Brix a 20°C.

b).- Determinación de pH. Para realizar ésta determinación se usó un potenciómetro.

c).- Determinación de ácido Cítrico. Se determinó con base en el método propuesto por A.A. Kader de la Universidad de California, de Davis.

d).- Determinación Química de la semilla: Ceniza; Proteína Cruda; Grasa Cruda; Fibra Cruda; Materia Humeda; Materia Seca; Lignina; Calcio y Fósforo.

3.- RESULTADOS

Los análisis físicos del jitomate

El peso osciló de 1.58 – 2.30 grs. El diámetro ecuatorial se encuentra entre 11.13 –15.30 mm y el diámetro polar de 12.86 – 14.94 mm.

Los análisis químicos de la pulpa

- En la determinación de Sólidos Solubles Totales (°Brix) la mayoría de los valores obtenidos en esta investigación se encuentran entre 6.45°Brix – 10.2°Brix. Los parámetros comerciales en jitomate piden mínimo de 6°Brix.

- En general, el rango obtenido en pH fue de 4.28 - 4.88 donde los frutos obtenidos de todas las poblaciones mostraron valores de un pH ácido.

- Los rangos obtenidos en ácido cítrico oscilaron entre: 0.47 % a 0.65%.

Los análisis químicos de las semillas

Aportaron valores entre los siguientes rangos: Contenido de proteína Cruda entre 21.28 - 31.84%; Fibra Cruda de 15.85 – 43.12%; Grasa Cruda 12.90 – 29.42%; Calcio 0.53 – 2.07%. Fosforo 0.14– 1.09%; Ceniza 2.39 – 4.65%; Lignina 23.55 – 32.81%; Materia seca 28.56 – 94.86%; y materia Humeda 5.07 – 6.98%.

4. CONCLUSIONES

Se consideran como una alternativa alimenticia. Debido a que durante el periodo de cosecha de los jitomates silvestres que se concentra en los meses de mayor humedad, significando una alternativa alimenticia para las comunidades que habitan estas zonas, y para los lugares donde los comercializan, los cuales vienen a sustituir otros tipos de jitomate que pertenecen a otras localidades. La fauna silvestre que habita en estas zonas donde se desarrollan estas poblaciones de jitomate, es una alternativa alimenticia muy importante para aves, roedores, insectos y murciélagos, representando en algunos casos como la única fuente de alimento, que les proporcionará además de agua, varios nutrientes que se encuentran en este fruto.

Representa una alternativa nutricional.- De acuerdo a los resultados de este estudio se observa que los jitomates silvestres son de gran valor nutricional, por el aporte de minerales de las semillas, ya que es una fuente importante de nitrógeno, magnesio, potasio, calcio y fósforo, para la fauna silvestre que la consume completa, siendo probablemente su única opción durante algunas épocas del año. Para el humano y la fauna silvestre los jitomates *Solanum lycopersicum* var. Cerasiforme son de gran valor nutricional, por que al ser masticadas o triturados en conjunto la pulpa y las semillas (debido a que son muy pequeñas), de acuerdo a este estudio, estas confieren un aporte significativo de proteínas, carbohidratos (siendo fuente de glucosa y fructosa), agua (tiene un alto contenido de ella), lípidos (proporcionándoles los ácidos grasos esenciales presentes en las semillas), y de los antioxidantes: vitamina C, licopeno (dan su color), compuestos fenólicos y carotenoides; además de vitamina A y otros minerales proporcionados por la pulpa y las semillas al consumidor. Es importante este tipo de estudios por la información nutricional que aporta de los frutos. Proporcionando el conocimiento de la composición química (proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales) de los jitomates silvestres y sus componentes (pulpa, y semillas), permitiendo saber el aporte nutricional que tienen estos frutos para el consumidor. Al zoólogo le proporcionara información de los nutrientes que consume la fauna silvestre del lugar, y al nutriólogo el tener el conocimiento del aporte nutricional de estos frutos que les permitirá introducirla en la dieta diaria como alternativa de otros alimentos, durante los meses cuando se produce.

Alternativa medicinal.- Los frutos, tallos y hojas de *Solanum lycopersicum* var. Cerasiforme tiene diferentes aplicaciones en la etnomedicina. Por ejemplo se menciona que es un estimulante del aparato digestivo y se recomienda al hombre para incrementar la virilidad o bien para conservar la juventud. También se utiliza para el crecimiento del cabello (fruto macerado y untado), para la curación de hemorroides en humanos y timpanismo en animales (tallo y hoja licuado) (Rodríguez et al. (2009). Otros usos etnomedicinales de *Solanum lycopersicum* var. Cerasiforme: Antiséptico, pectoral, gripe, tos, anemias, reumatismo, calambres, laxante, contra el cáncer, verrugas, anginas, irritación de los ojos, digestivo, callos, mal del pinto (vitiligo), diabetes, y desinfectante. Las formas de uso y propiedades curativas forman parte del conocimiento tradicional local, y un escaso número de propiedades han tenido el respaldo técnico científico como es el caso en la prevención de ciertos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Kavanaugh et al., 2007; Singh y Goyal 2008).). Es considerado que por el consumo diario de *Solanum lycopersicum* var. Cerasiforme confiere al consumidor la prevención de estas enfermedades. En general, el jitomate se utiliza también como elemento terapéutico en la medicina homeopática (Waizel, 2006)

Alternativa socioeconómica.- representa una alternativa socioeconómica, en las principales localidades de Nayarit, Jalisco y Michoacán, donde existen poblaciones de jitomate silvestre *Solanum lycopersicum* var. cerasiforme sujetas a recolección de estos frutos los cuales se consumen o comercializan en las plazas, tianguis y mercados locales o en ciudades cercanas, convirtiéndose de esta manera en un complemento alimenticio y socioeconómico de las comunidades asentadas en estas zonas, lo que viene a confirmar la importancia económica de estas poblaciones de frutos silvestres.

Cabe destacar que esta producción se obtiene a muy bajo costo (sin ningún tipo de energías antropogénicas), lo cual representa para los recolectores ingresos extras con poca inversión.

Por los resultados obtenidos de nuestros análisis, se concluye que el jitomate *Solanum lycopersicum* variedad Cerasiforme, puede representar para la fauna Silvestre y para los pobladores que habitan en estas zonas de Jalisco, Nayarit y Michoacán, una alternativa: medicinal, alimenticia, nutricional y Socioeconómica.

BIBLIOGRAFIA

1. Aguilar Meléndez Araceli, J. Canul ku, J. L. Chávez Servía, R. Lobato Ortiz, P. Sánchez Peña. 2009. Diagnostico del Jitomate (Tomate Rojo) En México Red de Jitomate. pp 141-156
2. Álvarez-Hernández, J. C., H. Cortez-Madrigal, I. García-Ruiz. 2009. Exploración y caracterización de poblaciones silvestres de jitomate (Solanaceae) en tres regiones de Michoacán, México. Polibotánica. Núm. 28: 139-159
3. Casas A., J. Caballero, C. Mapes y S. Zárate. 1997. Manejo de la vegetación, domesticación de plantas y origen de la agricultura en Mesoamérica. Boletín de la Sociedad Botánica de México 61. pp. 35 - 47.
4. Causse, M.; Buret, M.; Robini, K. y Versachave, P. 2003. Inheritance of nutritional and Sensory quality Traits in fresh market tomato and relation to consumer preferences. *J.FoodSci.*68:2342-2350.
5. Chávez S. J. L., J. C. Carrillo, A. M. Vera, E. Rodríguez y R. Lobato (2011) Utilización Actual y Potencial del Jitomate Silvestre Mexicano. Subsistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINAREFI), Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, CIIDIR-Unidad Oaxaca del Instituto Politécnico Nacional e Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, México. pp. 31- 49.
6. Carrillo-Rodríguez, José C. (2010). Calidad de frutos de tomates silvestres (*Lycopersicon esculentum* var. cerasiforme Dunal) de Oaxaca, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33(spe4), 7-13.
7. Crisanto-Juárez, Andrés U., Vera-Guzmán, Araceli M., Chávez-Servía, José L., y Carrillo-Rodríguez, José C. (2010). Calidad de frutos de tomates silvestres (*Lycopersicon esculentum* var. cerasiforme Dunal) de Oaxaca, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33(spe4), 7-13.
8. FAOSTAT.2011.Estadísticas de producción de cultivos. [en línea] <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567> [consulta: 12 mayo de 2011]
9. González Céspedes A.M., M.C. Salas Sanjuán, M. Urrestarazu Garilán. 2000. Producción y calidad en el cultivo de jitomate cherry. pp. 547 – 586
10. Lobato-Ortiz, R. E. Rodríguez-Guzmán, J.C. Carrillo-Rodríguez, J.L. Chávez-Servía, P. Sánchez-Peña, A. Meléndez. 2012. Exploración, colecta y conservación de recursos genéticos de jitomate: avances en la Red de jitomate. (SINAREFI). 9-11 p.
11. Juárez-Crisanto, Andrés U., Vera Guzmán, Araceli M., Servía Chávez, José L., José C. Carrillo Rodríguez. 2010. Calidad de Frutos de Tomates Silvestres (*Solanum lycopersicum* var. cerasiforme Dunal). De Oaxaca México. *Rev. Fitotec. Mex.* 33: 7-12.
12. Rodríguez, G. E.; Vargas, C. D.; Sánchez, G. J. J.; Lépiz, I. R.; Rodríguez, C. A.; Ruiz, C. J. A.; Puente, O. P. y Miranda, M. R. 2009. Etnobotánica de *Solanum lycopersicum* var. cerasiforme en el Occidente de México. *Naturaleza y Desarrollo.* 7(2):46-59.
13. Rodríguez Guzmán E.; Arriaga Ruiz M.; Aguilar Meléndez A; Minerva Vera Guzmán A; Lobato-Ortiz; Carrillo-Rodríguez; Chávez-Servía; Sánchez-Peña; Arellano-Rodríguez;

- Martínez-Ramírez; Ron-Parra; Lépiz-Ildelfonso. 2015. Caracterización morfoagronómica de colectas de *Solanum lycopersicum* realizadas por la Red de jitomate-Sinarefi, en México. XII Encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia.
14. Nuez, F. 1995. El cultivo del tomate. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 793 p.
 15. Nuez F. 2001. El cultivo del tomate. Ed. Mundi Prensa. 793 p
 16. Sánchez M de C. y Torija ME. (2011). Mineral and trace elements content in 30 accessions of tomato fruits (*Solanum pimpinellifolium* L., *Solanum cheesmaniae* L. Riley, and *Solanum habrochaites* S. Knapp & D.M. Spooner). *Biological Trace Element Research* 141 :329-339. doi: 10.1007/s12011-010-8738-6.
 17. Villarreal, R. 1982. Tomates. IICA. San José de Costa Rica. Serie Investigación y Desarrollo No. 6. 184 p.
 18. Wills R., B. Mc Glasson, D. Graham y D. Joyce. 1998. Introducción a la fisiología y manipulación poscosecha de frutas, hortalizas y plantas ornamentales. Editorial Acribia, Zaragoza España. pp. 7 – 165.

CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS DE ALGINATO DE SODIO Y QUITOSANO CON ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA INFRARROJA.

María Antonieta Ríos Corripio, Aurelio López-Malo

Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental. Universidad de las Américas Puebla.

RESUMEN

Las películas comestibles son matrices continuas formuladas a base de lípidos, proteínas o carbohidratos, y pueden servir como vehículos para un amplio rango de aditivos. Entre los aditivos naturales están los aceites esenciales que pueden ser extraídos de diversas plantas. Al adicionar aceites esenciales a las películas e incorporarlas a alimentos se evita el desarrollo de microorganismos, se prolonga la vida de anaquel, etc. Se obtuvieron películas de alginato y quitosano con agente plastificante y aceite esencial de tomillo utilizando el método de remoción de solvente por evaporación y preformado en placa. El objetivo de este estudio fue caracterizar mediante FTIR las películas obtenidas de alginato y quitosano con y sin aceite esencial de tomillo para observar diferencias en composición química entre cada muestra, las bandas fueron registradas, identificadas e interpretadas. Los resultados obtenidos mostraron que las películas de alginato y quitosano con y sin aceite esencial presentan bandas de absorción diferentes, pero típicas de cada uno de sus componentes. El análisis FTIR de las muestras nos ayudó a establecer las características espectrales de las muestras en base a los componentes empleados en su elaboración, los cambios en la forma de línea de los espectros FTIR hacen posible diferenciar a cada una de las muestras y así poder observar cambios químicos en los grupos funcionales mostrándose como presencia y desaparición de algunas bandas que determinarán su aplicación como películas comestibles antimicrobianas.

1. INTRODUCCIÓN

La creciente necesidad por reducir la producción de polímeros obtenidos de recursos fósiles, debido a los problemas ambientales causados por los desechos plásticos elaborados a partir de derivados del petróleo, ha promovido la investigación para la obtención de materiales que tengan las propiedades funcionales de un plástico derivado del petróleo, sin que perjudique el medio ambiente.

Una de las principales aplicaciones del plástico es el empaquetado, los grandes volúmenes de residuos causados por esta actividad, han causado la contaminación del agua, aire y suelo, ya que no son degradados por el entorno y no sufren oxidación o descomposición con el tiempo (Cristán y col., 2003). Por ello, las envolturas biodegradables a base de materias primas renovables pueden ser de gran ayuda para reducir el problema, ya que mediante la acción de enzimas, micro y macroorganismos, se degradan en compuestos de bajo peso molecular, sin ser nocivos para el ambiente, enriqueciendo los suelos (Hocking, 1992).

Las biopelículas son definidas para este contexto como aquellas elaboradas a partir de materiales biodegradables, los cuales son capaces de formar una lámina delgada (película). Los biopolímeros naturales que se han estudiado para la elaboración de biopelículas comestibles provienen de cuatro grandes fuentes: origen animal (colágeno/gelatina), origen marino (quitina/quitosano), origen

agrícola (lípidos y grasas e hidrocoloides, proteínas y polisacáridos) y origen microbiano [ácido poliláctico (PLA) y polihidroxialcanoatos (PHA)] de acuerdo a lo referido por Williams y Hillmyer, (2008).

Las biopelículas pueden servir como vehículos para un amplio rango de aditivos, incluyendo compuestos antimicrobianos, con la finalidad de proporcionarles mayores atributos como es el control de microorganismos. Entre los aditivos naturales están los aceites esenciales estos se pueden extraer de plantas y se ha comprobado que presentan inhibición contra hongos y bacterias. Si a las biopelículas se les adicionan estos productos, se evita el desarrollo de microorganismos, se prolonga la vida de anaquel, se retrasa la maduración de frutas climatéricas y se mantienen las propiedades sensoriales de éstos. La aplicación de técnicas que permitan controlar los factores alterantes en frutas y hortalizas es actualmente objeto de muchas investigaciones en el campo de ciencia y tecnología de los alimentos (Wiley, 1997). La incorporación de agentes antimicrobianos dentro de las biopelículas constituye una técnica innovadora en el mantenimiento de la inocuidad y vida útil de alimentos mínimamente procesados. Una de las técnicas analíticas que nos ayuda para saber la composición de las películas así como para la identificación química de los aditivos adicionados en ellas es la espectroscopia infrarroja.

La espectroscopia infrarroja, es una técnica de análisis que se ha empleado para la caracterización de materiales químicos, cerámicos, recubrimientos y plásticos. En este último caso, provee información acerca de la composición química del polímero. El análisis infrarrojo, es una técnica adecuada para el estudio de materiales biodegradables, debido a que se trata de una técnica no destructiva, requiere un mínimo de muestra, amigable con el ambiente y los resultados permiten analizar la composición química de las películas. El objetivo de este estudio fue caracterizar mediante FTIR las películas obtenidas a partir de alginato o quitosano con y sin aceite esencial de tomillo para observar diferencias en composición química entre cada muestra, las bandas fueron registradas, identificadas e interpretadas.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Elaboración de biopelículas a base de alginato.

Se preparó una solución al 1.5% de alginato de sodio grado alimenticio, y se añadió 30% de glicerol (en base a la cantidad de biopolímero utilizada en su formulación), a una cantidad de 500 ml de agua previamente caliente, esta mezcla se mantuvo a una temperatura de 60 °C en agitación constante durante 30 min, posteriormente una vez que la solución se observó homogénea, se le adicionó 500 µl de aceite esencial (tomillo) a la solución de alginato. Posteriormente, la mezcla de alginato, glicerol y aceite esencial se mantuvo en agitación constante durante 20 minutos más, a temperatura ambiente. Una vez homogeneizada la mezcla, se eliminaron las burbujas de aire aplicando vacío durante 10 minutos, una vez removido el aire se vertieron 30 ml de la solución en cajas Petri de vidrio (100x15) y moldes de silicón para formar las películas y fueron secadas a 35°C durante 24 horas por medio de un deshidratador de alimentos (Excalibur, 3900B, Sacramento EE.UU) utilizando el método de remoción de solvente por evaporación y preformado en placa. Una vez concluido el tiempo de secado, se realizó el proceso de reticulación añadiendo 1 ml de solución de CaCl₂ al 1%. Una vez reticuladas las películas se secaron nuevamente a 35° C durante 15 minutos, las películas fueron recuperadas desprendiéndolas cuidadosamente de los moldes de silicón o cajas Petri posteriormente fueron colocadas en bolsas de polietileno y almacenadas en un desecador a una humedad relativa de 32% hasta su análisis.

Elaboración de biopelículas a base de Quitosano.

Para la elaboración de las biopelículas de quitosano se siguió el mismo procedimiento utilizado para las de alginato, solo que en este caso se utilizó quitosano en una proporción de 1% (p/p) en una solución de ácido acético glacial a 1% (v/v) en 500 ml de agua destilada, se adicionó de igual

manera el agente plastificante y el aceite esencial de tomillo, en esta metodología no se llevó a cabo el procedimiento de reticulación. Las películas se almacenaron de la misma manera que las de alginato.

Caracterización de las biopelículas con y sin aceite esencial de tomillo por Espectroscopia Infrarroja FTIR.

El equipo utilizado para la obtención de los espectros FTIR en el rango MIR para el conjunto de muestras de biopelículas, fue un Infrarrojo con Transformada de Fourier, marca Bruker Modelo Vertex se utilizó el programa OPUS 6.5 para la adquisición de los datos y la técnica de muestreo fue por Reflectancia Total Atenuada. El espectrómetro está equipado con un detector de sulfato de triglicina deuterado (DTGS) que funciona con una resolución de 4 cm, una gota de 3µl fue suficiente para obtener espectros FTIR con alta razón señal/ruido. Las mediciones fueron realizadas para cada espectro en el rango espectral 400-4000 cm⁻¹. Cada espectro se obtuvo y se comparó contra el espectro de línea de base para la obtención del espectro de absorción. Dos mediciones por muestra se realizaron para la reducción de errores. Después de cada medición se lavó la superficie de la celda ATR con agua desmineralizada y se secó con un papel suave.

3. RESULTADOS

Se elaboraron películas de alginato y quitosano con y sin aceite esencial de tomillo, cada una de las películas presentó características únicas dependiendo de sus componentes.

Como se mencionó en la sección de metodología las soluciones a base de alginato y de quitosano se sometieron a un calentamiento durante 30 min a 60 °C, a todas las muestras se les adicionó un plastificante (glicerol) y aceite esencial de tomillo, como se muestra en la figura 1.

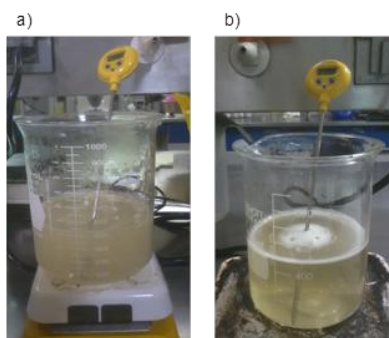


Figura 1. Imágenes de las soluciones obtenidas para la elaboración de películas a) alginato b) quitosano.

Una vez obtenidas las soluciones de ambas muestras estas se vertieron en cajas Petri o moldes de silicón y puestas en un desecador a 35 °C durante 24 horas (figura 2).



Figura 2. Imágenes de la secuencia de formación de las películas de alginato y quitosano.

Caracterización FTIR de alginato de sodio

Mediante la técnica de espectroscopia de absorción de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), se identificaron los grupos funcionales existentes en el alginato de sodio los cuales fueron C=O, C-O-C, COOH. En la figura 3, se muestra el espectro FTIR del alginato de sodio, para el cual se observa un pico de 3327 cm^{-1} indicativo de la presencia de un grupo funcional OH. Por su parte, el pico de 2931 cm^{-1} muestra un enlace C-H del aldehído. En los picos correspondientes a 1597 cm^{-1} y 1410 cm^{-1} , se observa un enlace doble C=O del grupo carboxilato. De igual forma, en 1300 cm^{-1} se evidencian los enlaces simples entre carbono e hidrogeno C-H y a 1123 cm^{-1} los enlaces C-C. El enlace C-O-C se observa en el pico de 1084 cm^{-1} y en el pico de 948 cm^{-1} se evidencia el tipo de enlace C-O (Coates, 2000).

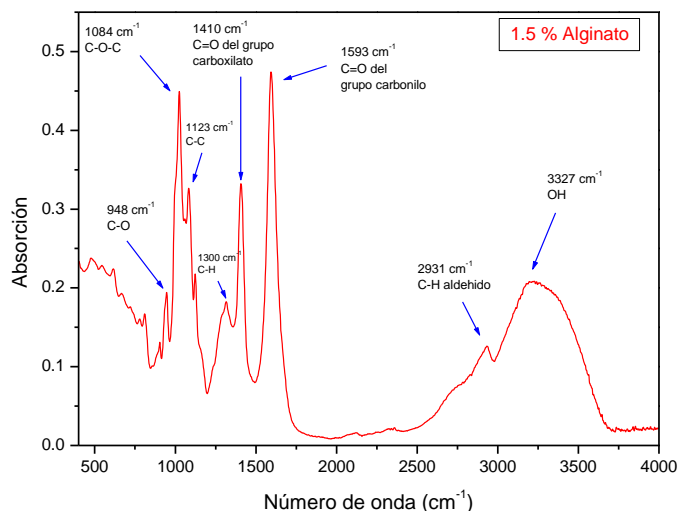


Figura 3. Espectro FTIR de alginato de sodio 1.5%.

Caracterización FTIR de quitosano.

La espectroscopia infrarroja del quitosano (figura 4), indica que posee una amina secundaria N-H que se evidencia en el pico de 3279 cm^{-1} y es confirmada en el pico de 710 cm^{-1} ; también se observa una amina primaria que corresponde al pico de 3363 cm^{-1} y que se confirma con el pico de

1553 cm^{-1} . Se observa además, la presencia de enlaces metílicos entre el carbono y el hidrogeno C-H dado por el pico de 1380 cm^{-1} y sobre el pico que corresponde a 1634 cm^{-1} se observa el estiramiento C=O de la amida primaria. (Stuart, 2004).

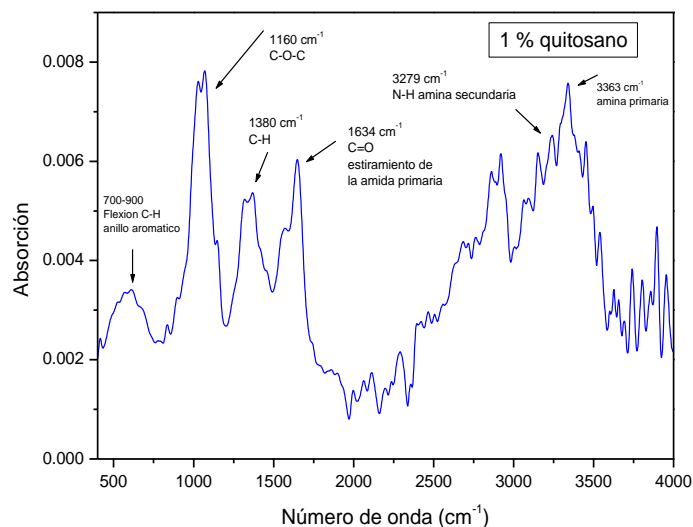


Figura 4. Espectro FTIR de quitosano 1%.

Caracterización FTIR de aceite esencial de tomillo.

En la figura 5 se muestra el espectro FTIR de aceite esencial de tomillo en el rango de 400-4000 cm^{-1} , por tratarse de sustancias con anillo aromático, sus espectros infrarrojo muestran las señales características de estos compuestos y dan información sobre el tipo de sustitución del anillo aromático además de los grupos funcionales presentes en la molécula. Se muestran en la figura 5 las principales bandas de absorción en 3650-3200 cm^{-1} tensión del enlace O-H, 2975-2845 cm^{-1} , tensión simétrica y antisimétrica del enlace C-H, y en 1622, 1421 y 1153 cm^{-1} C=C grupos aromáticos.

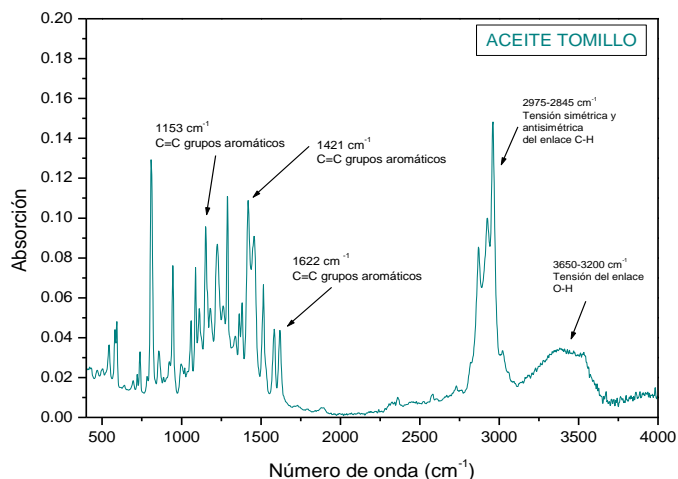


Figura 5. Espectro FTIR de aceite esencial de tomillo.

Caracterización FTIR de películas de alginato y quitosano.

Las muestras de alginato y quitosano sin aceite esencial de tomillo fueron caracterizadas mediante FTIR, en la figura 6 se muestran los espectros FTIR de dichas muestras en la región de 400-2000 cm^{-1} . Podemos observar que cada muestra presenta su espectro FTIR típico de cada componente (alginato y quitosano) que la conforma y que es posible discriminar su estructura química entre cada una de ellas mediante esta técnica.

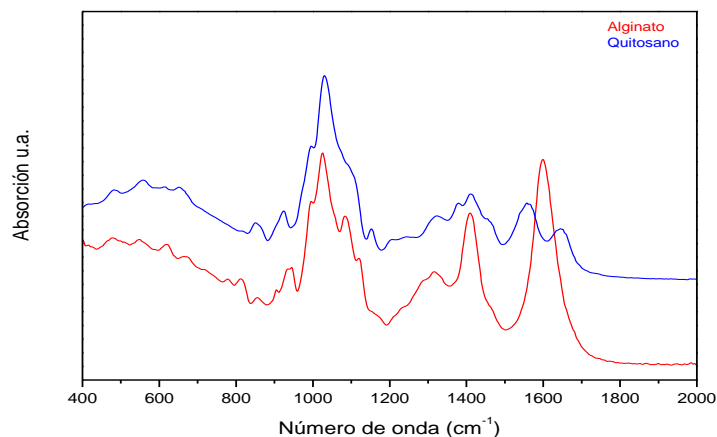


Figura 6. Espectros FTIR de películas de alginato (rojo) y quitosano (azul) sin aceite esencial de tomillo en la región de 400-2000 cm^{-1} .

Caracterización FTIR de películas de alginato y quitosano con y sin aceite esencial de tomillo.

En la figura 7 se presentan los espectros FTIR de películas de alginato sin aceite esencial de tomillo y alginato con aceite esencial de tomillo en la región de 400-2000 cm^{-1} . Al comparar ambos espectros se puede observar que la presencia del aceite esencial en la película trajo algunos cambios espectrales en las bandas situadas en 935, 1116, 1461 y 1602 cm^{-1} , lo que nos podría indicar la interacción que se presenta entre el aceite y la película de alginato.

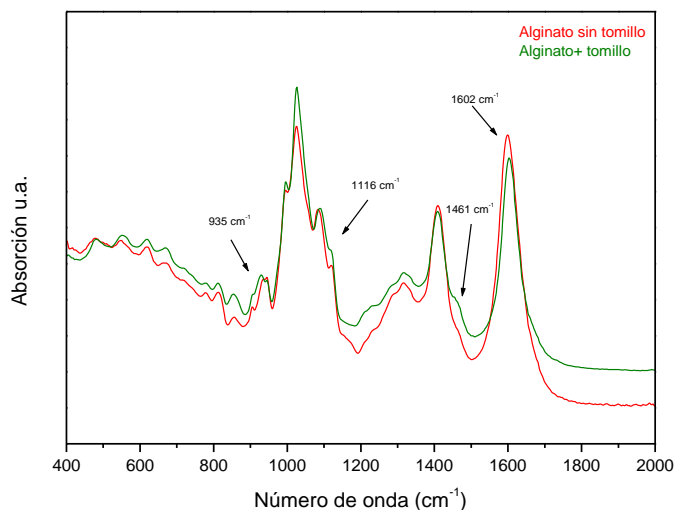


Figura 7. Espectros FTIR de películas de alginato sin aceite esencial de tomillo (rojo) y alginato con aceite esencial de tomillo (verde) en la región de 400-2000 cm^{-1} .

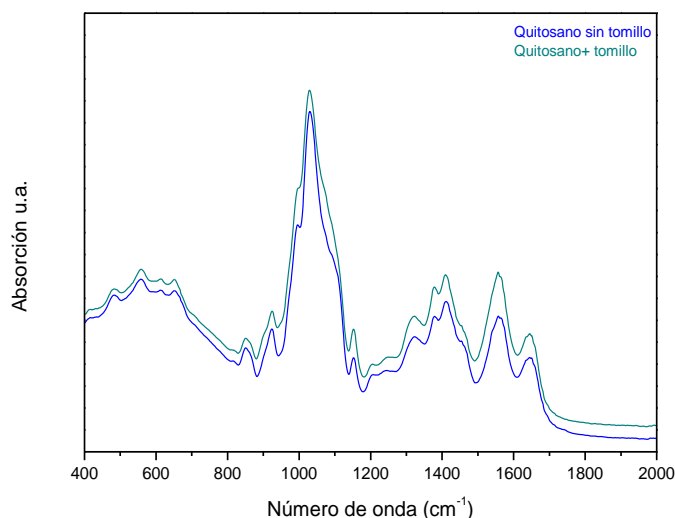


Figura 8. Espectros FTIR de películas de quitosano sin aceite esencial de tomillo (azul) y quitosano con aceite esencial de tomillo (verde) en la región de 400-2000 cm^{-1} .

En la figura 8 se presentan los espectros FTIR de películas de quitosano sin aceite esencial de tomillo y quitosano con aceite esencial de tomillo en la región de 400-2000 cm^{-1} . Al adicionarle el aceite esencial de tomillo a la película de quitosano podemos observar mediante FTIR que el espectro presenta ligeros cambios en su forma de línea base comparándolo con la muestra de quitosano que no tenía aceite esencial.

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos mostraron que las películas de alginato y quitosano con y sin aceite esencial presentan bandas de absorción diferentes, pero típicas de cada uno de sus componentes. El análisis FTIR de las muestras nos ayudó a establecer las características espectrales de las muestras en base a los componentes empleados en su elaboración, los cambios en la forma de línea de los espectros FTIR hacen posible diferenciar a cada una de las muestras y así poder observar cambios químicos en los grupos funcionales mostrándose como presencia y desaparición de algunas bandas que determinarán su aplicación como películas comestibles antimicrobianas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Coates, J. En Interpretation of infrared spectra, a practical approach. 2000, pp. 10815-10837. Chichester: R.A Meyers
2. Cristán Frías, A., Ize Lema, I. & Gavilán García, A. La situación de los envases de plástico en México. Gaceta Ecológica, 2003,67.
3. Hocking, P. J. The classification, preparation, and utility of degradable polymers. Polymer Reviews, 32, 1992, pp. 35-54.

4. Stuart, B. Infrared spectroscopy: fundamentals and applications. Sydney: John Wiley & sons, Ltd. 2004
5. Wiley, C. R. Frutas y Hortalizas mínimamente procesadas y refrigeradas. Zaragoza: España. Acribia. 1997, pp 68-82.
6. Williams, C. K. & Hillmyer, M. A. Polymers from Renewable Resources: A Perspective for a Special Issue of Polymer Reviews. Polymer Reviews, 48, 2008, pp.1-10.

BIOSORCIÓN DE PLOMO MEDIANTE EL USO DE BIOMATERIALES: EXOPOLISACÁRIDO Y BIOMASA DE KÉFIR

Lourdes Patricia Chávez Coronado¹, Mayra Zulema Treviño Garza¹, Katiushka Arévalo Niño¹.

¹ Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

RESUMEN

La biosorción es una alternativa para la eliminación de metales pesados tóxicos como el plomo (Pb). El kéfir es una mezcla microbiana (bacterias y levaduras), rodeadas por una matriz de exopolisacárido (kefirán). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de remoción de Pb a partir de kefirán y biomasa inactiva de kéfir. La producción de granos de kéfir se realizó en un medio a base de piloncillo (6 días $25 \pm 2^\circ$ C). El kefirán fue separado de la biomasa y extraído mediante precipitación etanólica. La biomasa y el kefirán se secaron (24h a 60° C), molieron y tamizaron (120 micras). Se determinaron los parámetros óptimos de remoción; pH, temperatura, tiempo de contacto y concentración del biosorbente. Las mediciones de Pb se realizaron por espectrofotometría de absorción atómica (Varian Spectraa 55b). El kefirán (2%) logró una remoción de 75% (pH 5, 25° C por 30 min), mientras que la biomasa inactiva (2%) removió 54% (pH 5, 35° C por 5 min). Los datos de la cinética de adsorción correspondieron a un modelo de pseudosegundo orden para ambos casos. Las isothermas experimentales de ambos biomateriales se ajustaron a modelos de adsorción por multicapas. En el caso del exopolisacárido se obtuvo una $R^2 = 0.99$ y una q_{max} de 2.73 mg/g para el modelo de Harkins-Jura, mientras que la biomasa mostró una $R^2 = 0.97$ y una q_{max} de 2.31 mg/g para el modelo de Temkin. En conclusión, el kefirán y la biomasa son una alternativa potencial para la remoción de plomo.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo tecnológico, el consumo masivo e indiscriminado y la producción de desechos principalmente urbanos, ha provocado la presencia de diferentes metales en cantidades importantes en el ambiente, generando diversos efectos sobre la salud y el equilibrio de los ecosistemas. Los metales son persistentes en el ambiente, pueden cambiar de especie química o de matriz, se incorporan en el organismo a través de los alimentos, el agua, o como partículas en el aire que se respira, acumulándose hasta llegar a límites de toxicidad. Si la incorporación es lenta se producen intoxicaciones crónicas, mientras que si el tiempo de exposición es corto y la dosis de metal alta la intoxicación puede ser aguda (Fernández, 2012).

Actualmente existen diversas tecnologías que hacen frente a la remoción de los desechos tóxicos incluyendo a los metales pesados, entre las que destacan: precipitación, ultrafiltración, ósmosis inversa, electrodiálisis y electrólisis. Desafortunadamente el alto costo para la realización de dichas técnicas hace imposible que sean adoptadas en las pequeñas empresas mexicanas (Sánchez *et al*, 2008). Los metales pesados presentes en sistemas de efluentes contaminados pueden ser removidos mediante técnicas alternativas a los procesos comúnmente conocidos, los cuales resultan complicados y costosos. Estas técnicas alternativas relativamente sencillas y de bajo costo han mostrado resultados significativos, entre ellas se destaca la remoción de metales contaminantes de efluentes mediante el método de biosorción haciendo uso de biomasa viva,

muerta o inmovilizada como adsorbente que atrapa en su superficie a los iones metálicos, o bien, utilizando compuestos con actividad secuestrante que atrapan al metal y forman un complejo acumulando al contaminante dentro de su estructura (Cañizares, 2000).

Por otro lado, el grano de kéfir es una mezcla microbiana de bacterias (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Acetobacter* y *Streptococcus spp.*) y levaduras (*Kluyveromyces*, *Torula*, *Candida* y *Saccharomyces spp.*), este se caracteriza por poseer propiedades antitumorales, antimicrobianas y antifúngicas. La matriz del grano de kéfir está formada por un polisacárido compuesto de glucosa y galactosa en relación 1:1, denominado kefirán, el cual posee aplicaciones industriales importantes en el área farmacéutica, alimenticia y cosmética (Kobayashi, 2004). Este polímero, puede ser una alternativa para la remoción de metales pesados en el ambiente. En este contexto, El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de remoción de Pb a partir de kefirán y biomasa inactiva de kéfir.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos

Las soluciones de Pb^{2+} (30 ppm) fueron preparadas a partir de una solución estándar de 1000 ppm de Pb^{2+} . Para el ajuste de pH se utilizaron soluciones de NaOH y HNO_3 0.2 N.

Producción del kéfir

En base a reportes previos (Simova *et al*, 2002), con algunas modificaciones, se utilizó un inoculo de 50g de kéfir que fue puesto a fermentar durante 5 días en un medio a base de piloncillo. Los granos fueron lavados y almacenados en refrigeración a 4° C.

Obtención de biosorbentes. Para realizar la extracción del polímero, se utilizó el método descrito por Piermaria *et al*, 2008 con algunas modificaciones. El kefirán fue separado de la biomasa y extraído mediante precipitación etanólica. La biomasa inactiva y el kefirán se secaron (24h a 60° C), molieron y tamizaron (120 micras).

Soluciones de kefirán y biomasa inactiva. Para la remoción de Pb, se evaluaron soluciones de kefirán al 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0% (elaboradas en agua destilada mediante agitación mecánica constante hasta su completa disolución). La biomasa fue evaluada en las mismas concentraciones (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0%) que el polímero.

Efecto de pH. Se evaluaron pH de 3, 4 y 5. En tubos falcon se añadieron soluciones de metal (concentración final de 30 ppm de Pb) y polímero (1.0%) en relación 1:1. En el caso de la biomasa, se evaluó una concentración del biosorbente (1.0%) en una solución de Pb de 30 ppm (con pH de 3, 4 y 5 previamente ajustado). Los tubos fueron llevados a agitación constante (150 rpm) durante 15 min.

Efecto de Temperatura. Se evaluaron temperaturas de 25, 35 y 45 °C, en un periodo de tiempo de 15 min, en agitación constante (150 rpm).

Cinética de biosorción. Se realizó con las condiciones de temperatura (25 y 35 °C para el polímero y la biomasa, respectivamente) y pH óptimos (pH 5) determinados en el puntos 2.5 y 2.6. Las soluciones se mantuvieron en agitación constante (150 rpm) durante 5, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos.

Isotermas de biosorción. Para las isotermas de biosorción se utilizaron concentraciones de formulado de kéfir y de biomasa de 0.5, 1, 1.5 y 2%, ajustados al pH óptimo determinado en el punto 2.5. Los tubos fueron llevados a agitación constante (150 rpm) a una temperatura de 25°C para el polímero y 35 °C para la biomasa.

En todos los casos, las soluciones resultantes en las diferentes determinaciones, se filtraron y se leyeron por espectrofotometría de absorción atómica (Varian Spectraa 55b). Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey en el paquete estadístico SPSS 17.0.

3. RESULTADOS

La tabla 1 muestra los resultados de la remoción de ambos biomateriales con respecto a pH y temperatura, determinándose que el pH óptimo de remoción fue de 5. En cuanto a la temperatura, el polímero trabajó mejor a 25° C, mientras que la biomasa tuvo una mejor capacidad de remoción a 35° C.

Condición	Biosorbente		
		Polímero	Biomasa
pH	3	57.18 ± 1.03 ^a	27.10 ± 0.45 ^a
	4	52.60 ± 3.30 ^a	38.92 ± 1.00 ^b
	5	54.58 ± 3.18 ^a	42.10 ± 0.64 ^c
Temperatura (°C)	25	54.18 ± 3.96 ^b	45.09 ± 1.16 ^a
	35	44.67 ± 2.60 ^a	49.02 ± 0.53 ^c
	45	46.80 ± 0.24 ^a	47.06 ± 0.36 ^b

Tabla 1. Remoción de los biomateriales utilizados respecto a pH y Temperatura.
Nota: ± Desviación estándar (P<0.05).

En la figura 1 se muestran los gráficos de la capacidad de biosorción con respecto al tiempo. Se observa que, en el caso del polímero se logró una máxima remoción a los 30 minutos con una q_{max} de 3.8 mg/g, mientras que para la biomasa se observó un comportamiento de remoción uniforme en el que no hubo diferencia significativa entre ninguno de los tiempos.

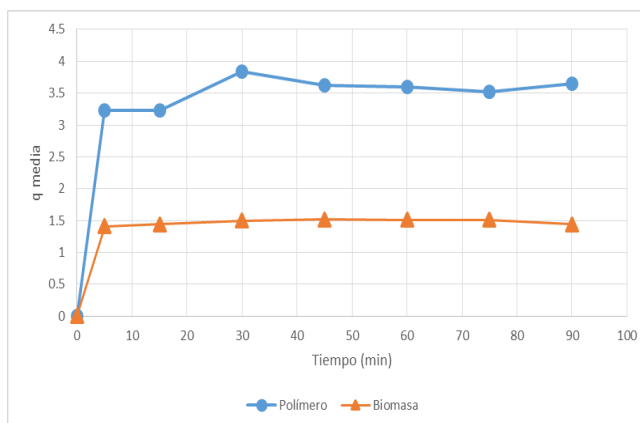


Fig 1. Variación de la capacidad de biosorción de Pb de kefirán y biomasa de kefir con respecto al

Los procesos de biosorción pueden ser descritos por una ecuación de pseudosegundo orden:

$$\frac{t}{q} = \frac{1}{k_m q_m^2} + \frac{1}{q_m} t \quad (1)$$

En donde K_m es la constante de velocidad de adsorción, mientras que q_m corresponde a la capacidad máxima de adsorción (Herrejon, Limón, Martínez, 2008).

En la figura 2 se presentan los gráficos lineales del modelo matemático que describe un comportamiento cinético de pseudosegundo orden, observándose una tendencia ascendente para ambos biomateriales, con un coeficiente de correlación de 0.998.

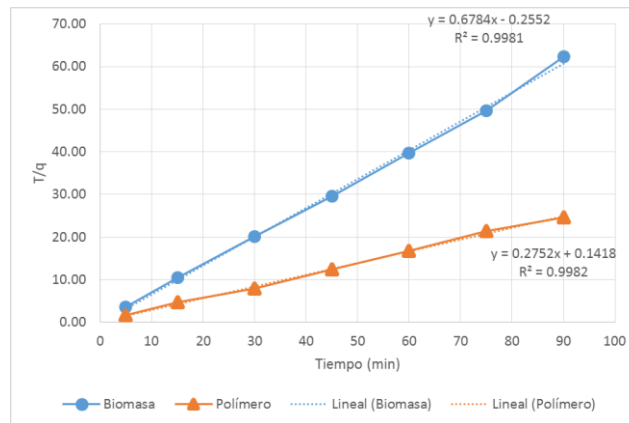


Fig 2. Relación t/q , respecto al tiempo de biosorción de Pb utilizando kefir y biomasa de kefir al 1%. Ambos biomateriales pertenecen a una ecuación de pseudosegundo orden.

Para este estudio se consideró la utilización de los modelos matemáticos de Langmuir y de Freundlich. Los cálculos se realizaron tomando en cuenta las siguientes relaciones:

$$q = (C_i - C_e) * V / X_o$$

Donde:

q = Tasa de biosorción de Pb^{2+} (mg/g de plomo por gramo de biosorbente)

C_i = Concentración inicial de Pb^{2+} en solución (mg/l)

C_e = Concentración final de Pb^{2+} (en equilibrio) en solución (mg/l)

X_o = Cantidad de biosorbente agregada (g)

V = Volumen de solución (l)

La isoterma de Freundlich se linealizó utilizando la relación:

$$\log q = \frac{1}{n} \log C_e + \log K \quad (3)$$

Donde:

n = constante empírica que indica la capacidad de adsorción y la afinidad del adsorbato por el adsorbente.

K = constante que representa la velocidad de saturación del adsorbato.

Para la isoterma de Langmuir se linealizó la ecuación graficando $1/q$ vs. $1/C_e$, obteniéndose la siguiente relación:

$$1/q = 1/q_{\max} + 1/b * q_{\max} * C_e \quad (4)$$

Donde:

q_{\max} = Tasa máxima de retención de plomo (mg de Pb/g biosorbente)

b = constante relacionada con la afinidad del biosorbente por los iones Pb^{2+}

Tabla 2. Coeficiente de correlación de los biomateriales utilizados para los modelos de Langmuir y Freundlich.

Modelo de adsorción	Coefficiente de correlación (R^2)	
	Polímero	Biomasa
Langmuir	0.4491	0.8890
Freundlich	0.9162	0.9649

En la tabla 2 se muestran los coeficientes de correlación obtenidos para el modelo matemático de Langmuir, los cuales fueron de 0.4491 para el polímero, y 0.8890 para la biomasa, mientras que en la isoterma de Freundlich se observó una R^2 de 0.9162 y 0.9649 para el polímero y la biomasa respectivamente.

Los datos experimentales fueron sometidos al ajuste de otros modelos matemáticos para determinar el mecanismo de biosorción de los biomateriales.

Se observó que los valores experimentales de biosorción para el polímero se ajustaron al modelo matemático de Harkins-Jura, que está dado por la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{Q_e^2} = \frac{B}{A} - \frac{1}{A} \log C_e \quad (5)$$

Donde:

Q_e = capacidad de adsorción del adsorbente en el equilibrio

A = parámetro de isoterma de Harkins-Jura, el cual considera adsorción por multicapas.

B = constante de la isoterma.

En la figura 3 se observa la ecuación linealizada de Harkins-Jura para la biosorción del kefirán. Se sugiere que éste modelo se ajusta mejor a los datos experimentales, al obtenerse un coeficiente de correlación de 0.9976 y una q_{\max} de 2.73 mg/g con un 75% de remoción de Pb. Éste modelo matemático asume que la adsorción del adsorbato ocurre en multicapas debido a que la superficie del sólido presenta microporos de adsorción heterogéneos aumentando el contacto y las interacciones entre las especies (Chamorro, Sanchez, 2012).

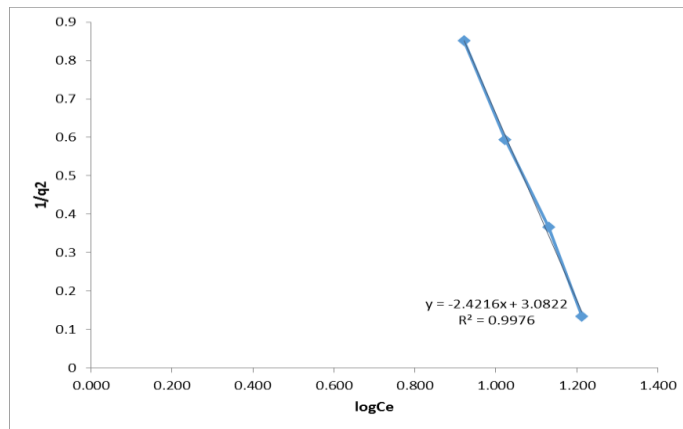


Fig 3. Isoterma de biosorción para kefirán, modelo matemático de Harkins-Jura (25° C, biosorbente 2%, pH 5, 30ppm Pb, 20 mL muestra, 30 min de contacto).

Para el caso de la biomasa, los datos experimentales se ajustaron al modelo de Temkin. Éste modelo está dado por la ecuación:

$$q_e = B \ln A + B \ln C_e, \quad \frac{RT}{b} = B \quad (6)$$

En la figura 4 se observa la ecuación lineal graficada para la isoterma de Temkin, para la cual los datos mostraron un coeficiente de correlación de 0.9706 y una qmax de 2.31 mg/g con un 54% de remoción a una concentración de 2%. La isoterma de Temkin asume que el calor de adsorción disminuye linealmente en todas las capas del adsorbente, debido a las posibles interacciones adsorbato-adsorbente, y ésta adsorción se caracteriza por ser uniforme sobre toda la superficie de contacto.

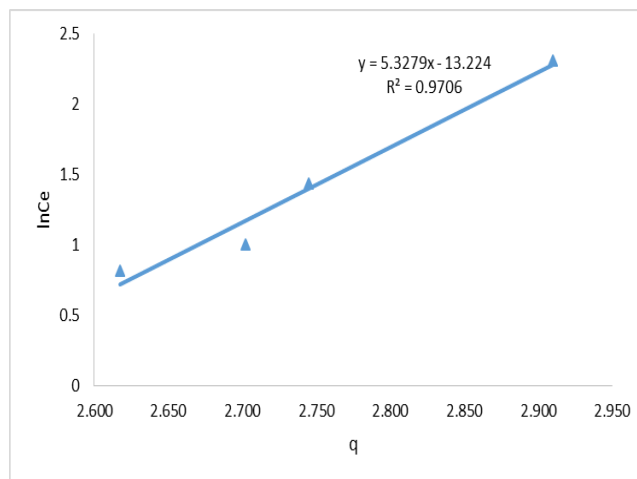


Fig 4. Isoterma de biosorción para biomasa, modelo matemático de Temkin (35° C, biosorbente 2%, pH 5, 30ppm Pb, 20 mL muestra, 5 min de contacto).

4. CONCLUSIONES

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de remoción de Pb a partir de kefirán y biomasa inactiva de kéfir. Los resultados obtenidos permiten concluir que el kefirán así como la biomasa inactiva son una alternativa potencial para la remoción de plomo. En ambos casos el mecanismo de bioadsorción se ajustó al modelo de multicapas, lo que habla de un adsorbente con superficie heterogénea.

BIBLIOGRAFIA

1. Cañizares Villanueva R, "Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana", *Revista Latinoamericana de Microbiología*, Vol. 42, 2000, pp. 131-143.
2. Chamorro Andrés Felipe, Sánchez Andica Rubén Albeiro, "Estudio de la adsorción de plomo en suelos de la región minera en el distrito de Buenos Aires en el departamento del Cauca, Colombia", *Revista de Ciencias*, Vol. 16, 2012, pp. 145-160
3. Fernandez Cirelli A, "El agua: un recurso esencial" Instituto Centro de Estudios Transdisciplinarios del Agua (CETA)", *Química Viva*, Vol. 3, 2012, pp. 147-169.
4. Herrejon Figueroa, Limon Rodrgiuez, Martinez Miranda, "Cinetica e isotermas de adsorción de Pb (II) en el suelo de Monterrey", *Ingenierías*, Vol. 11, 41, 2008, pp. 24-31.
5. Ibrahim, M.B. and Sani, S, "Comparative Isotherms Studies on Adsorptive Removal of Congo Red from Wastewater by Watermelon Rinds and Neem-Tree Leaves", *Open Journal of Physical Chemistry*, Vol. 4, 4, 2014, pp. 139-146.
6. Kobayashi Takeshi, "Recent Progress of Biochemical and Biomedical Engineering In Japan", Springer, 2004, pp. 55 – 57.
7. Larenas C, Andrango D, "Estudio isotérmico de biosorción de plomo en aguas utilizando residuos vegetales", *La Granja*, Vol. 8, 2, 2008, pp. 3-8
8. Piernaria Judith, Pinotti Adriana, García María A, Abraham Analía G, "Films based on kefirán, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization", *ELSEVIER*, Vol. 23, 3, 2008, pp. 684- 6.
9. Reyhaneh Saadi, Zahra Saadi, Reza Fazaeli, and Narges Elmi Fard, "Monolayer and multilayer adsorption isotherm models for sorption from aqueous media", *Korean J. Chem. Eng.*, Vol. 32, 5, 2015, pp. 1-13.
10. Sánchez Edna, Garza María Teresa, Almaguer Verónica; Saenz Isabel. "Estudio cinético e isotermas de adsorción de Ni(II) y Zinc(II) utilizando biomasa del alga *Chlorella* sp. inmovilizada", *Ciencia UANL*, Vol. 11, 2, 2008, pp. 168-176.
11. Simova, Beshkova, Angelov, Hristozova, Frengova and Spasov, "Lactic acid bacteria and yeasts in kéfir grains and kéfir made from them", *J Ind Microbiol Biotechnol*, Vol. 28, 2002, pp. 1-6.

COMPUESTOS FENÓLICOS, MELANOIDINAS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN CAFÉ COSECHADO Y COMERCIALIZADO EN COATEPEC Y XALAPA, VERACRUZ

Mónica L. Pérez-Ochoa^{1*}, Elia Nora Aquino-Bolaños¹ y José Luis Chávez-Servia²

¹Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Veracruzana. ²Instituto Politécnico Nacional-CIIDIR Unidad Oaxaca

RESUMEN

El café provee beneficios a la salud como reducción de incidencia de enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas debido a que presenta diversos compuestos antioxidantes del tipo polifenoles y melanoidinas. No obstante, su composición varía por diversos factores como condiciones de producción, variedad, grado de tostado y tiempo de almacenamiento. En este estudio se analizaron nueve variedades de café cultivado en Coatepec y siete comercializadas en Xalapa, Veracruz con el propósito de evaluar las diferencias entre café cosechado recientemente y el comercializado en casas comerciales. En el grano tostado y molido se evaluaron los parámetros de color, mientras que en la bebida extraída a presión (15 bar) se evaluó la actividad antioxidante (DPPH y FRAP), polifenoles, melanoidinas, acidez y pH. Se observó diferencias significativas ($P < 0.05$) entre variedades regionales y café comercial, en todos los parámetros evaluados. El color de grano al tostado fue altamente variable entre variedades, independientemente del origen. Las variedades Robusta (*C. canephora*), Bourbon y CR95A (*C. arabica*) presentaron mayor actividad antioxidante y concentración de polifenoles y melanoidinas, las últimas también presentaron mayor acidez titulable junto con CR95B. En este trabajo, las variedades regionales presentaron mayores contenidos de compuestos fenólicos, actividad antioxidante y acidez que las variedades de los centros comerciales. Por lo tanto, un café preparado con grano de cosechas recientes presenta una mayor concentración de compuestos fenólicos y antioxidantes (benéficos para la salud), que el comercializado en centros comerciales, porque regularmente permanece almacenado durante un tiempo prolongado y esto puede afectar su calidad final.

1. INTRODUCCIÓN

El café es una de las bebidas más populares en el mundo y posiblemente la más consumida. Esta bebida se prepara a partir de las semillas tostadas (granos) derivadas de un arbusto del género *Coffea*. De alrededor de 500 especies de café, solamente *Coffea arabica* y *Coffea canephora* (robusta) son económicamente importantes (Jeszka-Skowron *et al.*, 2015). En México, las variedades arábicas cultivadas en mayor proporción son Typica, Bourbon, Caturra, Mundo Novo, Garnica, Catuaí entre otras (Santoyo *et al.*, 1996). Veracruz es uno de los principales productores de café en México. El municipio de Coatepec se encuentra dentro de los municipios de mayor producción en el estado, junto con Tezonapa, Atzalan, Zongolica, Huatusco e Ixhuatlán del Café (SAGARPA, 2015).

Actualmente, el café es considerado un alimento funcional, debido a su alto contenido de compuestos que ejercen propiedades antioxidantes y beneficios biológicos (Esquivel y Jiménez, 2012). Diversos estudios han demostrado que algunos constituyentes del café, como la cafeína, los polifenoles (ácidos fenólicos), y los compuestos formados durante el tostado por la Reacción de Maillard (melanoidinas) poseen propiedades antioxidantes (Yanagimoto *et al.*, 2004; Fujioka y Shibamoto, 2006; Van Dam, 2006; Vota- vova *et al.*, 2009). Diversos estudios sugieren que las

melanoidinas son parcialmente responsables de la actividad antioxidante, antibacterial y de las propiedades quelantes de metales y por lo tanto se consideran compuestos bioactivos (Nicoli *et al.*, 1997; Daglia *et al.*, 1994; Homma y Murata, 1995; Daglia *et al.*, 2000).

La composición del café tostado es consecuencia de la pirólisis y la reacción de Maillard que suceden durante el proceso, algunos compuestos son degradados y otros se forman, incluyendo los compuestos bioactivos. La composición final del café tostado y por consiguiente de la bebida, varía de acuerdo a diversos factores como la composición de la materia prima, el grado de tostado y otras variables del tostado como el tipo de tostador, el tiempo y la temperatura (Farah, 2012). Posterior al tostado del grano, este es molido y almacenado para su venta y consumo, sin embargo, durante el almacenamiento, la calidad del café puede deteriorarse debido a problemas generados por el oxígeno presente en el espacio de cabeza que se deja cuando se empaqueta para su comercialización.

Por lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo comparar los granos de café tostado cultivados y cosechados en la región cafetalera de Coatepec, Veracruz con cafés tostados y molidos de marcas comerciales adquiridos en casas comerciales ubicadas en la ciudad de Xalapa, Veracruz, a través de la evaluación de color de grano, actividad antioxidante, polifenoles, melanoidinas y acidez de la bebida.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Muestras de variedades de café y marcas comerciales

Se recolectaron bayas de café de seis variedades de *Coffea arabica* L. y una de *C. canephora* L. var. Robusta, en cuatro fincas de la zona de Coatepec, Veracruz, entre noviembre 2014 y febrero 2015. Una de las variedades Catimor-CR95 se muestreo en tres fincas y se consideraron como independientes en función de la finca. Coatepec es una región de alta producción de café en México, se localiza a 19° 27' 20" LN, 96° 56' 40" LO, una altitud promedio de 1180 m, un rango de temperaturas promedio de 12 a 27 °C, clima templado-húmedo y precipitaciones promedio de 1800 mm (CONAGUA, 2015). Las muestras se recolectaron de acuerdo al tiempo de la cosecha en la maduración de cada variedad.

Las bayas de cada variedad por finca recibieron el proceso húmedo para retirar las capas del endocarpio y tegumento de la semilla (grano de café sin tostar). Las muestras se secaron de 60 a 65 °C hasta obtener una humedad constante entre 10 y 12%. Se realizó el tostado mediante un tostador de laboratorio (Quantik modelo TC-150 R), durante 10 min a 160 °C para obtener un tostado ligero con base en las recomendaciones de Somporn *et al.* (2011) para conservar la mayor composición de grano y actividad antioxidante. Adicionalmente, se adquirieron siete marcas comerciales de café en mercados locales (Xalapa, Veracruz): Blasón, Los Portales, Vips, La Parroquia, World Table, Garat y Neblina.

Color de grano. Se evaluó el color de grano tostado y molido de las variedades regionales y marcas comerciales en escala CIE Lab (a^* , b^* y L^*) y se estimaron los índices de cromaticidad [$C^* = \sqrt{(a^2 + b^2)}$] y ángulo de matiz Hue [$h^\circ = \tan^{-1}(b^*/a^*)$] (McGuire, 1992).

Preparación del extracto

Se evaluaron las bebidas de café tostado y molido de variedades regionales y se compararon con las marcas comerciales. Primero se trituró el grano en tamaño de partícula de 0.6 mm mediante un molino (Krups®, modelo GX4100, México), se pesaron 7 g de café, se compactó y se extrajo mediante presión a vapor húmedo de 15 bares mediante una cafetera (Oster Mod. BVSTEM7701, México), y obtener un extracto de café conocido como “expreso corto”. Posteriormente, todos los extractos se aforaron a 250 mL con agua destilada a 25 °C y se analizaron.

Acidez titulable y pH

La acidez titulable se evaluó por el método 942.15 de la AOAC (2005); 10 mL de la muestra se tituló con una solución de NaOH a 0.01 N hasta llegar a un pH de 8.2, y se registró el volumen de NaOH requerido para neutralizar la solución. Los valores de acidez se calcularon mediante la siguiente expresión; $\text{acidez titulable} = \frac{[(\text{mL NaOH}) (0.01 \text{ N})(\text{meq ácido málico})]}{100 \text{ g}}$, y se expresaron en términos de g de ácido málico por 100 g de muestra. El pH se midió directamente con un potenciómetro (HANNA Instruments, HI 8424, Rhode Island, USA).

Evaluación de actividad antioxidante

Método de DPPH. La actividad antioxidante por el método de DPPH se evaluó mediante la metodología de Brand-Williams et al. (1995). Se mezcló 100 μL del extracto diluido con 2.9 mL de reactivo de DPPH (3.9 mg 2,2-difenil-1-picrilhidracilo en 100 mL de metanol al 80% (v/v)), y se incubó durante 30 min a 25 °C, en ausencia de luz. Después se midió la absorbancia mediante un espectrofotómetro (Shimadzu, UV-1800) a 517 nm, y utilizando como blanco metanol al 80%. La actividad antioxidante se cuantificó con base a una curva estándar de Trolox en diluciones de 0 a 1.0 $\mu\text{mol ET/mL}$, y los valores se expresaron como $\mu\text{mol ET/g}$ de muestra en base seca.

Método de FRAP. El poder reductor de la muestra, en relación a Fe, fue evaluado siguiendo la propuesta de Benzie y Strain (1996). El reactivo FRAP fue preparado mezclando 300 mM de búfer de acetato a pH 3.6 (3.1 g de acetato de sodio trihidratado, se añadió 16 mL de ácido acético glacial y se aforó a 1 L con agua destilada), 10 mM de solución TPTZ con 40 mM de HCl y 20 mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, en relación 10:1:1, respectivamente. Para evaluar la capacidad antioxidante se mezcló 100 μL de muestra y 3 mL de reactivo de FRAP, y se incubó a 37 °C durante 30 min en ausencia de luz. Se realizaron lecturas espectrofotométricas a 593 nm. La cuantificación de actividad antioxidante se hizo con referencia a una curva estándar de Trolox en diluciones de 0 a 0.8 $\mu\text{mol ET/mL}$, y los resultados se expresaron en $\mu\text{mol ET/g}$ de muestra en base seca.

Determinación de polifenoles y melanoidinas

El contenido de polifenoles totales, se evaluó mediante el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). Se agregó 200 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 1 mL de agua destilada a 400 μL de muestra. La mezcla se agitó e incubó de 5 a 8 minutos en ausencia de luz. Posteriormente, se agregaron 2 mL de solución Na_2CO_3 al 7% (p/v) y 1.4 mL de H_2O destilada. La mezcla se incubó durante 1 h a 25 °C. Después, se midió su absorbancia en un espectrofotómetro UV-vis (Jenway 6305, Reino Unido) a 750 nm de longitud de onda, previamente calibrado con H_2O destilada como blanco. La cuantificación se hizo con referencia a una curva estándar de ácido gálico en diluciones de 0.02 a 0.16 mg/mL, y se expresó en valores de mg equivalentes de ácido gálico por g de muestra (mg EAG/g), en base seca.

Las melanoidinas se cuantificaron espectrofotométricamente. Primero, se estableció la longitud de onda de máxima absorción para melanoidinas mediante un barrido espectral UV-vis (Del Castillo et al., 2002). La curva de calibración se elaboró utilizando un extracto de café tostado como fuente de melanoidinas. Previamente, se preparó una dilución 2:1 del extracto de café tostado, considerada como una solución madre de melanoidinas. Posteriormente, se hicieron 5 diluciones seriadas y se determinó la absorbancia de cada dilución. La concentración de melanoidinas (C) se calculó mediante la fórmula de Lambert-Beer: $C = A/a \cdot b$, donde; A = es la absorbancia de la dilución, b = longitud de la celda del espectrofotómetro (1 cm) y a = coeficiente de extinción específico de melanoidinas en L/g cm. El valor de "a" usado fue de 1.1289 L/g cm (Tagliacruz et al., 2010). La concentración de melanoidinas en cada muestra se midió a 420 nm, y los valores se expresaron como g de melanoidinas/100 g de muestra.

Análisis estadístico

Para la evaluación y comparación de variedades cultivadas versus variedades comercializadas, se utilizó un diseño de bloques al azar con tres repeticiones. Adicionalmente, se hizo una comparación múltiple de medias por la prueba de Tukey ($P < 0.05$) y se realizaron correlaciones múltiples entre todas las variables evaluadas. Todos los análisis se hicieron en el paquete estadístico SAS® (2002).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las variedades de café regional presentaron diferencias significativas ($P < 0.0001$ y $P < 0.005$) con las marcas comerciales en todos los parámetros evaluados (Tabla 1)

Tabla 1. Significancia de cuadrados medios del color y composición fisicoquímica de variedades de café y café comercial.

Fuentes de variación	G L	a*	b*	L*	C	h°
TIPO	1	8.65**	8.81**	8.50**	17.75**	1.70*
VAR(TIPO)	14	3.22**	5.77**	2.42**	8.45**	25.60**
Error	32	0.005	0.01979167	0.006875	0.0170833	0.1741667
CV (%)		1.16	2.51	0.22	1.58	0.99

Fuentes de variación	G L	Actividad antioxidante				Acidez
		PT	DPPH	FRAP	Melanoidinas	AT
TIPO	1	181.17**	20243.32**	24529.85**	266.04**	0.25**
VAR(TIPO)	14	176.67**	6139.58**	19418.14**	31.63**	0.18**
Error	32	0.21	74.8935	34.17	0.001	0.00001
CV (%)		1.16	2.77	1.49	0.24	0.33

GL= Grados de libertad, PT=Polifenoles totales (mg EAG/g bs), AT=Acidez titulable (g ác. málico/100 g bs); *=Significativo a $p < 0.005$; **=Significativo a $p < 0.0001$.

En la tabla 2 se puede observar diferencias significativas (Tukey, 0.05) en los parámetros de color evaluados en el grano. Las variedades regionales tuvieron valores promedio de coordenadas cromáticas a* y b* y luminosidad, mayores que las comerciales. Lo mismo ocurrió con el contenido de polifenoles totales (41.08 mg EAG/ g), melanoidinas (15.46 mg melanoidinas/g) y la actividad antioxidante por el método DPPH (330.92 mg Eq. Trolox/g), FRAP (412.66 mg Eq. Trolox/g), además de la acidez titulable (1.41 g ác. málico/100g) (Tabla 2).

Color del grano

El color del grano de café es usado para controlar el proceso de tostado, a través del sistema de coordenadas cromáticas CIE L*a*b*, los parámetros a* y b* típicamente presentan valores positivos (rojo y amarillo respectivamente), y la luminosidad (L*), que correlaciona negativamente con el grado de tostado ya que disminuye gradualmente conforme aumenta el tiempo y temperatura de tostado (Saklar et al., 2001). El color de grano fue muy variable entre las muestras analizadas

independientemente del origen de estas. Se observó una disminución de las coordenadas a^* y b^* conforme disminuyó la luminosidad del grano. Las muestras que registraron menor luminosidad y por lo tanto un mayor grado de tostado, Neblina y Garat, fueron también las de valores menores para a^* y b^* , mientras que se observó un comportamiento inverso para las de mayor luminosidad, Robusta y Caturra Roja (Tabla 3). Mendes et al. (2001) reportaron que el grado de tostado con una mayor aceptación por los consumidores en café Robusta presentó valores de L^* entre 37.05-40.69, a^* entre 2.29-4.15 y b^* entre 2.7-6.29, parámetros similares a los obtenidos en nuestras muestras, excepto por el parámetro a^* donde obtuvimos valores superiores (3.20 – 7.87).

Tabla 2. Comparación de medias de color y composición fisicoquímica del café tostado de variedades de Coatepec y café comercial.

		Tipo	
		Regionales	Comerciales
Color del grano	a^*	6.49 a	5.63 b
	b^*	5.98 a	5.11 b
	L^*	38.91 a	38.07 b
	C^*	8.83 a	7.60 b
	h°	42.22 a	41.84 b
Compuestos fenólicos	PT	41.08 a	37.16 b
Actividad antioxidante	DPPH	330.92 a	289.52 b
	FRAP	412.66 a	367.10 b
	Melanoidinas	15.46 a	10.71 b
Acidez	AT	1.41 a	1.26 b

Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

Acidez titulable y pH

La acidez titulable mostró una correlación inversa con el pH de las muestras ($r = -0.88$). Las variedades que presentaron una mayor acidez fueron CR95 (A, B y C), Caturra y Bourbón (1.90 – 1.53 g ác. málico/100 g), contrariamente, las de menor acidez fueron Mundo Novo y Sarchimor (0.94 y 1.06 g ác. málico/100 g) (Tabla 4). Estas diferencias pueden atribuirse a la presencia de ácidos alifáticos (fórmico, acético, glicólico y láctico) y ácido quínico, producto de la degradación de mono y di sacáridos y a la del ácido clorogénico durante el tostado (Ginz *et al.*, 2000).

Compuestos con actividad antioxidante

La capacidad antioxidante del café está relacionada con la presencia de constituyentes naturales, principalmente compuestos fenólicos y de compuestos formados durante el proceso de tostado como las melanoidinas (Vignoli *et al.*, 2011). En este trabajo, la concentración de polifenoles totales

correlacionó significativamente con la actividad antioxidante por DPPH ($r=0.78$) y FRAP ($r=0.59$). Las variedades regionales, Robusta, Bourbon y CR95A presentaron mayor contenido de polifenoles totales (62.3, 48.14 y 42.71 mg EAG/g) y mayor actividad antioxidante por el método de DPPH (447.4, 361.9 y 338 mg Eq. Trolox/g respectivamente) mientras que las de menor concentración fueron WT, Parroquia y CR95B en ambos casos (Tabla 4). En cuanto a la actividad antioxidante por FRAP, los de mayor concentración fueron Robusta, CR95B y Vips (Tabla4).

Tabla 3. Parámetros de color de los granos de café tostado de variedades cultivadas en Coatepec y café comercial.

Muestra	Color del grano				
	a*	b*	L*	C*	h°
Robusta	7.27 b	7.80 a	40.37 a	10.67 b	47.00 a
Mundo Novo	5.93 gh	4.77 f	38.10 f	7.60 hi	38.70 gh
Bourbon	5.20 j	5.00 ef	38.70 de	7.23 ij	43.80 cd
Typica	5.77 hi	4.77 f	37.77 g	7.47 hi	39.47 g
Caturra Roja	7.87 a	8.07 a	40.17 a	11.23 a	45.70 b
CR95A	6.70 de	5.93 d	38.83 cd	8.90 ef	41.60 f
CR95B	6.90 cd	6.43 bc	39.00 bc	9.43 d	43.00 de
CR95C	5.67 i	4.27 g	38.10 f	7.07 j	37.17 i
Sarchimor	7.10 bc	6.77 b	39.20 b	9.83 c	43.57 cd
Blasón	6.57 e	6.13 cd	38.57 e	8.93 e	43.00 de
Portales	6.50 e	6.40 bc	39.00 bc	9.13 de	44.47 bc
Vips	6.27 f	5.80 d	38.60 de	8.53 fg	42.90 de
Parroquia	6.13 fg	5.77 d	38.47 e	8.43 g	43.27 cd
WT	5.87 hi	5.27 e	38.13 f	7.83 h	41.97 ef
Garat	4.90 k	3.83 h	37.23 h	6.23 k	37.67 hi
Neblina	3.20 l	2.60 i	36.47 i	4.10 l	39.63 g

Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05)

En la Tabla 4, se muestra la concentración de melanoidinas, estas correlacionaron positivamente con la actividad antioxidante por DPPH ($r=0.68$), presentando una mayor concentración de estos compuestos Robusta, Bourbon, CR95A y Mundo Novo (16.61-20.58 g melanoidinas/100g) mientras

que los de menor concentración fueron tres de las marcas comerciales, Blasón, Vips y Portales (8.17-10.87 g melanoidinas/100g). Es importante enfatizar que las variedades regionales recibieron el mismo proceso poscosecha y proceso de tostado. Y ya que el método de extracción de las muestras fue el mismo, las diferencias observadas en la composición pueden deberse a que el café de marcas comerciales presenta grados de tostado variables y a que permanecen almacenados durante tiempos prolongados en los centros comerciales hasta su consumo, donde pueden ocurrir reacciones de oxidación por presencia de oxígeno y la pérdida de compuestos volátiles.

Tabla 4. Composición fisicoquímica y actividad antioxidante de café tostado y café de marcas comerciales extracción a presión (15 bar)

Marca	Compuestos fenólicos		Actividad antioxidante		Acidez	
	PT	DPPH	FRAP	Melanoidinas	AT	pH
Robusta	62.26 a	447.44 a	604.70 a	20.58 a	1.35 f	5.39 d
Mundo Novo	32.67 hi	370.06 b	380.83 fg	16.61 d	1.06 j	5.80 a
Bourbon	48.14 b	361.92 bc	412.82 d	19.08 b	1.58 b	5.09 l
Typica	39.44 e	288.73 fg	400.19 de	14.34 g	1.20 g	5.32 f
Caturra Roja	39.45 e	277.34 fgh	389.36 ef	11.44 k	1.53 c	4.92 n
CR95A	42.71 c	337.99 cd	333.39 h	16.75 c	1.57 b	5.05 m
CR95B	30.90 j	284.45 fg	518.16 b	16.25 e	1.90 a	4.75 o
CR95C	36.76 f	325.84 de	344.88 h	12.26 i	1.54 c	5.09 l
Sarchimor	37.37 f	284.45 fg	329.65 h	11.80 j	0.94 k	5.60 c
Blasón	40.92 d	317.93 de	399.18 de	8.17 n	1.48 d	5.1 k
Portales	36.00 fg	276.32 fgh	364.40 g	10.87 l	1.12 i	5.3 g
Vips	41.87 dc	300.09 ef	491.15 c	8.31 m	1.34 f	5.21 j
Parroquia	33.18 h	256.39 h	330.59 h	11.48 k	1.16 h	5.38 e
WT	33.18 h	256.39 h	330.59 h	11.48 k	1.16 h	5.25 i
Garat	41.63 dc	321.10 de	342.26 h	14.00 h	1.42 e	5.29 h
Neblina	35.19 g	282.66 fg	305.05 i	15.53 f	1.16 h	5.74 b

PT=Polifenoles totales (mg EAG/g bs), AT=Acidez titulable (g ác. Málico/100 g bs. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

4. CONCLUSIONES

Las bebidas de café que presentaron un mayor contenido de compuestos con actividad antioxidante (polifenoles totales y melanoidinas), capacidad antioxidante evaluada por los dos métodos y acidez fueron los preparados con café de variedades cosechadas en Coatepec y analizadas justo después del tostado, principalmente Robusta, Bourbon, Caturra Roja y CR95A. Aunque las variedades comerciales presentaron capacidad antioxidante y niveles de polifenoles totales altos, estos fueron significativamente menores a las variedades regionales. Por tanto, podemos concluir que un café preparado con grano de cosechas recientes presenta mayor concentración de compuestos fenólicos y antioxidantes, que el adquirido en centros comerciales, lo que puede deberse a la composición del grano antes del tostado, al grado de tostado y a las condiciones y tiempo de almacenamiento del café durante su comercialización.

BIBLIOGRAFÍA

1. AOAC international. (2005). AOAC Official Method 942.15. Acidity (Titratable) of Fruit Products. Official method of Analysis, ed. 18, 37, 10.
2. Benzie, I. F. F. y Strain, J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299, 15–27.
3. Brand-Williams W., Cuvelier M., & Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28, 25-30.
4. COMISIÓN NACIONAL DEL AGUA. SERVICIO METEOROLÓGICO NACIONAL (2015). <http://smn.cna.gob.mx/climatologia/Normales8110/NORMAL30026.TXT> Accessed 10.02.16
5. Daglia, M., Cuzzoni, M. T., Dacarro C. 1994. Antibacterial activity of coffee. *J. Agric. Food Chem.* 1994, 42, 2270–2272.
6. Daglia, M., Papetti, A., Gregotti, C., Bert`e, F., Gazzani, G. 2000. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1449–1454.
7. Del Castillo, M.D., Ames, J.M. y Gordon, M.H. (2002). Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3698-3703.
8. Esquivel, P., Jiménez, V. M. 2012. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Res Int* 46:488–495 5.
9. Farah, A. 2012. Coffee constituents. In: *Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention*, pp. 27-43. First Edition. Edited by Yi-Fang Chu. John Wiley & Sons, Inc. Published 2012 by Blackwell Publishing Ltd.
10. Fujioka, K., Shibamoto, T. 2008. Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. *Food Chem.* 106, 217–221.
11. Ginz M, Balzer H, Bradbury A y Maier H. 2000. Formation of aliphatic acids by carbohydrate degradation during roasting of coffee. *European Food Research and Technology* 211: 404–410.
12. Homma, S., Murata, M. 1995. Characterization of metal-chelating compounds in instant coffee. In: *Sixieme Colloque Scientifique International sur le Café*. Kyoto, Japan: Association Scientifique International du Café; pp. 183–191.
13. Jeszka-Skowron, M., Zgoła-Grzeskowiak, A., Grzeskowiak, T. (2015). Analytical methods applied for the characterization and the determination of bioactive compounds in coffee. *European Food Research Technology*, 240, 19–31.
14. McGuire, R. G. (1992). Reporting of objective color measurements. *HortScience*, 27, 1254-1255.

15. Mendes, L.C. (2001). Optimization of the roasting of robusta coffee (*C. canephora* conillon) using acceptability tests and RSM. *Journal of Food Quality and Preference*, 12, 153–162.
16. Moreno, G. (2004). Obtención de variedades de café con resistencia durable a enfermedades, usando la diversidad genética como estrategia de mejoramiento. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 28 (107), 187-200.
17. Nicoli, M. C., Anese, M., Manzocco, L., Lerici, C. R. 1997. Antioxidant properties of coffee brews in relation to the roasting degree, *Lebensm. Wissens. Tech.* 30, 292–297.
18. Santoyo, C. V. H., S. Díaz C., B. Rodríguez P. y J. R. Pérez P. 1996. Sistema agroindustrial café en México: diagnóstico, problemática y alternativas. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. De Méx., México. 320.
19. SAGARPA, 2015. Servicio de información agroalimentaria y pesquera (SIAP). “Avance de siembras y cosechas. Resumen nacional por estado, perennes 2015”. México.
20. Saklar, S., Katnas, S. & Ungan, S. (2001). Determination of optimum hazelnut roasting conditions. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 271–281.
21. SAS, Statistical Analysis System (2002). SAS System for Windows Version 9.0 by SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.
22. Singleton, V. L.; Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16 (5), 144-158.
23. Samporn, C., Kamtuo, A., Theerakulpisut, P., Siriamornpu, S. (2011). Effects of roasting degree on radical scavenging activity, phenolics and volatile compounds of Arabica coffee beans (*Coffea arabica* L. cv. Catimor). *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 2287–229.
24. Tagliazucchi, D., Verzelloni, E. y Conte, A. (2010). Effect of Dietary Melanoidins on Lipid Peroxidation during Simulated Gastric Digestion: Their Possible Role in the Prevention of Oxidative Damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2513–2519.
25. Van Dam, R.M. 2006. Coffee and type 2 diabetes: from beans to beta-cells. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*.16: 69–77.
26. Vignoli, J. A., Bassoli, D. G. & Benassi, M. T. (2011). Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*, 124, 863-868.
27. Vota-vova, L., Voldrich, M., Sevcik, R., Cizkova, H., Mlejnecka, J., Stolar, M. y Fleisman, T. 2009. Changes on the antioxidant capacity of Robusta coffee during roasting. *Czech Journal of Food Science*. 27: S49-S52.
28. Yanagimoto, K., Ochi, H., Lee, K.G. y Shibamoto, T. 2004. Antioxidative activities of fractions obtained from brewed coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 592–596.
29. Zhishen J., Mengchengt T. & Jianming W. (1999). The determination of flavonoids contents in mulberry and their scavenging effects in superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64 (4), 555-559.

DESCRIPCIÓN MORFOMÉTRICA DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE DIFERENTES ESPECIES ANIMALES

Manuel Alberto González Esparza¹, Francisco Javier Padilla Ramírez¹, Alberto Ramos Mora¹, José Luis Rodríguez Ávila², Eréndira J. Sedano Quirarte¹, Hugo Castañeda Vazquez¹, Martha Alicia Castañeda Vazquez¹, Erika Patricia Salas Castañeda¹, Oscar Carbajal Mariscal¹.

¹Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara.

²Zoologico Guadalajara.

RESUMEN

Los espermatozoides son producto del proceso evolutivo, estos reúnen las características anatómico-estructurales que en gran parte determinan el éxito o no de su función; la fertilización. Cada especie animal ha desarrollado estrategias para garantizar la reproducción y preservación de la misma. Los estudios de las estructuras morfométricas del gameto masculino ayudan a entender las características reproductivas de la especie. El objetivo de este trabajo fue determinar la morfometría de las células espermáticas de diferentes especies animales. La toma de muestras se realizó en cinco Unidades de Manejo Ambiental (UMA) y Zooterios, incluyendo especies de interés zootécnico, compañía, zooterio y silvestres. El procesamiento de las muestras y determinaciones morfométricas se llevaron a cabo en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara. Se evaluaron muestras de 25 especies, nueve de mamíferos, ocho de aves, cuatro de reptiles, y cuatro de peces, se tiñeron con azul tripano al 4% y se observaron en microscopio óptico de interfaz digital para su medición en el software AxioVision. Las variables morfométricas evaluadas fueron: cabeza; longitud, anchura y superficie total; longitud del segmento medio, longitud total de la cola y longitud total del espermatozoide en micras. Se estimó también la proporción que mostraron las estructuras entre sí. Se tomaron fotografías del individuo, las características del tracto reproductivo y forma y tamaño de las estructuras espermáticas como cabeza, pieza media y cola. Este trabajo representa en un solo documento una fuente de información confiable de referencia con utilidad para la academia, investigación y validación de tecnología.

1. INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides son producto del proceso evolutivo, en las diferentes especies de animales éstos difieren en sus características morfométricas.

En los mamíferos, estos reúnen las características estructurales celulares que les van a permitir cumplir con la función de la fertilización. Uno de sus atributos está relacionado con la capacidad de movilizarse y de estar capacitado con el fin de penetrar las diferentes capas que protegen al ovocito. Para cumplir exitosamente este proceso el espermatozoide debe cubrir distancias de gran magnitud (Schatten 1988).

Cada especie animal ha desarrollado estrategias para garantizar la reproducción y preservación de la misma. Para realizar comparaciones interespecíficas o intraespecíficas de las células espermáticas, es necesario considerar los diferentes componentes anatómico-estructurales, ya que estos en gran parte determinan el éxito o no de su función que es fertilizar al ovocito.

Existen evidencias documentadas sobre la morfología de la membrana plasmática y del acrosoma (Bearer y Friend, 1990; Barthelemy *et al.*, 1990; Bayard, 1991), cabeza, núcleo (Pogany y Linder, 1993) y del axonema (Zavos *et al.*, 1998).

Los interesados en la conservación y preservación de la biodiversidad perciben como principal preocupación a las especies amenazadas o en peligro de extinción. Tal preocupación nace, entre otras razones, de la dificultad que se tiene para regular el uso de los recursos naturales y, además, por el desconocimiento existente con respecto a las especies que constituyen la biodiversidad, particularmente en cuanto a sus aspectos biológicos y las relaciones morfofisiológicas y evolutivas que puedan existir entre ellos (Austin, 1976; Cummins y Woodall, 1985; Gould *et al.*, 1975).

Los estudios que se realizan para conocer las estructuras morfométricas del gameto masculino ayudan a entender las características reproductivas de la especie.

OBJETIVO

Determinar la morfometría de las células espermáticas de diferentes especies animales

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en diferentes locaciones; la colección de semen y células espermáticas de especies silvestres se realizó en cinco Unidades de Manejo Ambiental (UMA) y zooterios. Mientras que las colectas de especies de interés zootécnico, de compañía y de zooterio fueron hechas a partir de semen congelado y de animales en ranchos, zooterios y propietarios cooperantes. El procesamiento de las muestras y la determinación de la morfometría espermática se llevaron a cabo en el laboratorio de toxicología genética del CUCBA de la universidad de Guadalajara. Se evaluaron en total 25 especies de las cuales correspondieron: nueve de mamíferos, ocho de aves, cuatro de reptiles, y cuatro de peces. La toma de la muestra se realizó utilizando la técnica recomendada en la literatura para cada especie. Los métodos de colecta fueron: Electroeyaculación, vagina artificial, masaje, manual, aspiración directa del epidídimo, lavado prepucial y sondeo uretral. Una vez colectada la muestra se procedió a identificar la presencia de células espermáticas antes de proceder a fijación y tinción, la que se realizó utilizando azul tripano al 4%. La selección de los campos para tomar la fotografía se realizó utilizando un microscopio óptico de la marca zeiss modelo AXIO con los objetivos de 40x y 100x. Todo el proceso de manejo de las muestras la realizó una sola persona capacitada con el fin de evitar efecto de individuo. Las imágenes fueron capturadas mediante una interfaz digital para su medición en el software AxioVision versión 4.7.2 con el fin de generar un acervo de las imágenes que sirvieron para la determinación de la morfometría. Las variables morfométricas que se evaluaron fueron: para la cabeza longitud, anchura y superficie total; longitud del segmento medio, longitud total de la cola y longitud total del espermatozoide en micras. Se estimó también las proporciones que mostraron las estructuras entre sí.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinó exitosamente la morfometría espermática de 25 especies animales incluyendo especies de interés zootécnico, de compañía, zooterio y silvestres. La forma de cómo se organizaron los resultados fue: una foto del individuo y dos cuadros; uno que incluye las medidas morfométricas de la célula espermática en cuestión y otro resaltando las características que destacan macroscópicamente la forma y tamaño de las estructuras como la cabeza, pieza media y cola. Se anexan cuadros para ejemplificar el formato de presentación de los datos obtenidos.

A pesar de las diferencias en la composición bioquímica del semen y células espermáticas maduras en las diferentes especies animales, el colorante mostro efectividad al trabajarlo de igual manera en todas ellas.

HAMSTER DORADO (MESOCRICETUS AURATUS)



DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA MUNDIAL

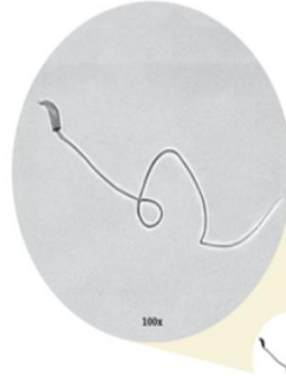


TAXONOMÍA

Reino:	Animalia
Filo:	Chordata
Clase:	Mammalia
Orden:	Rodentia
Familia:	Cricetidae
Género:	Mesocricetus
Especie:	M. auratus

Se encuentra en todos los continentes a excepción de la antártica. Distribuido ampliamente como animal de compañía e insecticida.

CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DE LA CÉLULA ESPERMÁTICA



FICHA DESCRIPTIVA

Cabeza:	Forma lanceolada. Representa el 5.07 % del total del espermatozoide.
Cola:	Un flagelo sencillo. Representa el 94.93 % del total del espermatozoide.

FICHA MORFOMÉTRICA

Estructura	Medida en µm
Cabeza	
Área	31.35
Largo	9.34
Ancho	3.29
Cola	
Largo flagelo	174.85
Total	184.19

Método de extracción:
LAVADO DE EPIDIDIMO

RINOCERONTE BLANCO (CERATOTHERIUM SIMUM)



DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA MUNDIAL



TAXONOMÍA

Reino:	Animalia
Filo:	Chordata
Clase:	Mammalia
Orden:	Perissodactyla
Familia:	Rhinocerotidae
Género:	Ceratotherium
Especie:	C. simum

Distribución principalmente en Sudán, Uganda, Zimbabue y Kenia. También hay unos pocos de ellos que se encuentran en Namibia. Actualmente su población a sido

CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DE LA CÉLULA ESPERMÁTICA



FICHA DESCRIPTIVA

Cabeza:	Forma ovalada. Representa el 12.28 % del total del espermatozoide.
Cola:	Flagelo sencillo. Representa el 87.72 % del total del espermatozoide.

FICHA MORFOMÉTRICA

Estructura	Medida en µm
Cabeza	
Área	21
Largo	7.05
Ancho	3.44
Cola	
Largo flagelo	50.33
Total	57.38

Método de extracción:
MASAJE

MANTIS RELIGIOSA (MANTIS RELIGIOSA)



DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA MUNDIAL

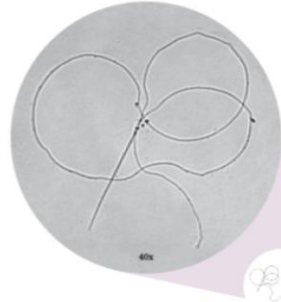


TAXONOMÍA

Reino:	Animalia
Filo:	Arthropoda
Clase:	Insecta
Orden:	Mantodea
Familia:	Mantidae
Género:	Mantis
Especie:	M. religiosa

Se distribuye cosmopolitamente.

CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DE LA CÉLULA ESPERMÁTICA



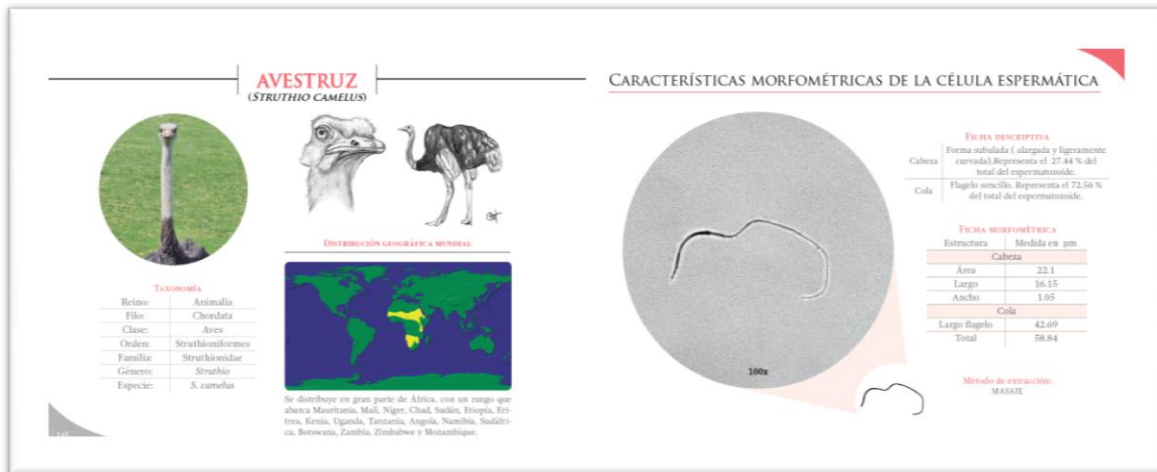
FICHA DESCRIPTIVA

Cabeza:	Forma acicular. Representa el 7.47 % del total del espermatozoide.
Cola:	Flagelo sencillo y demasiado largo. Representa el 92.53% del total del espermatozoide.

FICHA MORFOMÉTRICA

Estructura	Medida en µm
Cabeza	
Área	271.29
Largo	102.21
Ancho	2.81
Cola	
Largo flagelo	1265.32
Total	1367.63

Método de extracción:
MASCERACIÓN DE GONADAS



4. CONCLUSIÓN

Se determinó exitosamente la caracterización morfométrica de 25 especies animales. En el sitio de internet del zoológico de San Diego California, existe información disponible sobre la espermatología de diferentes especies animales, sin embargo, no se observa uniformidad de la información. Este trabajo representa en un solo documento una fuente de información confiable de referencia con utilidad para la academia, investigación y validación de tecnología.

BIBLIOGRAFÍA

1. Schatten Gerald, Fertilization; Encyclopedia of Reproduction. Ed. Knobil Ernst & Neill Jimmy D. Vol 2 Ep-L. Academic Press, San Diego: 256-264.1988.
2. Serres C., Escalier D., David G., Ultrastructural Morphometry of Human Sperm Flagellum with a Stereological Analysis of the Lengths of Dense Fibres; Biol. Cell. 49: 153-162. 1983.
3. Bearer E. L., Friend D. S., Morphology of Mammalian Sperm Membranes during Differentiation, Maturation, and Capacitation; Journal of Electron Microscopy Technique 16: 281-297. 1990.
4. Pogany G.C., Linder K.A., Morphometric Analysis of Intact Sperm Heads and of Sperm Nuclei in the Mouse; The Anatomical Record, 235: 539-546. 1993.
5. Zavos P. M., Correa J. R., Karagounis Ch. S., Ahtaraki A., Phoroglous Ch., Hicks C. L., Zarmakoupis-Zavos P. N., An Electron Microscope Study of the axonemal Ultrastructure in Human Spermatozoa from Male Smokers and Nonsmokers; Fertility and Sterility. 69: 430-434.1998.
6. Austin C. R., Specialization of Gametes; Reproduction Mammals Series, Book.
7. Austin C. R., Short R. V., The Evolution of Reproduction; Cambridge University Press. London: 149-182, 1976.

DIVERSIDAD DE MACROFAUNA EN DOS AGROECOSISTEMAS DEDICADOS A LA GANADERIA CON ÁRBOLES FRUTALES Y MADERABLES

Jeremías Nataren-Velázquez¹, Ana Lid del Angel-Pérez¹, Catalino Jorge López-Collado², Jacel Adame-García³, Gustavo López-Romero² y María de las Nieves Rodríguez-Mendoza⁴

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Km.34.5 Carretera Federal Veracruz-Córdoba. Ver. C.P. 91700. ²Colegio de Postgraduados campus Veracruz, Km. 88.5 Carretera Xalapa-Veracruz, C.P. 91690. Veracruz, Ver. ³Instituto Tecnológico de Ursulo Galván. Carretera Cardel-Chachalacas Km. 4.5, C.P.91667, Ursulo Galván, Ver. ⁴Colegio de Postgraduados campos montecillo, Carretera federal México-Texcoco.

RESUMEN

La macrofauna edáfica es importante para la fertilidad y estructura física del suelo. La presencia de microorganismos ayuda a la regulación de los nutrientes disponibles para las plantas, modificando el ambiente superficial y edáfico. Por lo anterior se contabilizó la macrofauna en dos predios, uno donde se establecieron árboles maderables y otro con árboles frutales. Los sitios están ubicados en la localidad de Loma Iguana Municipio de La Antigua, Ver. Los muestreos se realizaron en agosto del 2012 (Línea base) y agosto del 2014, se determinaron los índices de Shannon el cual se midió la diversidad de especies encontradas, el índice de Simpson para medir la dominancia de una especie y Margalef nos indicó los índices de riqueza específica. Los grupos de muestreo se dividieron en lombrices, arañas, hormigas, termitas, coleópteros, isópodos, chilopodos, diplopodos y otros. En el predio con árboles frutales se observó diversidad baja de acuerdo al índice de Shannon con un valor de 1, el índice de Margalef tuvo un valor de 1.9. se obtuvo un incremento en cuanto a la riqueza de especies después de establecer los árboles frutales, este mismo comportamiento se presentó en las especies maderables, en el tratamiento orgánico es donde se presenta una tendencia al incremento en la biodiversidad de la macrofauna edáfica. En conclusión, los árboles maderables con fertilización orgánica fueron los que presentaron una tendencia de incremento en la macrofauna en los tres índices evaluados con respecto a la línea base.

1. INTRODUCCIÓN

La macrofauna del suelo o edáfica está constituida por organismos que pasan toda o una parte de su vida sobre y/o bajo la superficie inmediata del suelo, troncos podridos y hojarasca superficial en la que se incluyen invertebrados con un diámetro mayor a 2 mm (Brown et al, 2001). Estos organismos tienen un papel muy importante en la fertilidad y estructura física de los suelos, ya que algunos de ellos realizan actividades cuyo impacto es positivo, por ejemplo, la regulación de los nutrientes disponibles para las plantas con lo cual se modifica el ambiente superficial y edáfico donde éstas se desarrollan (Lavelle et al, 1994).

Diversos estudios demuestran que existe una interacción importante entre la vegetación y la macrofauna del suelo (Wardle et al, 2004, Bardgett et al, 2005). Las plantas modifican la abundancia y diversidad de fuentes orgánicas y microhabitats (Gastine et al, 2003). Por otro lado, la macrofauna edáfica, a través de su actividad, incrementa la descomposición de materia orgánica y libera nutrientes minerales que incrementa la disponibilidad de éstos para las plantas (Lavelle 1996, Cragg and Bardgett 2001, Rossi et al, 2006).

Sin embargo, hasta ahora la macrofauna asociada al suelo ha recibido relativamente poca atención, situación que se acentúa en el trópico, debido al cambio de uso de suelo cuya secuela es la disminución de la diversidad (Guiller *et al.*, 1997, Pashanasi 2001). Por lo que probablemente la degradación física y química del suelo o pérdida de su estructura y fertilidad este muy relacionada con la reducción de las poblaciones de invertebrados (Lavelle 2002).

En los ecosistemas agrícolas desarrollados en los últimos años, para alcanzar altas producción, fue determinante la fertilización con grandes cantidades de agroquímicos, y se manejó bajo criterios de necesidad de nutrientes y eficiencia, olvidando que parte de ella está en función de los habitantes del suelo. Estas aplicaciones de agroquímicos han ido causando progresivamente graves problemas de degradación en los suelos, lo que a su vez produce pérdidas de la fauna edáfica y de esta manera se reducen sus principales actividades dentro del suelo.

La literatura señala que la fauna edáfica y su relación con la fertilidad del suelo deben de ser estudiadas para realizar un mejor uso del potencial de especies presentes en el suelo y de esta manera poder diseñar técnicas de manejo que permitan aumentar la productividad de manera sostenible. Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la diversidad de macrofauna edáfica presente en parcelas ganaderas con reciente incorporación de árboles frutales y maderables

2. TEORÍA

La macrofauna del suelo o edáfica está constituida por organismos que pasan toda o una parte de su vida sobre y/o bajo la superficie inmediata del suelo, troncos podridos y hojarasca superficial en la que se incluyen invertebrados con un diámetro mayor a 2 mm (Brown *et al.*, 2001). La macrofauna edáfica tiene un papel muy importante en la fertilidad y estructura física de los suelos, ya que algunos de estos organismos realizan actividades cuyo impacto es positivo, por ejemplo, la regulación de los nutrientes disponibles para las plantas con lo cual se modifica el ambiente superficial y edáfico donde éstas se desarrollan (Lavelle *et al.*, 1994).

Diversos estudios demuestran que existe una interacción importante entre la vegetación y la macrofauna del suelo (Wardle *et al.*, 2004, Bardgett *et al.* 2005). Las plantas modifican la abundancia y diversidad de fuentes orgánicas y microhabitats (Gastine *et al.*, 2003). Por otro lado, la macrofauna edáfica, a través de su actividad, incrementa la descomposición de materia orgánica y libera minerales que quedan disponible para las plantas (Rossi *et al.*, 2006). Sin embargo, hasta ahora la macrofauna asociada al suelo ha recibido relativamente poca atención, situación que se acentúa en el trópico, debido a la presión que ejerce el cambio de uso de suelo cuya secuela es la disminución de la diversidad (Pashanasi 2001). Por lo que probablemente la degradación física y química del suelo o pérdida de su estructura y fertilidad este muy relacionada con la reducción de las poblaciones de invertebrados (Lavelle 2002).

El agroecosistema es un sistema abierto que incluye un conjunto de factores bióticos y abióticos influidos por el ser humano, siendo estos, copartícipes de la actividad agrícola en la cual se concentra y actúan los factores sociales, políticos, económicos, tecnológicos y ambientales (Hart, 1985; Altieri, 1999; Ruiz, 2006). El sistema de producción bovino puede estar inmerso en el agroecosistema, refiriéndose al conjunto de plantas y animales los cuales se desarrollan en un medio físico-biótico, social y económico; que es controlado por el hombre mediante técnicas y herramientas para la obtención de leche y carne con el objetivo de comercializarla (Vilaboa *et al.*, 2009).

3. PARTE EXPERIMENTAL

El estudio se realizó en la localidad de loma iguana, municipio de la antigua, Ver. A N19° 14'15" y W96° 19'15"y a 20 metros sobre el nivel del mar. Las muestras se tomaron en dos predios ganaderos, donde se establecieron árboles frutales, chicozapote (*Manilkara zapotese*), naranja

(Citrus sinensis), mango (Mangifera indica), guanábana (Anona muricata), limón persa (Citrus latifolia), aguacate (Persea americana). en dos densidades de plantación de 8x14 m y 14x14 m en un predio, y maderable cedro (Cedrela odorata L.), caoba (Swietenia macrophylla King.), roble (Ehretia tinifolia L.) y primavera (Tabebuia donnell-smithii Rose).

Colecta de muestras y diseño experimental

En el mes de agosto de 2012 y 2014 se colectó macrofauna de suelo de acuerdo a la metodología recomendada por Tropical Soil Biology and Fertility (TSBF, IUBS/UNESCO) Programme (Anderson and Ingram 1993). La cual consistió en una excavación de 25x25x30 cm en cada punto de muestreo. Los monolitos de suelo obtenidos se dividieron en cuatro estratos sucesivos (hojarasca, 0-10 cm; 10-20 cm; 20-30 cm). Los puntos de muestreo fueron elegidos al azar dentro de cada predio. Las muestras de suelo se llevaron a las instalaciones del Campo Experimental Cotaxtla en bolsas de polietileno de 4 Kg. Para determinar la diversidad, se revisó cada muestra y se separó a los organismos en grupos de lombrices, arañas, hormigas, termitas, coleópteros, isópodos, chilopodos, diplopodos y otros. Para esto se utilizó el índice de Shannon.

4. RESULTADOS

Árboles Frutales

En los tratamientos donde se aplicó fertilización orgánica, en comparación con la línea base que se midió en el 2012, el índice de Shannon presenta mayor incremento en la profundidad de 20 cm y en la hojarasca, mientras que el tratamiento mineral se mostró por debajo de la línea base (Figura 1). Estudios realizados por Brown *et al*, (2001) sobre la diversidad y rol funcional de la macrofauna edáfica en los ecosistemas tropicales de México indican que se presentó un predominio de lombrices de tierra. Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con lo dicho por estos autores ya que la especie que más se presentó fueron las lombrices de tierra.

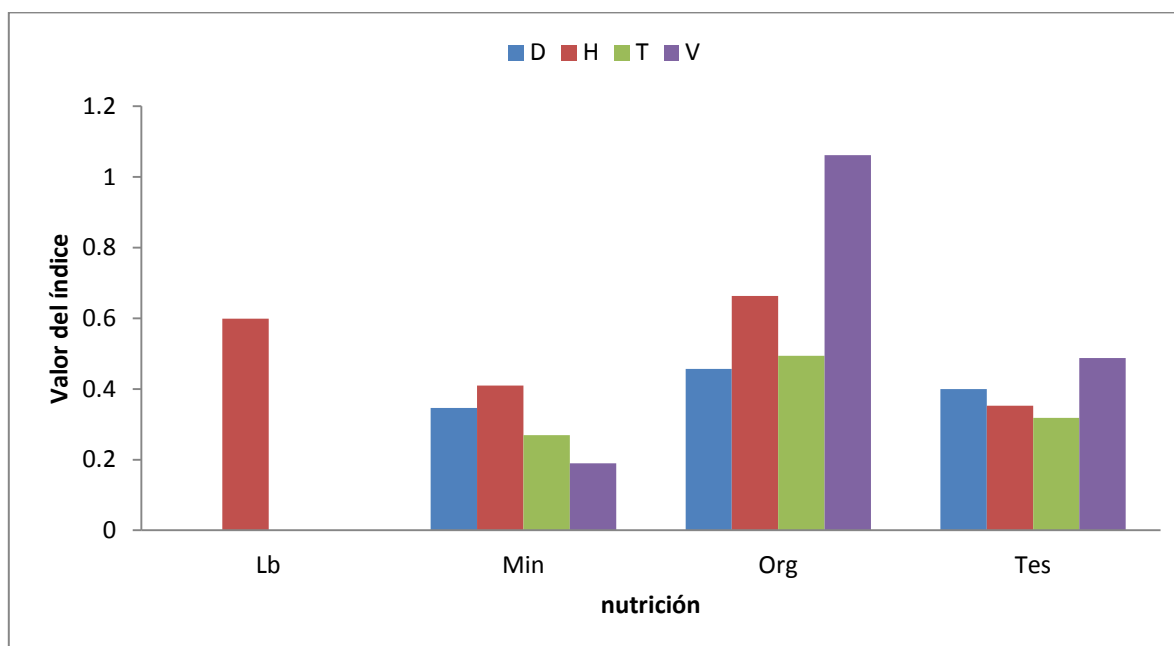


Figura 1. Índice de Shannon en predios ganaderos con árboles frutales, en tres profundidades de suelo y tratamientos nutrimentales. (H=hojarasca D=10cm, V=20cm, T= 30cm), (Lb= línea base, Min= Mineral, Org=orgánico y Tes=testigo).

En los tratamientos de acuerdo a la densidad de plantación y tratamientos nutrimentales, el índice de Shannon presentado en los resultados es bajo de acuerdo al rango que maneja este índice, pero como se puede apreciar hubo un incremento en el tratamiento orgánico dos años después de establecidos los árboles frutales y aplicado la fertilización orgánica, comparado con el muestreo tomado como Lb en el año 2012 (Figura 2). En cuanto a la densidad de plantación los resultados se presentaron de manera similar en ambos tratamientos evaluados, lo cual puede afectar de igual forma la diversidad de macrofauna, debido a que el aporte de materia orgánica al suelo no es el suficiente para cambiar las características del mismo y permitir un incremento en la presencia de organismos (Thomas *et al*, 2004, King y With 2002).

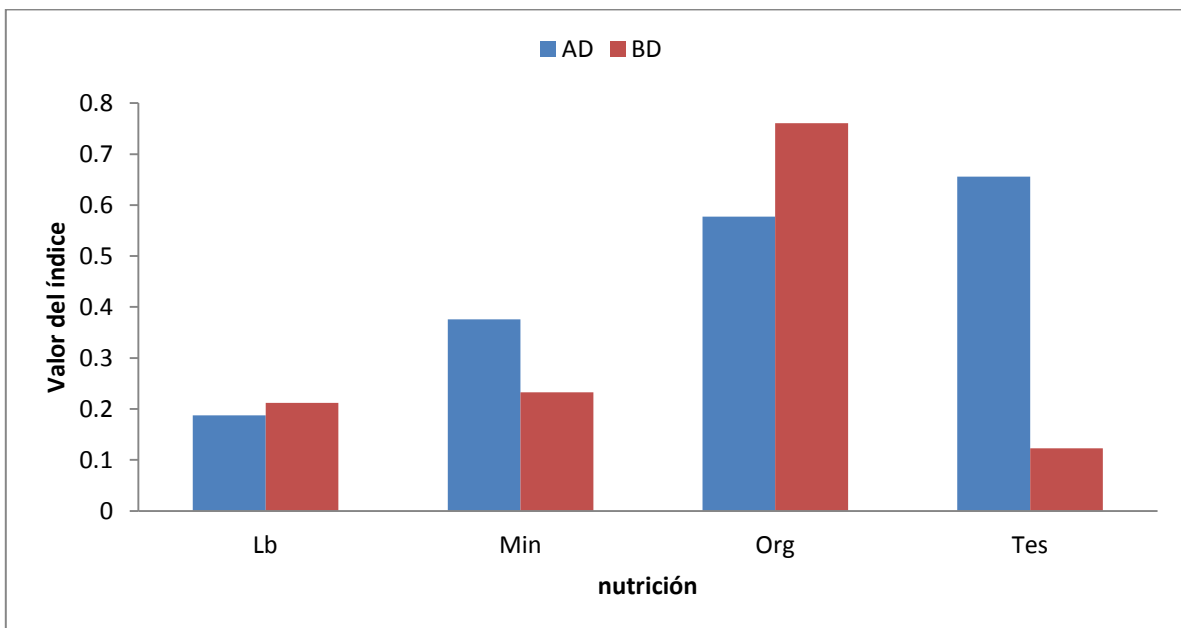


Figura 2. Índice de Shannon en predios ganaderos con árboles frutales en dos densidades de plantación y tratamientos de nutrición. (AD=alta densidad y BD=baja densidad) (Lb= línea base, Min= Mineral, Org=orgánico y Tes=testigo).

Árboles Maderables

El índice de Shannon de acuerdo a la fuente de fertilización y a la profundidad de muestreo utilizada. Se observa que en la fuente de fertilización orgánica se presentó un incremento en la diversidad de especies respecto a la línea base, siendo a la profundidad de 10 y 20 cm donde se ve más marcado el incremento, sin embargo, sigue siendo un índice bajo (Figura 3) ya que Santa, *et al.* (2009), mencionan que si el índice de Shannon tiene un rango de 0-3 se considera una diversidad baja y 3-5 diversidad alta. La menor diversidad apreciada en árboles con fertilizante mineral, lo cual corrobora lo indicado por Sadej *et al.* (2008), quienes afirman que la adición constante de fertilizantes minerales propicia condición desfavorable para la supervivencia de la macrofauna edáfica.

De acuerdo a la fuente de fertilización utilizada, y como se muestra en la gráfica el incremento, con respecto a la línea base, se presentó en todas las especies forestales cuando se aplicó la fuente de fertilización orgánica, sin embargo, el índice obtenido es muy bajo (Figura 4). Por otra parte, una menor población de macrofauna en sitios donde se aplicó fertilizante mineral, se puede deber a que, además de una menor disponibilidad de alimentos, la adición de fertilizantes nitrogenados, estimula la presencia de compuestos ácidos que obliga a algunas especies, principalmente lombrices, emigrar hacia otros sitios, tal como lo mencionan Edwards y Bohlen (1992), Momo y Falco (2003) y Sadej *et al*, (2008).

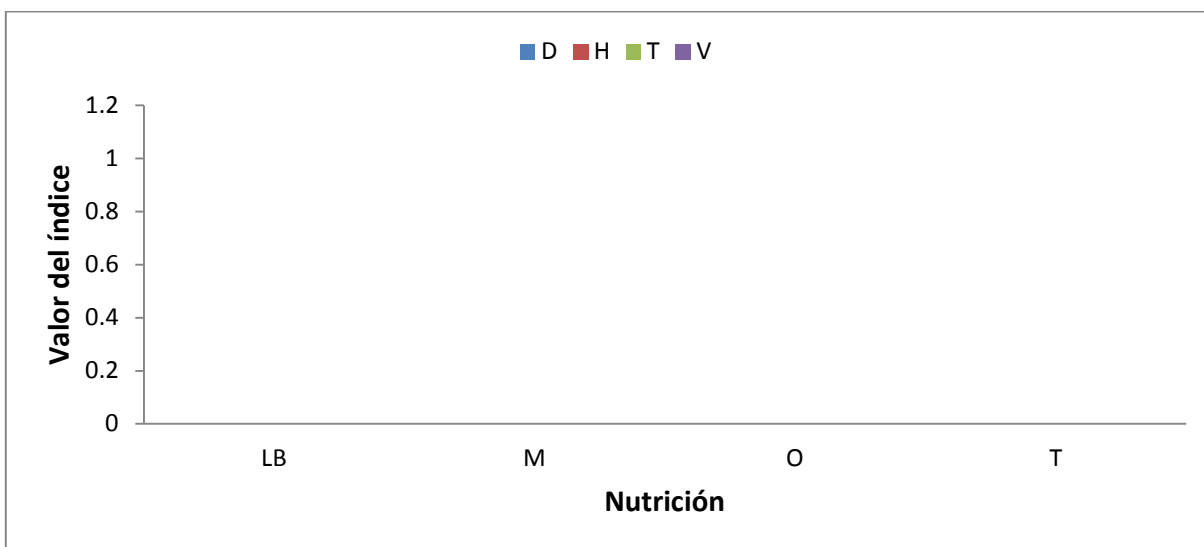


Figura 3. Índice de Shannon en predios ganaderos con árboles maderables, por fuente de nutrición y profundidad de suelo. (Lb= línea base, Min= Mineral, Org=orgánico y Tes=testigo), (H=hojarasca D=10cm, V=20cm, T= 30Cm).

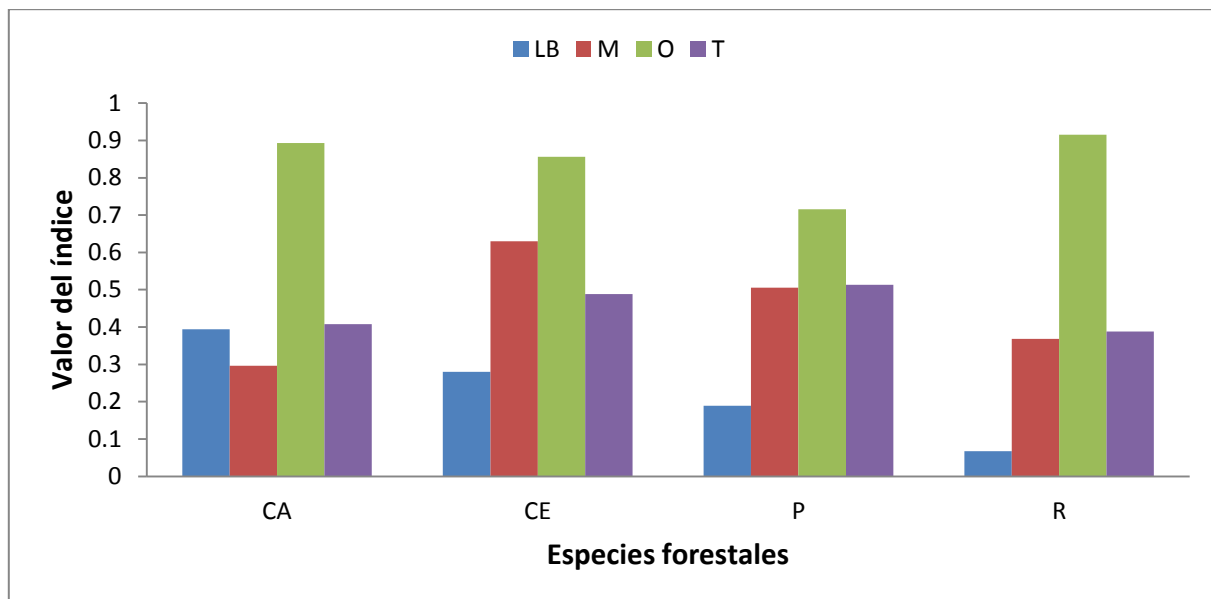


Figura 4. Índice de Shannon en predios ganaderos con árboles maderables y distintas fuentes de nutrición. (Lb= línea base, Min= Mineral, Org=orgánico y Tes=testigo), (CA=caoba, CE=cedro, P=primavera y R=roble).

5. CONCLUSIONES

En cuanto a los árboles maderables con fertilización orgánica fueron los que presentaron una tendencia de incremento en la macrofauna en los tres índices evaluados con respecto a la línea base.

En los árboles frutales la alta densidad es la que presentó una tendencia a incrementar la macrofauna.

BIBLIOGRAFÍA

1. Altieri, M. A. 1999. Agroecología bases científicas para una agricultura sustentable. Ed. Nordan-Comunidad. Montevideo. 339 p.
2. Bardgett, R. D., W. D. Bowman, R. Kaufmann, and S. K. Schmidt. 2005. A temporal approach to linking aboveground and belowground ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 20:634–641.
3. Brown, G. G., C. Fragoso, I. Barios, P. Rojas, J. C. Patron, J. Bueno, A. G. Moreno, P. Lavelle, V. Ordaz y C. Rodríguez. 2001. Diversidad y rol funcional de la macrofauna edáfica en los ecosistemas tropicales mexicanos. *Acta Zoologica Mexicana* 1:79-110.
4. Cragg, R. G., and R. D. Bardgett. 2001. How changes in soil faunal diversity and composition within a trophic group influence decomposition processes. *Soil Biol. Biochem* 33:2073–2081.
5. Edwards, C. A.; Bolhen, P. J. 1992. Effects of toxic chemicals on earthworms. *Reviews of environmental contamination and toxicology* 125: 23-99.
6. Gastine, A., M. Scherer-Lorenzen, and P. W. Leadley. 2003. No consistent effects of plants diversity on root biomass, soil biota and soil abiotic conditions in temperate grassland communities. *Applied Soil Ecology* 24:101–111.
7. Giller, K. E., M. H. Beare, P. Lavelle, A-M. N. Izac, and M. J. Swift. 1997. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystems function. *Applied Soil Ecology* 6:3-16.
8. Hart, R. D. 1985. Conceptos básicos sobre Agroecosistemas. Turrialba, C. R. Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza. 160 p.
9. King, A. W., and K. A. With. 2002. Dispersal success on spatially structured landscapes: when do spatial pattern and dispersal behavior really matter? *Ecol. Model.* 147:23–39.
10. Lavelle, P. 2002. Functional domains in soils. *Ecological Research* 17:441-450.
11. Lavelle, P., D. Bignell, and M. Lepage. 1996. Soil function in a changing world: the role of invertebrate ecosystem engineers. *European Journal Soil Biology* 33:159–193.
12. Lavelle, P., M. Dangerfield, C. Fragoso, V. Eschenbrenner, D. Lopez-Hernandez, B. Pashanasi, and L. Brussaard. 1994. Pags. 137-168. P. L. Woormer, and M. J. Swift, editors. *The relationship between soil macrofauna and tropical soil fertility. The Biological Management of Tropical Fertility.* Wiley-Sayce. USA.
13. Momo, F. R.; Falco, L. B. 2003. Meso fauna del suelo. *Biología y ecología.* Pp 51-58. In: A. Albanesi, A. Enriquez, S. Luna, C. Kunst and R. Ledesma (Eds.). *Microbiología agrícola un aporte de investigación argentina.* Editorial de la Universidad Nacional de Santiago del Estero, Santiago del Estero.
14. Pashanasi, B. 2001. Estudio cuantitativo de la macrofauna del suelo en diferentes sistemas de uso de la tierra en la Amazonia peruana. *Folia Amazónica* 12:75-97.
15. Rossi, J. P., J. Mathieu, M. Cooper, and M. Grimaldi. 2006. Soil macrofaunal biodiversity in Amazonian pastures: Matching sampling with patterns. *Soil Biology & Biochemistry* 38:2178-2187.

16. Ruiz R., O. 2006. Indicadores de sustentabilidad agroecológica. En: López, B. O., Ramírez, G. S., Ramírez, G. M., Moreno, B. G. y Alvarado, G. A. E. (eds.). *Agroecología y Agricultura Orgánica en el trópico*. Universidad Autónoma de Chiapas. México. pp 59-67.
17. Sadej, W.; Sadej, W.; Rozmyslowicz, R. 2008. Soil concentration of C and N shaped by long-term unidirectional fertilization versus noxious soil macrofauna. *J. Elementol* 13: 381-389.
18. Thomasa, F., P. Folgarait, P. Lavelle, and J. P. Rossi. 2004. Soil macrofaunal communities along an abandoned rice field chronosequence in Northern Argentina. *Applied Soil Ecology* 27:23-29.
19. Vilaboa-Arroniz, J., P. Díaz-Rivera, O. Ruiz, R., D. E. Platas-Rosado, S. González-Muñoz, F. Juárez-Lagunés. 2009. Caracterización socioeconómica y tecnológica de los agroecosistemas con bovinos de doble propósito de la región del Papaloapan, Veracruz, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 10: 53-62.
20. Wardle, D.A., R.D. Bardgett, J. N. Klironomos, H. Setälä, W. H. Van der Putten, and D. H. Wall. 2004. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* 304:1629–1633.

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE HARINA DE NOPAL EN TORTILLAS DE MAÍZ SOBRE ALGUNAS PROPIEDADES MEDIDAS EN SUERO DE RATAS DIABÉTICAS

Hector Eduardo Martínez Flores ¹, Judith Libertad Chávez González ¹, Juan de Dios Figueroa Cárdenas ², Omar Guzmán Quevedo ¹, Ma. Guadalupe Garnica Romo ¹, María Carmen Bartolomé Camacho ¹

¹Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, ² CINVESTAV-QUERÉTARO.

RESUMEN

Los alimentos funcionales son aquellos que contienen uno o más compuestos bioactivos capaces de generar bienestar a la salud humana o para prevenir o reducir el riesgo a contraer enfermedades. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de incorporar harina de nopal en tortillas de maíz sobre glucosa, insulina y hemoglobina glicosilada en suero de ratas con cuadro de hiperglucemia y obesas. Las dietas experimentales fueron: GCM: Grupo control sano que consumió dieta únicamente con maíz. GCMN5%: Grupo control sano que consumió dieta adicionada con 5% de nopal. GCMN10%: Grupo control sano que consumió dieta adicionada con 10% de nopal. GDM: grupo diabético que consumió dieta control únicamente con maíz. GDMN5%: Grupo diabético que consumió dieta con 5% de nopal. GDMN10%: Grupo diabético que consumió dieta con 10% de nopal. Las concentraciones de glucosa, insulina y hemoglobina glicosilada medidas en suero de ratas alimentadas con los tratamientos GCM, GCMN5%, GCMN10%, GDM, GDMN5% y GDMN10%, respectivamente, fueron los siguientes: glucosa en plasma (110, 91, 89, 297, 237 y 203 mg glucosa/dL, respectivamente), insulina (3.68, 5.37, 5.49, 1.05, 1.98 y 2.44 μ UI/ml, respectivamente) y hemoglobina glicosilada (6.10, 6.00, 5.00, 9.30, 8.26 y 7.86 HbA1c, respectivamente) en suero. En general, se observa que en todos los parámetros medidos, las dietas basadas en la incorporación de 10% de harina de nopal incorporadas a las tortillas presentaron mejores resultados al obtener menores valores de glucosa, mejor respuesta a la insulina y mayor contenido de hemoglobina glicosilada en ratas diabéticas.

1. INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es el cultivo más importante en México por el área destinada a la producción (Salinas y col., 2013). La mayor parte del maíz producido en México se transforma a tortillas por el proceso de nixtamalización, el cual consiste que consiste en la cocción alcalina del grano en un exceso de agua que contiene cal (1 a 2 g/100 g de maíz), se deja en reposo y posteriormente el maíz cocido, llamado nixtamal, se lava, y se muele para producir masa fresca, a partir de la cual se pueden elaborar tortillas, o bien, si la masa se somete a un proceso de secado y molienda, se obtiene harina de maíz nixtamalizado (Gaytán-Martínez y col., 2012). De la masa o de la harina se obtienen las tortillas. En este trabajo se buscó formular una tortilla adicionada con nopal (*Opuntia ficus-indica*) para obtener un alimento con características de tipo funcional. Lo anterior debido a que el nopal presenta compuestos bioactivos, como la fibra, capaces de generar bienestar a la salud humana. El género *Opuntia* presenta fibra soluble, que agrupa 7.5% de mucílagos, 8.0% de pectina y 3.0% de hemicelulosas débilmente unidas; la fibra insoluble engloba 15.5% de celulosa y 2% de hemicelulosas fuertemente unidas. De acuerdo a lo documentado en Pimienta-Barios *et al.* (2008), entre los beneficios a la salud por el consumo de nopal están sus propiedades hipoglucemiantes y en el metabolismo de colesterol y triglicéridos. El mucílago ha sido reconocido como un grupo de polisacáridos con usos potenciales diversos, como el medicinal, espesante en alimentos y agente clarificante de agua (Sáenz, 2006). Por lo que el objetivo del presente trabajo

fue evaluar el efecto de incorporar harina de nopal en tortillas de maíz nixtamalizado sobre el índice glucémico y el perfil de lípidos en ratas con Diabetes mellitus experimental.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Proceso de nixtamalización

Los granos de maíz enteros Sinaloa fueron cocidos con agua e hidróxido de calcio (1% p/v), a temperatura de 94 °C durante 30 min y reposados por 18 h. Posteriormente, se drenó el agua de cocido y se enjuagaron los granos de maíz cocidos con agua hasta remover el pericarpio de los granos. El maíz cocido se molió en un molino de piedras para obtener masa fresca, la cual se secó en un secador tipo Flash, a temperatura de entrada de 270 °C y de salida de 40 °C. Se obtuvo harina con humedad de 8-10%, la cual se molió nuevamente en un molino Pulvex con malla 0.5 mm. La harina de maíz se almacenó en bolsas al vacío a temperatura de 4 °C. Los cladodios de nopal se deshidrataron en un secador solar, se molieron hasta obtener harina y se almacenó al vacío a 4 °C.

Ensayo biológico

El estado diabético se indujo a 15 ratas mediante inyección intraperitoneal de 45 mg de estreptozotocina/kg de peso. Para el estudio, se usó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x5. Un factor fue el estado de salud y tuvo dos niveles: ratas diabéticas y no diabéticas. El segundo factor fue la proporción de harina de nopal contenida en la dieta administrada, con 3 niveles cada factor: dieta de maíz 100% (control), dieta de maíz y nopal a una relación del 95-5% y dieta de maíz y nopal a una relación del 90-10%. El contenido de las dietas se muestra en el Cuadro 1. Para el ensayo se obtuvieron tres grupos de ratas sanas y tres diabéticas, clasificadas de la siguiente manera: GCM: Grupo control sano que consumió dieta únicamente con maíz. GCMN5%: Grupo control sano que consumió dieta adicionada con 5% de nopal. GCMN10%: Grupo control sano que consumió dieta adicionada con 10% de nopal. GDM: grupo diabético que consumió dieta control únicamente con maíz. GDMN5%: Grupo diabético que consumió dieta con 5% de nopal. GDMN10%: Grupo diabético que consumió dieta con 10% de nopal.

Consumo de agua, alimento, masa corporal y mediciones en sangre

El volumen de agua y el alimento ingerido fueron cuantificados diariamente. Cada animal fue pesado semanalmente a partir del inicio del estudio. Las concentraciones séricas de glucosa, hemoglobina glicosilada, colesterol, HDL, LDL, triglicéridos e insulina por métodos colorimétricos en las muestras de suero que fueron tomadas al momento del sacrificio en las ratas diabéticas y en las sanas.

Cuadro 2. Valores nutricionales de las dietas formuladas con harina de nopal y maíz.

Componente	Dietas		
Humedad			
Materia seca			

Valores nutricionales de dietas administradas			
Determinación de muestra	Tortilla 100%	Tortilla 10%	Tortilla 5%
Humedad g%	6.80	7.00	6.60
Materia Seca g %	93.20	93.00	93.40
Extracción etéreo (grasa) g%	12.95	13.03	13.43
Fibra g%	9.76	9.59	9.72
Proteína Cruda g%	20.54	20.41	20.18
Cenizas (minerales) g%	5.60	5.88	5.91
E.L.N (carbohidratos) g%	51.76	51.09	50.76

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 2 se muestran los resultados de consumo de alimento, agua y peso corporal. Un parámetro importante en el desarrollo de la diabetes es la polifagia, en la que se incrementa el consumo de alimento, el cual se vio reflejado en este experimento. En las ratas diabéticas hubo un incremento significativo ($p < 0.05$) en el consumo de alimento respecto a sus controles. Y el consumo de alimento de las ratas diabéticas que consumieron las dietas adicionadas con nopal también fue mayor comparado con las que solo consumían maíz. El porcentaje de nopal administrado a los animales sanos no presentó efecto sobre el consumo de agua. Para las ratas diabéticas el agua consumida aumentó significativamente ($p < 0.05$) desde la primer semana.

En relación al peso inicial, los grupos sanos iniciaron el estudio con peso promedio de 243 g, y se incrementó con el tiempo. El grupo que ganó más peso (184 g) fue el que recibió la dieta control; mientras que el grupo con la dieta que contenía 5% de nopal tuvo la ganancia menor (174 g) respecto a su peso inicial, sin embargo, entre los tres grupos control no presentaron diferencias significativas en ganancia de peso al final del experimento (Figura 1).

El peso corporal inicial de los roedores diabéticos fue en promedio de 221 g. Durante el periodo que duro la inducción de la diabetes (1 semana), las ratas perdieron 20 g en promedio; peso que fueron recuperando gradualmente, sin llegar a los valores que alcanzaron las ratas sanas. A las ratas a las que se les administro la dieta de 10% de nopal tuvieron la menor ganancia de peso respecto a los otros grupos. Las ratas diabéticas ganaron menos peso comparadas con las control, evidenciándose más con las dietas en las que se adiciono harina de nopal al 5 y 10%.

Cuadro 2. Efecto de la dieta adicionada con nopal y dieta control de maíz sobre el consumo de agua y alimento, y peso corporal medidos durante 6 semanas en ratas Wistar sanas y diabéticas.

Grupo	Agua consumida (ml)	Alimento consumido (g)	Peso corporal (g)
GCM	233.15 ± 1.2 b	228.15 ± 0.80 c	345.74 ± 1.1 a
GCMN5%	229.13 ± 0.4 b	224.11 ± 1.32 c	341.65 ± 0.4 a
GCMN10%	262.45 ± 1.9 b	225.96 ± 0.28 c	334.78 ± 0.2 a
GDM	445.38 ± 2.3 a	251.56 ± 0.48 a	291.28 ± 1.2 b
GDMN5%	487.33 ± 0.1 a	244.54 ± 1.2 ab	284.37 ± 2.7 b
GDMN10%	491.23 ± 0.4 a	240.77 ± 3.1 b	269.50 ± 0.9 b

Diferente letra en la misma columna significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Glucosa, insulina, y hemoglobina glicosilada sérica

La glucosa se midió en suero plasmático al sacrificarse los animales, se observó que hubo diferencia significativa entre los valores de las ratas diabéticas, siendo diferente el grupo que consumió la dieta control que solo contenía maíz ($p < 0.05$). Algunas plantas antidiabéticas sólo presentan actividad hipoglucemiante cuando son administradas en estudios crónicos, debido a que las concentraciones del principio activo alcanzadas en el organismo son mayores, lo cual explica el hecho de que las ratas diabéticas tuvieran un descenso mayor de la glucemia, en comparación con el grupo control, estos valores se muestran en el Cuadro 3. Referente a los resultados de la insulina hubo diferencia significativa ($p = 0.05$). Se observó en los grupos sanos un incremento de esta hormona en los grupos que consumieron la dieta con nopal, respecto al grupo control, que presentaron valores medios de $5.5 \mu\text{U/ml}$, lo cual representó un aumento del 40%. Este efecto se presentó también en los animales diabéticos siendo diferente el grupo 10% ND el cual aumentó la presencia de esta hormona en un 15% con respecto al valor medio que presentaron los grupos diabéticos que consumieron menos cantidad de nopal y los que solo consumieron maíz en la dieta.

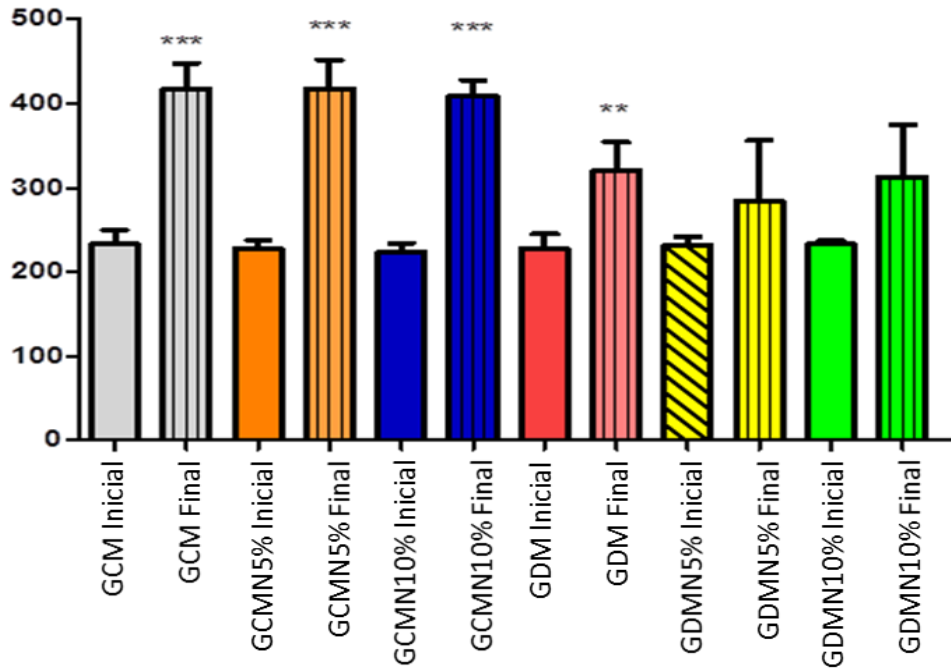


Figura1. Efecto de la dieta adicionada con nopal y dieta control de maíz sobre la evolución del peso corporal comparando inicial vs final de ratas sanas y diabéticas. Valores con (*) son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Cuadro 3. Efecto de la dieta adicionada con nopal y dieta control de maíz sobre la glucosa, insulina y hemoglobina medida en suero plasmático en modelo biológico de ratas Wistar sanas y diabéticas inducida con estreptozotocina.

PARÁMETROS BIOQUÍMICOS			
GRUPO	GLUCOSA (ml/dl)	INSULINA (μUI/ml)	HbA1c
GCM	110 \pm 0.83 a	3.68 \pm 0.47 cb	6.10 \pm 0.31 a
GCMN5%	91 \pm 0.75 a	5.37 \pm 0.70 c	6.00 \pm 0.47 a
GCMN10%	89 \pm 0.89 a	5.49 \pm 0.78 c	5.00 \pm 0.64 a
GDM	297 \pm 0.20 bc	1.05 \pm 0.83 a	9.30 \pm 1.15 ab
GDMN5%	237 \pm 0.52 b	1.98 \pm 0.05 a	8.26 \pm 0.19 b
GDMN10%	203 \pm 0.48 d	2.44 \pm 0.07 b	7.86 \pm 0.09 ab

Se expresan los valores medios \pm la desviación estándar prueba de comparación de medias ANOVA diferente letra en la misma columna significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En cuanto a la hemoglobina glicosilada se tiene considerado que para el control glucémico en los diabéticos, los valores son cotejados del siguiente modo: si el valor de HbA1c se encuentra en: 7% o menos equivale a un excelente control del azúcar en sangre; 7.1% a 8% buen control; 8.1% a 9.0% control regular y 9.1% o más alto mal control; 9% señal de diabetes mal controlada, con alto riesgo de complicaciones asociadas. Esta variable presentó diferencias significativas en el grupo diabético control en comparación con el grupo control sano ($p < 0.05$), cabe destacar que este grupo fue el único que presentó valores elevados denotando un nulo control en los valores de la glucemia. Los grupos diabéticos a los que se les administraron las dietas adicionadas con harina de nopal presentaron diferencia significativa ($p = 0.041$) en comparación con el grupo diabético que recibió la dieta control, presentando valores más bajos (20%) dentro de los parámetros que indican un control regular en los valores de glucosa. Los grupos sanos no presentaron diferencias significativas comparadas entre ellos, los valores resultantes mostraron un buen control en los niveles de glucosa.

4. CONCLUSIÓN

Se concluye que la adición de nopal en una dieta hipercalórica rica en grasas tiene un efecto protector sobre el síndrome metabólico. Posiblemente la fibra de nopal fue el componente que provocó la disminución de la ganancia de peso observando en los animales alimentados con una dieta hipercalórica. La adición de nopal también mejoró o revirtió la tolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina (factores de riesgo del síndrome metabólico) observada en los animales con dieta hipercalórica adicionada con nopal. Además mejoró el estado de dislipidemia así como los parámetros enzimáticos. Por los efectos fisiológico benéficos derivados de la ingesta de fibra de nopal, se considera que la adición de esta fibra le confiere a la tortilla la denominación de alimento funcional.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gaytán-Martínez M., Figueroa J.D.C., Vázquez-Landaverde P.A., Morales-Sánchez E., Martínez-Flores H.E., Reyes-Vega, M.L. 2012. CyTA Journal of Food, 10:182–195.
2. Pimienta-Barrios E., Méndez-Morán L., Ramírez-Hernández B.C., García García de Alba J.E., Domínguez-Arias, R.M. 2008. Efecto de la ingestión del fruto de xoconostle (*Opuntia joconostle* Web.) sobre la glucosa y lípidos séricos. Agrociencia, 42: 645-653. 2008
3. Sáenz C., Berger H., Corrales G.J, Galletti L., García de Cortázar V., Higuera I., Mondragón C., Rodríguez A., Sepúlveda E., Varnero M. 2006. Utilización Agroindustrial del Nopal. Boletín de Servicios Agrícolas de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación FAO 162. Roma, Italia
4. Salinas M.Y, Aragón C.F., Ybarra M.C., Aguilar V.J., Altunar L.B., Sosa M.E. 2013. Caracterización física y composición química de razas de maíz de grano azul/morado de las regiones tropicales y subtropicales de Oaxaca. Revista Fitotecnia Mexicana, 36 (1): 23 – 31.

ASPECTOS NUTRITIVOS DE UNA PASTA COMPUESTA DE TRIGO, GARBANZO Y CHÍA.

Alma G. Cota-Gastélum., María G., Salazar-García., Guadalupe A. López-Ahumada., R. Ortega-Ramírez., Espinoza-López Armida., María E. Orozco García y Violeta Parra-Vergara.

¹Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora. México.

RESUMEN

Las pastas alimenticias son reconocidas como fuente de carbohidratos, mayormente almidón, tienen bajo contenido de grasa, fibra dietaria y son consideradas de baja calidad proteica. Diversos estudios han mostrado modificaciones a la formulación de las pastas, utilizando nuevos ingredientes para intentar mejorar sus propiedades nutricionales. El objetivo de este trabajo fue evaluar la composición nutricional de una pasta compuesta de trigo, garbanzo y chía. Se prepararon diferentes formulaciones de harina de garbanzo, chía y semolina para la producción de la pasta. Las materias primas y las pastas producidas fueron evaluadas en su contenido de humedad, cenizas, grasa y proteína. Fibra soluble, insoluble y total fue determinada en todas las pastas, así como la presencia del inhibidor de tripsina. La composición nutricional de las pastas varió entre 1.66-2.82% de cenizas, 9-12 % de grasa y proteína 18.9-28.9%. De la misma manera la fibra soluble, insoluble y total mostró diferencias entre las pastas elaboradas siendo mayor en todos los casos que la pasta control. El inhibidor de tripsina mostró una reducción en todas las pastas. La combinación de harina de garbanzo y chía supone un opción en la producción de pasta con mejor calidad nutritiva, pudiendo alcanzar una sustitución parcial o completa de la semolina.

1. TEORÍA

En búsqueda de mejorar la calidad nutricional así como sus propiedades funcionales de productos alimenticios, se han realizado investigaciones cuyo objetivo es sustituir parte del ingrediente principal por otras harinas tales como las de cereales, leguminosas, tubérculos y concentrados proteicos e incrementar la fibra dietética. La incorporación de la fibra dietaria en el alimento permite una reducción del índice glucémico (Altan y col., 2008). El consumo de alimentos con bajo índice glucémico reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares, diabetes y obesidad (Magaletta y col., 2010).

Productos de consumo popular y de fácil acceso como la pasta alimenticia ha sido usado frecuentemente para desarrollar este objetivo. Así mismo, se ha hecho énfasis en el empleo de materias primas nacionales lo cual puede ser de significancia económica para los países en desarrollo (Torres y col., 2009 Justo y col., 2007).

El garbanzo es una leguminosa de gran relevancia en Sonora, ya que una gran extensión (SIAP 2014) de tierra se dedica a ese cultivo, considerado como uno de los principales productores a nivel nacional. En la dieta juega un papel importante aportando proteína de buena calidad, así como carbohidratos y fibra dietaria, lo que lo hace un alimento funcional, así mismo la chía es de gran importancia en la nutrición humana por ser una fuente rica en antioxidantes, vitaminas y minerales entre otros nutrientes (Leyva 2011).

2. PARTE EXPERIMENTAL

Materias Primas.

El garbanzo fue sometido a una limpieza manual y a remojo en agua en una proporción 1:5 durante 12 horas a 25°C. El agua fue retirada de los granos, se trituraron utilizando un molino, y colocaron en charolas de aluminio en un secador tipo túnel contracorriente a 60°C por 6 horas. Para la obtención de la harina se utilizó un molino Perten modelo LM3100. Para la obtención de la harina de chia se utilizó un Braun modelo Aromatic K2M2. Ambas harinas fueron almacenadas a 5°C.

Se prepararon las mezclas utilizando sémola, harina de chia y garbanzo en diferentes concentraciones de sustitución de sémola (0, 25, 50 y 75 %). La adición de chía fue la misma en todas las mezclas (10%).

Análisis Químico y Nutricional.

Las materias primas y las pastas fueron analizadas para conocer su composición química de acuerdo a la metodología de la AACCC (2001). Realizando las siguientes determinaciones por triplicado: contenido de humedad (método 44-15), contenido de cenizas (método 08-12) y contenido de proteína (método microkjeldhal 46-13) utilizando un factor de N x 5.7 para la sémola, un factor de N x 6.25 para garbanzo y chía.

Se determinó el contenido de fibra soluble, insoluble y total acuerdo al método oficial 982.29 de la AOAC (1997). El método consiste en la digestión y eliminación del almidón y proteínas presentes en la muestra mediante el uso combinado de tres enzimas (α -amilasa termoestable, proteasa y amiloglucosidasa), obteniendo al final de la digestión un residuo de material indigerible (la fibra), el cual se somete a diferentes filtrados, lavados y precipitaciones, para obtener finalmente los pesos que permiten calcular mediante ecuaciones matemáticas el contenido de fibra dietética soluble, insoluble y total presente en la muestra analizada.

Los inhibidores de tripsina fueron determinados en las harinas de acuerdo al método de Kakade y colaboradores (1974), el cual está basado en el uso de un sustrato sintético Benzoil-Arg-p-Nitroanilida (BAPNA).

Cuando el sustrato sintético se pone en contacto con una solución de la enzima tripsina y el sustrato de la muestra conteniendo el inhibidor de tripsina, se obtiene un compuesto colorido donde la intensidad disminuye a medida que aumenta la cantidad de inhibidor.

Simultáneamente se hace reaccionar la solución de tripsina con el sustrato obteniéndose un compuesto colorido cuya intensidad indica el 100 de actividad enzimática.

Los resultados se reportaron como unidades de tripsina inhibida (UTI) por mg de proteína.

Se llevó a cabo un análisis de varianza con un nivel de probabilidad de ($P < 0.05$), para evaluar el efecto de la adición HCH Y HG a la pasta de Semolina de trigo en las variables respuesta.

Se realizó una comparación de medias utilizando la prueba de Tukey ($P < 0.05$) para ver las diferencias entre los niveles de adición. El programa utilizado para la realización del análisis estadístico fue JMP versión 4.0.4. (SAS, 2000. Institute, INC., 2001).

3. RESULTADOS

Se observa un mayor porcentaje de humedad en las pastas que contienen mayor porcentaje de sémola (figura 1).

La influencia del garbanzo en todas las formulaciones, se observa claramente, donde el mayor contenido, lo presentó la muestra con mayor porcentaje de harina de garbanzo (figura 2).

El mismo efecto se presentó en el contenido de proteína, como se observa en la figura 3. Donde se observa que todas un mayor porcentaje por la presencia de las harinas de chíá y garbanzo.

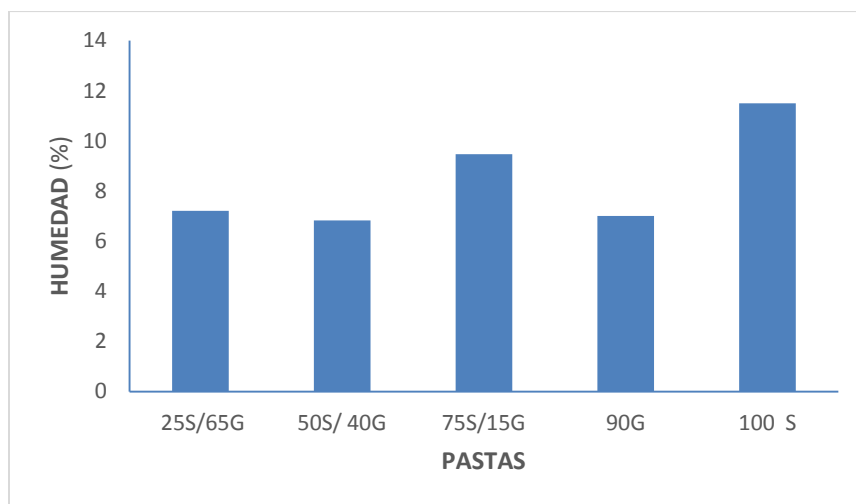


FIGURA 1. Contenido de humedad en las pastas elaboradas con sémola, garbanzo y chíá

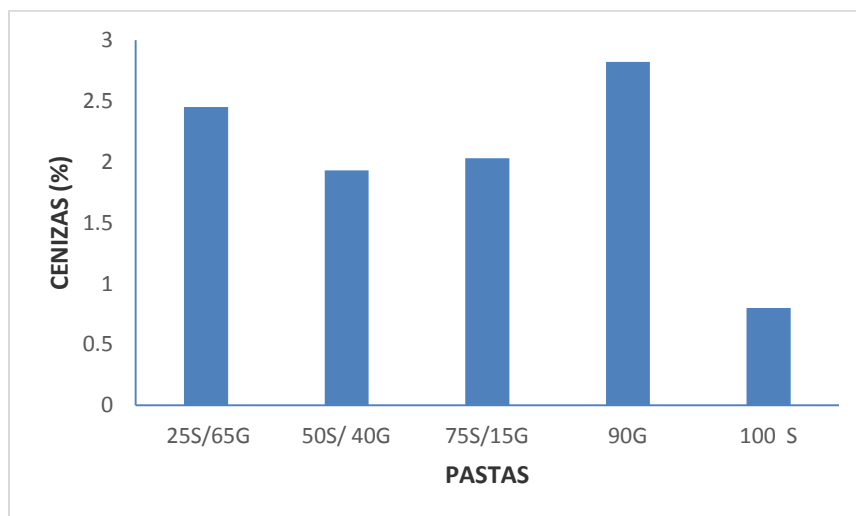


FIGURA 2. Contenido de cenizas en pastas elaboradas con sémola, garbanzo y chíá

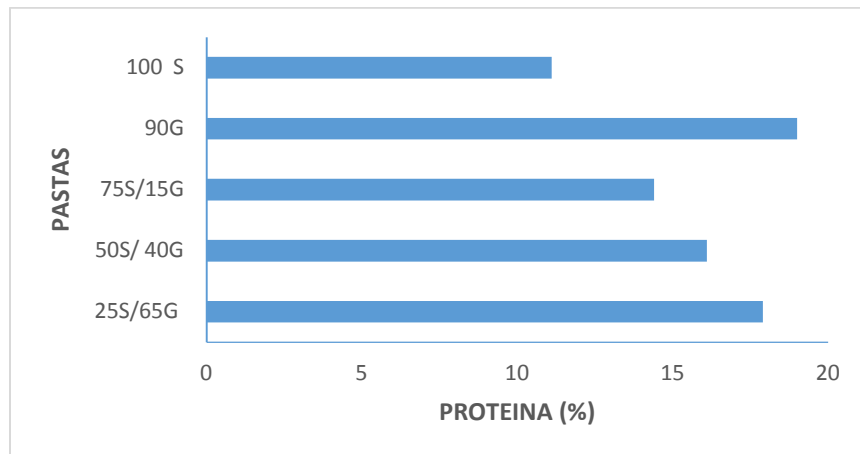


FIGURA 3. Contenido de proteína en pastas elaboradas con sémola, garbanzo y chía

Todas las pastas mostraron diferencia significativa comparada con el control, lo que indica que el incremento de grasa en las pastas fortificadas fue debido al nivel de fortificación que recibió la harina de semola como se observa en la figura 4.

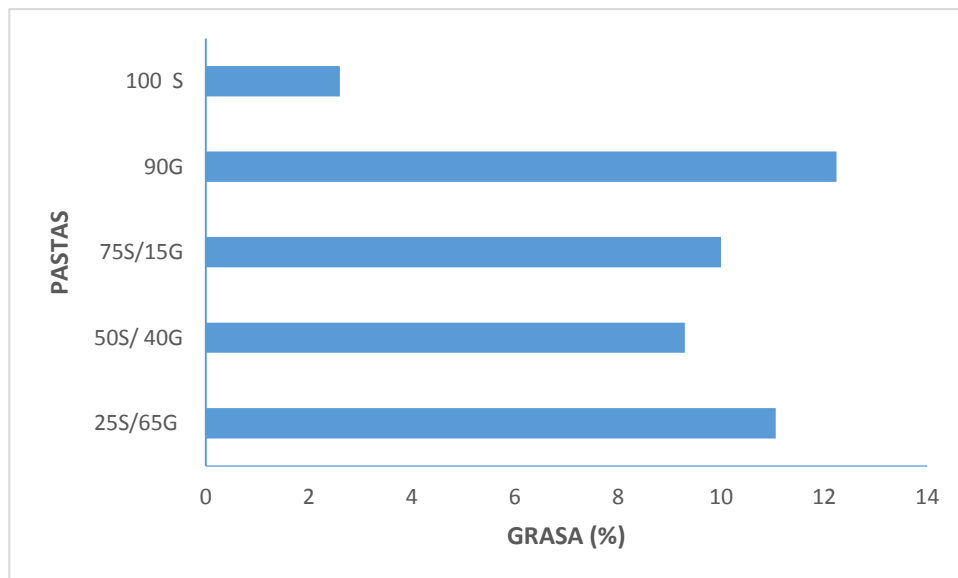


FIGURA 4. Contenido de grasa en pastas elaboradas con sémola, garbanzo y chía

El porcentaje de fibra dietaria total, soluble e insoluble es mostrado en la figura 5, claramente muestra el incremento en todas las pastas sustituidas, siendo mayor en la pasta con mayor porcentaje de harina de garbanzo.

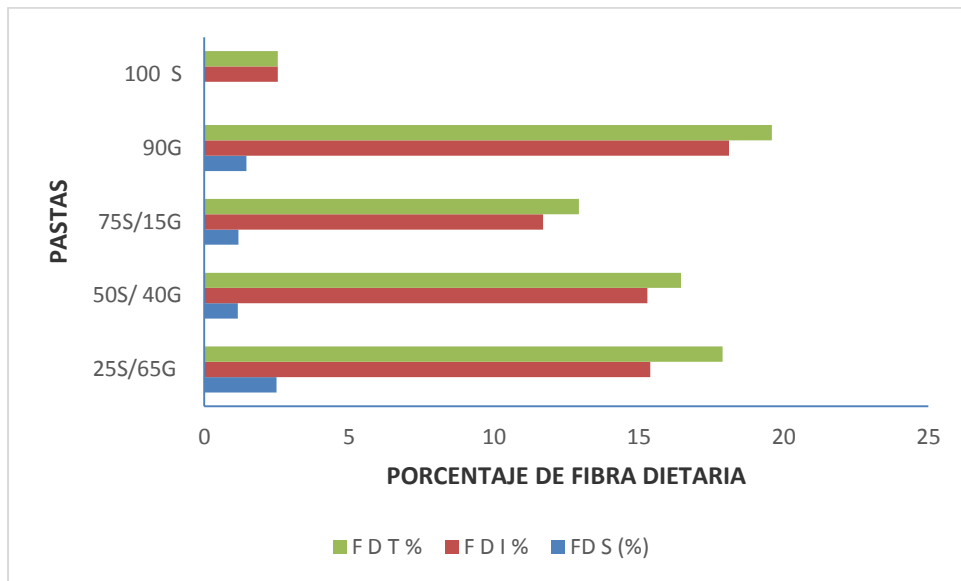


FIGURA 5. Contenido de fibra dietaria total, insoluble y soluble en pastas elaboradas con sémola, garbanzo y chíá.

Los resultados de la figura 6 muestran un incremento de UTI/mg, conforme aumenta el grado de sustitución de sémola en las pastas, lo cual puede explicarse a que la sémola al contacto con el agua produce una red proteica visco elástica que se forma debido a la interacción de la gliadina y glutenina, lo que dificulta la penetración del agua de cocimiento a la pasta e inactivar al inhibidor de tripsina, Todo lo contrario a la pasta elaborada con garbanzo que no puede formar esta red debido a la ausencia de dichas proteínas, logrando solo constituir aglomerados

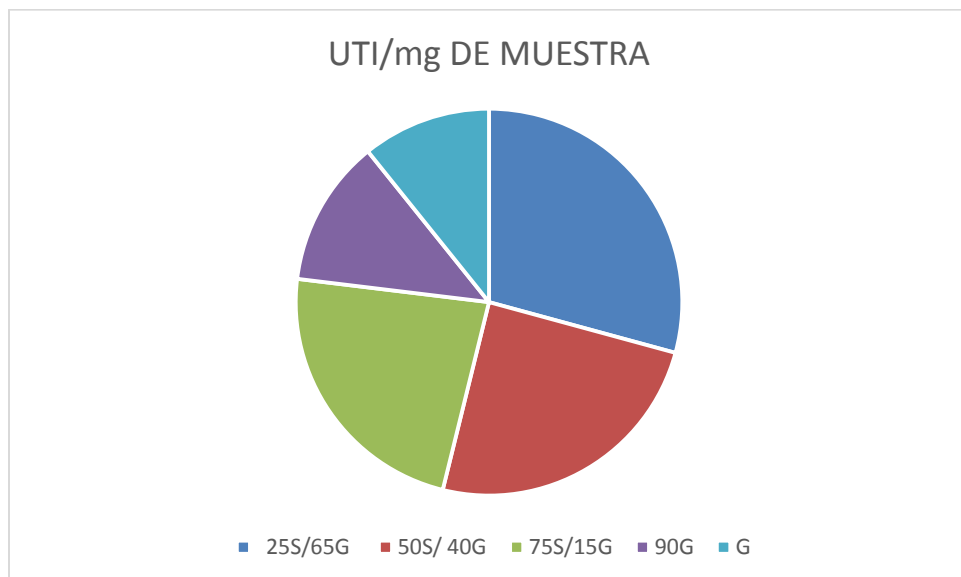


FIGURA 6. Unidades de tripsina inhibidas en pastas elaboradas con sémola, garbanzo y chíá

4. CONCLUSIONES

La composición química, así como la fibra dietaria de las pastas estuvo influenciada por el nivel de adición, mejorando notablemente en todos los casos en relación a la pasta de sémola. El porcentaje de sémola así como el cocimiento al que estuvo expuesta la pasta, disminuyó notablemente la presencia de inhibidores de tripsina.

Se puede realizar una suplementación parcial o completa de sémola utilizando la mezcla de harina de chia y garbanzo obteniendo una pasta más nutritiva y funcional.

BIBLIOGRAFÍA

1. A.A.C.C. Approved Method of the American Association of Cereal Chemistry. 2000. St. Paul Minnesota, USA.
2. ALTAN, A.; McCATHY, K.L.; MASKAN, MTwin-screw extrusion of barley-grape pomace belnds: extrudate characteristics and determination of optimum processing conditions. Journal of Food Engineering, v.89 . 2008. pp.24-32.
3. Magaletta, R. L., DiCataldo, S. N., Liu, D., Li, H. L., Borwankar, R. P. y Martini, M. C. in vitro method for predicting glycemic index of foods using simulated digestion and an artificial neural network. Cereal Chemistry 87, 2010. pp 363-369.
4. Kakade, M.L., Rackis, J.J.,Mc Ghee, J.E., and Puski, G. Determination of trypsin inibtor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. Cereal Chem. 51(3): 1974. pp 376-382.
5. Justo, B.M., alfaro, C.A.D., Aguilar, C. E. Wrobel, K., Guzmán, A.G., Sierra G.Z. y Zanella, D.V. Desarrollo de pan integral con soya, chía, linaza y ácido fólico como alimento funcional para la mujer. Arch. Latinoam.nutr.57(1) 2007. pp. 78-84
6. Leyva, G.D.I. Efecto de la incorporación de amaranto (*Amarantus hypochondriacus*), chia (salvia hispanica) y salvado de trigo sobre la calidad del pan y su impacto sobre la actividad antioxidante. Tesis de Licenciatura. Departamento de Ciencias Químico- Biológicas. 2011. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora.
7. SAS Institute Inc.. JMP: A business Unit of SAS. 2001 Version 4.0.4.
8. SIAP: Servicio de informacxión agroalimentaria y pesquera. 2014 recuperado el 20 de sep (<http://www.siap.gob.mx/>).
9. Torres, A., Rodríguez, M., Guerra, M., and Granito, M. Factibilidad Tecnológica de Incorporar Germen Desgrasado de Maíz en la Elaboración de Pasta Corta. An. Venez. Nutr. 22 (1) 2009. pp 25-31.

EVALUACIÓN DEL SEMEN EN DOS LOTES DE REPRODUCTORES DE TRUCHA ARCO IRIS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) A FINALES DEL PERIODO DE REPRODUCTIVO

¹González-Villaverde, P, ¹Castro-Castellón, A, ¹Martínez-Regalado, D, ¹Jiménez-Valencia, J y ²Cortés-García, A.

¹ Licenciatura de Biología Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. ²Laboratorio de Reproducción Genética y Sanidad Acuícola. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Calzada del Hueso N°1100, Col. Villa Quietud, C. P. 04960, Coyoacán, Ciudad de México.

RESUMEN

El centro acuícola el Zarco se dedica a la producción de crías de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) su época de reproducción es anual y el periodo reproductivo es entre los meses de octubre a febrero, por lo tanto la viabilidad de los gametos es determinante para garantizar altos porcentajes de fecundación. El objetivo de ésta investigación fue evaluar la calidad el semen de dos lotes de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en los reproductores con edad promedio de tres años, utilizando muestras del lote Michoacano y Zarco, considerando que el estudio fue al término del periodo reproductivo. Se seleccionaron siete machos Michoacanos y dos del Zarco. Los organismos fueron anestesiados con agua bicarbonatada al 10%, una vez sedados se obtuvieron medidas morfométricas y extracción de semen de cada organismo, la cual se realizó mediante una presión abdominal, colectando la muestra en tubos graduados de 50 mL., para el conteo de los espermatozoides se fijaron 50 μ L de semen con 950 μ L de suero fisiológico y 500 μ L de formol al 8%; el conteo se realizó con la ayuda de una cámara Neubauer realizando una dilución aplicando la siguiente formula Σ (5 cuadrantes) (30) (10^4) (100 ó 10, dependiendo la dilución realizada). Los resultados del volumen del semen para el lote Michoacano fue significativamente mayor 18.80 ± 7.77 con un máximo de 30 mL y un mínimo de 10 mL mientras que para las muestras del lote Zarco fue de 13 ± 9.90 mL. El número de espermatozoides para el Pool Michoacano fue $61 \times 10^8 \pm 5.7 \times 10^8$ siendo significativamente mayor que el Pool Zarco con $2.7 \times 10^8 \pm 4.2 \times 10^6$. Se concluye que los machos del lote Michoacano tienen mayor probabilidad de incrementar los porcentajes de fecundación, siendo información relevante para el centro acuícola para optimizar la reproducción artificial a finales de la época reproductiva.

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una actividad que actualmente se instituye como alternativa para la producción, tanto de animales como de plantas acuáticas, que aportan un alto aporte nutricional. Esta actividad se lleva a cabo siguiendo ciertas normativas que ayuda a que la producción sea exitosa.

Dentro de esta labor se encuentra la producción de la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* que es una especie de importancia que se cultiva en varios países, por su facilidad de adaptación a aguas frías. La introducción de la trucha arco iris en México se remonta a finales del siglo XIX, trayendo consigo beneficios sociales y culturales.

Su reproducción es sexual y externa, además es cíclica. Por este motivo uno de los objetivos primordiales de la acuicultura es aprovechar al máximo los recursos que de esta especie se pueden extraer en toda la época que presenta su pico reproductivo.

Muchas especies de peces como es el caso de la trucha arco iris que son mantenidas en sistemas de cultivo presentan disfunciones reproductivas importantes (Vargas 2003), entre las que destacan un desove inducido, además de atresia folicular. Es por esto que la producción depende en gran medida de un suministro frecuente de organismos, trayendo consigo el estudio y análisis tanto de los reproductores como de sus gametos, para que de esta forma esté asegurada la producción. Por lo antes mencionados en la presente investigación, se determina la calidad del semen de los reproductores de trucha arco iris del centro acuícola, para incrementar la producción, considerando las características cualitativas y cuantitativas del semen.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Selección de reproductores

Se seleccionaron siete machos del lote Michoacano y dos del lote Zarco de aproximadamente tres años del centro acuícola "El Zarco".

Sedación de reproductores

Para sedar a los machos se utilizó agua bicarbonatada al 10%.

Extracción de gametos

Se realizó manualmente con masajes ventrales en dirección opérculo-caudal, para la extracción del semen de los machos, y fue depositado en tubos graduados de 50 mL y etiquetados.

Evaluación del semen

Para la evaluación del semen se consideraron características cualitativas se registró el volumen directamente de los tubos graduados y el número de espermatozoides con la muestra fresca se conservó en una hielera.

El conteo de espermatozoides/mL se hizo mediante la cámara de Neubauer, empleando la técnica Coffin (1959) citado por Rodríguez (1992) con las siguientes modificaciones: la cámara se carga con la solución diluida previamente homogeneizada, con la micropipeta se toman 10 μ L, y por capilaridad se carga, y dejar reposar durante 5 minutos.

Número de espermatozoides

Para el conteo de espermatozoides se fijaron 50 μ L de semen con 950 μ L de suero, y 500 μ L de formol; y el conteo se realizó con la ayuda de una cámara Neubauer contabilizando cinco cuadrantes observados en un microscopio óptico a 40x, en caso de ser muy densa la muestra se realizó una dilución.

Se utilizó la siguiente formula¹:

$$\Sigma(5)(10^4)(30)(10o100)$$

Donde:

Σ = (5) sumatoria de los cuadrantes contados

(104) volumen de la cámara Neubauer

(30) veces de dilución madre

10 ó 100= Se multiplica según dilución.

3. RESULTADOS

Volumen y número de espermatozoides

En la tabla 4 se representan los machos que pertenecen al lote Michoacano, se observa que el macho con mayor volumen fue el número uno (M1) obtuvo 30 mL de semen y el macho con menor volumen fue el número dos (M2) que obtuvo 10 mL. Los machos que pertenecen al lote Pool se observa que el macho número (P1) uno obtuvo 20 mL de semen presenta mayor volumen que el macho número dos (P2) que obtuvo 6 mL. El volumen del semen del lote Michoacano fue significativamente mayor (18.80 ± 7.77) al compararlo con el lote Pool (13 ± 9.90).

Los machos que pertenecen al lote Michoacano, se observa que el macho con mayor espermatozoides/ volumen fue el número siete (M7) obtuvo 25×10^8 con 17.5 mL y el macho con menor espermatozoides/ volumen fue el número cinco (M5) obtuvo 7.1×10^8 con 14 mL. Para los machos que pertenecen al lote Zarco, se observa espermatozoides/ volumen obtuvieron 14×10^8 el número uno (Z1) con 20 mL y el número dos (Z2) con 6 mL. El lote Michoacano obtuvo mayor espermatozoides/ volumen con 15×10^{10} mientras que el lote Zarco obtuvo menor número espermatozoides/ volumen con 27×10^8 .

4. DISCUSIÓN

Con respecto al número de espermatozoides, Valdebenito (2007) en su investigación de la trucha arco iris, utilizó una solución salina 0,98% de NaCl para activar a los espermatozoides para el pool de semen, obtuvo $12.7 \pm 1,6 \times 10^9$ espermatozoides por mL. Bastardo *et al.* (2004) señala que los machos de tres años que observó durante el pico reproductivo (septiembre a enero) obtuvo una concentración de 1.2×10^6 por mL. Las investigaciones anteriormente mencionadas obtuvieron valores bajos al compararlo, con la investigación realizada de truchas arco iris al final de la época reproductiva se obtuvo un número de espermatozoides para el lote Michoacano que fue de 15×10^{10} por mL y el lote Zarco fue 27×10^8 por mL. Según Bastardo (1992) esta gran diferencia del número de espermatozoides entre el pico reproductivo (septiembre a enero) y el final del periodo reproductivo puede deberse al alimento consumido y a la calidad del agua utilizada para el cultivo.

Tabla 1. Volumen y número de espermatozoides de los machos pertenecientes a los lotes zarcos y michoacanos

Organismo	Cámara		X	DESVEST	mL/kg	Volumen (mL)	Spz/vol
	A	B					
M1	84×10^6	45×10^6	65×10^6	$\pm 28 \times 10^6$	9.35	30	19×10^8
M2	99×10^6	75×10^6	87×10^6	$\pm 17 \times 10^6$	6.29	10	8.7×10^8
M4	36×10^6	39×10^6	38×10^6	$\pm 2.1 \times 10^6$	10.09	22.5	8.4×10^8
M5	66×10^6	36×10^6	51×10^6	$\pm 21 \times 10^6$	9.27	14	7.1×10^8
M7	12×10^7	16×10^7	14×10^7	$\pm 28 \times 10^6$	10.87	17.5	25×10^8
PM	65×10^8	57×10^8	61×10^8	$\pm 57 \times 10^7$		25	15×10^{10}
Z1	57×10^6	81×10^6	69×10^6	$\pm 17 \times 10^6$	11.49	20	14×10^8
Z2	27×10^7	19×10^7	23×10^7	$\pm 5.5 \times 10^7$	2.38	6	14×10^8
PZ	27×10^7	28×10^7	27×10^7	$\pm 4.2 \times 10^5$		10	27×10^8

5. CONCLUSIONES

Se concluye que los machos del lote Michoacán tienen mayor probabilidad de incrementar los porcentajes de fecundación, siendo información relevante para el centro acuícola para optimizar la reproducción artificial a finales de la época reproductiva.

AGRADECIMIENTOS

Al centro acuícola "El Zarco" por abrirnos las puertas para efectuar la investigación y finalmente los laboratorios de Biología de la UAM-X por proporcionarnos el material utilizado en dicho estudio. A los compañeros del grupo BE03B del trimestre I-16 por su apoyo a lo largo del curso.

BIBLIOGRAFIA

1. H. Bastardo, Semen de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*): Concentración y volumen durante un periodo reproductivo en Mérida, Venezuela. *Veterinaria Tropical*, Vol. 17, 1992, pp 56-66.
2. R. Vargas, Evaluación de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) producida en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, Vol. 14, 2003, pp. 123-127.
3. I. Valdebenito, Efecto de la Cafeína en la Motilidad y Fertilidad Espermática de Trucha Arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). *Información tecnológica*, Vol. 18, 2, 2007, 2007, pp. 61-65.
4. M. Rodríguez-Gutiérrez, 1992. Técnicas de evaluación cuantitativa de la madurez gonádica en peces. AGT, México, D. F. 79 p.

ELECTROCARDÍOGRAFO DE 12 DERIVACIONES PORTABLE CON PROCESAMIENTO ANALÓGICO-DIGITAL Y VISUALIZACIÓN EN LA PLATAFORMA LABVIEW

A.A. Ruiz Heredia¹, A.C. Islas Padilla¹, H. García Estrada¹, M. G. Ramírez Sotelo², A.I. Cabrera Llanos¹

¹Departamento de Bioprocesos, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional. ²Departamento de Bioingeniería, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional

RESUMEN

Este trabajo presenta el desarrollo de un electrocardiógrafo de 12 derivaciones portable, implementado con procesamiento analógico-digital, además de una visualización en la plataforma de programación gráfica de LabVIEW. En el proceso de elaboración de este trabajo se emplearon dos etapas: la primera de manera analógica y posteriormente en forma digital. En la etapa analógica se obtienen las señales a través de un cable para electrocardiografía tomando el potencial de diez electrodos de succión, estos electrodos son conectados a amplificadores de instrumentación AD620, de estos amplificadores se adquieren nueve derivaciones (tres bipolares y seis precordiales) con un prefiltrado analógico pasa bajas de 120 Hz; las derivaciones adquiridas son sometidas a un primer filtrado usando un filtro analógico rechaza banda a 60 Hz de tercer orden. Después las señales son digitalizadas y son enviadas a un programa desarrollado en LabVIEW usando la tarjeta de adquisición DAQ NI USB-6009; dentro del programa se filtran digitalmente usando la biblioteca "Express" de LabVIEW las señales utilizando filtros de cuarto orden: un pasa altas, un pasa bajas y un rechaza banda. A continuación se realiza una estimación usando el cálculo de las derivaciones aumentadas a partir de la relación delta estrella existente con las derivaciones bipolares obteniendo de esta manera las 12 derivaciones. Finalmente para la visualización se utilizó una interfaz que permite al operador observar únicamente la derivación de su interés en una ventana que contiene una gráfica que se actualiza conforme va llegando la información del procesamiento; para esto se utilizó la herramienta "Tab Control" que permite la incorporación de las gráficas de las diferentes derivaciones en pestañas.

1. INTRODUCCIÓN

Un electrocardiógrafo es un dispositivo que registra los potenciales eléctricos del corazón de forma gráfica; el registro gráfico de las corrientes cardíacas se le denomina electrocardiograma [1]. Los sistemas de electrocardiología han evolucionado según las necesidades o aplicaciones. Como necesidades podemos referirnos al costo y dado ello, existen electrocardiógrafos con adquisición de 3,6 o 12 derivaciones entre menos cantidad de derivaciones menor será el costo, y refiriéndose a las aplicaciones existen los electrocardiógrafos para pruebas de esfuerzo, solo por mencionar algunas aplicaciones y variantes del electrocardiógrafo. En general estos equipos cuentan con la misma estructura, algunas diferencias entre cada equipo son su diseño o forma de procesamiento y tamaño. El electrocardiógrafo muestra la señal eléctrica del corazón, su comportamiento, es decir que muestra algún cambio en tiempo real de la actividad eléctrica [2]. Para el funcionamiento adecuado de un electrocardiógrafo es necesario:

Electrodos.

Para la adquisición de señales biomédicas de superficie es necesario utilizar electrodos. Los electrodos de superficie son aquellos que se colocan para estar en contacto con la piel del paciente. La piel humana tiende a tener una muy alta impedancia comparada con la de otras fuentes de voltaje. Típicamente, la impedancia normal de la piel, vista por el electrodo, varía desde 0.5 k Ω para piel sudorosa hasta 20 k Ω para piel seca. Problemas de la piel, especialmente resequeadad, piel escamosa, o enfermedades en la piel producen un incremento en la impedancia en el rango de 500 k Ω . En cualquier caso, se deberán tratar los electrodos de superficie como una fuente de voltaje con muy alta impedancia, situación que influye en forma decisiva en el diseño del circuito de entrada del amplificador bioeléctrico.

Para realizar un electrocardiograma estándar se colocan 10 electrodos, estos, se dividen en: electrodos periféricos y electrodos precordiales [3]. Estos se diferencian por colores y letras que indican cada derivación y su lugar de colocación.

Los electrodos periféricos son cuatro y van colocados en las extremidades del paciente o en el inicio de estas (figura 1). Estos se diferencian por colores y letras que indican cada derivación y su lugar de colocación.

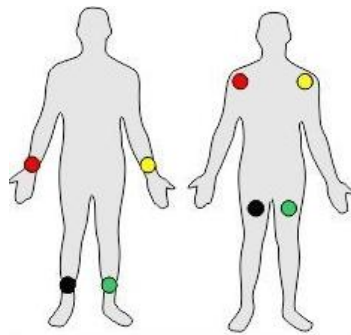


Fig. 1 Colocación de los electrodos periféricos

Los electrodos precordiales son seis y van colocados en la región precordial (figura 2).

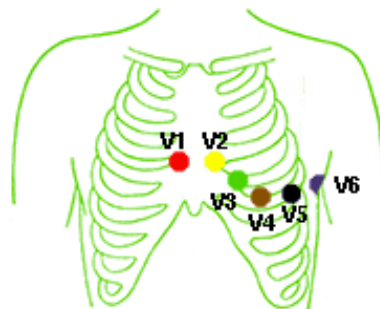


Fig. 2 Colocación de los electrodos precordiales

Los amplificadores.

Para amplificar señales bioeléctricas como las del corazón se requieren dos características en un amplificador: la primera es que presente una muy alta impedancia en sus terminales de entrada, y la segunda es que solamente amplifique la diferencia de voltaje existente entre dichas terminales. El amplificador que reúne las dos características mencionadas es el amplificador de instrumentación. Para llevar a cabo la amplificación de las señales electrocardiográficas se usó el amplificador de instrumentación modelo INA129P. La configuración interna del INA129P presenta algunas modificaciones en comparación con un amplificador de instrumentación hecho con tres operacionales, pero sigue la misma idea básica de tener alta impedancia a la entrada y un amplificador diferencial [4].

Los filtros.

El inconveniente presentado en el proceso de adquisición de la señal ECG es la posible contaminación de la señal debido a perturbaciones. Una perturbación es una señal indeseable que puede alterar los resultados deseados. Para ello es necesario la utilización de filtros, con diferentes configuraciones según el tipo de interferencia que se quiera eliminar, como:

Filtros pasa-bajas. Los cuales solamente dejan pasar señales con frecuencias menores a una frecuencia de corte establecida por el diseñador.

Filtros pasa-altas. Los cuales solamente dejan pasar señales con frecuencias mayores a la frecuencia de corte establecida por el diseñador.

Filtro pasa-banda. Los que permiten el paso de las señales eléctricas comprendidas entre dos frecuencias establecidas por el diseñador.

Filtro rechaza-banda. Son los que no permite pasar una frecuencia específica.

Sistema de adquisición de la señal.

Existen varios elementos para la adquisición de datos. La adquisición de datos (DAQ) es el proceso de medir con una PC un fenómeno eléctrico o físico como voltaje, corriente, temperatura, presión o sonido. Un sistema DAQ consiste de sensores, hardware de medidas DAQ y una PC con software programable (figura 3) [5] [6].



Fig. 3 Adquisición de la señal

Una forma de implementar sistemas DAQ es a través del entorno gráfico de programación de LabVIEW. Este entorno fue diseñado con la finalidad de desarrollar instrumentos virtuales. La programación en LabVIEW es muy fácil e intuitiva, además de que permite la aplicación de diferentes herramientas de adquisición y procesamiento de señales [7].

2. PARTE EXPERIMENTAL

Para la construcción del electrocardiógrafo se emplearon dos etapas, la primera una etapa analógica que consta de amplificación y prefiltrado. La segunda etapa es digital y consiste desde la adquisición de señal hasta la selección y visualización de las 12 derivaciones.

Amplificación

La actividad eléctrica generada por el corazón se encuentra en el rango de los milivoltios (0.5-4mV) para la visualización se realizó una amplificación 1000, calculada a partir de la hoja de especificaciones del fabricante como se puede apreciar en la ecuación 1. El amplificador de instrumentación debe cumplir con diversas características para el manejo adecuado de las señales, entre ellas están: CMRR alto, impedancia de entrada alta y bajo nivel de ruido.

$$G = 1 + \left(49.4 \frac{k\Omega}{R_G}\right) \dots(1)$$

Pre filtrado

El rango de frecuencias para un ECG en reposo está de 0.5 a 150Hz por lo que a cada una de las nueve derivaciones se realizó un filtrado analógico pasa bajas de 120 Hz.

Adquisición de la señal

La señal fue adquirida a través de la tarjeta de adquisición DAQ NI USB-6009, esta se caracteriza por utilizar un bus de datos hacia la computadora de tipo USB, entradas analógicas con 14bits de resolución y una velocidad de muestreo de 48 kS/s. Las señales son recibidas por una interfaz en LabVIEW (figura 4).

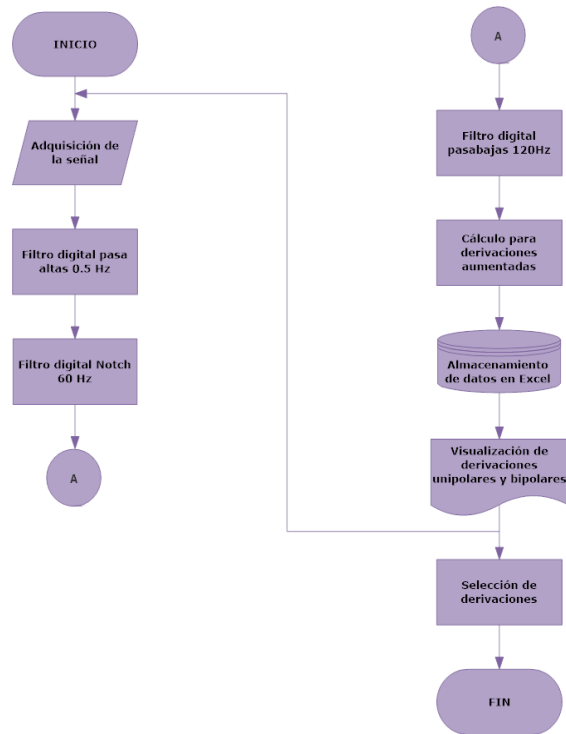


Fig. 4 Diagrama de flujo de la etapa digital

Filtrado Digital

Para lograr una mejor visualización de la señal en la interfaz, se emplearon filtros Butterworth tipo IIR de cuarto orden por cada una de las 9 derivaciones, un pasa alta de 0.1, un rechaza banda de 60Hz y un pasa altas de 100Hz.

Cálculo para las derivaciones aumentadas

Para poder visualizar las derivaciones aumentadas se utilizan las siguientes ecuaciones 2, 3 y 4:

$$aVR = \frac{-(I-II)}{2} \quad \dots(2)$$

$$aVR = \frac{-(I-III)}{2} \quad \dots(3)$$

$$aVR = \frac{(II-III)}{2} \quad \dots(4)$$

Almacenamiento de datos

Las herramienta de LabVIEW “Build Table” permite la conversión de la señal en una serie de datos que permite observar la amplitud de y el tiempo en cada punto de la señal. Para almacenar en Excel estos datos se utilizó la paleta “Write to Measurement File” esta permite la ubicación donde se desee guardar el archivo.

Selección de derivaciones

Es posible la selección de la derivación de la señal electrocardiográfica que se desee observar por medio de botones en el panel frontal de LabVIEW, estos son conectados con la estructura “Case” que contiene 12 subdiagramas correspondientes a las 3 derivaciones bipolares y a las 6 derivaciones unipolares.

3. RESULTADOS

Con el fin de obtener distintas mediciones de la señal electrocardiográfica se probó el prototipo portátil en diferentes sujetos. Un factor que influye para una correcta adquisición de la señal es la correcta colocación de los electrodos (figura 5). Las amplitudes y forma de onda de las señales adquiridas son similares a la señal real de un equipo de electrocardiografía, pero es importante remarcar que no hay un estándar en la amplitud de las ondas, segmentos e intervalos ya que este dato dependerá de cada paciente. En la figura 6 se muestra parte del circuito analógico utilizado, en este los amplificadores tienen una ganancia de 1000, logrando que la señal visualizada sea del orden de los volts.

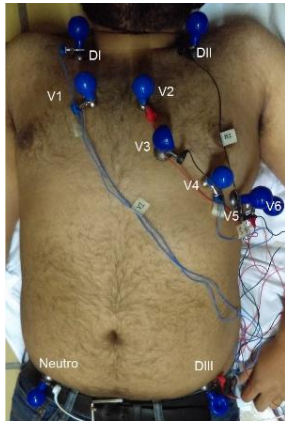
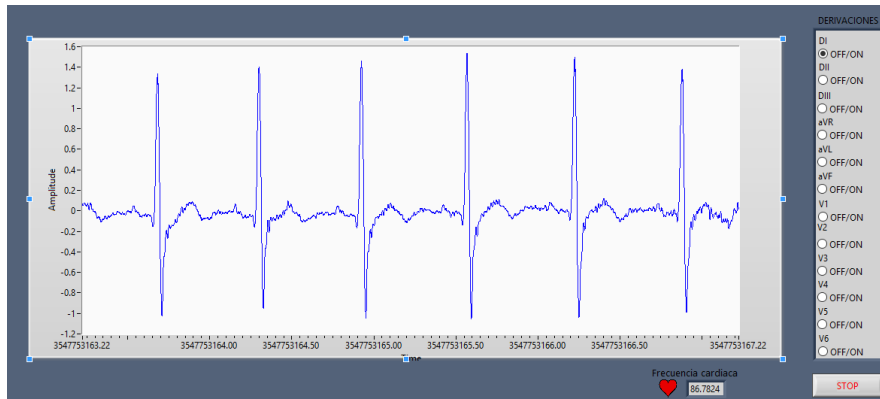


Fig.5 Colocación de los 10 electrodos



Fig. 6 Circuito empleado en la parte analógica

El desarrollo de la interfaz permite ver al usuario la derivación de su interés, por lo cual podrá escoger entre las derivaciones del plano frontal y las del plano transversal. En el panel frontal se observa la señal obtenida en la derivación DI (figura 7), en esta señal se pueden identificar las ondas P, T y el complejo QRS. También se observa la frecuencia cardiaca del sujeto. En la figura 8 se muestra parte del almacenamiento de datos en Excel, la primera columna corresponde al tiempo y la segunda columna corresponde a la amplitud de la señal. En la figura 9 se muestra la gráfica correspondiente al almacenamiento de datos.



Time - Voltage_0 (Filtered)	Amplitude - Voltage_0 (Filtered)
3547753163	0.0586458
3547753163	0.0552876
3547753163	0.0539625
3547753163	0.053996
3547753163	0.0545448
3547753163	0.0552757
3547753163	0.0565197
3547753163	0.0588442
3547753163	0.0624417
3547753163	0.0668629
3547753163	0.0712579
3547753163	0.0747758
3547753163	0.0767729
3547753163	0.0768852
3547753163	0.0751022
3547753163	0.0717413
3547753163	0.0673021
3547753163	0.062406
3547753163	0.0578258
3547753163	0.0543239
3547753163	0.0522508
3547753163	0.0512736

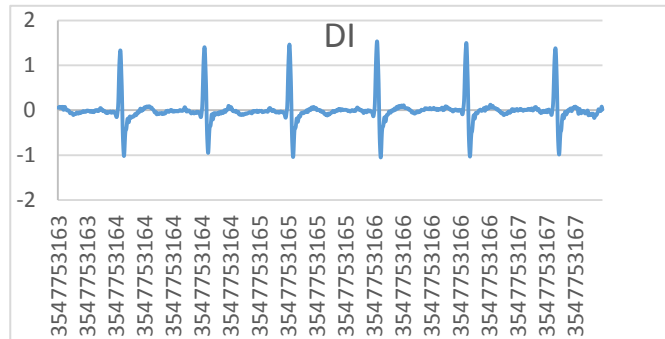


Fig 8. Datos obtenidos de la derivación DI

Fig. 9 Gráfica obtenida de la derivación DI

En la figura 10 se muestra la derivación aVF, el sujeto de al que se le tomó esta medición padece de arritmia, por lo cual se ve un aumento en amplitud de la onda T

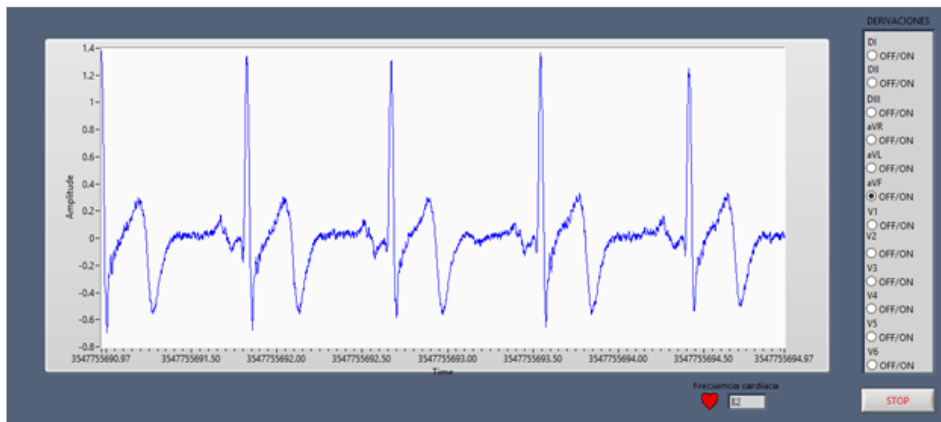
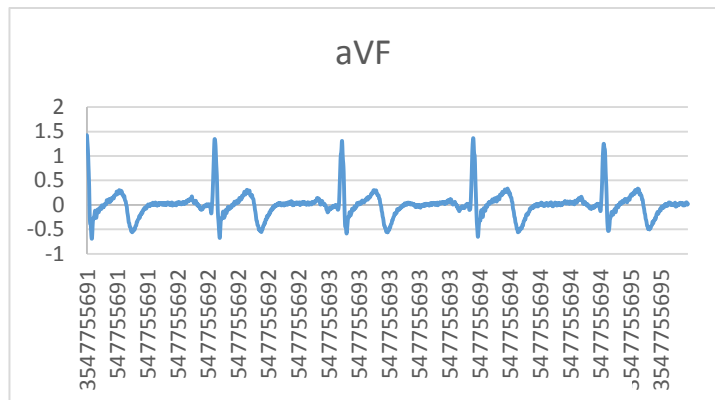


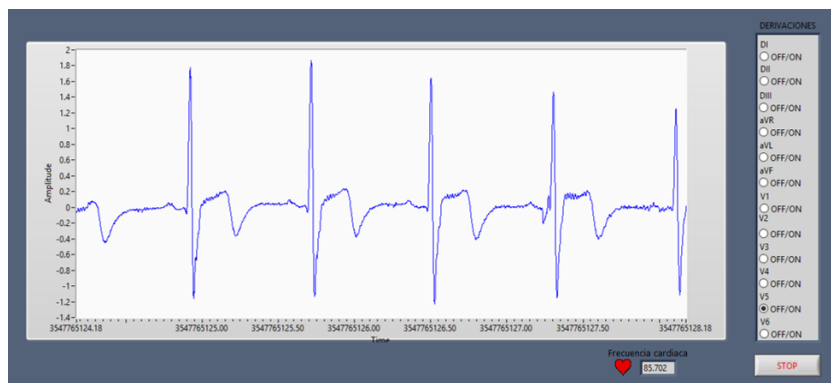
Fig. 10 Señal obtenida en derivación aVF en sujeto con arritmia

Time - Voltage_0 (Filtered)	Amplitude - Voltage_0 (Filtered)
3547755691	1.42208
3547755691	1.37811
3547755691	1.32486
3547755691	1.27419
3547755691	1.22924
3547755691	1.18494
3547755691	1.13356
3547755691	1.07041
3547755691	0.99501
3547755691	0.90981
3547755691	0.819603
3547755691	0.729945
3547755691	0.642747
3547755691	0.55219
3547755691	0.446195
3547755691	0.314959
3547755691	0.160719
3547755691	-0.000158127
3547755691	-0.145262
3547755691	-0.257683
3547755691	-0.332281
3547755691	-0.373863



En las figuras 11 y 12 se pueden ver los datos y la gráfica en Excel.

Por último en la figura 13 se muestra la derivación precordial V5, en la figura se observa parte del almacenado de datos en Excel. En la figuras 14 y 15 se observa la gráfica y tabla correspondiente.



Time - Voltage_7 (Filtered)	Amplitude - Voltage_7 (Filtered)
3547765345	0.0959675
3547765345	0.0986975
3547765345	0.0993241
3547765345	0.0980821
3547765345	0.0955291
3547765345	0.0916645
3547765345	0.0858117
3547765345	0.0778238
3547765345	0.0691097
3547765345	0.0619291
3547765345	0.0577308
3547765345	0.0562879
3547765345	0.0562357
3547765345	0.0562406
3547765345	0.0557851
3547765345	0.0550869
3547765345	0.0541997
3547765345	0.0524803
3547765345	0.0496654
3547765345	0.0471941
3547765345	0.0474642
3547765345	0.0516262

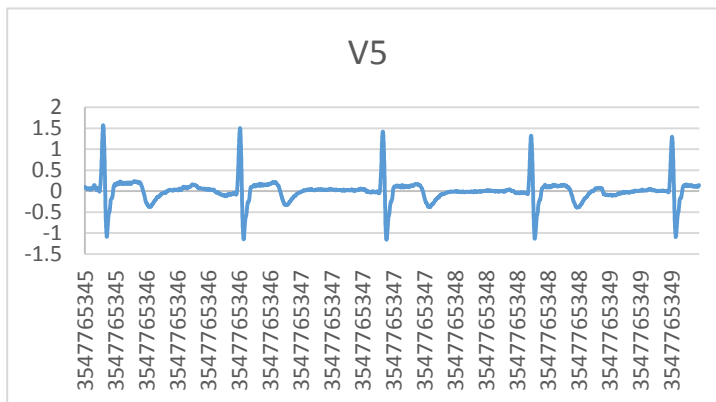


Fig. Datos obtenidos de la derivación V5

Fig. Gráfica obtenida de la derivación V5

4. CONCLUSIONES

Se desarrolló un sistema de electrocardiografía de tipo híbrido es decir con dos etapas de procesamiento una analógica y otra digital. Este sistema cuenta con una etapa de instrumentación que amplifica teóricamente con un factor de 1000 la señal obtenida; para cada una de las nueve derivaciones se implementó un prefiltrado analógico con un filtro pasabajos de 120 Hz, la etapa de digital consta de un filtro pasa altas y un rechazabanda de 60 Hz de tipo Butterworth, orden 4to, conectados en cascada dentro del diagrama de bloques en LabVIEW.

Por medio de la tarjeta de adquisición DAQ NI USB-6009 se pudo trasladar los datos a LabVIEW, se escogió esta tarjeta debido a sus características técnicas, como su frecuencia de muestreo y canales analógicos para su adquisición. El entorno de programación gráfica de LabVIEW permitió filtrar la señal para ser desplegada dentro de la interfaz donde se puede seleccionar cada derivación, según el interés del usuario. Así como el almacenamiento de los datos obtenidos de

cada derivación en Excel, listos para un procesamiento posterior. El uso de filtros digitales facilita la disminución de espacio en el circuito físico y permite la portabilidad del sistema. Este sistema solo puede ser utilizado en aplicaciones experimentales ya que aún se deben considerar especificaciones técnicas que deben cumplir estos equipos para una aplicación clínica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pallares D. Medrano G. (2013). Electrocardiografía Clínica. México. Méndez Editores
2. Webster John. (2010). Medical Instrumentation Application and Design. Estados Unidos: John Wiley & Sons.
3. Dvorkin, Cardinali & Ermoli. (2010). Bases Fisiológicas de la Práctica Médica. Argentina: Panamericana.
4. Texas Instrument. (Diciembre 2009). Datasheet INA 129P. Abril 2016, de Sitio web: <http://www.ti.com.cn/cn/lit/ds/symlink/ina129-ep.pdf>
5. Del Rio Joaquín (2013). LABVIEW Programación para Sistemas de Instrumentación. México: Alfaomega.
6. Sánchez, Rico, Sotelo de Ávila, Budar, Ramírez, Cabrera. Plataforma Visual de LabVIEW de algoritmo en línea para el análisis del desempeño atlético. SOMI XXIX, Congreso de Instrumentation, 2014
7. Sanchez Velarde E., Sotelo de Avila A. A., Cabrera Llanos I. A. (2015). Fuzzy-state machine for Triage priority classifier in emergency room.

FORMACIÓN DE MEMBRANAS POR ELECTROSPINNING UTILIZANDO QUITOSÁN-OXIDO DE POLIETILENO ENTRECruzADAS CON GENIPINA

Rangel-Rodríguez, A.M.¹, Licea-Jimenez, L.², Arévalo-Niño, K.¹

¹Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. San Nicolás de los Garza, Nuevo León. CP 66455. ²Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV), Unidad-Monterrey. Parque de Investigación e Innovación Tecnológica, Alianza Norte 202, Alianza Norte, CP 66600.

RESUMEN

El electrospinning es una técnica que produce fibras a escala nano- y micrométrica, estas presentan características propias bien definidas como lo son propiedades estructurales, térmicas, área definida, mayor superficie de contacto, etc. Las membranas producidas por esta técnica han sido utilizadas como matriz celular, apósitos en heridas y andamios para ingeniería de tejidos. El quitosán es un biopolímero que incrementa la biocompatibilidad de matrices poliméricas, este material tiene como propiedad actividad antimicrobiana, antitumoral, antioxidante. El óxido de polietileno es un material no iónico, teniendo como uso: aditivo en productos farmacéuticos y mucoadhesivos. La genipina es un entrecruzante natural obtenido de *Gardenia jasminoside* o *Genipa americana* siendo este 5000 a 10000 veces menos toxico que el glutarandehido. En este trabajo de investigación se llevó a cabo la formación de membranas de quitosán-óxido de polietileno y genipina mediante la técnica de electrospinning y su caracterización parcial. El quitosán y el óxido de polietileno al 4% (p/v) fueron mezclados en proporciones 1:1 y la genipina a 250 mg/L. Las condiciones de electrospinning fueron (1 a 35 Kv), distancia a 15 cm, un flujo a 5 mL/h. Las membranas se analizaron mediante FTIR, TGA y microscopía electrónica de barrido. En el análisis de FT-IR se observaron las señales características de los polímeros observando un ensanchamiento en la región de 1630-1520 cm⁻¹. La interacción entre los polímeros y el entrecruzante. El análisis térmico nos mostró que mejoran la estabilidad térmica cuando se adiciona la genipina. Mientras que en el SEM se observaron que las fibras presentaron un diámetro de ~57 nm. Las membranas de PEO-Quitosán mejoran sus propiedades cuando son entrecruzadas con genipina.

1. INTRODUCCIÓN

Los procesos de formación de membranas se pueden llevar a cabo mediante procesos enzimáticos, físicos y químicos. Dentro de los procesos físicos en la formación de estos materiales se encuentra el electrospinning¹ el cual puede ser combinado mediante con el proceso químico mediante la mezcla de biopolímeros. El electrospinning es un proceso en donde el campo eléctrico de alto voltaje atrae las partículas cargadas eléctricamente de una solución desde un inyector hacia la superficie. Los parámetros dependientes del tipo de estructura a obtener son: voltaje eléctrico aplicado, tipo de colector, distancia y velocidad de flujo. Los materiales obtenidos oscilan en el rango de nanómetros a submicrómetros, dependiendo de las características del polímero y condiciones del proceso.² Las características que presentan estos materiales es que mejoran sus propiedades estructurales, térmicas, área definida, mayor superficie de contacto, etc. La aplicación de los productos obtenidos mediante esta tecnología es en el área de los alimentos, biomédica (regeneración de tejidos), biotecnología, cerámica y farmacéutica.³ Los polímeros

utilizados para la formación de membranas mediante este método se encuentran el quitosán, la pectina, la carboximetil celulosa, el alginato, el fucoidán entre otros. El quitosán es un biopolímero compuesto por unidades de D-glucosamina unido por enlace $\beta(1-4)$ glucosídico. Obtenido por la desacetilación controlada de la quitina.⁴ Este material tiene grupos amino libres con alta densidad de carga positiva. Su campo de aplicación es multidisciplinario. Entre los que se encuentran el área de alimentos, cosmética, agrícola, biotecnológica y principalmente la médica. Mientras que el óxido de polietileno es un material no iónico, teniendo como uso: aditivo en productos farmacéuticos y mucoadhesivos. La genipina es un entrecruzante natural obtenido de *Gardenia jasminoides* o *Genipa americana* siendo este 5000 a 10000 veces menos tóxico que el glutaraldehído.⁵ En este trabajo de investigación se llevó a cabo la formación de membranas de quitosán-óxido de polietileno y genipina mediante la técnica de electrospinning y su caracterización parcial. El uso de estas membranas nos permitirá obtener membranas con características definidas para aplicaciones biotecnológicas.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Preparación de soluciones.

El quitosán (4%, p/v) fue preparado en ácido acético 1 M. Mientras que el óxido de polietileno de un peso molecular de 600000 (4%, p/v) se preparó en agua destilada. Una vez disueltos los polímeros se mezclaron en proporción 1:1 y se mezclaron durante 15 min. La genipina 150 μ L (250 mg/mL) se preparó en buffer de fosfatos ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) a un pH 7.0, la cual se mantuvo en agitación constante durante 1 h. Posteriormente la genipina se adicionó la solución de quitosán-PEO, la cual se mantuvo por agitación constante durante 15 min y se llevó al electrospinning.

Electrospinning

Las membranas fueron preparadas mediante la técnica de electrospinning utilizando un sistema de placa horizontal. El voltaje se evaluó de 10-30 kV a una velocidad de flujo a 5 ml/h. El sistema recolector fue una placa de aluminio a una distancia de 15 cm. El diámetro interno de la aguja utilizado fue de 0.6 mm. Las membranas obtenidas se colocaron a 40°C durante 12 h. Las membranas control de quitosán-PEO, la genipina se sustituyó por el buffer de fosfatos.

Caracterización

La morfología de las membranas fue determinada en un Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de campo modelo Nova NanoSEM200, FEI.

Las membranas fueron analizadas mediante infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR, Thermo Scientific Nicolet iS10) utilizando un accesorio reflectante atenuado (ATR). Los espectros fueron registrados por 36 escaneos a una resolución de 4.0 cm^{-1} . Las lecturas se realizaron a una resolución de 4000-650 cm^{-1} . Los espectros fueron corregidos y normalizados a línea base a absorbancia de 1. Para lo cual se utilizó el software Omnic v8.2.

Los análisis térmicos fueron realizados en un equipo de análisis termogravimétrico (TGA) SDT Q600, TA Instruments.

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

La formación de membranas de quitosán-PEO y quitosán-PEO-genipina, lograron obtenerse mediante la técnica de electrospinning. Las membranas se pudieron obtener a un voltaje de 25 kV para quitosán-PEO y 22 kV para quitosán-PEO-genipina. La distancia utilizada fue de 15 cm, utilizando un colector horizontal. Las membranas obtenidas fueron de color blanco. En el análisis de FT-IR (Figura 1A) se observaron las señales características de los polímeros utilizados. El espectro del quitosán se muestra la región de 1200-950 cm^{-1} característica de carbohidratos. La

señal de los grupos amida I a 1647 cm^{-1} , amida II $1320\text{-}1360\text{ cm}^{-1}$ y los amino protonados 1580 cm^{-1} . Mientras que en la región de $2460\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ se encuentra presente la región de los grupos -OH . En el espectro del óxido de polietileno se observa en la señal de 2850 cm^{-1} es característica de los grupos -CH_2 la señal de 964 y 1096 cm^{-1} es asignada a -COC .⁶ Mientras que en la Figura 1B, en la membrana de quitosán-PEO se observa un ensanchamiento en la región de 1500 a 1620 cm^{-1} , esto debido a la interacción de los polímeros utilizados. En cuanto al espectro de las membranas entrecruzadas con genipina, se observa que hay un corrimiento en la región de $879\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ esto debido a la interacción que existe entre los materiales. En cuanto la señal $1489\text{-}1683\text{ cm}^{-1}$ esta región se ve disminuida, debido a la interacción de los grupos amino del quitosán con el entrecruzante utilizado. En la señal de 2800 cm^{-1} presenta una mayor intensidad por los grupos -CH presentes en ambos polímeros.

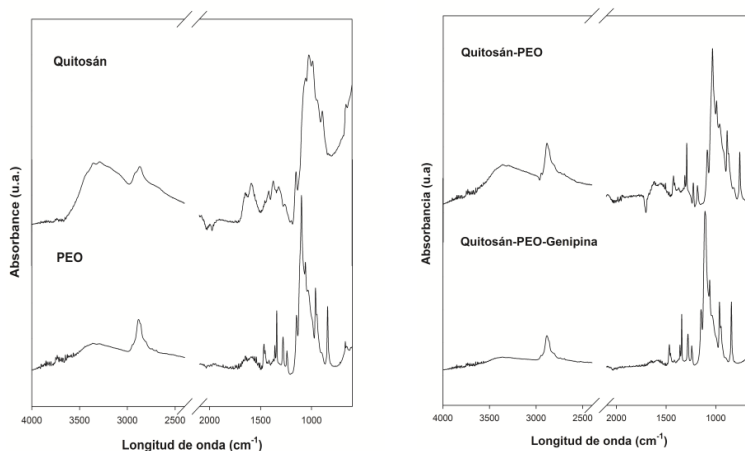


Figura 1. Infrarrojo por transformadas de Fourier de polímeros (A) y membranas obtenidas por electrospinning (B).

En la Figura 2, se muestra el termograma de las membranas obtenidas de quitosán-PEO y quitosán-PEO-genipina, obtenidos mediante electrospinning. El termograma está dividido en tres regiones. La primera región está asociada a la pérdida de peso en función de la temperatura por deshidratación la cual se encuentra en el rango de $80\text{-}120\text{ °C}$. La segunda es por los cambios de degradación de las membranas, observando que su descomposición comienza a partir de los 240 °C para ambas membranas, sin embargo se observa que la membrana entrecruzada con genipina mejora su estabilidad térmica. Finalmente se observa la región III en donde los compuestos inorgánicos que quedan después de la descomposición de los biopolímeros.

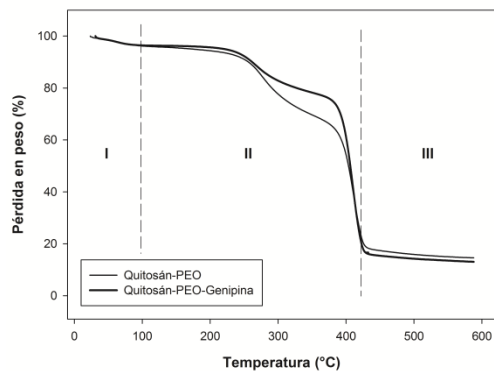


Figura 2. Termograma de TGA de membranas obtenidas por electrospinning de Qitosán-PEO y Qitosán-PEO-Genipina

En la Figura 3, se observan las micrografías de las muestras electrohiladas de quitosán-PEO y quitosán-PEO-genipina. En las fotografías se muestra que presentan uniformidad homogeneidad a lo largo de las membranas. Se puede observar la porosidad y el área de superficie. En las membranas sin entrecruzante se observa que el tamaño de las fibras es más polidisperso. Mientras que en las entrecruzadas con genipina se observa mayor homogeneidad. El diámetro promedio esta ~57 nm.

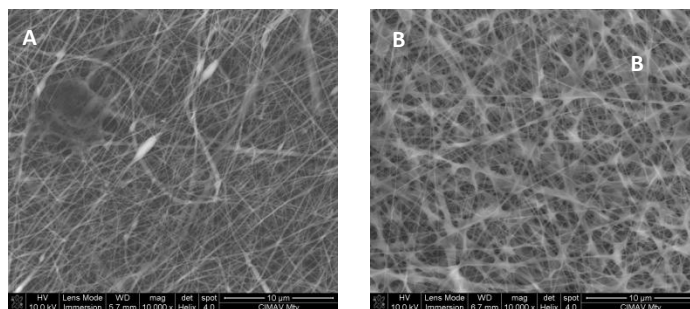


Figura 3. Micrografías de membranas obtenidas por electrospinning de quitosán-PEO (A) y quitosán-PEO-genipina (B).

4. CONCLUSIONES

Mediante la técnica de electrospinning y las condiciones establecidas se logró obtener membranas de quitosán-PEO y quitosán-PEO-genipina. Observando una distribución homogénea en las membranas. Además de que se observó que las membranas entrecruzadas mejoran las propiedades térmicas y estructurales. Estas membranas presentan un potencial para su aplicación en diversas áreas de la biotecnología, ya que por sus características tanto el agente entrecruzaste así como los biopolímeros utilizados han sido utilizados en aplicaciones farmacéuticas y ambientales.

BIBLIOGRAFÍA

1. G. Xinying, K. Oh.Hyeong, J. Jinho, "Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acid acetic solution", *Biomaterials*, Vol. 26, 2005, pp. 5427-5432.
2. S. L. M. Duque, L. Rodriguez, M. López, "Electrospinning la era de las nanofibras", *Revista Iberoamericana de Polímeros*, Vol. 14, 1, 2013, pp. 10-27.
3. A. Farah Ejaz, L. Boor Singh, H. Raed, "A review electrospinning form membrane fabrication:Challenges and applications", *Desalination*, Vol. 356, 2015, pp. 15-30.
4. Z. Vida, M. Asghari, A. Dshti, "A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives and applications", *Chem. Bio. Eng. Reviews*, Vol. 2, 2015, pp. 204-226.
5. H. W. Sung, D. M. Huang, W. H. Chang, R. N. Huang, J. C. Hsu, "Evaluation of gelatin hydrogel crosslinked with various crosslinking agents as bioadhesives: In vitro study" *J. Biomed. Mater. Res.* Vol. 46, 2009, pp. 520-530.
6. M. Dilamian, M. Montazer, J. Masoumi, "Antimicrobial electrospun membranes of chitosan/poly(ethylene oxide) incorporatins poly(hexamethylene biguanide) hydrochloride", *Carbohydr. Polym.* Vol. 94, 2013, pp 364-371.

SCEXLX1, UNA EXPANSINA ACTIVA SOBRE CELULOSA Y QUITINA

Omar Eduardo Tovar-Herrera¹, Ramón Alberto Batista-García², María del Rayo Sánchez-Carbente², Ma. del Socorro Flores González¹, María Magdalena Iracheta-Cárdenas¹, Jorge Luis Folch-Mallo²
* Katiushka ArévaloNiño¹ *

¹Instituto de Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. ²Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México.

RESUMEN

A través de una búsqueda en el genoma del Basidiomicete *Schizophyllum commune*, se encontró, clonó y expresó una nueva proteína (ScExlx1) del grupo de las expansinas. Esta proteína presentó las características canónicas de las expansinas de plantas. ScExlx1 fue capaz de formar “burbujas” en fibras de algodón, reducir el tamaño de partícula de avicel e incrementar la liberación de azúcares de reductores a partir de fibras de algodón pretratadas con la proteína y después tratadas con celulasas. Una nueva característica de ScExlx1, es su capacidad de incrementar la liberación de azúcares reductores (N-acetil glucosamina) a partir de quitina pretratada con ScExlx1 y después con una quitinasa, una característica que no se había reportado para expansinas o proteínas tipo-expansinas. Este es el primer reporte de una expansina *bona fide* encontrada en un basidiomiceto.

1. INTRODUCCIÓN

Las expansinas son proteínas no enzimáticas que inducen la extensión y relajación de las paredes celulares vegetales, actuando como agentes que “aflojan” la matriz de polisacáridos que compone a la pared celular vegetal (1, 2). Las expansinas tienen de 225-275 amino ácidos y consisten de dos dominios compactos (D1 y D2) unidos mediante una pequeña región “linker” (1). En años recientes se han reportado expansinas microbianas originarias de bacterias como *Bacillus subtilis* y *Pectobacterium carotovorum* (3, 4). La expansina de *B. subtilis*, denominada BsExlx1, es la expansina que cuenta con la caracterización más extensa de una expansina originaria de una fuente no-vegetal, y la única expansina bacteriana cristalizada hasta hoy en día. Estas proteínas han presentado afinidad por distintos tipos de celulosa, y algunas han exhibido incluso actividad sinérgica con celulasas y xilanasas.

En este trabajo se identificó una expansina de origen fúngico en el basidiomiceto *Schizophyllum commune* (ScExlx1). La expansina fue clonada y expresada en *Pichia pastoris*, y la proteína fue capaz de mejorar la hidrólisis de celulosa y quitina cuando fue usada como pretratamiento.

2. PARTE EXPERIMENTAL

El gen *ScExlx1* de *S. commune* fue clonado en *E. coli* DH5α y expresado en *P. pastoris*. La proteína recombinante fue purificada mediante cromatografía de afinidad. Los alineamientos fueron preparados con el programa Geneious, mediante MUSCLE.

La secuencia de amino ácidos de ScExlx1 fue sometida al servidor I-TASSER para obtener un modelo tridimensional de la proteína. Posteriormente, se realizó una segunda ronda de modelado

usando como templatado el PDB 3D30 correspondiente a la proteína BsExlx1 de *Bacillus subtilis*. Las visualizaciones estructurales de los modelos fueron obtenidos en VMD (Visual Molecular Dynamics).

Las técnicas de SDS-PAGE y western blot fueron usadas para determinar la identidad de la proteína ScExlx1.

La actividad de la proteína ScExlx1 fue determinada de manera indirecta al mejorar la hidrólisis del polímero de celulosa cristalina y quitina de cáscara de camarón por celulasas y quitinasas. El análisis estadístico se realizó aplicando diferentes pruebas de ANOVA para los distintos experimentos y las pruebas post hoc de Duncan y Tukey según fuera el caso.

3. RESULTADOS

Análisis de secuencia

Se realizó una búsqueda en el genoma de *S. commune* H4-8 v3.0 con el fin de encontrar proteínas del grupo de las expansinas, usando como anzuelo una expansina de *Clavibacter michiganensis*. Únicamente se encontró una proteína de 239 amino ácidos que contenía los dos dominios clásicos de la expansinas canónicas. La secuencia de nucleótidos correspondiente a la expansina de *S. commune*, designada como ScExlx1, presentó un 97.2% de identidad con la secuencia de la misma proteína en la cepa de *S. commune* H4-8. Los amino ácidos que participan en la unión a polisacáridos y responsables de la actividad “catalítica” no presentaron alteraciones importantes. Algunas características importantes de ScExlx1 fueron la presencia de un péptido señal (Met-1 a Ala-19) y un sitio blanco de N-glicosilación (figura 1).

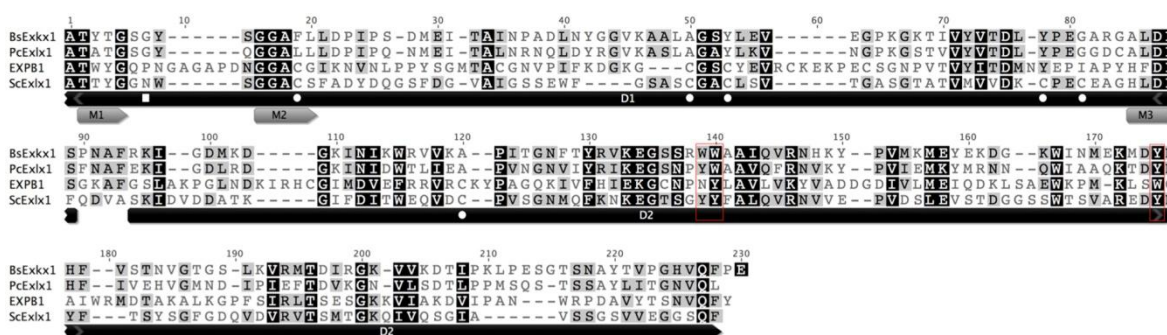


Figura 1. Alineamiento proteico de ScExlx1, PcExlx1, EXPB1 y BsExlx1. Los colores mas oscuros indican mayor grado de conservación de amino ácidos entre las secuencias. M1, M2 y M3 indican los motivos clásicos de las expansinas. Los amino ácidos enmarcados en rojo son residuos importantes en la unión a celulosa en BsExlx1. Los cuadros blancos indican sitios de N-glicosilación y los círculos blancos indican sitios que forman puentes disulfuro.

Modelado de ScExlx1

Se construyó un modelo tridimensional de ScExlx1 comenzando en el amino ácido Arg-20 (el péptido señal fue removido antes del modelado) con un TM-score de 0.8 ± 0.10 y un C-score de 0.49 en I-TASSER (figura 2). El PDB 3D30 fue seleccionado por I-TASSER como el mejor templatado. Estos valores confirmaron la confianza en la calidad del modelo obtenido e indicaron que ScExlx1 podría tener actividad expansina.

Clonación y expresión de ScExlx1

El producto génico fue clonado en marco con las secuencias codificantes para el factor de secreción alfa y una etiqueta de histidinas situada en el extremo C-terminal. El gen recombinante fue expresado bajo el promotor inducible por metanol (AOX) de *P. pastoris*. La proteína fue purificada y por cromatografía de afinidad y cargada en un gel SDS-PAGE. El gel de poliacrilamida reveló la presencia de tres bandas con masas moleculares aproximadas de ~24, ~28 (tamaño esperado) y ~30 (figura 3a). La confirmación de identidad de la proteína ScExlx1 y las bandas observadas en el SDS-PAGE se llevó a cabo mediante western blot, detectando la presencia del epítipo myc presente en la proteína recombinante (figura 3b).

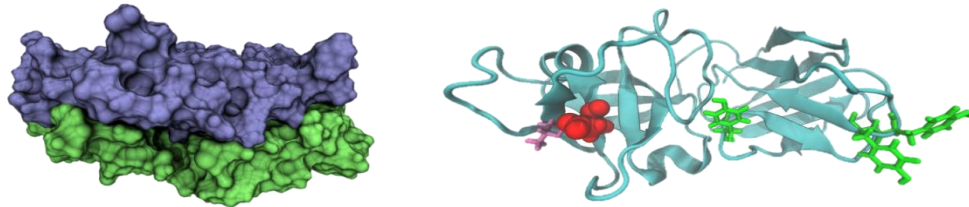


Figura 2. Izquierda; Definición de frente y reverso de ScExlx1. La parte morada indica el frente de la proteína, mientras que la parte verde indica el reverso de ScExlx1. Derecha; Amino ácidos conservados/importantes entre las expansinas microbianas: morado Thr12, rojo Asp82, verde Tyr161, Tyr162 y Tyr195.

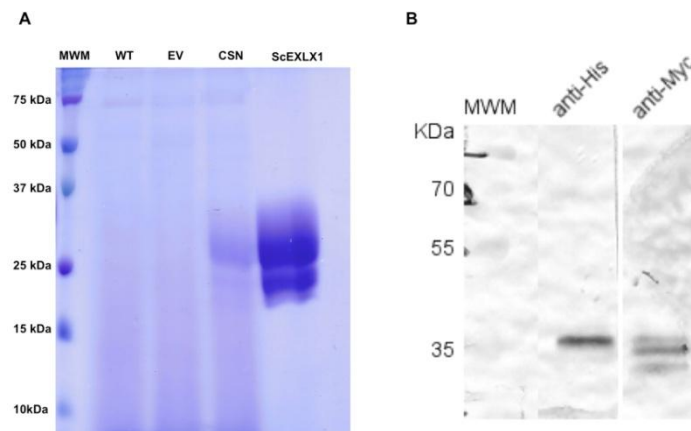


Figura 3. Purificación y western blot de la proteína ScExlx1. A) SDS-PAGE de cepas recombinantes y cepas control. WT-wild type, EV-empty vector, CSN-crude supernatant y ScExlx1. B) Análisis por western blot de la proteína ScExlx1.

Efecto de ScExlx1 sobre celulosa

Se evaluó el efecto de ScExlx1 sobre fibras de algodón mercerizado y avicel, considerando que expansinas y proteínas relacionadas con expansinas de diferentes orígenes han demostrado ser activas sobre celulosa.

Las fibras tratadas con buffer o proteínas del sobrenadante obtenido con el vector vacío no presentaron cambios visuales cuando fueron observadas mediante microscopia de campo claro, mientras que el tratamiento con ScExlx1 generó la formación de estructuras tipo “burbuja”, similares a aquellas estructuras generadas por tratamientos con proteínas tipo-expansinas (loosenina y swollenina) (figuras 4a y 4b). Además, cuando el avicel fue tratado con ScExlx1, se observó una reducción en el tamaño de partícula cuando se comparó con los tratamientos control. Estos resultados confirmaron que ScExlx1 es una proteína funcional y es capaz de modificar la estructura de la celulosa cristalina (figuras 4c y 4d).

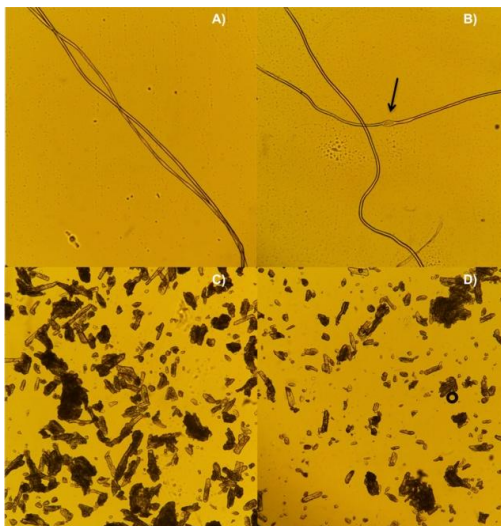


Figura 4. Actividad disruptiva de ScExlx1 sobre fibras de algodón y avicel. A) Proteínas del sobrenadante de la cepa transformada con el vector vacío actuando sobre fibras de algodón. B) ScExlx1 actuando sobre fibras algodón. Se observa el efecto burbuja generado sobre las fibras a 10X. C) Proteínas del sobrenadante de la cepa transformada con el vector vacío actuando sobre avicel. D) Reducción de tamaño en partículas de avicel tratadas con ScExlx1.

Hidrólisis enzimática

Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar si ScExlx1 era capaz de mejorar la hidrólisis de celulosa mediada por una mezcla de celulasas de *T. reesei*. La figura 5 muestra las diferencias entre la hidrólisis de avicel tratado con ScExlx1 y los tratamientos control después de 3 h de reacción. Cabe mencionar, que cuando ScExlx1 fue incubada de manera individual con avicel no se detectaron azúcares reductores en el sobrenadante después de 72 h.

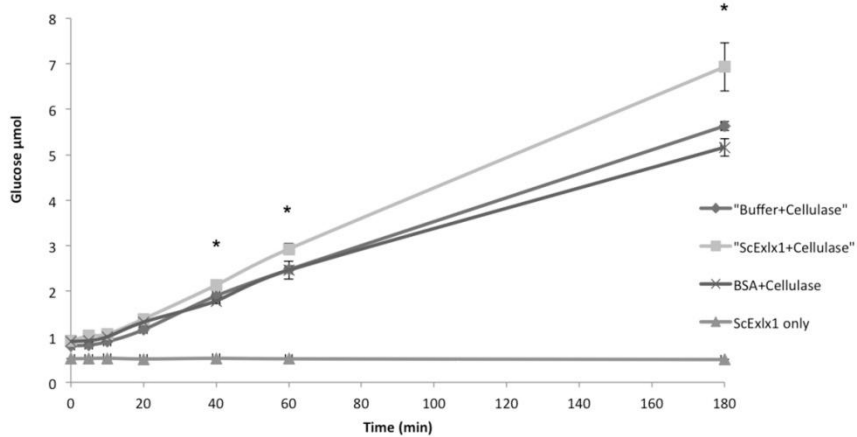


Figura 5. Efecto de ScExl1 en la hidrólisis enzimática de celulosa.

A pesar de que diferentes proteínas tipo-expansinas han mostrado capacidades de unión a quitina, no existen reportes sobre el efecto que una expansina tiene sobre este polisacárido. Por esta razón, pretratamos quitina con ScExl1 antes de añadir una mezcla de quitinasas de *Streptomyces griseus*. Este experimento resultó en la liberación de 2 veces más N-acetil glucosamina a partir de la quitina pretratada con ScExl1 cuando se comparó con los tratamiento control (figura 6).

Estos resultados indican que ScExl1 es capaz de modificar el polímero de quitina, un hecho interesante, dado que la pared celular fúngica está compuesta principalmente de este polisacárido. Probablemente, las expansinas de hongos podrían jugar un papel importante durante la remodelación de la pared celular en estos organismos, aunque se requiere mayor evidencia para confirmar esta función para las expansinas de origen fúngico.

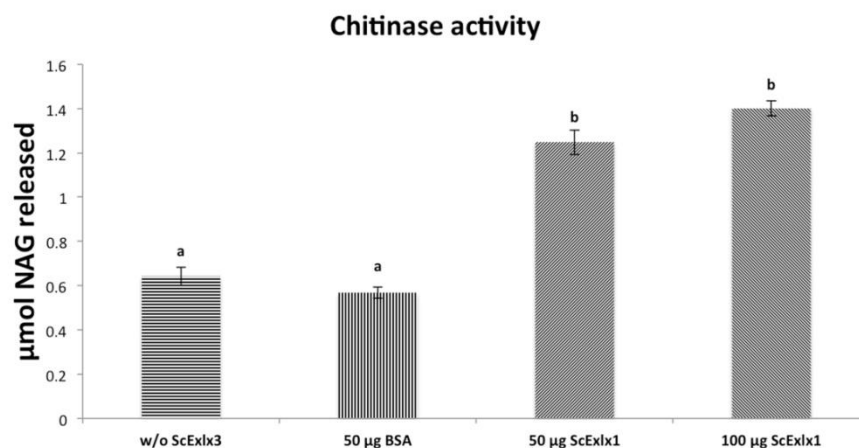


Figura 6. Efecto de ScExl1 sobre la hidrólisis enzimática de quitina de camarón.

4. CONCLUSIONES

En este trabajo se estudió el efecto de ScExlx1 sobre fibras de algodón, Avicel y quitina. Como miembro de la superfamilia de las expansinas, ScExlx1 causó una modificación en la anatomía de la celulosa cristalina, sugiriendo que este efecto puede servir para incrementar la hidrólisis de celulosa por *S. commune* cuando vive como hongo de pudrición blanca.

Con respecto a la hidrólisis enzimática, las expansinas han sido evaluadas con el fin de incrementar la hidrólisis de lignocelulosa y reducir la cantidad de enzima usada. En relación a lo anterior, un pequeño pero significativo incremento en la hidrólisis de celulosa se detectó cuando fibras de algodón pretratadas con ScExlx1 fueron expuestas al cóctel de celulasas después de 3 h. Con los datos obtenidos en este trabajo, demostramos que ScExlx1 mejora la hidrólisis de celulosa cuando se usa antes que las celulasas a bajas dosis enzimáticas.

Finalmente, este es el primer reporte del efecto de una expansina sobre el polímero de quitina. Este hecho es muy importante por dos razones principales: 1) el efecto en la mejora de hidrólisis de quitina por una quitinasa puede ser explotado de muchas maneras, ya que este polímero ha ganado gran interés por la comunidad científica gracias a sus numerosas aplicaciones médicas y biotecnológicas; 2) existe la posibilidad de que ScExlx1 pueda estar actuando como factor de remodelación de la pared celular en hongos, funcionando de manera similar a las expansinas de las plantas. Sin embargo, aún no está claro cual es el efecto que se genera sobre el polímero de quitina por ScExlx1.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sampedro J, Cosgrove DJ. The expansin superfamily. *Genome Biol.* 2005 Jan; 6(12):242. PMID:16356276
2. Cosgrove DJ. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature.* 2000 Sep 21; 407(6802):321–6. PMID: 11014181
3. Kerff F, Amoroso A, Herman R, Sauvage E, Petrella S, Filée P, et al. Crystal structure and activity of *Bacillus subtilis* YoaJ (EXLX1), a bacterial expansin that promotes root colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Nov 4; 105(44):16876–81. doi: 10.1073/pnas.0809382105 PMID: 18971341
4. Olarte-Lozano M, Mendoza-Nuñez M, Pastor N, Segovia L, Folch-Mallol J, Martínez-Anaya C. PcExl1 a novel acid expansin-like protein from the plant pathogen *Pectobacterium carotovorum*, binds cell walls differently to BsEXLX1. *PLoS One.* 2014 Jan; 9(4):e95638. doi: 10.1371/journal.pone.0095638 PMID: 24755657

RUTAS DE REACCIÓN DE CLORACIÓN Y DE OXIDACIÓN EN LA TRANSFORMACIÓN DE CLOROFENOLES A PRODUCTOS ALIFÁTICOS

Ana María Núñez Gaytán¹, Ricardo Agustín López¹, María Elena Núñez Gaytán¹

¹Departamento de Ciencias Básicas de la Facultad de Ingeniería Química. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.

RESUMEN

En este trabajo se muestra un estudio experimental detallado de los productos iniciales que se forman cuando el fenol a niveles traza (50 y 20 µg/L) es sometido a cloración bajo condiciones parecidas a las que podrían tenerse durante el tratamiento y la distribución del agua potable. El seguimiento de la evolución y transformación del fenol, así como la formación y persistencia de los productos formados se realiza mediante un sistema en línea previamente desarrollado de extracción en fase sólida con la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (EFS-CLAE) usando dos detectores UV y electroquímico durante 5 horas. Este estudio permite además deducir la coexistencia de dos vías reaccionales para la transformación o degradación de los clorofenoles a productos no fenólicos. Una es la ruta de cloración, que consiste en la cloración secuencial del anillo aromático en posiciones "orto-para" hasta formar el 2,4,6-triclorofenol, seguido por la ruptura del anillo aromático hacia la formación de productos alifáticos. La segunda vía es la de oxidación, ésta comienza con la cloración del anillo para formar monoclorofenoles (MCFs): 2-MCF y 4-MCF, los cuáles se oxidan directamente a dihidroxibencenos; estos productos muy reactivos se cloran y oxidan rápidamente a benzoquinonas cloradas que finalmente se degradan a productos alifáticos. En medio neutro y ligeramente alcalino, los monoclorofenoles se forman relativamente rápido y su posterior cloración u oxidación depende fundamentalmente de la dosis de cloro (≤ 5 mg/L) y la fuerza iónica del medio.

1. INTRODUCCIÓN

El cloro reacciona con diversos microcontaminantes orgánicos e inorgánicos presentes en el agua como Fe(II), As(III), NO_2^- , fenoles, pesticidas y fármacos. En la mayoría de estas reacciones, el HOCl es la especie de cloro más reactiva. El tratamiento del agua por cloración proporciona un residual de cloro que, además de desinfectar, puede reaccionar con algunos compuestos orgánicos presentes al nivel de trazas para formar compuestos clorados que permanecen en el agua modificando su sabor y olor [1-2].

El fenol causa problemas en el proceso de desinfección del agua debido a su rápida cloración con el cloro libre disponible que conlleva a la formación de productos policlorados. Algunos de éstos pueden ser tóxicos o cancerígenos y en ocasiones se encuentran en el agua tratada por encima de los niveles de concentración máximos permitidos por los organismos oficiales.

Es sabido que la cloración de los fenoles se efectúa mediante ataque electrofílico del cloro en las posiciones orto y para respecto al grupo -OH. Sin embargo, la naturaleza de los sustituyentes en el anillo aromático y las condiciones del medio afectan la velocidad de reacción, determinando la mayor o menor persistencia de diversos productos clorados. Por eso, es necesario un mejor conocimiento de la transformación química o degradación del fenol y de sus derivados clorados

bajo condiciones que se asimilen a las que pueden encontrarse en las plantas de tratamiento del agua [3]. La determinación de la naturaleza, de la cantidad y de la persistencia de los productos formados es un primer paso indispensable para mejorar las condiciones de operación en los procesos de desinfección del agua, de modo a minimizar la presencia de compuestos nocivos hasta una concentración no peligrosa para los organismos vivos, e incluso lograr su eliminación completa antes de llegar a la red de distribución doméstica.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Los experimentos de cloración se realizaron de acuerdo con el procedimiento siguiente:

1. Se tomó una alícuota apropiada del estándar de cloro (500 mg/L, como Cl_2) y se disolvió en 200 mL del medio de reacción a estudiar (agua pura o amortiguador) para obtener la concentración inicial deseada.

2. Se tomó una alícuota del estándar de fenol (250 μL ó 100 μL del estándar de concentración 40 mg/L) y se puso en un frasco ámbar, se vertieron los 200 mL de la disolución de cloro, mezclando rápidamente e iniciando la cuenta del tiempo de reacción. Inmediatamente se colocó un electrodo indicador de pH en el frasco, ajustándolo apropiadamente, para seguir las variaciones de este parámetro durante la reacción.

3. Después del tiempo de contacto establecido para el experimento en curso (entre 5 y 300 min), se eliminó el cloro residual con 400 μL de la disolución de Na_2SO_3 al 10%.

4. Se acidificó la mezcla de reacción a pH 2 con ácido perclórico concentrado. De esta disolución se tomaron 3 muestras (~50 mL), se filtró y desgasificó cada una para caracterizar los productos formados mediante el método analítico en línea desarrollado de Extracción en Fase Sólida con la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia[4]. Para la determinación de los diclorofenoles y los policlorofenoles (TriCFs, TetraCFs y Pentaclorofenol) fue necesario agregar un volumen adecuado de metanol a las muestras correspondientes para tener 1% y 10% (v/v) de disolvente orgánico, respectivamente.

3. RESULTADOS

La identificación de los clorofenoles específicos formados a partir de la cloración del fenol en diferentes medios y condiciones, así como el seguimiento de su evolución en el tiempo, son indispensables para poder determinar las vías de reacción que conducen hasta su degradación a productos no fenólicos. Como ya se ha mencionado, la cloración del anillo sólo se efectúa en las posiciones “*orto*”-“*para*” con respecto al grupo $-\text{OH}$, generando 5 posibles clorofenoles: 2-CF, 4-CF, 2,4-DCF, 2,6-DCF y 2,4,6-TCF

Se presentan los perfiles de concentración relativa de los clorofenoles formados en función del tiempo, separándolos de acuerdo con la dosis de cloro aplicada. La concentración relativa se refiere al cociente de la concentración molar del clorofenol dividida entre la concentración molar inicial de fenol y se expresa como un porcentaje.

En la Figura 1 se muestran los clorofenoles formados y la evolución de sus perfiles de concentración en el tiempo, obtenidos al aplicar una dosis de cloro de 5 mg/L a soluciones de fenol 0.532 μM en medios amortiguados a diferentes valores de pH y en medio no amortiguado.

La influencia del medio de reacción en la formación y transformación de clorofenoles fue más notoria cuando el dopaje de cloro se redujo cinco veces (14.1 μM) manteniendo la misma concentración inicial de fenol (0.532 μM). La Figura 2 muestra los clorofenoles formados y la evolución de sus perfiles de concentración en el tiempo bajo estas condiciones.

La dosis más baja de cloro, asociada con una menor concentración inicial de fenol ($0.213 \mu\text{M}$), dio como resultado una notable disminución en el rendimiento y variedad de los clorofenoles formados en todos los medios estudiados. Como muestra la Fig.3, los únicos derivados clorados que alcanzaron a formarse en estas condiciones fueron el 2-CF y el 4-CF.

El esquema de reacción propuesto que explica los resultados obtenidos cuando disoluciones acuosas de fenol a niveles traza ($\leq 50 \mu\text{g/L}$) son tratadas con dosis de cloro semejantes a las que se aplican en los procesos de purificación del agua ($\leq 5 \text{ mg/L}$).

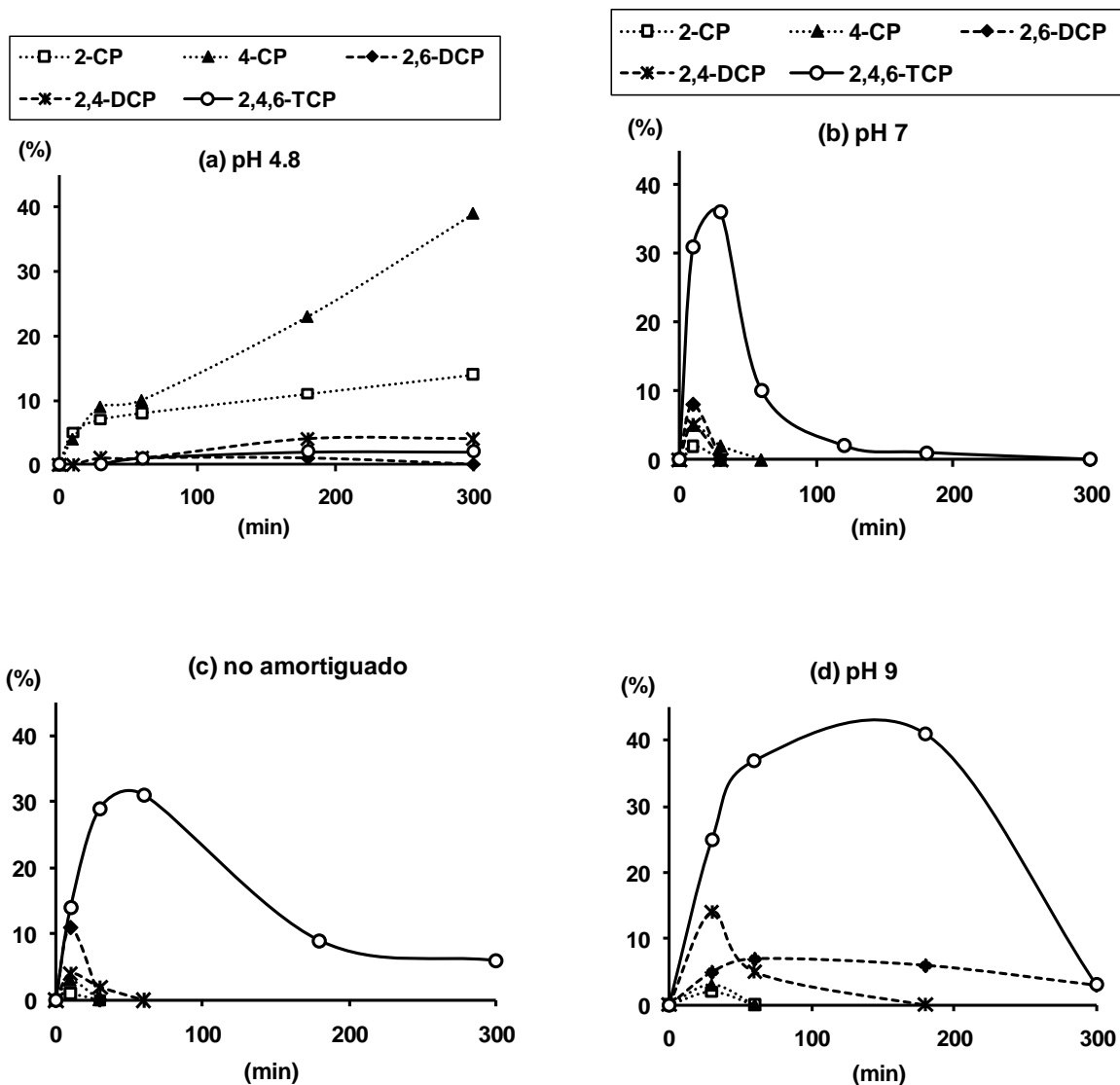


Fig.1. Perfiles de concentración de los clorofenoles formados por cloración del fenol con una dosis alta de cloro. $[\text{fenol}]_0 = 0.532 \mu\text{M}$ ($50 \mu\text{g/L}$), $[\text{cloro}]_0 = 70.5 \mu\text{M}$ (5 mg/L). Las líneas sólo indican tendencia.

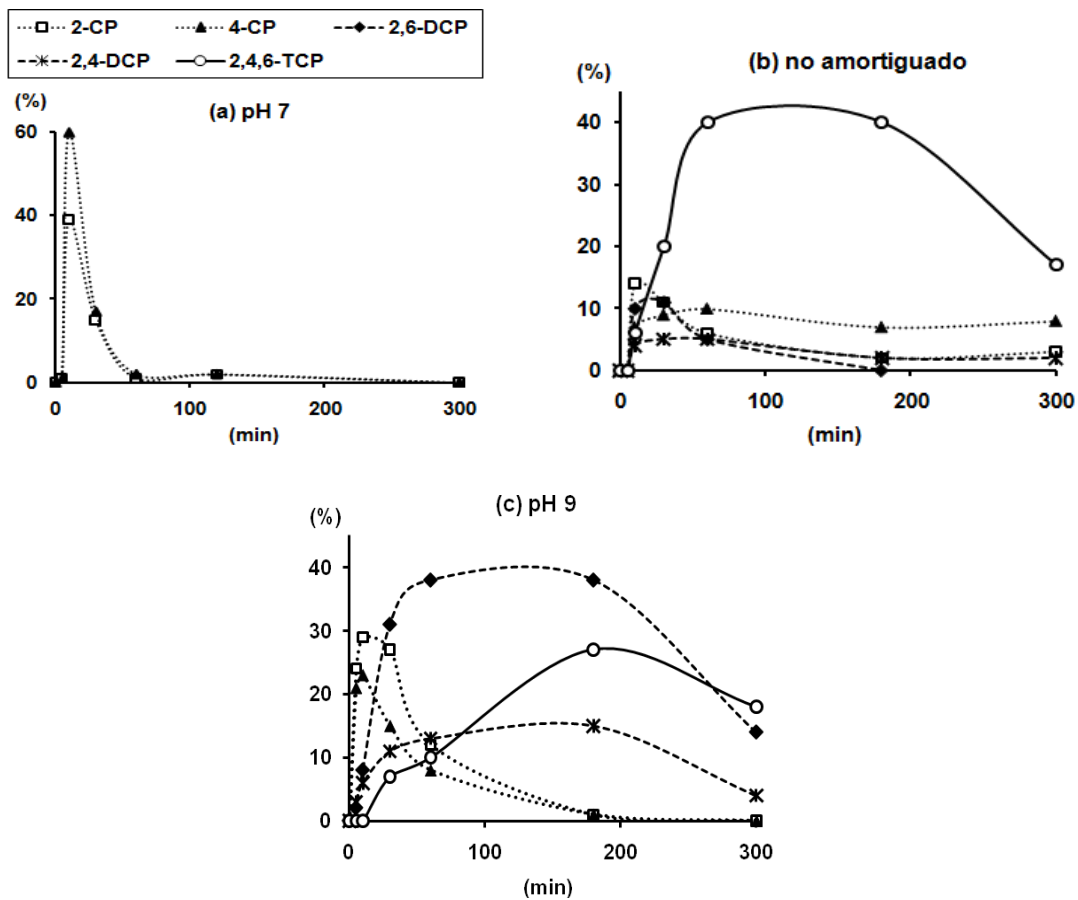
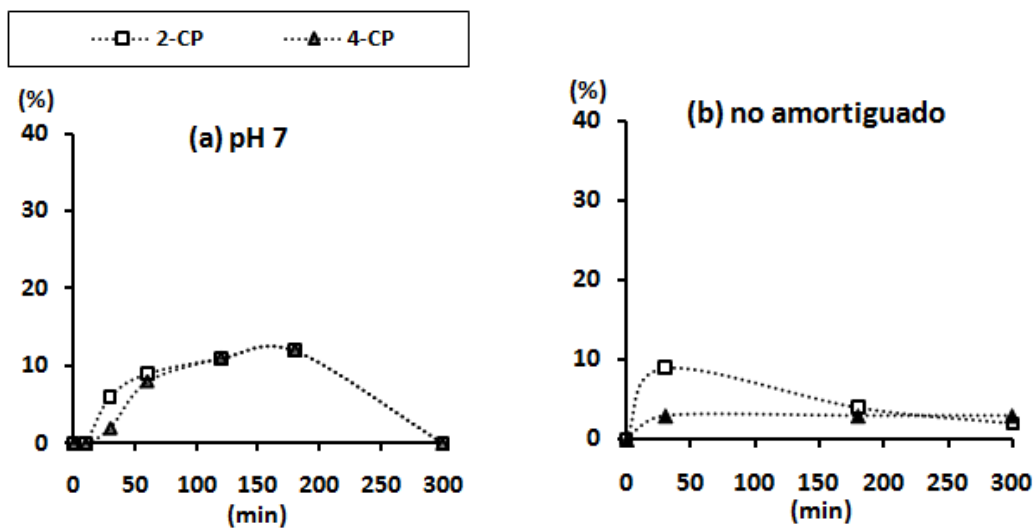


Fig. 2. Perfiles de concentración de los clorofenoles formados por cloración del fenol con una dosis media de cloro. $[\text{fenol}]_0 = 0.532 \mu\text{M}$ ($50 \mu\text{g/L}$), $[\text{cloro}]_0 = 14.5 \mu\text{M}$ (1mg/L). Las líneas sólo indican tendencia.



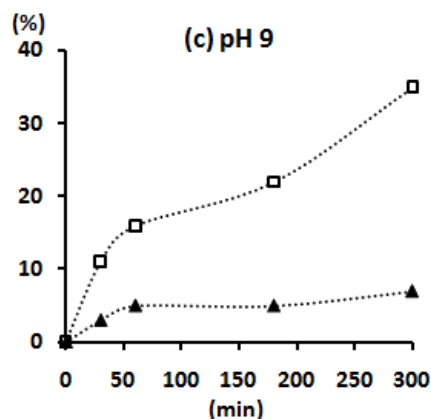
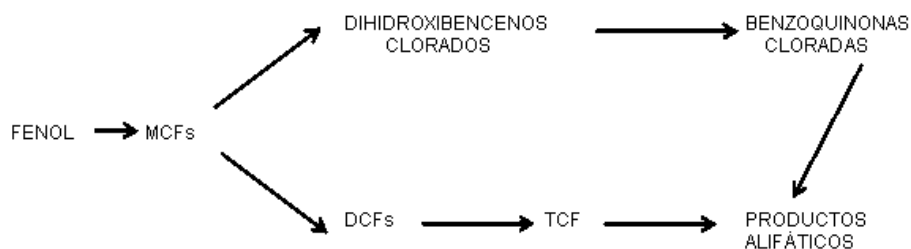


Fig. 3. Perfiles de concentración de los clorofenoles formados por cloración del fenol con una dosis baja de cloro. $[fenol]_0 = 0.213 \mu M$ ($20 \mu g/L$), $[cloro]_0 = 2.82 \mu M$ ($0.2 mg/L$). Las líneas sólo indican tendencia.



4. CONCLUSIONES

1. La especiación y seguimiento cuantitativo de los clorofenoles formados por cloración del fenol en diferentes condiciones (dosis de cloro, pH y fuerza iónica del medio), permitió deducir la coexistencia de dos vías reaccionales para la transformación o degradación de estos compuestos a productos no fenólicos. Una es la vía tradicionalmente reconocida (vía de cloración), que consiste en la cloración secuencial del anillo aromático en posiciones “*orto-para*” hasta formar el 2,4,6-triclorofenol, seguido por una oxidación más o menos lenta para formar benzoquinonas cloradas y una rápida policloración posterior que provoca la ruptura del anillo y la formación de productos alifáticos. La segunda vía (llamada vía de oxidación) no ha sido reportada anteriormente. Ésta comienza también con la cloración del anillo para formar monoclorofenoles (MCFs), los cuales se oxidan directamente a dihidroxiclorados; estos productos muy reactivos se cloran y oxidan rápidamente a benzoquinonas cloradas que finalmente se degradan a productos alifáticos.

2. En presencia de una dosis baja de cloro ($0.2 ppm$), o en medios ligeramente ácidos con dosis de cloro mayores ($1-5 mg/L$), el fenol reacciona muy lentamente y sólo alcanzan a formarse en cantidad apreciable los derivados monoclorados durante el tiempo de reacción estudiado. En medio neutro y ligeramente alcalino, los MCFs se forman relativamente rápido y su posterior cloración u oxidación depende fundamentalmente de la dosis de cloro y la fuerza iónica del medio. Con dosis de cloro altas ($5 mg/L$), la velocidad de las reacciones es similar por lo que la transformación hasta productos no fenólicos ocurre por ambas vías. Al reducir a $1 mg/L$ la dosis de cloro, se pone en evidencia la influencia de otros factores: la cloración es la reacción preferida (más rápida) a fuerza iónica baja o moderada ($<0.05 M$), ya sea en pH neutro o ligeramente

alcalino; la oxidación es francamente predominante en soluciones de alta fuerza iónica (>0.1 M) y pH neutro.

3. La existencia de dos vías reaccionales, cuya predominancia depende de las condiciones de cloración, puede tener importantes implicaciones en otros ámbitos. En efecto, la vía de oxidación es mucho más rápida que la vía de cloración, por lo que representa un atajo en la transformación de compuestos fenólicos nocivos a productos alifáticos menos dañinos.

BIBLIOGRAFÍA

1. R.H. Burttshell, A.A. Rosen, F.M. Middleton, M.B. Ettinger, M.B. *Chlorine derivatives of phenols causing taste and odor*, J. Am. Water Works Assoc., 51 (1959) 205-214.
2. J.J. Rook. *Formation of haloforms during chlorination of natural waters*, Water Treatment Examination, 23 (1974) 234-243.
3. J.P. Croué, J.F. Debroux, G.L. Amy, G.R. Aiken. In: *Formation and Control of Disinfection By-Products in Drinking Water*. Ch. 4, P.C. Singer, Ed., AWWA, Denver, Col, 1999.
4. A.M. Nuñez-Gaytán, L.E. Vera-Avila, M.R. Covarrubias-Herrera, *On-line methodology for the trace level determination of the chlorinated phenol family in water samples*, J. Mex. Chem. Soc., 52 (2008) 185-192.

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROVENIENTES DE AGUAS SUBTERRÁNEAS PARA OBTENCIÓN DE ÓXIDOS DE HIERRO Y MANGANESO

R. Ortega Villar¹, D. Roa-Velazquez¹, B.E. Jaramillo-Loranca¹, M.A. Flores-González¹, C. Coronel-Olivares², C. Lucho-Constantino², M. Villanueva-Ibáñez^{1,*}.

¹Universidad Politécnica de Pachuca, Laboratorio de Nanotecnología y Bioelectromagnetismo Aplicado. ²Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

RESUMEN

La obtención de nanopartículas (NPs) de óxidos de Manganeseo y de Hierro a partir de microorganismos ha generado interés para variadas aplicaciones tecnológicas debido sus condiciones de procedencia. En el presente proyecto se aislaron microorganismos de aguas subterráneas localizadas en el municipio de Apan en el estado de Hidalgo, que se emplearon para la obtención de las partículas. Para su aislamiento se realizó el método de vertido en placa por diluciones seriadas, adicionalmente las placas de cultivo se suplementaron con Fe y Mn con la finalidad de seleccionar aquellos microorganismos resistentes a la presencia de estos metales. Se aislaron un total de nueve bacterias, las cuales se caracterizaron macro y microscópicamente. Para la obtención de las NPs, se obtuvo biomasa y filtrado libre de células proveniente de las bacterias. La síntesis se trabajó a una temperatura de 28 °C, en agitación constante y en presencia de una sal precursora del metal respectivo. Los materiales obtenidos se caracterizaron mediante espectroscopia UV-vis, granulometría láser y Microscopía Electrónica de Barrido evidenciando las cepas capaces de participar en la obtención de los óxidos biogénicos.

1. INTRODUCCIÓN.

El agua es el solvente más abundante del mundo por lo tanto puede involucrar una gran cantidad de materiales al estar en contacto con los terrenos en los cuales circula. El Hierro y el Manganeseo son elementos que se encuentran comúnmente en la tierra pero representan un problema cuando se encuentran de forma abundante en el agua subterránea ya que ocasionan problemas estéticos, dando al agua una apariencia rojiza volviéndola desagradable para su consumo y operacionales, dañando las tuberías [1]. Estos elementos se encuentran de forma soluble en el agua y al oxidarse ya sea al momento de la cloración o al estar en contacto con el oxígeno del aire se precipitan generando un color oscuro provocando los problemas antes mencionados [1].

Es conocido que los microorganismos tienen una gran capacidad para cambiar el estado de oxidación de los materiales [2] generando, entre otros, las bacterias son los microorganismos más abundantes sobre la Tierra, de diferentes tamaños, formas y que viven en ambientes extremos, pH ácido o alcalino, altas o bajas temperaturas, por mencionar algunos ejemplos [4]. Los óxidos de Manganeseo generados biológicamente, las bacterias y hongos que oxidan el Manganeseo (Mn-II) a Mn (IV) son conocidos como microorganismos Mn-oxidantes, los óxidos biogénicos de Mn formados por bacterias oxidantes tienen muchas características específicas, tales como altas áreas superficiales y reactividades específicas y pueden ser utilizados como adsorbentes, catalizadores y oxidantes o reductores [5]. Por otro lado los óxidos de Hierro son una clave versátil de materiales que permiten una amplia gama de tecnologías, la mayoría de éstas depende de sus propiedades y a forma de obtención [6]. De esta forma, en el presente proyecto se llevó a cabo el aislamiento y

caracterización morfológica de microorganismos resistentes a Mn y Fe para posteriormente realizar la biosíntesis de nanopartículas (NPs) de óxidos de estos metales, con potencial para ser aplicados en la remoción de contaminantes del agua.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Los reactivos que se emplearon fueron grado analítico y el medio utilizado para la dilución seriada de aislamiento de microorganismos fue agua peptonada. Como medios de cultivo empleados se tuvo agar nutritivo (agar 15 g/L, caldo nutritivo 8 g/L) y caldo nutritivo (8 g/L). Todo proceso de realizó en condiciones estériles.

Aislamiento de la cepa. Obtenida la muestra se procedió a sembrar en cajas Petri con agar bacteriológico y caldo nutritivo hasta obtener la cepa totalmente aislada. Para la selección se realizaron diluciones seriadas (10-1-10-6) de la muestra en agua peptonada, sembradas en agar nutritivo suplementado con sales de manganeso o de hierro, incubadas a 28°C por 24 horas y resembrando los microorganismos aislados en agar nutritivo a las mismas condiciones para obtener la cepa pura.

Caracterización macro-microscópica de microorganismos. Se realizó después de tener colonias aisladas y sin contaminación, identificando de cada colonia el color, elevación, borde, consistencia y transparencia. La caracterización microscópica se hizo a cada uno de los microorganismos aislados en 20 ml de caldo nutritivo en un matraz Erlenmeyer incubados por 4 horas a 28°C y se realizó la tinción Gram, observando las muestras en microscopio óptico a objetivo de 100X.

Obtención de Biomasa. Se utilizó el medio de cultivo para la producción de biomasa reportado por Zhou H. y col. 2015., el cual contiene 3.0 g de Extracto de Levadura, 5.0 g de Peptona, 5 g de Glucosa, 2.5 g de Cloruro de Sodio (NaCl) para 1 litro de Agua destilada, se ajustó el pH a 7 con hidróxido de Sodio (NaOH) 1 M. Se preparó en matraces Erlenmeyer de capacidad de 500 mL, cada uno con un volumen de operación de 200 mL de medio de cultivo, se inoculó con una asada extraída de la caja Petri que contenía la cepa.

Filtrado libre de células. El filtrado libre de células se llevó a cabo de acuerdo a Filippone y col. en 2014, consistió en centrifugar a 5000 rpm por 15 minutos y después lavar tres veces usando agua estéril. El filtrado se resuspendió en agua estéril por 5 días, transcurridos los 5 días se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos.

Síntesis de Nanopartículas de óxidos biogénicos de Manganeso y de Hierro. Para la síntesis de nanopartículas se ocupó el sobrenadante del paso 3, se le adicionó la sal precursora, Cloruro de Manganeso ($MnCl_2$) de acuerdo a Furgal y col. 2014, se monitoreó un espectrofotómetro UV-visible a 600-620 nm, para las nanopartículas de óxidos biogénicos de hierro se utilizó como sal precursora el Sulfato de Hierro ($FeSO_4$) y se monitoreó en un espectrofotómetro UV-visible a 200-800 nm como lo menciona Periyathambi P. y col. en 2014.

Caracterización de los materiales obtenidos. De acuerdo a Hosseinkhain y col. 2011. La preparación de las muestras consistió en fijar con glutaraldehído 4% por 10 minutos, seguido de la separación de células por centrifugación (5000 rpm por 10 minutos) y se lava 3 veces con agua MilliQ. Finalmente las células fueron re-suspendidas en agua MilliQ, las rejillas se cargaron con 10 μ l de la suspensión y se secaron.

3. RESULTADOS

Se aislaron nueve cepas de la muestra de agua subterránea que crecieron en medios suplementados con las sales de Mn y de Fe. Estas cepas se identificaron de manera microscópica y macroscópica (Figura 1). Al observarlas al microscopio óptico se determinó que todas las bacterias eran Gram negativas (Figura 2). Se identificaron seis bacilos (ROV 61, ROV 19 B, ROV

47, ROV 11 B2, ROV 18 A, ROV 11 B1), dos cocos (ROV 18 B, ROV 97) y un cocobacilo (ROV 15 A).

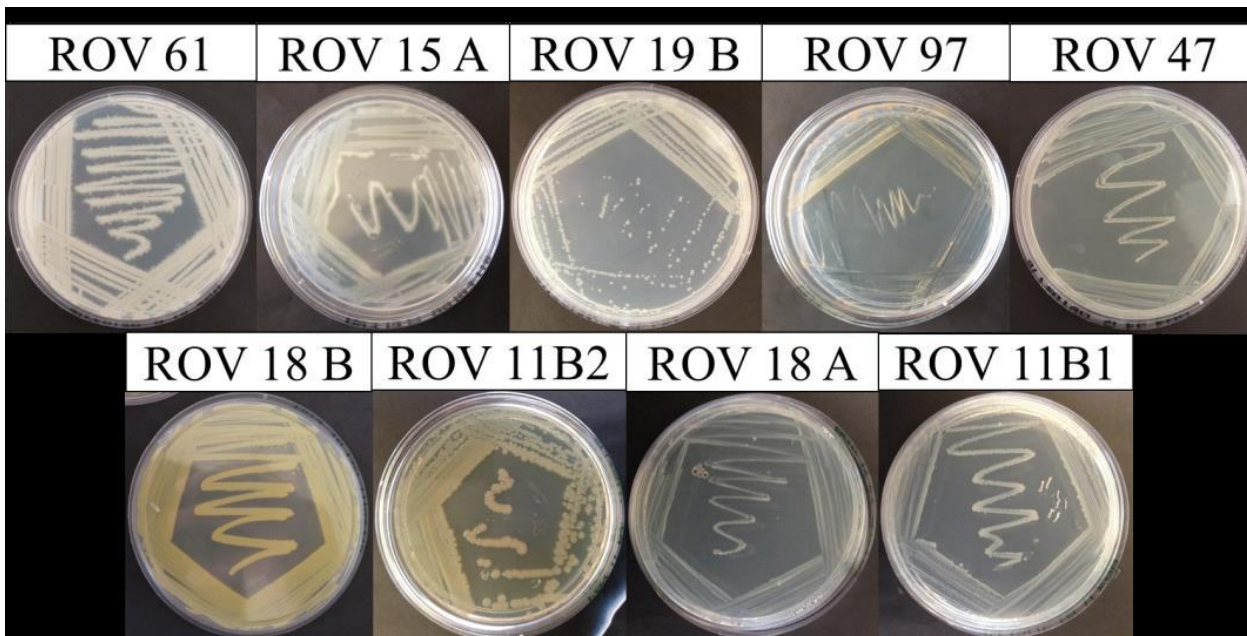


Figura 1. Vista macroscópica de las bacterias aisladas.

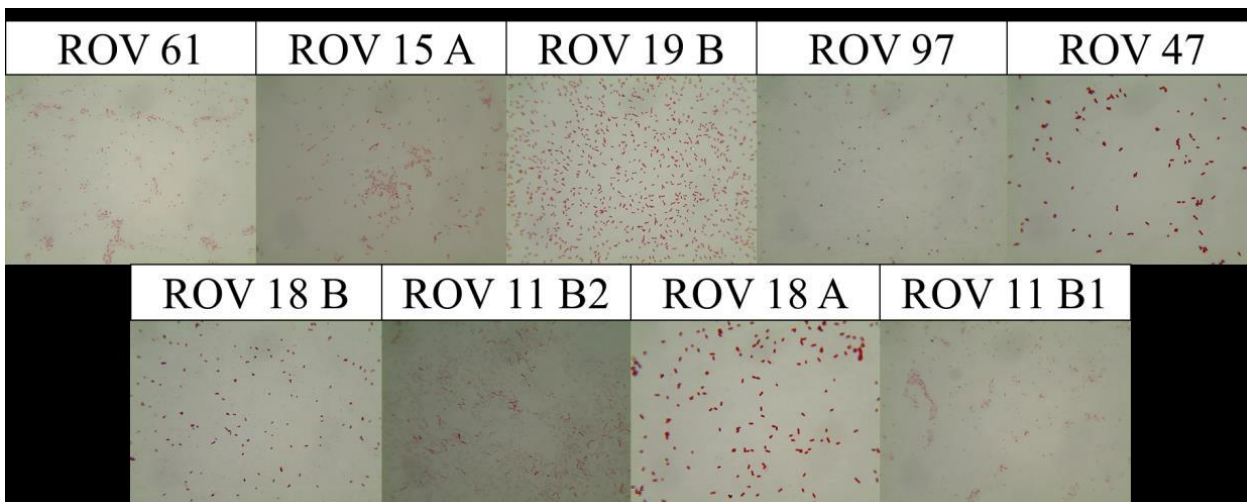


Figura 2. Vista microscópica de las bacterias aisladas (100X).

Al exponer la biomasa y FLC de las bacterias aisladas a las sales precursoras ($MnCl_2$ y $FeSO_4$) se determinó que tres bacterias (ROV 18 A, ROV 15 y ROV 47) llevaron a cabo la biosíntesis de NPs de MnO , tal y como lo evidencia el análisis de espectroscopia UV-vis, mediante la banda de absorción 300-500 nm similar a la reportada por Sinha y col., 2011, que pertenece al material de interés; asimismo, se aprecia la banda alrededor de 260 nm que se asigna a las NPs de óxido de hierro. Cabe mencionar que los viales de síntesis al inicio y a las 120 h de reacción presentaron un

cambio de color característico debido a la amortiguación de las oscilaciones de electrones libres en los óxidos (Figura 3a y b).

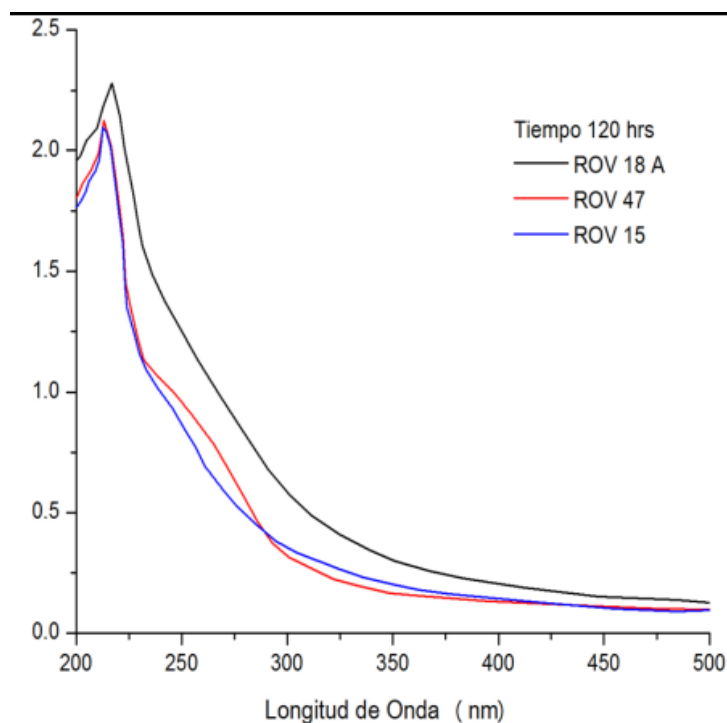
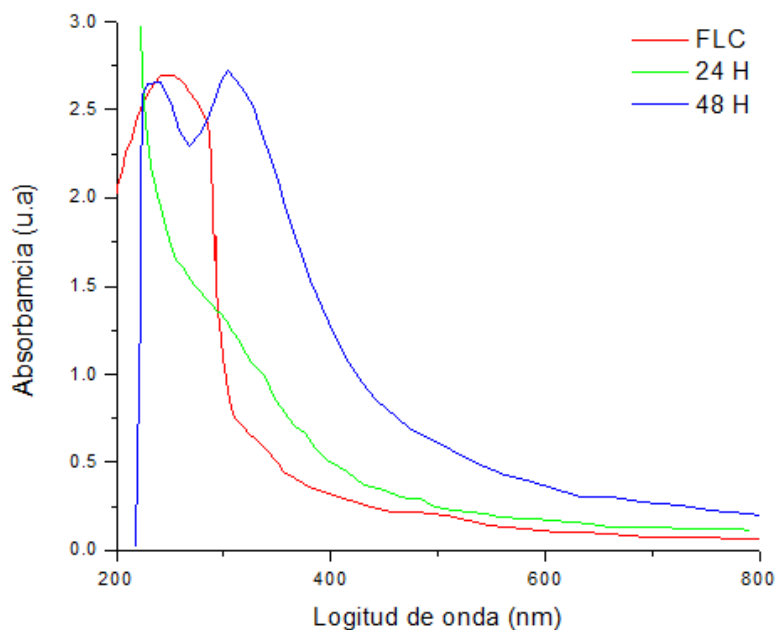


Figura 3. Espectros de absorción UV-vis. a) Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro con el FLC de la bacteria ROV 47; b) síntesis de nanopartículas de óxido de manganeso con el FLC de la obtenido con el FLC de las bacterias ROV 18 A, ROV 15 y ROV 47.

De igual forma, la biosíntesis de las nanopartículas de óxido de hierro con el FLC de las cepas elegidas quedó patente con las observaciones que se realizaron en Microscopia Electrónica de Barrido (Figura 4a y 4b), donde se aprecian partículas dispersas y algunas aglomeradas formando estructuras más grandes. En este caso la banda de absorción UV-vis se presentó entre 300 y 400 nm tal y como lo menciona la literatura.

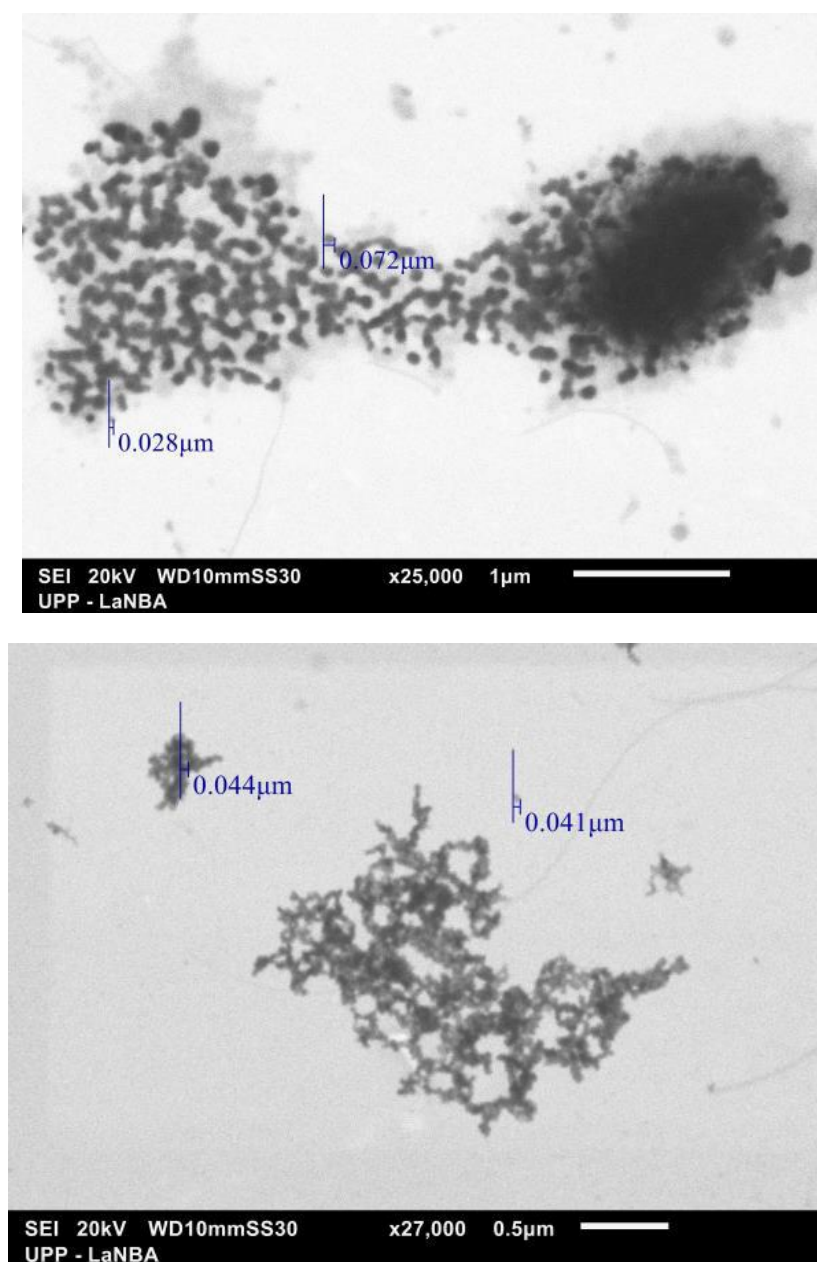


Figura 4. Observaciones en MEB. a) Muestra de nanopartículas de óxido de manganeso y b) muestra de nanopartículas de óxido de hierro. Todas las partículas analizadas fueron obtenidas mediante el FLC.

4. CONCLUSIÓN

A partir de muestras de agua de pozo se lograron aislar y caracterizar micro y macroscópicamente nueve bacterias gram negativas resistentes a sales de manganeso y de hierro. Considerando los análisis de los espectros UV-vis, tres de sus FLCs llevaron a cabo la síntesis de nanopartículas de óxido de manganeso y de hierro. Esta alternativa de biosíntesis de nanopartículas de óxidos con el filtrado libre de células evita la ruptura celular de la biomasa que en muchas ocasiones dificulta el proceso. Las partículas obtenidas tanto de óxido de manganeso como de óxido de hierro presentan tamaños inferiores a 100 nm.

BIBLIOGRAFÍA

1. Seminario Internacional: Visión Integral en el Mejoramiento de la Calidad del Agua (s. f.). [En línea]. Burbano L., Sánchez L. D. Recuperado en: http://objetos.univalle.edu.co/files/Remocion_de_hierro_y_manganeso_por_oxidacion.pdf Consultado el 27 de abril de 2016.
2. CYTED (s. f.). Remoción de Hierro y Manganeso en Fuentes de Agua Subterránea para abastecimiento Público. Red Iberoamericana de Potabilización y Depuración del Agua. Recuperado en: http://tierra.rediris.es/hidrored/ebooks/ripda/pdfs/Capitulo_04.pdf Consultado el 28 de abril de 2016.
3. Hennebel T., De Gusseme B., Boon N., Verstraete W. (December, 2008). Biogenic Metals in Advanced Water Treatment. *Cell Press* Vol. (27): 90-98.
4. Quester K., Avalos-Borja M., Castro-Longoria E. (2013). Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. *Micron*. Vol. (54-55): 1-27.
5. Shaofeng J., Do-Gun k., Jeonghyunk K., Seok-Oh K. (2010). Characterization of the Biogenic Manganese Oxides Produced by *Pseudomonas putida* strain MnB1. *Environmental Engineering Research*. Vol. (4): 183-190.
6. Bharde A., Parikh r., Baidakova M., Jouen s., Hannoyer B., Enoki T., Prasad B., Shouche Y., Ogale S., Sastry M. (2008). Bacteria Mediated Precursor-Dependent Biosynthesis of Superparamagnetic Iron Oxide and Iron Sulfide Nanoparticles. *Langmuir*. Vol. (24): 5787-5794.
7. Zhuo H., Pan H., Xu J., Xu W., Liu L. (2015). Acclimation consortium for efficient Mn (II) oxidation and manganese containing particle production. *Journal of Hazardous Materials*. Vol. (304): 434-440.
8. Filippone A., Sinigaglia M., Ateri C. (2014). Study on bioactivity of cell-filtrate filtrates from dairy propionibacteria. *Anaerobe*. Vol. (30): 137-145.
9. Furgal K. M., Meyer L. R., Bester K. (2014). Removing selected steroid hormones, biocides and pharmaceuticals from water by means of biogenic manganese oxide nanoparticles in situ at ppb levels. *Chemosphere*. Vol. (136): 321-326.
10. Periyathambi P., Vedakumari W. S., Bojja S., Kumar S. B., Sastry T. P. (2014). Green biosynthesis and characterization of fibrin functionalized iron oxide nanoparticles with MRI sensitivity and increased cellular internalization. *Materials Chemistry and Physics*. Vol. (148): 1212-1220.
11. Hosseinkhani B., Emtiazi G. (2011) Synthesis and characterization of novel extracellular biogenic manganese oxide (Bixbyte-like Mn₂O₃) nanoparticle by isolated *Acinetobacter* sp. *Curr Microbiol*. Vol. (63): 300-305.

ELEMENTOS REPETITIVOS BOX PARA LA TIPIFICACIÓN GENÉTICO-MOLECULAR DE CEPAS DE *SALMONELLA ENTERICA* Y SU ASOCIACIÓN CON EL FENOTIPO

Ballesteros-Nova NE¹, Vázquez-Garcidueñas MS², Figueroa-Aguilar GA³, Chávez-Castañeda L³, Vázquez-Marrufo G¹.

1. CMEB, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UMSNH. 2. División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez". UMSNH. 3. LESP de Michoacán.

RESUMEN

La salmonelosis es una enfermedad asociada con la ingestión de alimentos contaminados, generando altas tasas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. La combinación de métodos de tipificación genética con técnicas de tipificación fenotípica se ha aplicado con éxito en estudios epidemiológico-moleculares para determinar mecanismos de dispersión de especies/cepas de relevancia en salud pública. En este trabajo se determinó el serotipo, la resistencia a antibióticos y los patrones genéticos de BOX-PCR de 130 cepas de *Salmonella enterica* aisladas durante 2013-2014 de alimentos en Michoacán, buscando posibles relaciones entre genotipo y fenotipo. Se identificaron 33 serotipos, siendo los más frecuentes Anatum (n=23), Agona (n=18), Enteritidis (n=14), Typhimurium (n=11) y Serogroup B (n=8). En relación a años anteriores se observa un cambio en el serotipo más prevalente (Typhimurium a Anatum) y la aparición del serotipo Enteritidis en el grupo mayoritario. Las resistencias más prevalentes fueron hacia sulfa trimetoprim (45/130), ampicilina (30/130), ampicilina con sulbactam (16/130) y moxifloxacina (10/130), con un 7% (9/130) de cepas multi-resistentes. Una cepa del serotipo Typhimurium presentó resistencia a ceftriaxona, cefalosporina de tercera generación de importancia clínica. Los patrones BOX-PCR permitieron calcular el valor de similitud (S) entre las cepas mediante el algoritmo Dice y el dendrograma generado mediante el criterio UPGMA agrupó a todas las cepas de *S. Typhimurium*, presentando 4 grupos principales con 68 genotipos a un corte de similitud de 90%. No se observó relación entre el genotipo BOX-PCR con el serotipo o los perfiles de resistencia de las cepas.

1. INTRODUCCIÓN

La salmonelosis no tifoidea es una enfermedad transmitida por alimentos (ETA) y está relacionada con el consumo de alimentos y agua contaminados con heces (WHO, 2008). Se estiman 93.8 millones de casos de gastroenteritis causada por *Salmonella* no tifoidea cada año en el mundo, 80.3 millones son causados por alimentos, con un estimado de 155,000 muertes anualmente (Majowicz *et al.*, 2010). En México se presentaron durante el 2014 un aproximado de 87,230 casos de salmonelosis en el país, según datos de la Secretaría de Salud.

El género *Salmonella* comprende a las especies *S. bongori* y *S. enterica*, reconociéndose seis subespecies de esta última (Tindall *et al.*, 2005), entre las cuales se encuentra a la subespecie *enterica*, que incluye al 99% de los serotipos que causan enfermedad en el ser humano y en los animales de sangre caliente (Hurley *et al.*, 2014).

La salmonelosis es una enfermedad que ha sido reportada durante décadas, sin embargo, dicho padecimiento se considera emergente debido a que en diversas partes del mundo se ha vuelto más frecuente (Velge *et al.*, 2005). La combinación de técnicas fenotípicas y genotípicas en los

estudios epidemiológicos de enfermedades gastrointestinales ocasionadas por *Salmonella enterica* ha sido esencial tras la ocurrencia de brotes en distintas regiones geográficas relacionados con cepas provenientes de alimentos de origen animal, y con características fenotípicas y genotípicas particulares. Diversos factores han sido enumerados para que la salmonelosis, junto con otras enfermedades infecto-contagiosas, represente aún un riesgo para la salud y sea considerada como enfermedad emergente por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2002). Entre estos factores se encuentran la globalización en la comercialización de alimentos y la introducción accidental de patógenos en nuevas áreas geográficas. También se han considerado los cambios asociados a las poblaciones microbianas, lo que permite que surjan cepas más virulentas y con resistencia a antibióticos o con la capacidad de sobrevivir a condiciones adversas (Bochner *et al.*, 2008; Joerger *et al.*, 2009). Otros factores importantes son la movilidad internacional de personas expuestas a patógenos, los cambios en la población humana, incluyendo modificaciones en la edad de la población, la alimentación deficiente y otras enfermedades como las infecciones por VIH, que ocasionan una mayor susceptibilidad a infecciones por *S. enterica* y otras bacterias patógenas (Feasey *et al.*, 2012). En el caso de los países en vías de desarrollo como México, los niños con alimentación deficiente son una población más susceptible a las enfermedades transmitidas por alimentos. Los cambios en el estilo de vida son otro factor que favorece la transmisión de salmonelosis por alimentos, debido al incremento en el consumo de comida rápida en lugares con condiciones de higiene deficientes (Feasey *et al.*, 2012).

En México existen escasos estudios epidemiológico-moleculares sobre cepas de *S. enterica* aisladas de alimentos y su importancia en la salud pública. Siendo en general los únicos datos epidemiológicos existentes, información fenotípica de rutina como el serotipo y el perfil de resistencia a antibióticos obtenida por la Secretaría de Salud con sus programas de vigilancia sanitaria. La información fenotípica es útil para identificar la identidad de las bacterias de forma rápida, pero no nos permite determinar la dispersión clonal de las cepas y su relación filogenética, por lo que la información epidemiológica molecular se vuelve indispensable al existir cepas altamente clonales de *Salmonella enterica* (Harbottle *et al.*, 2006). El estudio de la incidencia de genotipos, su distribución geográfica y su asociación con características fenotípicas, ha sido ya aplicado con éxito para el análisis epidemiológico de brotes ocasionados por *S. enterica* en distintas partes del mundo (Egorova *et al.*, 2008; Le Hello *et al.*, 2011; Hauser *et al.*, 2010).

En México, este tipo de estudios sería útil para generar una base de datos de utilidad en programas de vigilancia epidemiológica, lo que ayudaría en el diseño de estrategias de prevención y control. Además, se podría brindar información sobre los patrones de distribución de genotipos y fenotipos con el fin de obtener perfiles de riesgo. El objetivo general de este trabajo es establecer las relaciones genéticas entre cepas de *Salmonella enterica* y encontrar asociaciones entre genotipo y fenotipo en la población analizada. El estudio también nos permitirá obtener patrones de distribución espacial y temporal de los diferentes genotipos y fenotipos encontrados y correlacionarlos con la zona geográfica y el alimento de origen del aislado.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con 130 cepas de *S. enterica* aisladas de alimentos en el estado de Michoacán del 2013-2014 por el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Michoacán (LESPM). Todos los aislados están perfectamente identificados por fecha de aislamiento, lugar de procedencia y tipo de producto alimenticio de donde fueron aislados.

Análisis fenotípico

La determinación del serotipo se realizó mediante el esquema de Kauffman White por el LESP. Los patrones de resistencia a antibióticos de los aislados obtenidos se generaron empleando el método de Kirby-Bauer, siguiendo los estándares y guías de interpretación establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2006, 2007).

Análisis genotípico

Para evaluar la estructura clonal de la población se utilizó la técnica de huella genética denominada BOX-PCR (Versalovic *et al.*, 1991; Koeuth *et al.*, 1995).

Aislamiento de ADN

La extracción de ADN de los aislados bacterianos obtenidos se realizó mediante el protocolo de fenol-cloroformo (Sambrook y Russell, 2001) partiendo de cultivos en medio líquido.

Ensayo BOX-PCR

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 12 μ L y contienen: buffer 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8.4, KCl 50 mM), $MgCl_2$ 1.5 mM, 0.2 mM de cada deoxinucleótido (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 50 pmol del iniciador BOX A1R: CTACGGCAAGGCGCTGACG, 2 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen, USA) y 50 ng de ADN templado. Las condiciones de amplificación que se utilizaron para este ensayo fueron: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, 30 ciclos a 94 °C por 1 min, 59 °C por 1 min y 65 °C por 8 min, con una extensión final de 16 min (modificado de Oliveira *et al.*, 2007), en un Termociclador Corbett research CG1-96 (USA).

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % a 60 V/cm. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (1.5 μ /mL) y se visualizaron bajo luz UV en un transiluminador ChemiDoc (Biorad, USA). El tamaño de los amplicones se determinó por comparación con un marcador de peso molecular de ADN (1Kb *plus ladder* de Invitrogen).

Análisis de los patrones de bandeo

Para la captura de las imágenes de los geles con los patrones de amplificación obtenidos se utilizó la versión 4.5 del software "Quantity One" (Biorad, USA) para la detección de bandas, permitiendo un 5 % de tolerancia. Una vez definidas las bandas de amplificación, el software permite la generación de curvas densitométricas para cada uno de los carriles del gel, una vez que se ha completado el análisis densitométrico se genera una matriz binaria de 1 y 0 para cada uno de los ensayos BOX-PCR.

Elaboración de Dendogramas

A partir del código binario obtenido en los diferentes ensayos, se generó un dendograma utilizando el software PAST (Hammer, 2008). Con dicho paquete se calcularon las distancias genéticas mediante el algoritmo de Dice y se generó un patrón de agrupamiento mediante el criterio UPGMA (Lim *et al.*, 2005). Se consideró una similitud genética mínima del 95 % para asignar un aislado dentro de un genotipo.

3. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Entre los aislados obtenidos se identificaron un total de 33 serotipos, siendo los más frecuentes Anatum (n=23), Agona (n=18), Enteritidis (n=14), Typhimurium (n=11) y Serogroup B (n=8). Las cepas presentaron resistencia más frecuente a sulfa trimetoprim (45/130), ampicilina (30/130), ampicilina con sulbactam (16/130) y moxifloxacina (10/130). Los resultados mostraron una prevalencia de 7% (9/130) de cepas multi-resistentes, las cuales incluyeron a los serotipos Agona, Anatum, Enteritidis, Typhimurium y Saint Paul. La cepa multi-resistente 409 (Typhimurium), aislada de muestras de chorizo de la ciudad de Morelia, presentó resistencia a ceftriaxona (CRO), cefalosporina de tercera generación. De los patrones de amplificación mediante PCR obtenidos del elemento BOX se generaron matrices binarias (1, 0) a partir de las cuales se calculó el valor de similitud (S) entre las cepas mediante el algoritmo de Dice, construyendo de los valores obtenidos un patrón de agrupamiento mediante el criterio UPGMA. El dendograma que incluyó 95 cepas

presentó 3 grupos principales con 68 genotipos a un corte de similitud de 90%. Tanto en este dendrograma, como en el que se incluyó sólo cepas de los serotipos mayoritarios, todas las cepas de *S. Typhimurium* quedan agrupadas, también se observó el agrupamiento de las cepas no serotificables. En relación a años anteriores se observa un cambio en el serotipo más prevalente (*Typhimurium* a *Anatum*) y la aparición del serotipo *Enteritidis* en el grupo mayoritario, las causas de dichos patrones de prevalencia están por determinarse. La resistencia a CRO es de relevancia en salud pública, ya que es el tratamiento de elección en caso de salmonelosis sistémicas en niños, y puede ser transferida a través del plásmido CMY-2 que porta una β -lactamasa.

BIBLIOGRAFIA

1. WHO, "Foodborne disease outbreaks: guidelines for investigation and control" (Geneva, World Health Organization, 2008).
2. S. E. Majowicz, J. Musto, E. Scallan, F. J. Angulo, M. Kirk *et al.*, "The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis", *Clin. Infect. Dis.*, Vol. 15, 50(6), 2010, pp. 882-889.
3. B. J. Tindall, P. A. D. Grimont, G. M. Garrity, J. P. Euzéby, "Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Vol. 55, 2005, pp. 521-524.
4. D. Hurley, M .P. McCusker, S. Fanning, M. Martins, "*Salmonella*-host interactions - modulation of the host innate immune system", *Front. Immunol.*, Vol. 7, 5, 2014, pp. 481.
5. P. Velge, A. Cloeckert, P. Barrow, "Emergence of *Salmonella* epidemics: the problems related to *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* and multiple antibiotic resistance in other major serotypes", *Vet. Res.*, Vol. 36, 2005, pp. 267-288.
6. WHO, "Foodborne diseases, emerging" (Geneva, World Health Organization. 2002).
7. B. R. Bochner, L. Giovannetti, C. Viti, "Important discoveries from analysing bacterial phenotypes", *Mol. Microbiol.*, Vol. 70, 2, 2008, pp. 274-280.
8. R. D. Joerger, C. A. Sartori, K. E. Kniel, "Comparison of Genetic and Physiological Properties of *Salmonella enterica* Isolates from Chickens Reveals One Major Difference Between Serovar Kentucky and Other Serovars: Response to Acid", *Foodborne Pathog. Dis.*, Vol. 6, 4, 2009, pp. 503-512.
9. N. A. Feasey, G. Dougan, R. A. Kingsley, R. S. Heyderman, M. A. Gordon, "Invasive nontyphoidal *Salmonella* disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa", *Lancet.*, 379, 9835, 2012, pp. 2489-2499.
10. H. Harbottle, D. G. White, P. F. McDermott, R. D. Walker, S. Zhao, "Comparison of Multilocus Sequence Typing, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and Antimicrobial Susceptibility Typing for Characterization of *Salmonella enterica* Serotype Newport Isolates" *J. Clin. Microbiol.*, 44(7), 2006, pp. 2449-2457.
11. S. Egorova, M. Timinouni, M. Demartin, S. A. Granier, J. M. Whichard, V. Sangal, *et al.*, "Ceftriaxone-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport, France. *Emerg. Infect. Dis.*, Vol. 14, 6, 2008, pp. 954-957.
12. S. Le Hello, R. S. Hendriksen, B. Boublert, I. Fisher, E. Moller Nielsen, J. M. Whichard *et al.*, "International spread of an epidemic population of *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 resistant to ciprofloxacin", *J. Infect. Dis.*, vol. 204, 2011, pp. 675-684.
13. E. Hauser, E. Tietze, R. Helmuth, E. Junker, K. Blank, R. *et al.*, "Pork Contaminated with *Salmonella enterica* Serovar 4,[5],12:i:-, an Emerging Health Risk for Humans", *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 76, 14, 2010, pp. 4601-4610.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Analysis and presentation of cumulative antimicrobial susceptibility test data. 2nd ed. Approved guideline M39-A2. Wayne, PA: CLSI, 2006.

15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informational supplement. CLSI document M100-S17. Wayne, PA: CLSI, 2007.
16. J. Versalovic, T. Koueth, J. R. Lupski, "Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes", *J. Nucleic. Acids.*, Vol. 19, 1991, pp. 6823-6831.
17. T. Koueth, J. Versalovic, J. R. Lupski, "Diferencial subsequence conversation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria", *Genome R.*, Vol. 5, 1995, pp. 408-418.
18. J. Sambrook and D.W. Russell, "Molecular cloning: a laboratory manual" (New York, Cold Spring, USA, 2001).
19. S. D. Oliveira, M. C. Bessa, L. R. Santos, M. R. Cardoso, A. Brandelli *et al.*, "Phenotypic and Genotypic characterization of *Salmonella* Enteritidis isolates", *Braz. J. Microbio.*, Vol. 38, 2007, pp. 720-728.
20. O. Hammer, D.A.T. Harper, P.D. Ryan, "PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*", Vol. 4, 2001, pp. 1-9. Available from: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
21. B. W. Liu, B. Liu, X. N. Zhu, Y. J. Shui, S. M. Xian, "Diversity of *Salmonella* isolates using serotyping and multilocus sequence typing", *Food Microbiol.*, Vol. 28, 6, 2011, pp. 1182-1189.

ACTIVIDAD ANTIULCEROSA DE UN COMPUESTO DE AZUFRE DERIVADO DEL 2-AMINOBENZIMIDAZOL

Bautista Ramírez María Esther¹, Gómez y Gómez Yolanda¹, Balderas López Abraham², Cruz Alejandro²,

Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Departamento de Bioprocesos¹, Departamento de Ciencias Básicas².

RESUMEN

La presencia de ácido es un factor fundamental en la patogénesis de las úlceras gástricas y duodenales, muchos factores se relacionan con este padecimiento como es la presencia *H. pilory* y la disminución de la producción de moco y prostaglandinas, dando como resultado gastritis, úlceras pépticas y duodenales, reflujo gastroesofágico y síndrome de Zollinger-ellison. Una serie de benzimidazoles presentan actividad como potentes inhibidores de la bomba *H⁺K⁺ATPasa* tales como el omeprazol, lanzoprasol, rabeprazol, pantoprazol y esomeprazol teniendo una significancia clínica en el tratamiento de las úlceras por lo que es importante el estudio de nuevas moléculas más potentes, por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antiulcerogénica de un compuesto derivado del benzimidazol. La actividad antiulcerativa fue realizada en ratas hembras albinas de la cepa Wistar n=5, utilizando el modelo ulcerativo inducido por agentes necrosantes (etanol) administrando por vía oral 150 mg/Kg del compuesto **1** (fig.1) y ranitidina, donde el control sin protección presentó en promedio úlceras de 2.3 cm, utilizando la ranitidina presentaron úlceras de 0.055 cm y el compuesto derivado del benzimidazol presentaron úlceras de 0.75 mm, donde se observa una protección del compuesto probado comparado con el control sin protección pero menor al presentado por la ranitidina.

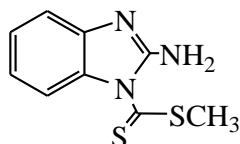


Fig.1. Compuesto 1

1. INTRODUCCIÓN

La secreción de ácido gástrico H^+ es una función compleja y continua en la que contribuyen múltiples factores centrales y periféricos. Los factores neuronales (acetilcolina, ACh), parácrinos (histamina) y endócrinos (gastrina) regulan la secreción de ácido (fig.2) sus receptores específicos (M_3 , H_2 y CCK_2) se encuentran en la membrana basolateral de las células parietales en el cuerpo y el fondo del estómago. Algunos de estos receptores están presentes en las células enterocromafines (ECL) donde regulan la liberación de histamina. El receptor H_2 es un receptor que activa la vía G_5 -adenilato ciclasa-AMPC-PKA. La acetilcolina y la gastrina señalizan a través de receptores que acoplan la vía Gq -PLC- IP_3 - Ca^{2+} en las células parietales. En estas, el AMPC y la vía

dependiente del Ca^{2+} activan la $\text{H}^+\text{K}^+\text{ATPasa}$ (la bomba de protones) que intercambia iones de hidrógeno y potasio a través de la membrana de la célula parietal (Goodman)

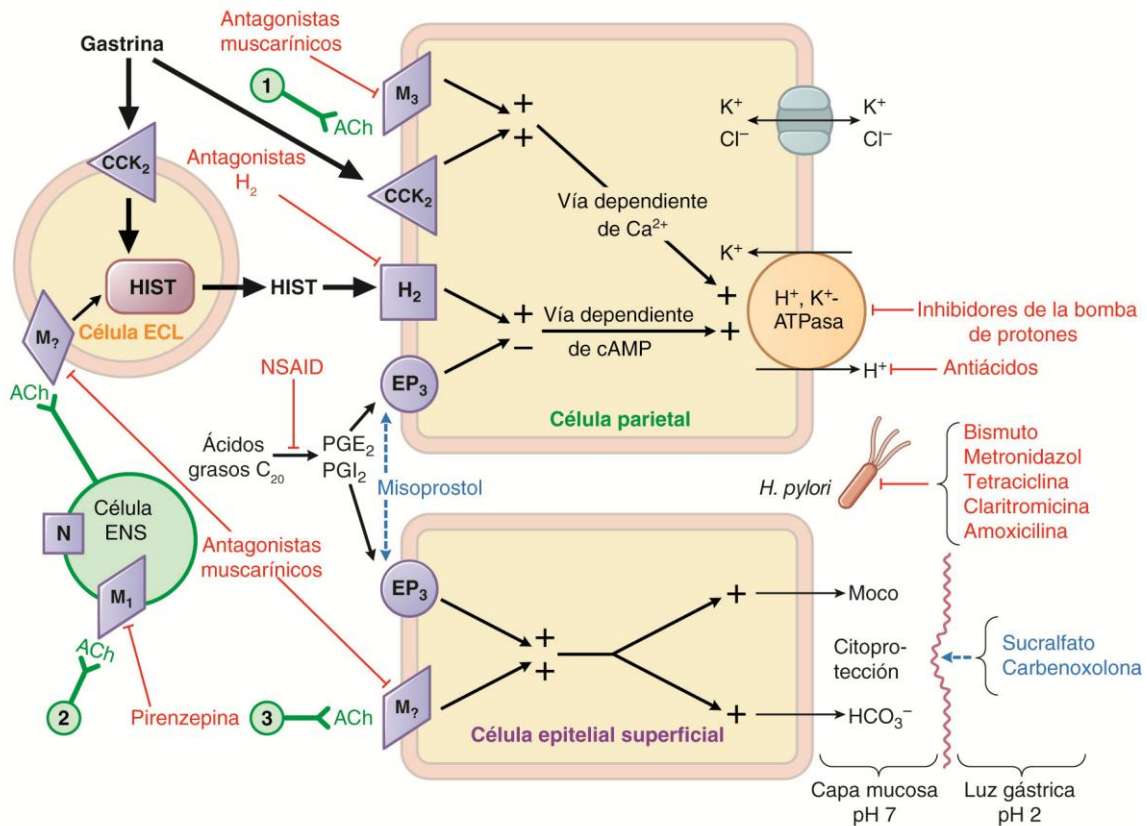


Fig. 2. Regulación fisiológica y farmacológica de la secreción gástrica

La presencia de ácido es un factor fundamental en la patogénesis de las úlceras gástricas y duodenales, muchos factores se relacionan con este padecimiento como es la presencia de *H.pilory* y la disminución de la producción de moco y prostaglandinas dando como resultado gastritis, úlceras pépticas y duodenales, reflujo gastroesofágico y síndrome de Zollinger-ellison.

El tratamiento de las úlceras está enfocado en la reducción de los factores que dañan la mucosa y aumentar los que protegen el estómago y el duodeno. Entre los que se encuentran los inhibidores de la bomba de protones derivados del benzimidazol el descubrimiento de los benzimidazoles como inhibidores de la bomba de protones se debe a Sachs y Hirschowitz en 1960. Se dispone de 6 inhibidores de la bomba de protones para uso clínico: omeprazol, esomeprazol, lanzoprazol, dexlanzaprazol, rabeprazol y pantoprazol (fig.X). Estos fármacos tienen diferentes sustituciones en sus grupos de piridina y benzimidazol pero son notablemente similares en sus propiedades farmacológicas (A.Patil, 2008).

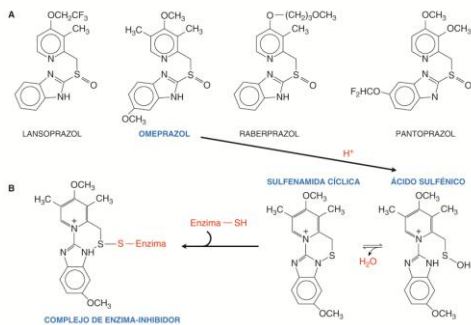


Fig. 3. Inhibidores de la bomba de protones

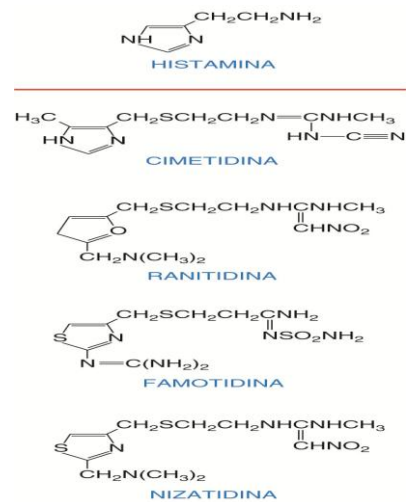


Fig. 4. Histamina y antagonistas del receptor H_2

Otros fármacos importantes para el control de la secreción de H^+ son los antagonistas del receptor H_2 , la descripción del bloqueo selectivo del receptor H_2 de la histamina fue un avance clave en el tratamiento de la enfermedad ácida péptica (Black, 1993) se dispone de 4 antagonistas de los receptores H_2 : cimetidina, ranitidina, famotidina y nizatidina (fig. X).

Orsetti (1998) sintetizó una serie de análogos de la ranitidina que contienen la molécula del benzimidazol que mostraron tener actividad para bloquear *in vivo* e *in vitro* el receptor H_2 . (fig. X)

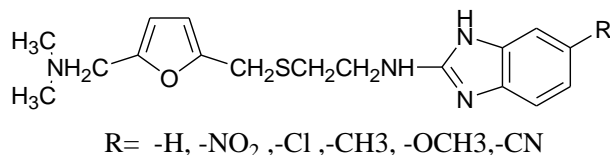


Fig. 5. Análogos de la ranitidina que contienen benzimidazol

Por lo anterior se determinó la actividad antiulcerogénica de un compuesto de azufre derivado del 2-aminobenzimidazol (fig.1) en un modelo para determinar el efecto gastroprotector induciendo el daño con etanol al 95%.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Metodología para la determinación de la actividad gastroprotectora.

Determinación del efecto gastroprotector induciendo el daño por etanol al 96%.

El método consiste en utilizar ratas hembras de la cepa Wistar blanca con un peso de 200 ± 50 g, en ayuno previo con agua por 18 horas antes del experimento. Los animales fueron pesados, marcados y distribuidos en 4 grupos de 5 ratas c/u como se muestra en la tabla 1, a los cuales se les administró el compuesto por vía oral (V.O.) a una dosis de 150 mg/kg.

Tabla 1. Distribución de grupos experimentales para el efecto gastroprotector.

Grupo	Tratamiento (n=5)	Dosis (mg/kg)
1	Compuesto 1	150
2	Ranitidina	150
3	Control negativo (agua)	1 ml
4	Control positivo (etanol al 96%).	1 ml

Las ratas fueron sacrificadas en una cámara de éter etílico e inmediatamente se les efectuó la extracción del estómago que fue abierto por la curvatura mayor y se observó macroscópicamente el aspecto de la mucosa gástrica y se cuantificó la presencia de úlceras midiendo con un vernier su tamaño (A. Saravia 2005).

3. RESULTADOS

Los resultados reportados en la tabla 2 y fig. 6 indican que el compuesto derivado del benzimidazol presenta una disminución en el tamaño de las úlceras (0.75 mm) en el modelo utilizado comparado con el tamaño de las úlceras presentadas cuando no hay protección (2.3 cm) pero si se utiliza la ranitidina las úlceras son aún más pequeñas (0.055 cm) por lo que el compuesto 1 ejerce el 50% de protección al disminuir el tamaño de las úlceras, es importante determinar otros parámetros que indiquen la disminución de la producción de H⁺ en el estómago y determinar si se trata de un antagonista H₂ o un inhibidor de la bomba de protones o solamente actúa como un citoprotector. El porcentaje de inhibición respecto al índice de ulceración del grupo control se calculó como sigue:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{P \text{ media del grupo control} - P \text{ media del grupo patrón}}{P \text{ media del grupo control}} \times 100$$

Donde:

P = Puntaje obtenido en la evaluación macroscópica según la escala de Lacroix & Guillaume

Tabla 2. Tamaño de las úlceras presentadas

Grupo	Tamaño de las úlceras (cm)	% de Inhibición
1	0.75±0.025	75
2	0.055± 0.011	50
3	1.1±0.1	0
4	2.3±0.4	0

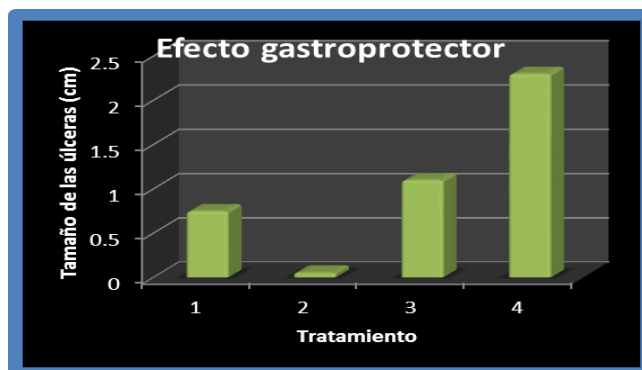


Fig. 6 Efecto gastroprotector en los diferentes tratamiento

En la fig.7 se muestran los estómagos de las ratas con los diferentes tratamientos.

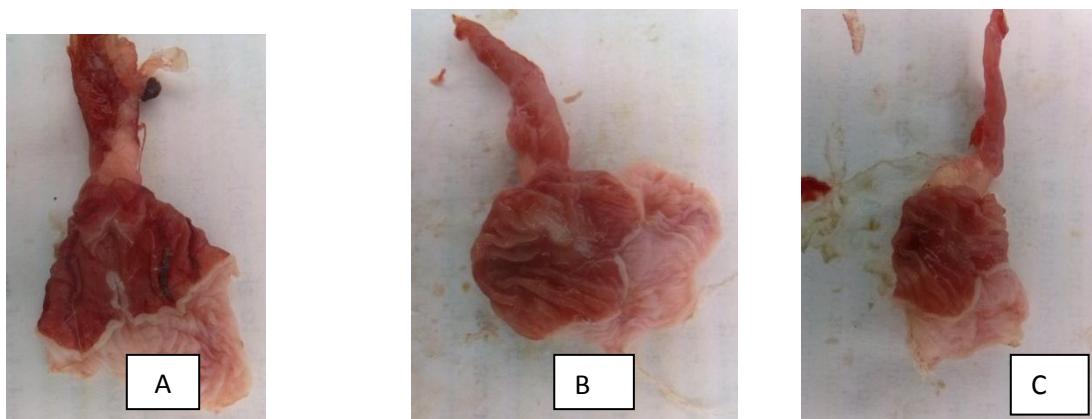


Fig.7 Úlceras presentes en los estómagos de las ratas Winstar . Donde A) Estómago tratado con etanol al 96%. B) Estómago tratado con el compuesto 1 (150 mg/Kg) y C) Estómago tratado con Ranitidina (150 mg/Kg)

4. CONCLUSIONES

El compuesto 1 presentó un 50% de protección para presentar úlceras en el estómago de la rata en el modelo utilizado, induciendo la formación de úlceras con etanol al 96%. Es importante realizar otros estudios para demostrar el mecanismo por el cual se induce la protección.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. Patil, S. Ganguly, S. Surana, "A systematic review of benzimidazole derivatives as an antiulcer agent", Rasayan J.Chem, Vol. 1, 3, 2008, pp. 447-460.

2. A. Saravia, "Manual de ensayos toxicológicos y farmacológicos experimentales *in vivo e in vitro*", editorial universitaria, Universidad de San Carlos de Guatemala 2005. pp 478.
3. L. Brunton, B. Chabner, B. Knollman, "Goodman and Gilman", Las bases farmacológicas de la terapéutica (Mc Graw Hill, México, 2011), capítulo 45, pp.1309-1321.
4. M. Orsetti, L. Oggero, "New Ranitidine analogues containing the 2-aminobenzimidazole moiety: in vivo and in vitro histamine H2-receptor blocking activity", Agents and Actions, Vol 24, 1998, pp 109-113.

LA COMPOSTA, VERMICOMPOSTA ESTIERCOL DE BOVINO EN LA RETENCIÓN DE HUMEDAD DEL SUELO

Alicia de Luna Vega, María Luisa García Sahagún, Eduardo Rodríguez Guzmán, Enrique Pimienta Barrios, Cecilia Jiménez Plascencia

Universidad de Guadalajara

1. INTRODUCCIÓN

El mejorar y conservar las condiciones físicas, químicas y biológicas de un suelo, constituyen la base de su productividad agrícola, dependiendo en gran parte de la presencia o no de materia orgánica, la composta y la vermicomposta son un aliado en la conservación de la humedad del suelo. El composteo es una forma importante de reciclar elementos orgánicos residuales de la agricultura y la ganadería. Una de las principales tecnologías es el uso de composta que el productor puede elaborar en su unidad de producción, utilizando los materiales de que dispone localmente. Los abonos orgánicos producen efectos benéficos a los cultivos, dependiendo de la naturaleza del abono, características del suelo, tipo de cultivo, periodicidad de la aplicación y cantidad del abono, entre otros. Por otra parte los fertilizantes químicos solo mejoran las propiedades químicas del suelo, que los coloca en desventaja sobre los orgánicos, desde el punto de vista del mantenimiento de las propiedades físicas del suelo. Para la recuperación de los suelos y la inocuidad de nuestros alimentos, la composta es el mejor abono que el hombre puede hacer y consiste en seguir el ejemplo de la naturaleza: a través de microorganismos (bacterias, virus, hongos, algas) y macroorganismos (hormigas, escarabajos, gusanos, lombrices, etc.), se lograra la revitalización de los residuos orgánicos para convertirlos en composta (De Luna y Vázquez, 2009).

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de los abonos orgánicos aplicados en condiciones controladas, sobre la retención de humedad de un suelo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó de febrero a julio de 2015 en el campo experimental así como en el laboratorio de Agromicrobiología del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara. Se ubica en el predio Las Agujas, municipio de Zapopan, Jalisco, localizado en la región centro del estado, en las coordenadas extremas de 20°25'30" a 20°57'00" de latitud norte y 103°19'30" a 103°39'20" de longitud oeste, a una altura de 1,548 metros sobre el nivel del mar.

La elaboración de la composta se realizó utilizando 50 kg de estiércol de bovino, 50 kg de residuos de vegetales, 500 g de levadura para pan y 500 g de azúcar, estos ingredientes se pusieron a fermentar durante 21 días, la preparación consistió en construir un "montón" a partir de capas paralelas de cada uno de los materiales, se aplicó el agua y la mezcla de melaza y levadura para humedecer sin provocar escurrimiento.

En los primeros tres días se mezcló el montón por la mañana y por la tarde y a partir del cuarto día, se combinó una sola vez. Finalmente, entre los 12 y 15 días el abono fermentado logró su maduración, su temperatura fue igual a la ambiental, adquiriendo un color gris claro, estaba seco y de consistencia suelta después se hicieron análisis, tomando el parámetro físico que consistió en la capacidad de absorción de agua.

Se evaluaron cuatro tratamientos con cuatro repeticiones. La determinación de la capacidad de absorción de agua se realizó en una maceta con capacidad de 300 ml según el manual de Fisher *et al.* (2003); se colocó sobre una palangana. La maceta se rellenó del sustrato hasta la marca (250 ml) dejándola caer varias veces para comprimir y rellenando nuevamente hasta la marca, una vez nivelado el sustrato se pesó (peso seco), se agregó agua a la palangana hasta una altura poco menor a la altura de la maceta, se retiró la maceta una vez que la superficie del sustrato se observaba ligeramente cubierta de agua, se dejó escurrir toda el agua de la maceta y posteriormente se pesó (peso húmedo). Al final para determinar la capacidad de absorción de agua se aplicó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Abs} = \text{ml agua} / \text{Volumen de la maceta} * 100$$

Dónde: ml de agua= (peso húmedo) – (peso seco)

Fue un diseño completamente al azar con siete tratamientos con cuatro repeticiones, donde los tratamientos consistieron en la inclusión de los abonos orgánicos; composta (C), vermicomposta (V) y estiércol fresco de bovino (EF), cada uno en dosis de 20 y 30 ton/ha, el testigo con suelo sin abono (T).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante los primeros riegos, los tratamientos de vermicomposta registraron una mayor capacidad para conservar la humedad en el suelo. En general, todos los tratamientos con abono orgánico, registraron una menor evaporación de agua en el suelo, con marcadas diferencias por tipo y dosis de abono, habiéndose observado que estadísticamente, los tratamientos con vermicomposta, propiciaron una fuerte disminución en la evaporación de la humedad del suelo, al registrar una diferencia altamente significativa con ahorros de agua, superiores al 35%. En el volumen acumulado de siete riegos, los tres tratamientos con vermicomposta, registraron los requerimientos más bajos de agua, y a mayor dosis, menos agua se tuvo que aplicar. Los tratamientos con 20 y 30 t ha⁻¹ de estiércol de bovino, presentaron poca diferencia a los de composta y vermicomposta, y por el contrario, los tratamientos sin abono orgánico fueron los que mayor evaporación permitieron, seguidos del tratamiento con 20 t ha⁻¹ de estiércol. El coeficiente de variación fue menor al 8%. El uso de composta y vermicomposta en dosis de 20 y 30 t ha⁻¹, es significativamente más efectiva para conservar la humedad en el suelo (De Luna *et al.*, 2014). La composta, presentó una marcada tendencia a disminuir la evaporación, conforme se aumentó la dosis, registrando hasta un 9% de ahorro en el requerimiento de agua. El uso de los estiércoles de bovino fresco, no registró en general, tendencia de variación en los requerimientos de agua. Velocidad de infiltración 36 segundos y capilaridad 9.36 %. Esta propiedad consiste en que el sustrato tenga la capacidad de absorber agua a través de los microporos y de transportarla en todas las direcciones. Cuando el sustrato no tiene capilaridad, el agua se mueve verticalmente a través del perfil del mismo, llegando rápidamente al drenaje y dejando zonas secas en las cuales no se pueden desarrollar las raíces (Cadahia, 2005).

4. CONCLUSIONES

Los tratamientos con composta y vermicomposta, presentaron la mejor opción, para la conservación de la humedad en el suelo, al propiciar la retención de hasta un 25% más de agua que los demás abonos. El estiércol de bovino, en dosis de 20 y 30 t ha⁻¹ es otra alternativa para conservar la humedad en el suelo.

LITERATURA CITADA

1. Abad, M., Fornes, F., Mendoza-Hernández, D. y García de la Fuente, R. 2008. Actas de Horticultura 53:17-31.
2. Alexander, M. 1996. Introduction to soil microbiology. John Wiley and sons. USA. p.p.455.
3. Ansorena, J., Batalla, E., Merino, D. y Moreno, A. 2012. El compost de biorresiduos como componente de sustratos. Horticultura N° 300: 42-47.
4. Ansorena, J., Batalla, E. y Merino, D. 2014. Propiedades fisicoquímicas del compost de residuos de alimentos y su empleo como componente de sustratos. XI Jornadas de la SECH. Zizurkil, 25-27 jun.
5. Bures, S. 1997. Sustratos, Ediciones Agrotécnicas F.L., Madrid España, pp. 342.
6. U.S. Composting Council. 2001. Test methods for the examination of composting and compost, USDA-Compost Council.
7. Cadahia, C. 2005. Fertirrigación. Cultivos hortícolas, frutales y ornamentales, Tercera edición, Ediciones Mundi-Prensa, España, pp. 301-322.
8. Chamani, E.; Joyce, D. C. and Reihanytabar, A. 2008. Vermicompost effects on the growth and flowering of *Petunia hybrida* 'Dream Neon Rose'. American- Eurasian J. Agric. Environ. Sci. 3:506-512.
9. Dalzel, H.W. 1991. Manejo del suelo. Producción y uso del compost en ambientes tropicales y subtropicales, Boletín de Suelos de la FAO, No. 56, Roma Italia, pp. 18-20.
10. De Luna, V.A. y E.A. Vázquez. 2009. Elaboración de abonos orgánicos, Segunda edición, Universidad de Guadalajara, México, pp. 86.
11. De Luna V. A.: García S.M.L.: Rodríguez G. E.: Pimienta B. E. 2014 Calidad agronómica de composta con residuos de cítricos Ciencias Naturales y Agropecuarias pp 420- 430
12. Fischer P., 2003, Manual de prácticas del curso: Uso y manejo de compostas para sustratos de plántulas de hortalizas y ornamentales, Universidad de Guadalajara, Guadalajara Jalisco, México, pp. 69.
13. Instituto Nacional de Normalización. 2005. Norma chilena oficial para el control de la calidad de compostas (NCh-2880.Of2004), Decreto exento no. 89, Chile.
14. Labrador, M.J. 2002. La materia orgánica en los agroecosistemas, Segunda Edición, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid España, pp. 174.
15. Lampkin, N. 1998. Agricultura ecológica, Gestión de los estiércoles y residuos orgánicos, Ediciones Mundi Prensa, México D.F., pp. 85-104.
16. Nieto, G.A. 2002. La composta. Importancia, elaboración y uso agrícola, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz B.C.S., México, pp. 86.
17. Reyes, C.P. 1999. Diseño de experimentos aplicados, Editorial Trillas, Tercera edición, pp. 122-128
18. Rosas, R.A. 2007. Agricultura orgánica práctica, Quinta Edición, Grupo Agrovereda, Bogota Colombia, pp. 193-196.
19. Stoffella, J.P. y A.B. Kahn. 2005. La utilización de compost en los sistemas de cultivo hortícola, Mundi-Prensa, Madrid España, pp. 397.
20. Ulloa, H.; García, M.; Pérez, A.; Meulenert, A.; Ávila, D. 2011. Clima y Radiación Solar en las Grandes Ciudades: Zona Metropolitana de Guadalajara.

FRECUENCIA DE NEOPLASIAS EN CANINOS DOMÉSTICOS EN LA CIUDAD DE SANTIAGO DE QUERÉTARO.

Paola Aranda-Vargas¹, María Guerrero-Carrillo¹, Sonia Vázquez-Flores², Araceli Aguilera-Barreyro¹, Tercia Reis de Souza¹, José Gómez-Soto¹.

¹ Universidad Autónoma de Querétaro, ² ITESM Campus Querétaro.

RESUMEN

Durante los últimos años, en la práctica veterinaria en pequeñas especies, ha sido notoria la visita de caninos con problemas de neoplasias en distintas regiones corporales, por lo tanto, ha sido necesario recurrir a estudios histopatológicos para la tipificación de las lesiones y determinar el pronóstico del paciente. Las neoplasias se definen como masas anormales de tejido, de crecimiento tisular descontrolado, exagerado, que no está coordinado con el tejido de origen y persiste de manera excesiva aún tras finalizar el estímulo que lo inicio. Todas las células neoplásicas poseen cambios a nivel genómico debido a factores físicos, químicos o biológicos que tienen la capacidad de dañar al ADN de las células expuestas. En el presente trabajo se evaluaron histopatológicamente 88 casos, de los cuales 79 correspondieron a lesiones neoplásicas, seis fueron procesos inflamatorios y cuatro fueron eliminados del proyecto por problemas con su conservación. De los 79 diagnósticos neoplásicos, 52 pertenecieron a hembras (65.8%) y 27 a machos (34.1%); 41 fueron benignas (51.8%) y 38 malignas (48.1%). El promedio de edad de los animales estudiados fue de 8.8 años. El órgano con mayor presencia de neoplasias fue la piel con 40 casos (50.63%), seguido por glándula mamaria con un total de 23 casos (29.11%) y 16 casos (20.25%) implicando otros órganos. Dentro de los diagnósticos más frecuentes están en primer lugar el tumor de células basales (8.8%), mastocitoma (6.3%), adenocarcinoma sólido (5.0%), carcinoma mixto (5.0%), melanoma (5.0%) y fibroma (5.0%). Con respecto a las razas afectadas, las ocurrentes involucran al French Poodle (15.18%), Schnauzer (11.39%), Boxer (7.59%), Labrador (7.59%) y Mestizo (6.32%).

Palabras clave: Neoplasia, caninos, piel, glándula mamaria.

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de la clínica de pequeñas especies, una de las causas más frecuentes de la visita médica es la identificación de neoplasias. Los especialistas requieren tipificar dichas masas, razón por la cual se recurre al estudio histopatológico para poder tener un diagnóstico, pronóstico y tratamientos más certeros a seguir. Los factores medioambientales pueden participar de manera directa o indirecta en la aparición de neoplasias en los caninos, lo que ha obligado a realizar estudios epidemiológicos para generar asociaciones directas (Sánchez y Trejo, 2006).

La palabra neoplasia significa “crecimiento nuevo” y se puede definir como una masa anormal de tejido, la cual tiene un crecimiento tisular descontrolado, no acorde con el tejido de origen, persistiendo de manera excesiva sin importar el estímulo que lo inició (Trigo y Valero, 2002).

Todas las células neoplásicas presentan una alteración a nivel de su genoma, lo que implica que exista un crecimiento anormal siendo una característica de todas estas, no importando su estirpe

embrionaria y su etiología (Trigo y Valero, 2002; García *et al.* 2013). Esta inestabilidad genómica se puede presentar en distintos tipos de neoplasias, desde lesiones precancerosas hasta un cáncer avanzado, ya que dichas alteraciones en el genoma se produce en casi un 90% de las neoplasias malignas (Karras *et al.*, 2014). Se ha comprobado que existe alteración directamente en los genes que tienen como función controlar el crecimiento celular de los procesos tumorales, mediante la inducción o mantenimiento de dichas células. Estos se clasifican como oncogenes y se conocen más de 100 variedades, de entre los cuales se pueden nombrar a los proto-oncogenes y antioncogenes. Los proto-oncogenes son aquellos que tienen como función estimular el crecimiento y diferenciación normal de las células y los antioncogenes genes supresores) que regulan o controlan el crecimiento normal celular y cuando existe ausencia de los mismos, no hay forma de controlar el crecimiento neoplásico (Meuten 2002; Trigo y Valero, 2002). Para que estos cambios se den a nivel de genoma, se han detectado muchos agentes que pueden producir daño y dar como consecuencia una neoplasia. Los agentes carcinogénicos pueden dividirse en: a) carcinógenos químicos (alimentos, hormonas y vacunas), b) energía radiante (luz ultravioleta y energía ionizante) y c) microorganismos oncogénicos principalmente de tipo viral (Trigo y Valero, 2002).

En México existen pocos estudios que identifiquen las neoplasias más frecuentes que afectan a los caninos domésticos y en específico en la Ciudad de Santiago de Querétaro, Querétaro, no se encontró información al respecto.

OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar la frecuencia, tipificación y posibles factores medioambientales que predisponen la presentación de neoplasias benignas y malignas en perros domésticos pertenecientes a la ciudad de Santiago de Querétaro de los casos que se recibieron durante un año en la Facultad de Ciencias Naturales, de la UAQ.

Objetivos específicos

- a) Identificar y caracterizar por sus características morfológicas, las principales neoplasias mediante estudios histopatológicos que padecen los caninos de la ciudad de Santiago de Querétaro en un periodo.
- b) Correlacionar las condiciones medioambientales y de dieta que permiten la diferenciación de estos tumores por su entorno.
- c) Analizar si la aparición de tumores tiene una relación con el género y edad del canino de donde proviene la masa tumoral.
- d) Identificar la relación que existe entre la aparición de neoplasias con respecto a la raza de los caninos.
- e) Relacionar la aparición de masas tumorales con las regiones anatómicas afectadas y de ese modo, identificar órganos con mayor afección.

2. METODOLOGIA

Para el desarrollo de este proyecto, se realizó una colección de masas neoplásicas, obtenidas quirúrgicamente de pacientes caninos o de pacientes finados al momento de realizar la necropsia. El muestreo comprendió el periodo de enero del 2013 a diciembre del 2014.

Obtención de muestras

Las muestras fueron obtenidas de los casos que se remitieron al Laboratorio de Histopatología Veterinaria y al Hospital Veterinario de Especialidades en Pequeñas Especies (HVEPE) de la Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia (LMVZ) de la Facultad de Ciencias Naturales (FCN), de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ).

Del mismo modo, se solicitó apoyo a Médicos Veterinarios a cargo de Clínicas Veterinarias particulares, entregándoseles frascos de vidrio etiquetados, con formol al 10% para el manejo correspondiente de las muestras.

Durante este proyecto, no se tuvo contacto con los pacientes, únicamente se recibieron muestras y se conto con la información provista por los clínicos.

Datos demográficos de los animales muestreados

Los animales a los cuales se les extirpó la masa son provenientes de la ciudad de Santiago de Querétaro, en el estado de Querétaro.

A la recepción de las muestras, se llenó un formato el cual involucra el nombre del médico a cargo y los datos generales del paciente tales como sexo, edad, raza, localización anatómica, historia clínica, antecedentes previos de neoplasias, estilo de vida y medio ambiente (involucra alimentación y hábitat), tamaño de la masa, tiempo de evolución, consistencia y diagnóstico.

Procesamiento de las muestras

Se procedió al registro de las mismas en la bitácora del laboratorio de Histopatología de la Facultad de Ciencias Naturales, de la Universidad Autónoma de Querétaro, asignándosele número de caso de proyecto. Se midieron las neoplasias con un vernier digital, tomando en cuenta el diámetro (en caso de masas que fueron completamente redondas), longitud, anchura y profundidad de la masa. Todas las neoplasias fueron fotografiadas al momento de la medición. Posteriormente se procedió a realizar un corte semifino, obteniendo una porción representativa de la masa, la cual se conservó en formol al 10% hasta el momento que inicio su proceso histopatológico. Posterior al corte, la pieza fue deshidratada, aclarada, incluida en parafina en un procesador de tejidos marca Leica modelo TP1020. Se realizó la inclusión en parafina a 62° de fusión, formando bloques sólidos. Una vez conformados los bloques se continuó con el proceso de corte en micrótopo de parafina Leica RM 2145, a 5 μm de espesor para tinción (Prophet *et al.*, 1995).

Tinciones y observación al microscopio

Todas las muestras fueron teñidas con Hematoxilina y Eosina (HE) para su posterior análisis con el microscopio Axiostar Plus, marca KARL ZEISS (Prophet *et al.*, 1995). Las fotografías se obtuvieron con un Fotomicroscopio modelo Axio VertA1, marca Karl Zeiss, con cámara AxioCam1Cc1 y el software Axio Vision LE64.

En casos específicos, se realizaron tinciones especiales para determinar diagnóstico final. Las tinciones utilizadas fueron la Tricrómica de Masson para la identificación de tejido conjuntivo y muscular y la de azul de Toluidina para la identificación de células cebadas en corte fino de 3 μm (Prophet *et al.*, 1995).

Criterios para tipificación de las neoplasias

Para la determinación del tipo neoplasia; benigna o maligna se usaron criterios como: pleomorfismo nuclear y celular, relación núcleo citoplasma, hiperromatismo nuclear así como mitosis típicas y atípicas (Trigo y Valero, 2002; McGavin y Zachary, 2007).

Análisis estadístico

El análisis de resultados se realizó mediante el software Excel (Microsoft 10) y JMP versión 11.0, para obtener datos estadísticos y de evaluación demográfica mediante pruebas paramétricas que involucran frecuencias de género, edad, consulta clínica, antecedentes, región anatómica, condición reproductiva (esterilizado y sin esterilizar), hábitat y alimento. Las diferentes pruebas estadísticas utilizadas fueron para corroborar que los resultados no fueran obtenidos al azar, no obstante en algunos casos el número de casos no era suficiente para identificar diferencias. Se usaron pruebas como: T de Student, ANOVA y Wilcoxon. Las pruebas no paramétricas se utilizaron para medición de la masa en longitud, anchura, profundidad y diámetro dado que no presentaban una distribución normal observándose diferencias entre género con pruebas estadísticas de Tukey y HSU's MCB. En todos los casos se estimó el intervalo de confianza en 95% para identificar la probabilidad.

3. RESULTADOS

La recopilación de datos y obtención de diagnósticos, de un total de 88 casos remitidos, se clasificó en: 79 correspondieron a lesiones neoplásicas, cinco a afecciones de tipo inflamatorio y cuatro fueron eliminados del proyecto por ser muestras dañadas por manejo. El análisis de datos de las muestras de tipo neoplásico, se determinó que el 55.6 % (44 /79) corresponden a neoplasias benignas y el 44.3% (35/79) fueron malignas. Con respecto al género, 52 muestras pertenecieron a hembras (65.8%) y 27 a machos (34.1%). La edad se clasificó en tres rangos: 0 a 4 años donde se contabilizaron 7 neoplasias benignas; 5 a 10 años, en el cual se registraron 23 neoplasias benignas y 22 malignas; y animales mayores de 11 años, en los cuales se obtuvieron 14 neoplasias benignas y 12 malignas. La edad promedio de aparición de tumores de manera genérica fue de 8.8 años.

La relación entre raza y la presentación de neoplasias indicó que: Poodle (15.8%), Schnauzer (11.39%), Boxer (7.59%), Labrador (7.59%), Mestizo (6.32%) y Fox Terrier (6.32%), fueron las razas con neoplasias más frecuentes, siendo el Poodle el que tiene mayor número de tumores malignos, seguido del mestizo, mientras que el Schnauzer, Boxer y Labrador poseen mayor número de neoplasias de tipo benigno.

Con respecto a las regiones anatómicas mayormente afectadas por crecimiento neoplásico en machos, la región de la cabeza, miembros locomotores y región lumbosacra a nivel de piel y tejido subcutáneo poseen mayor afección, mientras que en las hembras; la glándula mamaria, es el órgano mayormente afectado involucrando cadena mamaria completa (torácicas craneal y caudal, abdominales craneal y caudal e inguinales) y en forma aislada, las inguinales y las torácicas.

Se evaluó la condición reproductiva de los caninos, siendo más vulnerables a neoplasias animales enteros. Se analizó la causa principal por la que el propietario acude a diagnóstico clínico, encontrándose la aparición de la masa como factor de consulta médica. En su mayoría (81%), los caninos involucrados en este estudio no presentaron antecedentes previos de neoplasias.

Al evaluar el manejo alimenticio por parte de los propietarios hacia los caninos, se concluyó que la mayor parte de la población es alimentada con productos procesados, sin embargo los machos aparentemente son excluidos del alimento casero. Continuando con el manejo con respecto al hábitat, se relacionó el género con las condiciones del hábitat, dividiéndolo en interiores (perros que viven en el interior del domicilio), exteriores (perros que viven en patios y/o jardines) y hábitat combinado (interiores y exteriores). Se identificó que las hembras que viven en interiores tienen una mayor frecuencia de presentación de neoplasias (40%) en comparación con hembras y machos que viven en exteriores o ambientes combinados. Entre los diagnósticos que presentaron las hembras de interiores se encuentran el adenoma papilar, carcinoma mixto, carcinoma papilar sin calcificación, carcinoma simple sólido, leiomioma, lipoma y mastocitoma. El medio ambiente combinado es el que obtuvo el segundo lugar en cuanto a presentación de neoplasias (19%) y el melanoma, el cual es una neoplasia maligna relacionada con la exposición de rayos UV, está

presente en esta clasificación. Las hembras que pasan todo el tiempo en patios y jardines (14%), son la menor proporción de la población femenina y presentaron únicamente fibromas. El comportamiento de las neoplasias en los machos tiene una tendencia más homogénea, sin embargo en machos que viven en interiores (11%), la neoplasia que destaca es el tumor de glándulas sebáceas. El resto de las neoplasias se mantienen en tendencias similares e involucran al carcinoma de células basales, leiomioma, lipoma, épulis fibromatoso, tricoepitelioma, plasmocitoma, tumor de células basales y tumor de células de Sertoli. El tiempo de evolución de desarrollo de la masa fue similar por género. La longitud de las tumoraciones fue diferente entre machos (33.9 ± 24.4 mm) y hembras (56.7 ± 46 mm) (Hsu's MCB valor $p < 0.05$). En relación con los diagnósticos obtenidos, las neoplasias de piel y tejido subcutáneo son más frecuentes con 40 casos registrados (50.6%), mientras que en glándula mamaria se identificaron 23 (29.1%). El resto de los diagnósticos corresponden a otro tipo de estructuras (20.25%).

Con respecto a los diagnósticos presentes en piel y en tejido subcutáneo, las de mayor ocurrencia involucran al tumor de células basales (8.8%), mastocitoma (6.3%), melanoma (5.0%) y fibroma (5.0); con respecto a las neoplasias de glándula mamaria, el adenocarcinoma fue el más frecuente (5.0%), seguido del carcinoma mixto (5.0%), carcinoma simple sólido (3.7%) y adenoma de glándula mamaria (3.7%).

4. DISCUSIÓN

El análisis de datos corresponde a muestras de tipo neoplásico, donde se determinó que el 5% (44/79) corresponden a neoplasias benignas y el 48.1% (52/79) fueron malignas. Estos valores no coinciden con lo reportado por De Vivero *et al.* (2013), en Perú, donde determinaron que las neoplasias malignas fueron más frecuentes ($64.9 \pm 2\%$) en relación a las benignas ($35.08 \pm 3\%$).

Con respecto al género, 52 muestras pertenecen a hembras (65.8%) y 27 a machos (34.1%). De acuerdo a García *et al.* (2013), quien realizó un estudio retrospectivo de neoplasias caninas en el estado de Jalisco, reportaron que de una población total de 1318 animales, el 65.1% correspondieron a hembras y 34.9% a machos, dichos datos son muy parecidos a los obtenidos en el presente trabajo. De igual manera, en el estudio realizado en Uruguay por Elgue *et al.* (2012), donde evaluaron distintas presentaciones de cáncer en caninos, existió una mayor ocurrencia en hembras (70.6%) con respecto a los machos (29.4%).

La edad promedio en la cual los caninos son afectados de manera general fue de 8.8 años y el rango de mayor ocurrencia de neoplasia abarca de los 5 a los 10 años, teniendo mayor número de neoplasias tanto benignas como malignas. Seguido de este rango, los animales mayores de 11 años de igual manera, presentan ambos tipos de tumores. García *et al.* (2013), documentaron que el intervalo de edad de mayor frecuencia de neoplasias fue entre los 7 y 10 años, obteniendo un promedio de 7.5 años. De igual manera, en el estudio realizado en el estado de México por Fajardo *et al.* (2013), donde evaluaron prevalencias de tumores en perros, la mayor ocurrencia observada involucró animales de los 7 a 15 años y determinó que los animales viejos tienen un mayor potencial a la malignidad. Con respecto a casos de cáncer, la edad en que se presenta mayor frecuencia involucra de los 5 a los 10 años (Elgue *et al.*, 2012).

La relación entre raza y la presentación de neoplasias evidenció que el Poodle (15.8%), Schnauzer (11.39%), Boxer (7.59%), Labrador (7.59%), Criollo (6.32%) y Fox Terrier (6.32%), fueron las razas que presentan más reiteradamente neoplasias. El Poodle presentó mayor número de neoplasias malignas, seguido del mestizo, mientras que el Schnauzer, Boxer y Labrador poseen mayor número de neoplasias de tipo benigno. No obstante, el número de muestras no permite tener una conclusión al respecto, se requiere un número mayor de muestras para entender la tendencia por raza. Mukaratirwa *et al.* (2005), indica que los perros mestizos poseen mayor frecuencia con respecto a las razas puras, ya que los Terriers, Labrador, Pastor Alemán, Jack Russel, Doberman y Rottweiler desarrollaron menores problemas neoplásicos. Bravo *et al.* (2010) también coincide que

los animales mestizos son mayormente afectados y seguido de razas como el Boxer, Labrador, French Poodle y Pastor Alemán. En investigaciones realizadas en México, García *et al.* (2013), reporta al mestizo como más afectado (16.9% de sus casos evaluados), seguido del Poodle (15.2%), Pitt Bull (8.5%) y Cocker (8.2%). Fajardo *et al.* 2013, a su vez indica que las razas puras poseen la frecuencia más alta (91.9%) comparada con los mestizos (8.1%); siendo el Labrador (18.4%), Schnauzer y Cocker (8.2%), Pastor Alemán y Poodle (7.6%) las razas más frecuentes. Vidales y Espinosa (2008), mencionan que para realizar un análisis donde se evaluó la relación de presentación de neoplasias, con respecto a razas predisponentes, hay que tomar en cuenta factores como ubicación geográfica, estatus socioeconómico de los propietarios e inclusive gustos particulares de estos últimos, ya que los resultados reportados en distintos estudios pueden estar influenciados por dichas situaciones. En el presente trabajo se realizó una recopilación de datos por medio de un cuestionario, sin embargo no se tuvo contacto directo con los individuos de los cuales se obtuvieron las muestras, por lo tanto, se desconoce el grado de su pureza racial.

Las regiones corporales mayormente afectadas involucran piel y glándula mamaria, en distintas ubicaciones anatómicas. García *et al.*, (2013), reporta a la piel como el órgano más afectado con 51.4% del total de casos revisados, seguido de la glándula mamaria con el 36.9%. Las lesiones tumorales en glándula mamaria se encuentran entre las más comunes que afectan a hembras caninas, donde se estima que el riesgo a padecer un tumor maligno a lo largo de la vida de la hembra, varía entre el 2% al 50%. Las neoplasias benignas fueron menos frecuentes y la glándula inguinal más afectada (50%) (Meuten, 2002; Vail y Withrow, 2009; García *et al.*, 2013). Los tumores de piel representan aproximadamente desde la mitad hasta un tercio de las neoplasias que se presentan en perros (Ortiz y López, 2008; Vail y Withrow, 2009; Dobson *et al.*, 2014), siendo en su mayoría benignos (entre el 70% y 80%) y primarios (Dobson, *et al.*, 2014); mientras que entre el 20% al 40% corresponden histológicamente a lesiones malignas y afectan principalmente a hembras (Vail y Withrow, 2009; García *et al.*, 2013). Dichas afirmaciones coinciden con lo reflejado en el presente estudio donde en la glándula mamaria presentó mayor frecuencia de cáncer y que en piel predominan las neoplasias benignas.

El estado reproductivo fue un factor de importancia, tal y como lo afirman Withrow y MacEwen's (2007), dado que el aporte hormonal en hembras y machos, puede ser detonante de producción de neoplasias o cáncer. Meuten (2002), refiere que mediante pruebas bioquímicas cuantitativas para receptores de estrógenos en tejido neoplásico mamario, ha logrado demostrar la dependencia de algunas neoplasias a los estrógenos, mientras tanto en los machos, los andrógenos juegan un papel importante en la patogenia del cáncer de próstata y adenoma de glándulas perianales. Sin embargo, en el presente trabajo existen datos sin especificar, lo cual no permite analizar en su totalidad el estado reproductivo como factor de riesgo. A su vez, falta información de la edad en la cual fueron esterilizados, ya que como lo menciona Sorenmo *et al.* (2011), en hembras caninas esterilizadas después de los cuatro años de edad, no les es otorgada protección alguna para el desarrollo de tumores, por lo tanto, son candidatas para padecer neoplasias mamarias.

La mayor parte de la población canina fue alimentada con productos procesados comerciales, donde los machos fueron excluidos del alimento casero. Esta evidencia puede influenciar al desarrollo de neoplasias debido a los agentes químicos adicionados a los alimentos procesados y la presencia de micotoxinas que pueden estar presentes en los ingredientes de los mismos con efectos carcinogénicos en los animales (Meuten, 2002; Aquino y Correa, 2011).

Con respecto al manejo de hábitat en los perros, se identificó que las hembras que viven en interiores fueron las mayormente afectadas con mayor proporción de casos con respecto al resto de la población. Dentro de los factores físicos que pueden generar desarrollo de neoplasias, podemos mencionar a los rayos ultravioleta (UV), que tienen la capacidad de ejercer distintos cambios en células expuestas, tales como inhibición de la división, inducción de mutaciones, inactivación de enzimas y muerte celular en dosis altas (Trigo y Tavera, 2006). La piel tiende a ser afectada, debido a su compleja estructura, ya que puede aparecer una gran variedad de

neoplasias primarias y secundarias o metastásicas (Warland *et al.*, 2011). La exposición a agentes químicos también pueden tener potencial para la generación de neoplasias. Se ha demostrado que algunos componentes de herbicidas, insecticidas y pulguicidas comerciales domésticos, poseen un alto potencial carcinogénico. La exposición a insecticidas tópicos y el uso de collares antipulgas contribuyen al desarrollo de carcinomas de células transicionales, siendo el Scottish Terrier susceptible a dichas sustancias (Withrow y MacEwen's, 2007).

El tiempo de evolución de desarrollo de la masa, no mostró diferencia significativa entre hembras y machos, sin embargo, al evaluarla en conjunto con respecto al tamaño entre el género, fue posible evidenciar que las hembras poseen una tendencia a mostrar masas de mayor longitud con respecto a los machos, por lo tanto, se concluyó que a pesar de que los tiempos de evolución entre hembras y machos son similares, las hembras desarrollan neoplasias de mayor tamaño y de formas irregulares.

Los diagnósticos obtenidos, indicaron mayor frecuencia en piel y glándula mamaria. Con respecto a la piel, las cuatro principales neoplasias fueron el tumor de células basales (8.8%), mastocitoma (6.3%), melanoma (5.0%) y fibroma (5.0%). Fajardo *et al.*, (2013) obtuvo en su estudio como principal neoplasia de piel al fibroma con 6.9% de diagnósticos evaluados, seguido del histiocitoma (5.2%) y pilomatrixoma (4.6%). El mastocitoma (3.2%) y el melanoma (2.90%) al contrario de esta investigación, obtuvieron una menor frecuencia. El tumor de células basales, únicamente es mencionado por García *et al.*, (2013), en una referencia que indica que ha sido frecuentemente diagnosticado en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Aparicio y Forero (2008), registro al mastocitoma como el más frecuente de su estudio (22%), seguido del histiocitoma (12%), tricoepitelioma (6%), melanoma amelanocítico (6%), lipoma (6%) y carcinoma de células escamosas (6%).

Con respecto a la glándula mamaria, los principales diagnósticos obtenidos involucran al adenocarcinoma sólido (5.0%), carcinoma mixto (5.0%), carcinoma simple sólido (3.7%) y adenoma de glándula mamaria (3.7%). Vidales y Espinosa (2008), reportan neoplasias de glándula mamaria, que de las 173 neoplasias analizadas, el 41% correspondieron a benignas, involucrando adenoma, papiloma, fibroadenoma y tumor mixto benigno; y de las malignas, involucra un 59% del total de neoplasias analizadas, entre las cuales citan al tumor mixto mamario maligno (22%) y el carcinoma sólido (1.2%).

5. CONCLUSIONES

La aparición de neoplasias en caninos domésticos se ha convertido en un motivo importante de consulta veterinaria, ya que los propietarios al notar aparición de nódulos o masas en el cuerpo de sus mascotas acuden con especialistas.

Las neoplasias benignas poseen una tendencia mayor con respecto a las neoplasias malignas, sin embargo, están últimas, en su mayoría presentaron elevada anaplasia, lo que desencadena una malignidad agresiva que compromete la vida del paciente.

Las hembras son el género mayormente afectado con la aparición de neoplasias benignas y malignas, presentando a su vez mayor longitud en las tumoraciones, siendo estadísticamente significativo. Se observó que el manejo entre ambos géneros es diferente, siendo las hembras las que mayor contacto tienen con el ambiente humano, al vivir principalmente en interiores y recibir alimentos de diversas fuentes. La carga hormonal es difícil de evaluar, ya que los datos de esterilización y edad a la cual fueron sometidas al procedimiento, no son suficientes y por lo tanto no es concluyente, sin embargo, no se descarta a las hormonas como factor de riesgo.

El órgano que posee más afectación es la piel, teniendo mayor frecuencia de neoplasias benignas. El segundo órgano con alta frecuencia es la glándula mamaria, pero a comparación del anterior, la

aparición de cáncer posee mayor tendencia. Con este último hallazgo, se refuerza la postura de alta afectación hacia las hembras.

La neoplasia con mayor aparición es el tumor de células basales, el cual esta pobremente reportado en otras publicaciones, lo que sugiere que su aparición en la ciudad de Querétaro, puede estar influenciada por la región geográfica de estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sánchez, G.D.J. y Trejo, B.N.I. (2006). Biología molecular del cáncer. En Biología celular y molecular (179-184). México, DF: Editorial Alfil.
2. Trigo, F.J. y Valero, E.G.(2002). Trastornos del crecimiento celular. En Patología General Veterinaria (323-386). México, DF: Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.
3. García, C.M., Barragán, C.V., Damián, S.M, De la Colina, F.F, Rodríguez, F.H, Escareño, S.L.M. (2013). Estudio retrospectivo de neoplasias en caninos diagnosticadas en el Centro de Investigación en Patología Animal de la Universidad de Guadalajara en el Periodo 2001-2010. XXII Congreso Nacional de Patología Veterinaria. ISBN: 978-607-9012-40-5.
4. Karras, J. R., Paisie, C. A., and Huebner, K. (2014). Replicative stress and the FHIT gene: Roles in tumor suppression, genome stability and prevention of carcinogenesis. *Cancers*, 6(2), 1208-1219.
5. Meuten, J.D. (2002). An overview of cancer pathogenesis, diagnosis and management. In *Tumors in Domestic Animals*(3-14). USA: Iowa State Press.
6. Prophet E.B., Mills B., Arrington J.B. y Sobin L.H. (1995). Métodos Histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP): Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP), Washington, D.C.
7. McGavin, M.D. and Zachary, F.J. (2007). Neoplasia and tumor biology. In *Pathologic Basis of Veterinary Disease* (252-270). USA: MosbyElsevier.
8. De Vivero, G.L.E, Chavera, C.A., Perales, C.R. y Fernández, C.V. (2013). Frecuencia de neoplasias caninas en Lima: Estudio retrospectivo en el periodo 1995-2006. *Rev. Inv. Vet. Perú*. 24(2):182-188.
9. Elgue, V., Piaggio, J., Amaral, C.Z., y Pessina, P. (2012). Factores asociados a la presentación del tipo de cáncer en caninos atendidos en el Hospital de la Facultad de Veterinaria de Uruguay. *Veterinaria*, 48(185), 23- 28.
10. Fajardo, R., Alpízar, A., Pérez, L.S., Martínez, J.S. and Córdova, E. (2013). Prevalence of tumors in dogs from the municipality of Toluca, México, from 2002 to 2008. *Arch Med Vet*, 45, 305-309.
11. Mukaratirwa, S., Chipunza, J., Chitanga, S., Chimonyo, M., and Bhebhe, E. (2005). Canine cutaneous neoplasms: prevalence and influence of age, sex and site on the presence and potential malignancy of cutaneous neoplasms in dogs from Zimbabwe. *Journal of the South African Veterinary Association*, 76(2), p-59.
12. Bravo, T.D., Cruz-Casallas, P. y Ochoa, A.J. (2009). Prevalencia de neoplasias en caninos en la universidad de los Llanos, durante 2004 a 2007. *Rev. MVZ Córdoba*. 15(1): 1925-1937.
13. Vidales, G. T., y Espinosa, L. B. (2008). Estudio histopatológico retrospectivo de neoplasias de glándula mamaria en caninos (1975- 2000). *Orinoquia*, 12(1), 80-88.
14. Vail, D. y Withrow, S. (2009). Tumores de la piel y tejidos subcutáneos. Withrow S, Vail D. *Oncología clínica de pequeños animales*. 4a ed. España: Multimédica Ediciones Veterinarias. p, 371-395.

15. Ortiz, C.E.A., y López, J.H.F. (2008). Estudio retrospectivo de masas cutáneas neoplásicas en caninos diagnosticadas histopatológicamente en la Universidad de La Salle (1999-2003). *Revista de Medicina Veterinaria*, (16), 111-120.
16. Dobson, J.M. y Lascelles, B.D.X., (2014). *Manual de Oncología en pequeños animales*. Tercera Edición. Editorial Sastre Molina, S.L., Barcelona, España.
17. Withrow, S.J. and MacEwen's, D.V. (2007). Neoplasm. In *Small Animal Clinical Oncology* (3-21). USA: Saunders Elsevier.
18. Sorenmo, K.U., Rasotto, R., Zappulli, V., and Goldschmidt, M.H. (2011). Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Veterinary Pathology Online*, 48(1), 85-97.
19. Aquino, S. and Corrêa, B. (2011). Aflatoxins in pet foods: a risk to special consumers. *Aflatoxins—detection, measurement and control*, ed. Torres-Pacheco I, 53-74.
20. Warland, J., y Dobson, J. (2011). Tumores cutáneos en el perro y el gato. *Veterinary Focus*. 23 (3): 34-41.
21. Aparicio, O.C. y Forero, L.J. (2008). Estudio retrospectivo de masas cutáneas neoplásicas en caninos diagnosticadas histológicamente en la Universidad de La Salle (1999-2003). *Rev Med Vet* (16):111-120.

DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL ANTIRRADICAL Y ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Sterculia apetala*.

Abril Ramírez Higuera¹, Rosa María Oliart Ros¹

¹ UNIDA Instituto Tecnológico de Veracruz M.A. de Quevedo 91897, Veracruz, (229) 934 57 01 ext 102.

RESUMEN

Se obtuvieron extractos etanólicos de semillas de *Sterculia apetala*, endémicas del estado de Veracruz, las cuales son consumidas por habitantes de la región. Se colectó semilla en enero (inmadura) y mayo (madura). Se realizó la extracción etanólica de la semilla inmadura entera y del integumento, nucelus y cotiledón, y de la semilla madura entera y de la cubierta externa, testa y cotiledón maduro, y se evaluó su capacidad antirradical y antioxidante usando los radicales ABTS y DPPH. La actividad antirradical quedó definida por el número de unidades antirradical (AU), el número de unidades antirradical por miligramo de extracto (EAU), el número total de unidades antirradical por miligramo de extracto (PAU) y el número de unidades antirradical por gramo de muestra (TAU), mientras que la actividad antioxidante se determinó por el porcentaje de inhibición del radical (A%). Los resultados indican que la concentración de fenoles totales depende de la parte de la semilla y de su estado de maduración. La mayor actividad antirradical con ABTS y DPPH en la semilla inmadura se encontró en la semilla entera y en el nucelus, mientras que en la semilla madura con ambos métodos se encontró en el cotiledón maduro. Con respecto a la actividad antioxidante el ABTS reveló mayor actividad en la semilla inmadura, mientras que el DPPH lo hizo para la semilla madura. Se concluye que *Sterculia apetala* es una fuente de antioxidantes potenciales para futuras investigaciones, los radicales libres se asocian con diversos padecimientos, por lo que es importante reforzar el sistema de defensa antioxidante a través de la dieta siendo trascendental estudiar nuevos recursos naturales que brinden esta protección, lo cual además de permitir aumentar su valor agregado, también posibilite y fomente su cultivo y consumo.

1. INTRODUCCIÓN.

El género *Sterculia* comprende 300 especies de árboles del orden Malvales localizados en México en los estados de Veracruz, Tabasco, Oaxaca y Chiapas (Herrera et al., 2014). En estas localidades, las semillas son hervidas o tostadas para desarrollar sabores a nuez, cacahuete o chocolate y son consumidas por sus habitantes. Los radicales libres se producen como parte de los procesos metabólicos naturales, su exceso puede causar estrés oxidativo, implicado con muchas enfermedades degenerativas como aterosclerosis, enfermedades coronarias, envejecimiento, cáncer y síndrome metabólico (Brooks, 2011). Una forma de hacer frente a tales padecimientos es reforzar el sistema de defensa oxidativo incorporando alimentos ricos en antioxidantes; de ahí la importancia de explorar y explotar nuevas fuentes de origen natural como lo son las especies de la familia Malvaceae, encontrándose dentro de sus componentes activos principales flavonoides, ácidos fenólicos y taninos, localizados en las hojas, flores, semillas y raíces (Tešević et. al., 2012). El presente estudio se centra en la extracción y cuantificación de fenoles totales de las semillas de *Sterculia apetala* de la región de San Andrés Tuxtla, así como en evaluar su capacidad

antirradicalaria y antioxidante, con la finalidad de abrir un nuevo campo de aplicación y estudio de las semillas para un aprovechamiento integral de la mismas en beneficio de la salud, de tal manera que se fomente su cultivo y consumo.

2. PARTE EXPERIMENTAL.

Se trabajó con la semilla de *Sterculia apetala* obtenida de la región de San Andrés Tuxtla del estado de Veracruz, la primer colecta se realizó en el mes de Febrero (semilla inmadura) y la segunda en mayo (semilla madura). Para la obtención de los extractos etanólicos se tomó en cuenta tanto la parte interna como externa de la semilla, y la semilla completa en ambos estados de maduración: semilla inmadura (Figura 1) y madura (Figura 2). Cada muestra (A-H) se maceró con 10mL de etanol, se colocó en un tubo de ensaye y se llevó a 60 °C siguiendo el método de extracción reportado por Lock et al. (2006), se dejó en contacto con el solvente durante 72 h a temperatura ambiente en ausencia de luz, y se filtró. La determinación de fenoles totales se estimó espectrofotométricamente utilizando el reactivo Folin-Ciocalteu siguiendo el método descrito por Sun et al. (2007), y se leyó a 750 nm. Se evaluó la inhibición del radical ABTS midiendo la absorbancia a 734nm bajo el método propuesto por Scartezzini et al. (2006). La captación de radicales mediante DPPH se midió a una absorbancia de 517 nm siguiendo el método de Lu et al. (2010). Los cálculos para la determinación del número de unidades antirradical (AU), el número de unidades antirradical por miligramo de extracto (EAU), el número total de unidades antirradical por miligramo de extracto (PAU) y el número de unidades antirradical por gramo de muestra (TAU), y el porcentaje de inhibición del radical (A%) se realizaron de acuerdo a Shalaby et al. (2013).

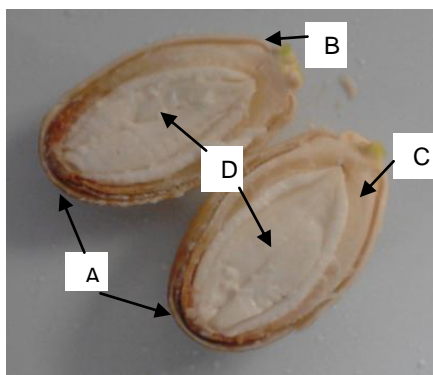


Figura 1. Semilla inmadura: A) Semilla inmadura completa, B) Integumento, C) Nucelus, D) Cotiledón.

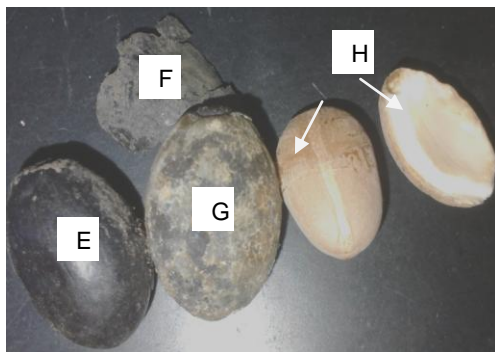


Figura 2. Semilla madura: E) Semilla madura completa, F) Cubierta externa, G) Testa, H) Cotiledón maduro.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración de fenoles totales en la semilla inmadura fue mayor cuando se determinó en el extracto de la semilla completa que en las diferentes disecciones de la misma, mientras que en la semilla madura se encontró mayor concentración en el cotiledón (Tabla 1). Las plantas sintetizan fenoles como metabolitos secundarios; dentro de sus diversas funciones están las de brindar protección a diferentes factores de estrés tanto biótico como abiótico. Su distribución en la planta puede ir desde la raíz hasta la semilla y es muy diferente, tanto en concentración como en composición, de acuerdo al tejido de la planta que se utilice para su extracción y determinación, también influyen las condiciones climáticas y temporada de cosecha. Durante el periodo que la semilla es inmadura, sufre de múltiples divisiones por lo que necesitaría distribuir sus mecanismos de defensa, entre ellos los fenoles, en todos sus componentes para asegurar que la semilla complete su desarrollo, hasta la formación de una semilla madura. Una vez que ha madurado, la cubierta exterior se engrosa (testa) y funciona como un mecanismo de barrera natural y primer escudo de protección. Sin embargo, si ésta se rompiera por alguna razón, necesitaría proteger el cotiledón maduro, que es donde se concentra la mayor cantidad de nutrientes, además de ser la vía por la cual reiniciaría el desarrollo de una nueva planta al germinar. Por lo tanto, los fenoles se concentran en esta región de la semilla.

Tabla 1. Concentración de fenoles totales

Extracto obtenido de:	PHE (mg/mL)
A. Semilla madura	118.65 ± 7.14 ^a
C. Nucelus	117.25 ± 2.17 ^a
F. Cubierta externa	14.77 ± 1.38 ^d
H. Cotiledon maduro	90.74 ± 2.71 ^a

PHE: Concentración de fenoles totales.

Letras diferentes indican diferencia significativa ± Desviación estándar.

Al evaluar la actividad antirradical, tanto con ABTS como con DPPH (Tabla 2), para la semilla inmadura se encontró que los extractos con mayor concentración de fenoles totales (semilla completa y nucelus), también tienen un mayor número de unidades antirradical definidas como AU, EAU, PAU y TAU. Esta observación se hace extensiva para la actividad antioxidante definida como A% al evaluar ambos radicales. Para la semilla madura, la relación de mayor concentración de fenoles-mayor actividad antirradical (AU, EAU, PAU y TAU) se encontró únicamente con el radical ABTS en el cotiledón maduro y la cubierta externa; sin embargo, al evaluar la A%, ésta fue mayor únicamente en la cubierta externa (Tabla 3). Con el radical DPPH se encontró una mayor actividad antirradical (AU, EAU, PAU y TAU) en el cotiledón maduro y la testa, mientras que la mayor A% se encontró en la semilla madura completa (Tabla 3). Los resultados demuestran que aquellos extractos con mayor concentración de fenoles generalmente tienen mayor número de unidades antirradical, sin embargo, no siempre coinciden con ser los de mejor actividad antioxidante. También se demuestra que el extracto que reveló mayor actividad antioxidante frente al ABTS puede no ser igual de eficaz con el DPPH y viceversa, lo que coincide con lo encontrado por otros autores (Kiliç y Yeşilouğlou, 2013). Esto puede deberse a que no todos los compuestos extraíbles que se pueden medir como fenoles totales tienen la capacidad de reaccionar con el radical libre específico empleado para determinar la actividad antioxidante (ABTS o DPPH), debido a los aspectos estructurales o impedimentos estéricos de los diferentes compuestos que están

presentes en los extractos (Sagdic *et al.*, 2011), los cuales, como se mencionó con anterioridad, varían dependiendo con la parte que se diseccionó para realizar el extracto y al estado de maduración de la misma.

4. CONCLUSIONES

La mayor actividad antioxidante y concentración de fenoles totales de la semilla de *Sterculia apetala* se encuentra en la semilla inmadura completa, y en el cotiledón de la semilla madura. Es importante mencionar que es el cotiledón maduro lo que la población consume, después de un proceso de tostado, por lo que sería pertinente evaluar estos parámetros en la semilla tostada para realmente determinar el aporte de este alimento a la defensa antioxidante de los pobladores de la región. Esto marca la pauta para futuros estudios donde estos extractos puedan ser probados en enfermedades cuya incidencia es de importancia nacional y que se relacionan con estrés oxidativo como lo son obesidad, diabetes, síndrome metabólico entre otras.

Tabla 2. Actividad antirradical y antioxidante evaluando el radical ABTS y DPPH en semilla inmadura

	ABTS				
	AU	EAU	PAU	TAU	%A
A. Semilla inmadura	0.45 ± 0.03 ^a	2.82 ± 0.39 ^b	14477.40 ± 998.30 ^a	2820.84 ± 384.93 ^b	63.58 ± 4.14 ^a
C. Nucelus	0.35 ± 0.03 ^g	3.83 ± 0.32 ^d	5942.17 ± 571.24 ^c	3831.08 ± 315.95 ^d	50.11 ± 4.53 ^c
	DPPH				
A. Semilla inmadura	0.17±0.04 ^b	2.42±0.89 ^b	12240.00±3541.93 ^a	2426.66±891.88 ^a	29.90±8.56 ^b
C. Nucelus	0.11±0.02 ^c	6.07±1.27 ^c	9440.00±2075.07 ^a	6077.92±1277.73 ^c	20.76±4.50 ^d

Tabla 3. Actividad antirradical y antioxidante evaluando el radical ABTS y DPPH en semilla madura

	ABTS				
	AU	EAU	PAU	TAU	%A
F. Cubierta externa	0.16±0.044 ^f	0.15±0.04 ^f	163.0±44.07 ^f	154.77±39.62 ^f	22.34± 6.14 ^f
H. Cotiledón maduro	0.05±0.023 ^c	0.41±0.17 ^g	451.91±191.61 ^h	417.51±172.24 ^g	7.58±3.20 ^b
	DPPH				
G. Testa	0.42±0.001 ^f	0.14±0.005 ^a	169.00±0.53 ^f	149.24±4.51 ^g	74.38±0.002 ^g
H. Cotiledón maduro	0.08±0.006 ^a	1.31±0.117 ^f	1416.66±98.93 ^g	1313.59±117.05 ^h	14.67±1.071 ^a

(AU)= número de unidades antirradical, (EAU)= número de unidades antirradical por miligramo de extracto, (PAU)= número total de unidades antirradical por miligramo de extracto, (TAU)= número de unidades antirradical por gramo de muestra, (A%)= actividad antioxidante. Letras diferentes indican diferencia significativa ± Desviación estándar.

BIBLIOGRAFÍA

1. Herrera M., Martínez A., Sánchez O., Mendoza Lopez M., García B., Ortiz V. y Oliart R. "Fatty acid composition and some physicochemical characteristics of *Sterculia apetala* seed oils", *Grasas Aceites*, 65 (3): e039. doi: doi.org/10.3989/gya.0223141, 2014.
2. Brooks M., Bifeng G., Swapan K. y Joe M. Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation. *Molecular Aspects of Medicine* 32, 234–246, 2011.
3. Tešević V., Vlatka V. Lekić S., Dorđević I., Novaković L., Vujisić J. y Todosijević M. Lipid composition and antioxidant activities of the seed oil From three malvaceae species. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 64 (1), 221-227, 2012. DOI:10.2298/ABS1201221T.
4. Lock O., Cabello I. y Doroteo V. "Analysis of flavonoids in plants", *Manual de laboratorio de química*, Pontificia Universidad Católica del Perú, Perú, Lima, 2006.
5. Sun T., Xu Z., Wu C., Janes M. y Prinyawiwatkul W. Antioxidant Activities of Different Colored Sweet Bell Peppers (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Food Science*, 72 (2), 2007.
6. Scartezzini P., Antognoni F., Raggi M., Poli F. y Sabbioni C. Vitamin C content and antioxidant activity of the fruit and of the Ayurvedic preparation of *Embllica officinalis* Gaertn, *J. Ethnopharmacology*, 104, 113–118, 2006.
7. Lu Y. y Foo L. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chem.*, 68, pp. 81–85, 2000.
8. Shalaby A. y Shanab M. Comparasion of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*. 42(5), 556-564, 2013.
9. Kiliç I. y Yeşilouğlou Y. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of p-coumaric acid. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 2013; 115:719-724.
10. Sagdic, O.; Ozturk, I.; Ozkan, G.; Yetim, H.; Ekici, L. y Yilmaz, M. RP-HPLC-DAD analysis of phenolic compounds in pomace extracts from five grape cultivars: evaluation of their antioxidant, antiradical and antifungal activities in orange and apple juices. *Food Chem.* 2011,126, 1749–1758.

ELEMENTOS BENÉFICOS AFECTAN LA FISIOLÓGÍA DE GERMINACIÓN DE LA SEMILLA BOTÁNICA (FUZZ) DE CAÑA DE AZÚCAR

Héctor Emmanuel Sentíes-Herrera¹, Libia Iris Trejo-Téllez¹, Fernando Carlos Gómez-Merino¹

¹Colegio de Postgraduados

RESUMEN

Elementos como aluminio, lantano, yodo, silicio y titanio, sin ser elementos esenciales para las plantas, pueden tener efectos benéficos en su crecimiento y desarrollo. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de Al, La, I, Si y Ti a diferentes concentraciones en la fisiología de germinación de semilla botánica (Fuzz) de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.). Se evaluaron 15 tratamientos más un testigo absoluto. Se empleó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones. Las variables evaluadas fueron: cinética de germinación (CG), coeficiente de velocidad de germinación (CVG), tiempo promedio de germinación (TPG), velocidad de germinación (VG) y porcentaje de germinación total (PGT). La CG mejoró notablemente con la aplicación de Al [50 y 100 μM], La [20 μM] y Si [5 y 10 μM]. El CVG se redujo con Al, La y Ti, en sus tres concentraciones, con I [60 μM] y con Si [15 μM]. Sin embargo, este coeficiente aumentó considerablemente con Si [5 μM]. El TPG mejoró con Al, La, I y Ti, en cualquiera de sus concentraciones, con Si [15 μM] fue incrementado. El PGT se incrementó con la aplicación de Al [100 μM] y Si [5 μM]. Se concluye que los elementos benéficos mejoran la fisiología de germinación del Fuzz de caña de azúcar.

1. INTRODUCCIÓN

El proceso de hibridación es la manera más efectiva de combinar características de interés de variedades sobresalientes y con ello el establecimiento de un cruzamiento (Silva *et al.*, 2013). Durante este proceso, se lleva a cabo la polinización. Se cortan los tallos de ambos progenitores con flores en campo a inicios de la apertura floral. Después, dichos tallos son llevados a la casa de hibridación donde los cruzamientos son establecidos (Andrade-Landell y Bressiani, 2010) dando lugar a dos tipos: los biparentales (apareamiento de dos individuos de sexo diferente) y policruzamientos (apareamiento de tres o más individuos de diferente sexo). Ambos cruzamientos se realizan en farol para evitar la contaminación de polen extraño (Sentíes-Herrera *et al.*, 2014). Por lo anterior, la producción de semilla botánica (Fuzz) es de vital importancia para los programas de mejoramiento genético de caña de azúcar. Sin embargo, gran porcentaje de los cruzamientos realizados año con año, presentan baja cantidad de semilla y poca viabilidad. Una alternativa para mejorar esta condición es el uso de elementos benéficos como el aluminio (Al), lantano (La), yodo (I), silicio (Si) y titanio (Ti), de los cuales se tiene evidencia que mejoran características fisiológicas de la planta y en especial en la germinación. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de los elementos benéficos Al, I, La, Si y Ti en la solución aséptica del CIDCA, en diferentes indicadores fisiológicos de germinación del Fuzz.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en la estación de Hibridación de la Caña de Azúcar, dentro de las instalaciones del Centro de Investigación y Desarrollo de la Caña de Azúcar, A. C. (CIDCA), ubicada geográficamente en Tuxtla Chico, Chiapas, a 14° 56' latitud norte y 92° 51' longitud oeste,

a una altitud de 320 m (INAFED, 2016). El clima es cálido húmedo con temperatura media anual de 26.4 °C y precipitación media anual de 4,259 mm (Serrano-Altamirano *et al.*, 2006; CONAGUA, 2016).

Se utilizaron los progenitores de caña de azúcar femenino CC 93-3826 y masculino CP 80-1743, para llevar a cabo un cruzamiento biparental, éste se realizó de acuerdo a las condiciones de trabajo del CIDCA, para lo cual se utilizaron tallos con flores disponibles para armar cada cruzamiento. La duración de éste, fue de 12 días. Posteriormente, fue eliminado el progenitor masculino y el femenino se trasladó a la casa de maduración. Después se llevó a cabo la cosecha de las panículas, hasta obtener el Fuzz. Los tratamientos ensayados consistieron en agregar a la solución aséptica tres concentraciones de cinco elementos benéficos de la forma siguiente: Al a 50, 100 y 150 μM ; I a 20, 40 y 60 μM ; La a 10, 20 y 30 μM ; Si a 5, 10 y 15 μM ; y Ti a 25, 50 y 75 μM . Las fuentes fueron $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, KI, LaCl_3 , SiO_2 y TiO_2 , respectivamente. Como testigo absoluto se utilizó la solución séptica sin elementos benéficos, como la emplea el CIDCA. La adición de estos elementos se realizó dos veces durante la duración del cruzamiento, siguiendo el criterio de la reposición de ácidos fijos.

Las variables evaluadas fueron: cinética de germinación (CG), coeficiente de velocidad de germinación (CVG), tiempo promedio de germinación (TPG), velocidad de germinación (VG) y porcentaje de germinación total (PGT). Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones. Por cada repetición e tuvieron 1100 semillas. Se realizó de manera independiente para cada elemento benéfico el análisis de la varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$) con el programa estadístico SAS v. 9.4.

3. RESULTADOS

La importancia de conocer la cinética de la germinación radica en que muestra el posible potencial de vigor de una semilla para generar una plántula vigorosa, por lo que una germinación lenta y con amplia dispersión en el tiempo produce plántulas heterogéneas y pequeñas (Matthews y Khajeh-Hosseini, 2006). En esta investigación la cinética de la germinación fue específica para cada elemento benéfico y concentración respectiva (Figura 1). Con 100 μM Al se incrementa considerablemente la CG, mientras que con 150 μM Al, ésta se reduce en mayor medida (Figura 1A). El La en concentraciones de 10 y 30 μM La, reducen la CG, aunque 20 μM La, mejora ligeramente esta característica (Figura 1B). La CG, es casi totalmente reducida con las tres concentraciones de I (20, 40 y 60 μM I) (Figura 1C). Sin embargo, el Si mejora notablemente la CG, en su concentración 5 μM Si, pero esta se ve reducida con 15 μM Si (Figura 1D). En lo referente a Ti, el efecto de este elemento en sus tres concentraciones (25, 50 y 75 μM Ti), fue muy similar pero inferior al testigo, lo cual es un efecto no deseable (Figura 1E).

Otras características de importancia son: Coeficiente de Velocidad de Germinación (CVG); Tiempo Promedio de Germinación (TPG); Velocidad de Germinación (VG), que nos proporciona más información sobre la calidad de la semilla (Maguire, 1962; Côme, 1970). El CVG disminuyó por efecto de las concentraciones de Al (50, 100 y 150 μM Al) pero mejoró el TPG al alcanzar un valor promedio de 3.7 días con 150 μM Al y la VG aumento a 36.7 con la misma concentración, en comparación con el testigo (Cuadro 1). El La mostró efectos negativos en el CVG, ya que para todas las concentraciones éste disminuyó, pero no así con el TPG, el cual se mejoró y también la VG con valores superiores a 30 para las tres concentraciones ensayadas (Cuadro 1). El I, en su concentración 60 μM I, presentó el menor CVG con un valor de 4.76, mientras que el resto de las concentraciones no tuvieron afectación alguna en esta variable. Sin embargo, las tres concentraciones aceleraron el TPG, con 1, 3.6 y 4.1 días para 60, 40 y 20 μM I, respectivamente. Caso contrario con la VG, la cual fue inhibida en su totalidad con 60 μM I, pero aumentada considerablemente con 20 y 40 μM I (Cuadro 1). Se presentaron efectos contrarios con la aplicación de Si en el CVG, la concentración 5 μM Si aumentó esa variable con un valor de 17, mientras que con 15 μM Si ésta se redujo a 16. El TPG también tuvo modificaciones, mejorándose con 15 μM Si

al alcanzar en el menor tiempo la germinación promedio, y con 5 μM Si se obtuvo el mayor TPG, estas misma concentraciones afectaron contrariamente la VG, con 5 μM Si se aumentó y con 15 μM Si se disminuyó (Cuadro 1). El Ti, disminuyó el CVG en las concentraciones 50 y 75 μM Ti, con valores de 15.7 y 15.8, respectivamente. Pero se mejoró en menor medida el TPG con las mismas concentraciones, y también la VG, con valores de 32.3 y 32.6, respectivamente (Cuadro 1).

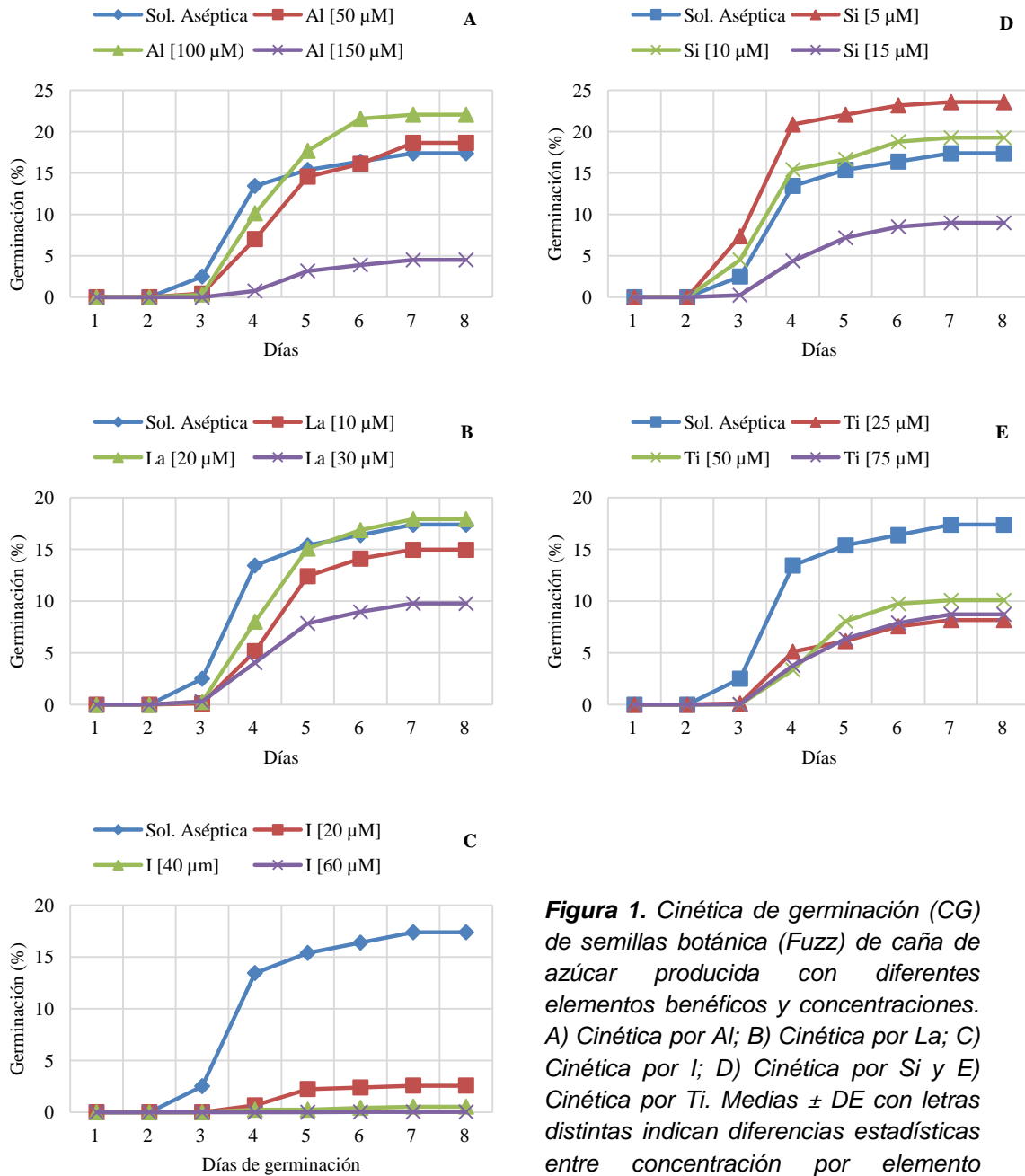


Figura 1. Cinética de germinación (CG) de semillas botánica (Fuzz) de caña de azúcar producida con diferentes elementos benéficos y concentraciones. A) Cinética por Al; B) Cinética por La; C) Cinética por I; D) Cinética por Si y E) Cinética por Ti. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias estadísticas entre concentración por elemento benéfico (Tukey, $P \leq 0.05$).

Cuadro 1. Variables para la evaluación de la calidad de la semilla botánica (Fuzz) de caña de azúcar.

Concentración	CVG			TPG (días)			VG (semillas germinadas por día)		
Al									
Sol. Aséptica	16.6	± 0.05	a	4.7	± 0.06	c	26.7	± 0.39	c
[50 µM]	15.8	± 0.11	b	4.1	± 0.10	b	32.9	± 1.09	ab
[100 µM]	15.9	± 0.08	b	4.3	± 0.08	bc	30.9	± 0.72	b
[150 µM]	15.3	± 0.05	c	3.7	± 0.06	a	36.7	± 0.79	a
La									
Sol. Aséptica	16.6	± 0.05	a	4.7	± 0.06	b	26.7	± 0.39	b
[10 µM]	15.7	± 0.07	b	4.1	± 0.05	a	32.0	± 0.49	a
[20 µM]	15.9	± 0.05	b	4.2	± 0.03	a	30.9	± 0.27	ab
[30 µM]	15.9	± 0.14	b	4.2	± 0.15	a	31.7	± 1.56	a
I									
Sol. Aséptica	16.6	± 0.05	a	4.7	± 0.06	b	26.7	± 0.4	c
[20 µM]	15.6	± 0.03	a	4.1	± 0.06	b	32.6	± 0.6	b
[40 µM]	15.5	± 0.08	ab	3.6	± 0.11	b	38.0	± 1.6	a
[60 µM]	4.76	± 0.13	b	1.0	± 0.87	a	0.0	± 0.0	d
Si									
Sol. Aséptica	16.6	± 0.05	b	4.7	± 0.06	b	26.7	± 0.39	b
Si [5 µM]	17.0	± 0.05	a	5.1	± 0.05	c	24.3	± 0.28	c
Si [10 µM]	16.7	± 0.10	ab	4.9	± 0.08	bc	25.9	± 0.53	bc
Si [15 µM]	16.0	± 0.05	c	4.3	± 0.05	a	30.7	± 0.47	a
Ti									
Sol. Aséptica	16.6	± 0.05	a	4.7	± 0.06	b	26.7	± 0.39	b
[25 µM]	16.1	± 0.16	ab	4.3	± 0.16	ab	30.3	± 1.39	ab
[50 µM]	15.7	± 0.07	b	4.1	± 0.04	a	32.3	± 0.40	a
[75 µM]	15.8	± 0.11	b	4.1	± 0.13	a	32.6	± 1.27	a

Medias ± DE con letras distintas en cada variable por elemento benéfico (hilera), indican diferencias estadísticas (Tukey, $P \leq 0.05$). Coeficiente de Velocidad de Germinación (CVG); Tiempo Promedio de Germinación (TPG); Velocidad de Germinación (VG).

El Porcentaje de Germinación Total (PGT), presentó un decremento por efecto de la concentración 150 µM Al, con un valor inferior al 5 %, mientras que con 100 µM Al superó el 20 %, pero este incremento no fue estadísticamente significativo (Figura 3A). El La en la concentración alta (30 µM La), disminuyó más de un 30 % el PGT, en tanto que las otras dos concentraciones aunque presentaron una disminución ligera, éstas se fueron iguales al testigo (Figura 3B). Los efectos más severos en el PGT se observaron con I, ya a medida que la concentración fue incrementada el porcentaje también lo hizo, alcanzado valores cercanos a cero con la concentración alta evaluada (60 µM) (Figura 3C). Contrariamente, con Si se observó el mejor PGT, ya que la concentración baja (5 µM) incrementó en un 6 % esta condición, pero al incrementar la concentración de dicho elemento hasta 15 µM, ésta puede disminuir en un 50 % (Figura 3D). El Ti, no tuvo un efecto

benéfico, en las tres concentraciones ensayadas, dado que condujeron a una disminución del PGT (Figura 3E).

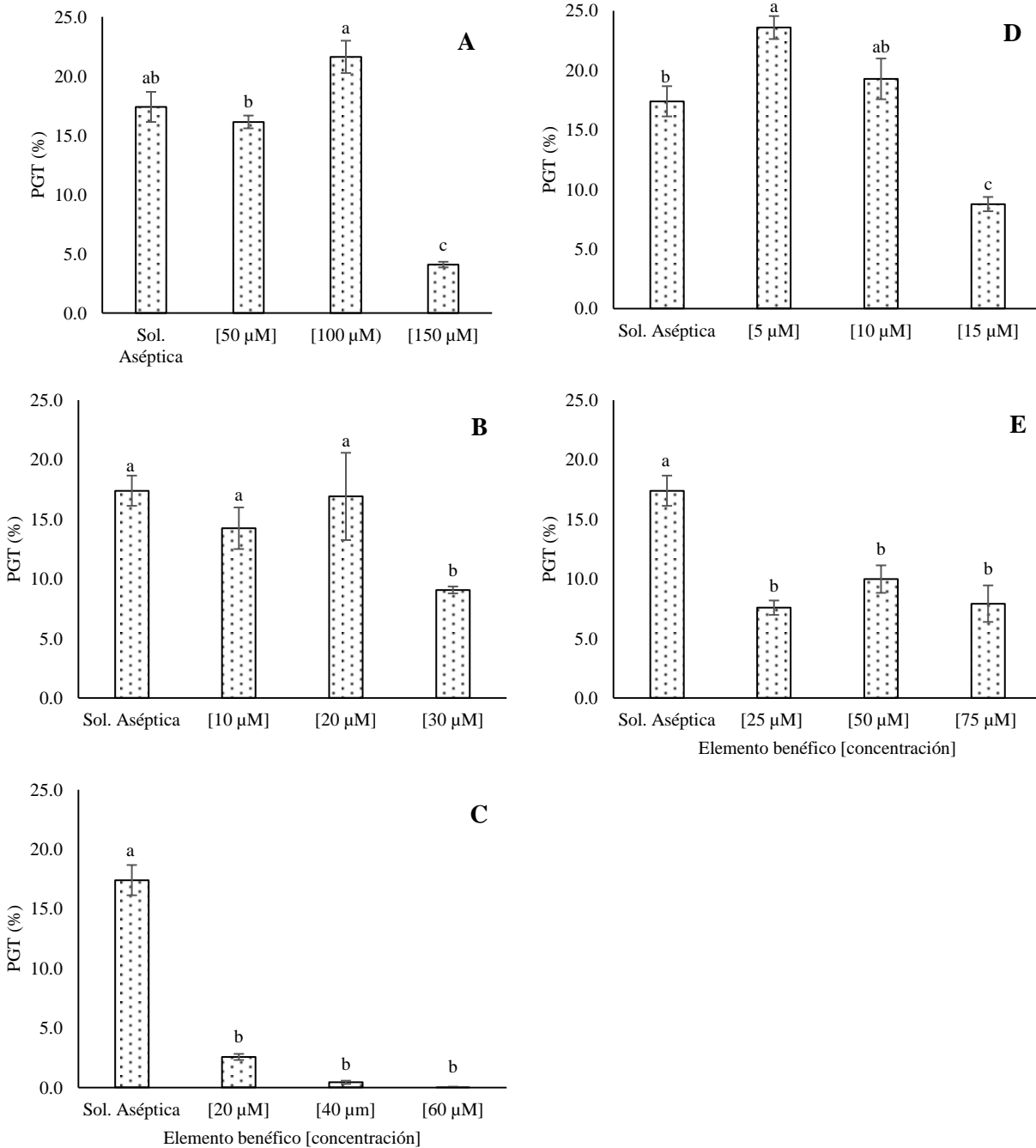


Figura 2. Porcentaje de Germinación Total (PGT). A) Porcentajes obtenidos por efecto de Al. B) Porcentajes obtenidos por efecto de La. C) Porcentajes obtenidos por efecto de I. D) Porcentajes obtenidos por efecto de Si. E) Porcentajes obtenidos por efecto de Ti. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias estadísticas entre concentración por elemento benéfico (Tukey, $P \leq 0.05$).

En esta investigación el Al mejoró la cinética de germinación del Fuzz y la VG, contrariamente, decreció la CVG y el PTG y también tuvo un efecto negativo en el PGT. Lo anterior puede deberse a que al no ser un elemento esencial para las plantas, su presencia puede afectar en dos sentidos la respuesta esperada, aunque son más sus efectos positivos siempre y cuando se utilicen concentraciones adecuadas del mismo, tal como se ha demostrado, que puede aumentar la vida de florero de flores de corte, la expansión foliar, ser estimulante del crecimiento de raíces y como alternativa a la acumulación de proteínas (Kidd y Proctor, 2000; Trejo-Téllez y Gómez-Merino, 2007; Pilon-Smits *et al.*, 2009; Mahdi *et al.*, 2012). El La en nuestro estudio, presenta mayores afectaciones negativas en la cinética de germinación y en el CVG, pero puede mejorar el TPG y la VG. Sin embargo, en concentraciones no adecuadas puede disminuir considerablemente la germinación, sin embargo hay reportes que consideran al La como promotor del crecimiento y de biomasa, y tener un efecto benéfico en la germinación de semillas (Liu y Hasenstein, 2005; Ramírez-Martínez *et al.*, 2012; Chaturvedi *et al.*, 2014), lo anterior puede atribuirse al genotipo y concentración del elemento utilizada. El I juega un papel importante como antioxidante, además que puede mejorar indicadores de producción de biomasa (Blasco *et al.*, 2011; 2013). Sin embargo, en nuestro estudio, se observaron efectos contrarios, ya que redujo casi en su totalidad la cinética de germinación en sus tres concentraciones; disminuyó el CVG, pero incrementó el PGT. Pero en dosis no adecuadas puede reducir a niveles cercanos a cero la VG pero otras concentraciones la pueden aumentar. A pesar de los efectos benéficos anteriores, el PGT es totalmente afectado a medida que incrementa la concentración con valores cercanos al cero. En nuestro estudio el Si tuvo efecto benéfico en concentración baja, mejorando ésta significativamente la cinética de germinación. También puede incrementar o reducir el CVG, TPG y la VG, y la concentración de Si será dependiente de la especie. La caña de azúcar es una especie hiperacumuladora de Si, y dicho elemento está relacionado en procesos fisiológicos en ésta, tales como germinación y en la actividad antioxidante bajo condiciones de estrés salino, además como un mitigador de los efectos de factores bióticos y abióticos (Xiao-dong *et al.*, 2010; Jamali y Rahemi, 2011). Por lo anterior se confirma su efecto benéfico en germinación.

Se encontraron efectos antagónicos del Ti, ya que en sus tres concentraciones disminuyó en la misma magnitud la cinética de germinación y el CVG; por el contrario, redujo considerablemente el TPG y aumentó la VG. Sin embargo, el PGT disminuyó en el orden de un 50 % en las tres concentraciones ensayadas. Sin embargo, existen evidencias que el Ti, puede mejorar la germinación, además de otras condiciones de postcosecha en plantas ornamentales como aumentar la vida de florero y disminuir la producción de la hormona vegetal etileno (Norman y Chen, 2011; Kleiber y Markiewicz, 2013; Mahmoodzadeh *et al.*, 2013). En general, se presentaron respuestas diferenciales entre los elementos benéficos en un mismo genotipo de caña de azúcar, y en específico para la producción de Fuzz. Esto da pauta para estudiar a profundidad los efectos de estos elementos en procesos específicos en una cada especie en particular.

4. CONCLUSIONES

Los elementos benéficos tienen efectos diferenciales en la solución aséptica y en las variables fisiológicas evaluadas en caña de azúcar para propósitos de hibridación. Con el conocimiento de las concentraciones adecuadas de cada uno de ellos, se pueden mejorar considerablemente características de calidad de semillas, tal es el caso del Si, que puede mejorar la cinética de germinación, el CVG, TPG, VG y el PTG.

No todos los beneficios de un elemento benéfico pueden extrapolarse entre especies, debido a que el I, puede ser un elemento no benéfico para características agronómicas de interés como son la producción de Fuzz y viabilidad de la misma.

BIBLIOGRAFÍA

1. B. Blasco, J. J. Ríos, R. Leyva, L. M. Cervilla, E. Sánchez-Rodríguez, M. M. Rubio-Wilhelmi, M. A. Rosales, J. M. Ruiz, L. Romero. "Does Iodine Biofortification Affect Oxidative Metabolism in Lettuce Plants?", *Bio. Trace Elem. Res.* Vol. 142, 2011. pp. 831-842.
2. B. Blasco, R. Leyva, L. Romero, J. M. Ruiz. "Iodine effects on phenolic metabolism in lettuce plants under salt stress", *J. Agric. Food Chem.* Vol. 61, 2013. pp. 2591-2596.
3. B. Jamali, M. Rahemi. "Carnation flowers senescence as influenced by nickel, cobalt and silicon", *J. Biol. Environ. Sci.* Vol. 5, 15, 2011. pp. 147:152.
4. C. E. Silva, F. Martínez, C. Madrid, T. León. "La floración en caña de azúcar, su manejo para mejoramiento genético y en la producción comercial", III Congreso AETA, Sep.18-20 del 2013. Guayaquil-Ecuador. pp.1-9.
5. CONAGUA. "Precipitación pluvial media histórica y total anual en el Estado de Chiapas". Disponible en: <http://www.conagua.gob.mx/OCFS07/Contenido/Documentos/mediasgrfs.htm>. 2016.
6. D. Côme. "Les Obstacles a la Germination", (Masson & Cie, Paris, 1970). p. 162.
7. D. J. Norman, J. Chen. "Effect of Foliar Application of Titanium Dioxide on Bacterial Blight of Geranium and Xanthomonas Leaf Spot of Poinsettia". *HORTSCIENCE.* Vol. 46, 3, 2011. pp.426-428.
8. E. A. Pilon-Smits, C. F. Quinn, W. Tapken, M. Malagoli, M. Schiavon. "Physiological functions of beneficial elements". *Curr. Opin. Plant Biol.* Vol. 12, 2009. pp. 267-274.
9. H. E. Senties-Herrera, F. C. Gómez-Merino, A. Valdez-Balero, H. V. Silva-Rojas, L. I. Trejo-Téllez. "The agro-industrial sugarcane system in Mexico: current status, challenges and opportunities", *Journal of Agricultural Science.* Vol. 6, 4, 2014. pp. 26-54.
10. H. Mahmoodzadeh, M. Nabavi, H. Kashefi. "Effect of Nanoscale Titanium Dioxide Particles on the Germination and Growth of Canola (*Brassica napus*)", *Journal of Ornamental and Horticultural Plants.* Vol. 3, 1, 2013. pp. 25-32.
11. INAFED. "Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México. Tuxtla Chico". Disponible en: <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM07chiapas/municipios/07102a.html>. 2016
12. J. D. Maguire. "Speed of germination in selection and evaluation for seedling emergence and vigor", *Crop Science.* Vol. 2, 2, 1962. pp. 176-177.
13. J. M. Mahdi, M. Kafi, A. Khalighi, N. Hasanzadeh. "Evaluation of aluminum sulfate as vase solution biocide on postharvest microbial and physiological properties of 'Cherry Brandy' rose", *Annals of Biological Research.* Vol. 3, 2, 2012. pp.1132-1144.
14. L. I. Trejo-Téllez, F. C. Gómez-Merino. "Respuestas fisiológicas y bioquímicas de plantas de tabaco a concentraciones de aluminio en invernadero", *TERRA Latinoamericana.* Vol. 25, 3, 2007. pp. 251-259.
15. M. G. Andrade-Landell, J. A. Bressiani. "Melhoramento genético e manejo varietal". (Cana-de-açúcar. L. L. Dinardo-Miranda, A. C. M. Vasconcelos, M. G. A. Landell (eds), Instituto Agronomico Campinas, 2010), pp. 101-176.
16. M. Liu, K. H. Hasenstein. "La³⁺ uptake and its effect on the cytoskeleton in root protoplasts of *Zea mays* L". *Plant Physiol.* Vol. 220, 2005. pp. 658-666.
17. M. Ramírez-Martínez, L. I. Trejo-Téllez, F. C. Gómez-Merino, A. M. Castillo-González, I. Hernández-Ríos, E. Hernández-Acosta. "Bioacumulación de potasio, calcio y lantano en tulipán tratado con lantano", *Terra Latinoamericana.* Vol. 30, 3, 2012. pp. 229-238.
18. N. Chaturvedi, R. Gannavarapu, N. Kumar-Dhal. "Effect of Lanthanum on the growth and physiological activities of *Zea mays*, *Vigna radiata* and *Vigna mungo*", *International Journal of Environmental Science.* Vol. 4, 5, 2014. pp. 653-659.
19. P. S. Kidd, J. Proctor. "Effects of aluminium on the growth and mineral composition of *Betula pendula* Roth", *J. Exp. Bot.* 51, 2000. pp. 1057-1066.
20. S. Matthews, M. Khajeh-Hosseini. "Mean germination time as indicator of emergence performance in soil of seed lots of maize (*Zea mays*)", *Seed Science and Technology.* Vol. 34, 2006. pp. 339-347.

21. T. Kleiber, B. Markiewicz. "Application of "Tytanit" in Greenhouse Tomato Growing", Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus. Vol. 12, 3, 2013. Pp. 117-126.
22. V. Serrano-Altamirano, G. Díaz-Padilla, A. López-Luna, M. A. Cano-García, A. D. Báez-González, E.R. Garrido-González. "Estadísticas climatológicas básicas del Estado de Chiapas (período 1961-2003)". (Centro de Investigación Regional Pacífico Sur, Campo Experimental Centro Chiapas. Libro Técnico 1. INIFAP, 2006). p. 186.
23. W. Xiao-dong, C. Ou-yang, F. Zhe-ren, S. Gao, F. Chen and L. Tang. "Effects of exogenous silicon on seed germination and antioxidant enzyme activities of *Momordica charantia* under salt stress", Journal of Animal & Plant Sciences. Vol. 6, 3, 2010. Pp. 700- 708.

CRECIMIENTO DE TRES VARIEDADES DE ALCATRAZ EN RESPUESTA AL SUMINISTRO DE LANTANO EN LA SOLUCIÓN NUTRITIVA

Nadia Issaí Torres-Flores^a, Libia I. Trejo-Téllez^a, Gabriel Alcántar-González^a, Fernando C. Gómez-Merino^b, Prometeo Sánchez-García^a y Brenda I. Trejo-Téllez^c.

Colegio de Postgraduados ^aCampus Montecillo, ^bCampus Córdoba, ^cCampus San Luis Potosí.

RESUMEN

En este estudio se evaluó en un experimento factorial, el efecto de la concentración de La (0, 10, 20 y 30 μ M) y de la fuente de La [$\text{La}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y LaCl_3] en la altura de planta en cosecha de tres variedades comerciales de alcatraz (Gold Fever, Regal y Garnet Glow). De cada uno de los ocho tratamientos resultantes se tuvieron cinco repeticiones y la unidad experimental fue una planta en una bolsa de polietileno negro. El La fue adicionado a la solución nutritiva y durante el ciclo de cultivo se realizaron tres riegos semanales de 200 mL por unidad experimental. Entre variedades se observaron respuestas diferenciales. En Gold Fever y Garnet Glow no se observaron efectos principales ni interactivos significativos en la altura de planta. En Regal el efecto principal de concentración de La afectó de manera significativa la altura de planta; la adición de La en concentración de 30 mM incrementó la altura en esta variedad en 27% en comparación con el testigo (sin La). Así también en Regal la interacción de los factores de estudio fue significativa, la adición de La como LaCl_3 en concentración de 30 μ M, incrementa la altura en 44% en comparación con plantas sin La en la solución nutritiva. Se concluye que el La no afecta de manera negativa el crecimiento de alcatraz en las variedades Gold Fever y Garnet Glow, mientras que en la variedad Regal esta variable incrementa por efecto del La.

1. INTRODUCCIÓN

La horticultura ornamental es de gran importancia en México debido a que presenta características favorables para la producción, tales como una gran diversidad de climas que le permiten cultivar alrededor de 349 especies distintas, en un área de 375 000 ha, donde el 5.8% está destinado a la producción de ornamentales (García *et al.*, 2008); el 93% de la producción de ornamentales se obtiene a cielo abierto, mientras que el 7% es en invernadero (Morales, 2011).

En el mercado actual, existen más de 120 híbridos de alcatraces de colores con diferentes matices y tonalidades (Funnell, 1993); además de que continuamente, se están obteniendo variedades de diferentes colores a los existentes para favorecer el mercado (López *et al.*, 2005). La disponibilidad de nutrimentos es uno de los factores determinantes en el desarrollo sano, vigoroso y equilibrado de los cultivos, que permite lograr una producción óptima cuantitativa y cualitativamente (Gómez *et al.*, 2010).

El lantano es un metal, considerado el segundo en abundancia dentro del grupo de los elementos de las tierras raras; dicho metal fue descubierto por Carl Gustaf Mosander, en Suecia en el año de 1839. El lantano junto con el silicio, cobalto, sodio, selenio, titanio y vanadio están incluidos en el grupo de los elementos benéficos, es decir de forma directa o indirecta benefician la nutrición de las plantas superiores. Estos elementos estimulan el crecimiento y el desarrollo en las plantas pero no se consideran esenciales porque no cumplen con los criterios de esencialidad (Rodríguez y Floréz, 2015).

En el contexto anterior, este trabajo plantea como objetivo la evaluación del parámetro altura de planta en tres variedades de alcatraz de color (Gold Fever, Regal y Garnet Glow), durante su ciclo de evaluación para determinar si la concentración y la fuente de La aplicadas influyen en el desarrollo del cultivo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló bajo condiciones de invernadero; en la cual fueron utilizados rizomas de tres variedades comerciales de alcatraz (Gold Fever, Regal y Garnet Glow); los cuales fueron desinfectados con una solución de Cupravit® + Benomilo® en una dosis de 2 g L⁻¹ de agua durante 15 min para prevenir enfermedades fungosas; inmediatamente después de esta aplicación los rizomas se introdujeron en una solución de 100 mg L⁻¹ de ácido giberélico, por 15 min para estimular la floración. Cada unidad experimental consistió en una bolsa de polietileno negro de 30 x 30, con una mezcla de tezontle (tamaño medio de partícula entre 5 y 8 mm) + Agrolita® (70/30, v/v); utilizada como sustrato, donde los rizomas fueron plantados uno por bolsa.

Se evaluaron ocho tratamientos, producto de la aplicación de cuatro dosis de La (0, 10, 20 y 30 µM) y de dos fuentes de La [La(NO₃)₂ 6H₂O y LaCl₃]. Se utilizó un experimento factorial 4X2 con cinco repeticiones por tratamiento, teniendo 40 unidades experimentales. Las concentraciones evaluadas fueron suministradas en la solución nutritiva Steiner al 50% (Steiner, 1984). La aplicación de los tratamientos se inició 15 días después de la plantación (ddp), aplicando 200 mL por bolsa tres veces por semana. A partir de que la primer hoja estaba completamente desarrollada y con una altura de 10 cm, se inició con el registro de altura cada semana, hasta llegar a una altura constante; registrando la final al momento de la cosecha. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias mediante la prueba de Tukey (p ≤ 0.05 %) empleando el software Statistical Analysis System (SAS, 2002).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Figura 1** se muestran las alturas de los ocho tratamientos en la variedad Gold Fever, registradas al momento de la cosecha, donde se observa que no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos; de igual forma no hubo diferencias significativas entre las dos fuentes aplicadas [La(NO₃)₂ 6H₂O y LaCl₃] ya que presentaron una altura de 41.6 y 41.0 cm respectivamente.

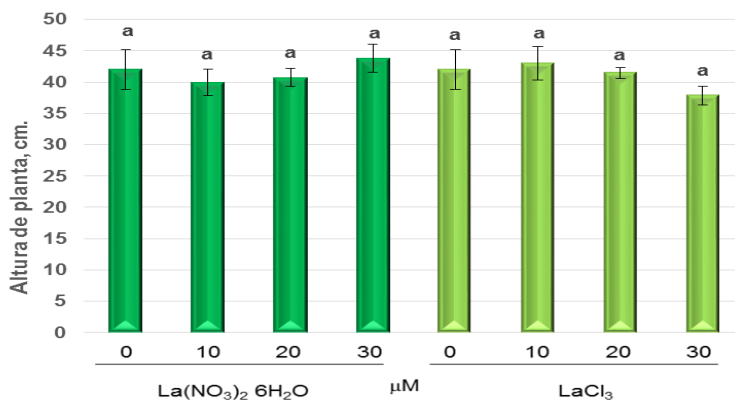


Figura 1. Altura de planta en la variedad Gold Fever, en respuesta a la aplicación de 4 dosis (0, 10, 20 y 30 µM) de dos fuentes de La [La(NO₃)₂ 6H₂O y LaCl₃]. Barras ± DE con letras distintas en cada figura indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, P ≤ 0.05) entre tratamientos.

En la variedad Regal el efecto principal de concentración de La afectó de manera significativa la altura de planta; la adición de La como $\text{La}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en concentración de 30 μM incrementó la altura en esta variedad en 27% en comparación con el testigo (sin La).

Así también en esta variedad la interacción de los factores de estudio fue significativa, la adición de La como LaCl_3 en concentración de 30 μM , incrementa la altura en 44% en comparación con plantas sin La en la solución nutritiva (**Figura 2**).

Martínez *et al.* (2012) reportaron que el La, al ser un catión y presentar propiedades químicas similares a los elementos Ca y K, puede tener efectos en la absorción y acumulación de estos nutrientes, los cuales son de suma importancia para el cultivo de tulipán (*Tulipa gesneriana* L.); debido a que favorece el incremento de altura de la planta y el peso de materia seca.

De la misma manera en especies como arroz (*Oriza sativa* L.) y en *Arabidopsis thaliana*, al estudiar distintas concentraciones de La^{3+} , la menor elongación de tallo se reportó en el testigo (Fashui *et al.*, 2000).

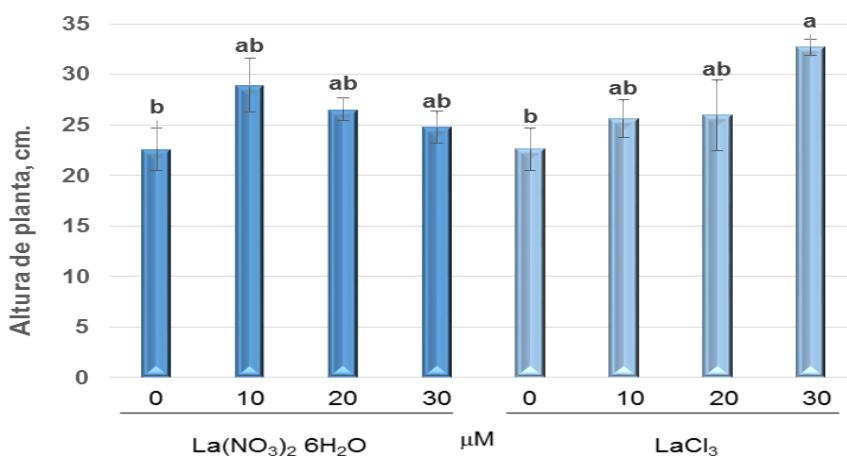


Figura 2. Altura de planta en la variedad Regal, en respuesta a la aplicación de 4 dosis (0, 10, 20 y 30 μM) de dos fuentes de La [$\text{La}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y LaCl_3]. Barras \pm DE con letras distintas en cada figura indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

En la variedad Garnet Glow, en la variable altura de planta registrada al momento de la cosecha no presentó diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos; de la misma manera, los efectos principales de los factores de estudio no fueron significativos. La altura de planta promedio fue de 29.3 cm con el tratamiento con LaCl_3 y de 27.4 cm con el suministro de $\text{La}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (**Figura 3**).

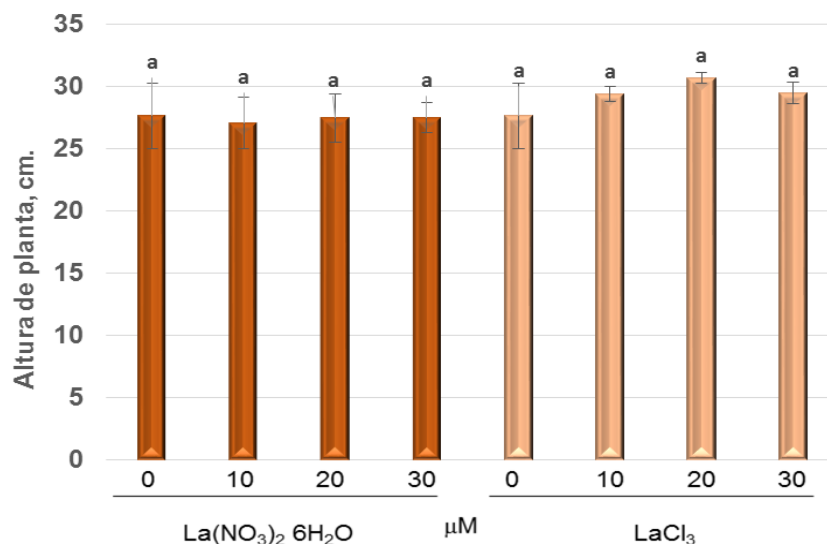


Figura 3. Altura de planta en la variedad Garnet Glow, en respuesta a la aplicación de 4 dosis (0, 10, 20 y 30 μM) de dos fuentes de La [$\text{La}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y LaCl_3]. Barras \pm DE con letras distintas en cada figura indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

4. CONCLUSIÓN

Se concluye que el La no afecta de manera negativa el crecimiento de alcatraz en las variedades Gold Fever y Garnet Glow, mientras que en la variedad Regal incrementa la altura de planta, especialmente cuando es suministrado como LaCl_3 a una concentración de 30 μM .

BIBLIOGRAFÍA

1. A. López. V., J. Pérez., C. Sosa., J. M. Mejía y L. Bucio. El cultivo de plantas ornamentales tropicales. Instituto Para el Desarrollo de Sistemas de Producción del Trópico Húmedo de Tabasco. 117 p. 2005.
2. A. Steiner, "The universal nutrient solution". In: ISOSC Proceedings 6th International Congress on Soilless Culture. The Netherlands. 1984.633-649.
3. J. J. García D; H., Chalate, M. y R., San Juan, H. Identificación y Priorización de la Megacadena Ornamental en el estado de Veracruz. Tepetates, Veracruz. Fundación produce de Veracruz, A. C. y Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz. 2008.
4. H. Fashui., W. Zhenggui. and G. Zhao. Effect of Lanthanum on Aged Seed Germination of Rice. Department of Chemistry, University of Science and Technology of China. 2000. 75:205-213.
5. K. Funnell. "The Physiology of Flower Bulbs". *Zantedeschia*. In: De Hertogh A. and M. Le Nard (Eds.). Amsterdam, Holland. Elsevier Science. 1993. pp. 683-704.
6. M. Ramírez. M., L. I. Trejo. T., F. C. Gómez. M., A. M. Castillo. G., I. Hernández. R., E. Hernández. A. Bioacumulación de potasio, calcio y lantano en tulipán tratado con lantano. Terra Latinoamericana, Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Vol. 30, 3, 2012, pp. 229-238.

7. M. Morales, S. Construcción de indicadores agregados para la toma de decisiones financieras en el sector de floricultura en el Estado de México. Programa de Postgrado de Ciencias de la Administración. Tesis de Maestría en Finanzas. Universidad Autónoma de México, México. 2011.
8. S. Gómez, C. R. Bonilla., y J. C. Menjívar. "Absorción de nutrientes en *Zantedeschia elliotiana* variedad Cristal Blush y su relación con la producción de biomasa en condiciones de la zona cafetera de Colombia". Acta Agronómica Vol. 59, 4, 2010, pp 462-472.
9. M. Rodríguez, S. y V. Floréz, R. Elementos esenciales y beneficiosos. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 2005.
10. SAS. SAS High-Performance Forecasting 2.2: User's Guide, Volumes 1 and 2. Cary, NC: SAS Institute Inc. Ver. 9. 652p. SAS. 2002. SAS High-Performance Forecasting 2.2: User's Guide, Volumes 1 and 2. Cary, NC: SAS Institute Inc. 2002. Ver. 9. 652p.

MEJORAMIENTO DE SUELOS SALINOS EMPLEANDO *AZOTOBACTER* PARA EL CULTIVO DE HORTALIZAS

E. Adriana Villeda ^a, E. L. Macías-Wong^a, D. Cottonieto-Conde^a, N. Morales-Macías^a, R. García-Barrera^a, P. R. Galicia-García^a.

Laboratorio de Biotecnología Ambiental. Área A5-Químico-Biológicas. Universidad Tecnológica de Tecámac.

RESUMEN

Existen distintos tipos de técnicas para recuperación de suelos (entre ellos el suelo salino); que buscan favorecer sus condiciones fisicoquímicas y hacerlos más aptos para el cultivo. Una de ellas emplea microorganismos como fijadores de nitrógeno (N_2) (**MEB**). *Azotobacter* es una bacteria fijadora de N_2 de vida libre no simbiótica; esto asegura su permanencia y adaptación. Una vez inoculada al suelo es capaz de utilizar distintos tipos de fuentes de carbono para alimentarse, entre ellas las sales. El objetivo es mejorar las condiciones de suelo para el cultivo de hortalizas (rábano y lechuga) empleando diversas concentraciones de inóculos de *Azotobacter*. Se determinaron las características fisicoquímicas al suelo (conductividad eléctrica, pH, carbono total y N_2) de acuerdo a la NOM 021 STPS 2010, clasificando al suelo como fuertemente salino. Se cuantificó carbono total y N_2 antes y después de colocar inóculos de *Azotobacter* en concentraciones 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 UFC/ml en cultivos de rábano y lechuga. Al término de 3 meses la concentración de inóculo de *Azotobacter* 1×10^7 UFC/ml mostró un incremento de 50% en los niveles de N_2 , confirmando la adaptación de la bacteria, el incremento en la fijación de N_2 en el suelo y el mejoramiento del suelo salino para el cultivo de hortalizas.

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los elementos naturales más importantes es el suelo, ya que constituye la base del ecosistema terrestre. La explotación de los suelos ha sido uno de los principales problemas en nuestro país actualmente, la tierra pierde su fertilidad, por lo que no se puede cultivar nada que sea aprovechable para el ser humano y se pierde gran parte de la biodiversidad en consecuencia de ello; por lo tanto, el mejoramiento del suelo para el crecimiento de plantas con propiedades alimenticias es de gran importancia para la vida del hombre y muchos seres vivos incluyendo microorganismos. Desde hace algunos años y hasta la actualidad se han tratado de desarrollar técnicas para el mejoramiento de suelos tales como la fertilización a base de compostas y la modificación de algunas especies bacterianas y de plantas (transgénicos), sin embargo estas técnicas no son del todo buenas, ya que se debe de producir un gran cantidad de materia orgánica para realizar una composta, que si bien ayuda a reducir los desechos, el aprovechamiento no es permanente, y en el caso de los transgénicos nos puede ocasionar lo que se llama un cuello de botella, que en lugar de mejorar perjudica al tener el riesgo de que ciertas especies de plantas desaparezcan. Otro problema es que se han tratado los suelos con fertilizantes nitrogenados el problema es que su producción es costosa y su utilización no es del todo efectiva.

El presente trabajo tiene como objetivo, analizar el suelo de la Universidad Tecnológica de Tecámac, e identificar las condiciones en que se encuentra; para realizar la adaptación de *Azotobacter* en el suelo y evaluar su adaptación midiendo nitrógeno y con el cultivo de hortalizas.

2. TEORÍA

Los suelos salinos son producto de la acumulación de sales solubles esto puede ocurrir de manera natural que es cuando se trata de suelos bajos y planos, que son periódicamente inundados por ríos o arroyos; o si el nivel de las aguas subterráneas es poco profundo y el agua que asciende por capilaridad contiene sales disueltas. Por otro lado cuando la salinidad tiene un origen antropogénico generalmente está asociado a sistemas de riego.

Se llama suelo salino a un suelo con exceso de sales solubles, La sal dominante en general es el cloruro de sodio (NaCl), razón por la cual tal suelo también se llama suelo salino-sódico.

Una consecuencia de la salinización del suelo es la pérdida de fertilidad, lo que perjudica o imposibilita el cultivo agrícola. Es común frenar o revertir el proceso mediante costosos lavado de los suelos para lixiviar las sales, o pasar a cultivar plantas que toleren mejor la salinidad. Por otro lado, en la planificación de los sistemas de riego modernos este es un parámetro que se considera desde el comienzo, pudiendo de esta forma prevenirse la salinización dimensionando adecuadamente las estructuras y estableciendo prácticas de riego adecuadas (Abrol, 1988).

Entre las acciones para proteger los ecosistemas agropecuarios y prevenir su degradación, la aplicación de abonos orgánicos tiene una importancia significativa, pues resulta indispensable que la materia orgánica, y particularmente el humus, es el sostén básico para la vida en este medio y puede definir su potencial productivo (Paneque & Calaña, 2004). El concepto y la tecnología de los microorganismos efectivos (EM) o microorganismos benéficos (MB), como también se les llama, fueron desarrollados por el Dr. Teruo Higa, Japón (Correa, 2008).

Los microorganismos que intervienen en la fijación biológica de nitrógeno atmosférico (FBNA) que es la reducción enzimática de nitrógeno (N_2) a amoníaco (NH_3), podemos clasificarlos en dos grupos. Los primeros son microorganismos como bacterias, algas y hongos que fijan nitrógeno en forma no simbiótica o de vida libre. El segundo grupo se compone por microorganismos que fijan el nitrógeno en forma simbiótica con plantas leguminosas y no leguminosas, las mayores cantidades de nitrógeno atmosférico fijado, es llevado a cabo por leguminosas en asociación simbiótica con bacterias del género *Rhizobium* (Bojórquez *et al*, 2010). En las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre se encuentran los géneros más estudiados que son *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckia* y *Klebsiella*.

Algunos de estos microorganismos son utilizados para la preparación de biofertilizantes y los biofertilizantes son preparados de microorganismos aplicados al suelo y/o planta con el fin de sustituir parcial o totalmente la fertilización sintética así como disminuir la contaminación generada por los agroquímicos. Los microorganismos utilizados son clasificados dentro de dos grupos: El primer grupo incluye microorganismos que tienen la capacidad de sintetizar sustancias que promueven el crecimiento de la planta, fijando nitrógeno atmosférico, solubilizando hierro y fósforo inorgánico y mejorando la tolerancia al stress por sequía, salinidad, metales tóxicos y exceso de pesticidas, por parte de la planta. El segundo grupo incluye microorganismos los cuales son capaces de disminuir o prevenir los efectos de deterioro de microorganismos patógenos (Alfonso *et al*, 2007)

Azotobacter es una bacteria de vida libre que crece en medios sin nitrógeno debido a que estas utilizan el nitrógeno atmosférico para la síntesis de sus proteínas celulares. Estas proteínas se mineralizan después de que la célula muere lo que contribuye a la disponibilidad de nitrógeno en el suelo para las plantas silvestres y los cultivos agrícolas.

Son bacterias gram -, que tienen una pared celular compuesta por una membrana externa y una capa interna de peptidoglicano que contiene ácido murámico y mureína. El género *Azotobacter* son células ovoides que miden de 1.5 a 2.0 µm de diámetro, que habitan generalmente en suelos y aguas frescas. Son pleomórficas, su morfología varía desde bacilos hasta cocos (Espín, 2002).

Algunas especies como *A. vinelandii*, *A. chroococcum* tienen un proceso de diferenciación para formar un quiste que las protege de la desecación. Además de que son quimioorganotróficas, es decir, utilizan azúcares, alcoholes y sales inorgánicas para crecer también utilizan nitratos y sales de amonio entre otros aminoácidos como fuente de nitrógeno. *Azotobacter* además de fijar nitrógeno, sintetiza sustancias como la tiamina, ácido nicótico, ácido pantoténico, riboflavina y otras hormonas vegetales que estimulan la germinación de las semillas y el crecimiento y desarrollo de algunas especies vegetales además de fungicidas que inhiben el crecimiento de hongos patógenos del género *fusarium*, *alternaria*, *penicillium* y *rhizoctonia* (Yerovi, 2010) .

3. PARTE EXPERIMENTAL

Se determinaron conductividad eléctrica, pH, carbonó total y N₂ siendo la de mayor importancia la de nitrógeno que se realizó mediante el método AS-25 proceso de digestión en un equipo Kjendal en el cual en un matraz Kjendal se añade un 1 g de muestra al cual se le adiciona 1.1 g de mezcla de catalizadores y 3 ml de H₂SO_{4 conc} y se lleva a digestión hasta que el digerido se torna color verde claro al termino se deja enfriar después se le agrega 300 ml de agua, 100 ml de NaOH al 10 N, 6 a 7 lentejas de sodio, virutas de parafina se lleva a destilación y en el matraz donde se recibirá la destilación contendrá 50 ml de H₂BO₄ al 4% con gotas de indicador, alcanzado un volumen de 200 ml en el matraz se retira y se hace una titulación con HCl 0.1 N. También se determinó conductividad eléctrica por el método AS-08 para la cual primero se obtiene un extracto de saturación en la cual se pesan 600 gr de suelo y se adiciona agua hasta se asemeje a un espejo posteriormente se deja reposar 24 hrs pasadas estas se filtra por vacío, obtenido el extracto se calibra el conductímetro y se prosigue a leer las muestras. Se realizaron por triplicado y dieron resultados de que el suelo no tenía las condiciones para el cultivo debido a su baja concentración de nitrógeno y la alta cantidad de sales presente en él. Se emplearon 3 concentraciones para determinar cuál era más efectiva en cultivo de lechuga y rábano. Para esto se realizó el cultivo de *Azotobacter* y el conteo por el método de vaciado en placa el cual consiste en hacer diluciones que van de 10⁻¹, 10⁻²...10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹, los tubos contendrán 9 ml de agua destilada estéril, del matraz madre se tomara 1 ml y se pasara a la primera dilución y de esta se pasara 1 ml a una caja Petri así sucesivamente hasta la dilución 10⁻⁹, se adiciona el medio a las cajas y se dejan incubar 48 hrs se proseguirá a leer las cajas que entran en un rango entre 25-250 UFC's al termino del conteo se multiplican por la inversa de la dilución donde hubo crecimiento. En este caso las diluciones en donde se hizo el conteo y las concentraciones de interés fueron las de 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹ se realizaron los cálculos con la siguiente fórmula $C_1V_1=C_2V_2$ despejándola para obtener los ml que se debía agregar del matraz madre para obtener las soluciones con las concentraciones deseadas, antes de proseguir a la inoculación se hizo una pre inoculación a las semillas la cual consistió en agregar en condiciones estériles a un tubo con agua destilada y las semillas 0.05 g de sacarosa además de 1 ml del matraz madre y dejar incubar 24 hrs esto para que la bacteria se adhiera a la semillas posterior a este tiempo sembrar en los vasos haciendo 10 repeticiones una por cada concentración y una por el control tanto de rábano como lechuga, teniendo las semillas ya sembradas se prosigue a inocular con las soluciones antes preparadas esto ya no en condiciones estériles se inoculara 3 ml al suelo. Después de 1 mes se realizó una segunda inoculación y al transcurso de 3 meses se volvió a determinar nitrógeno lo que confirma que la bacteria logro permanecer viable en el suelo.

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos fueron comparados con lo establecido en la NOM-021-SEMARNAT-2000 para los parámetros de fertilidad y salinidad. De las muestras tomadas de la parte este del parque estatal sierra hermosa se realizaron determinaciones de pH, conductividad eléctrica, materia

orgánica y N₂. El pH obtenido clasifica el suelo como medianamente alcalino que es un rango de 7.4 a 8.5; según Yerovi (2010) *Azotobacter* crece en pH alcalinos que oscila entre 7-8 esto nos indica que la bacteria podrá desarrollarse óptimamente en el suelo; al fijar en N₂ el pH podrá descender ya que *Azotobacter* fija nitrógeno de 7.0-7.5. El suelo se clasificó como fuertemente salino de acuerdo a la norma (de 8.1-16.0); esto no afecta en la adaptación de la bacteria ya que utiliza sales inorgánicas para crecer, y es capaz de soportar cantidades grandes de sal. La materia orgánica presente en el suelo es escasa lo que pudiera afectar en el desarrollo de las plantas. Los resultados de N₂ muestran que existe una importante deficiencia en el suelo ya que de acuerdo a la norma está en la clasificación de muy bajo que lo establece de un rango entre <0.05 lo que afecta el desarrollo de las plantas al ser un nutriente indispensable para su crecimiento. Los resultados muestran que hubo un aumento en la cantidad de N₂ en el suelo inoculado con *Azotobacter*; la concentración de 10⁻⁷ UFC/mL tubo un mejor crecimiento en comparación de las otras dos concentraciones de prueba

Con base en los resultados obtenidos se confirma que la bacteria logra adaptarse en suelos salinos, ya que logro mantenerse viable después del periodo de estudios.

La concentración adecuada para la aplicación del inoculo y en la cual se obtuvo un mejor crecimiento de las hortalizas de prueba es de 10⁷ UFC/ml así como en la medición de nitrógeno esto excluyendo el nitrógeno que ya fue consumido por la planta.

Las características físicas (crecimiento el cm) de la planta fueron mejores donde se empleó la concentración de 10⁷ UFC/ml de inóculo de *Azotobacter* con respecto al grupo control.

Se sugiere realizar análisis físico químicos y microbiológicos, para evaluar los cambios que presenta el suelo a largo plazo en comparación a como se encontraba en un inicio; así mismo una evaluación microbiológica del suelo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sepúlveda V. T. & Velazco-Trejo J.A. Tecnología de remediación para suelos contaminados, México.
2. Espin G. "Biología de *Azotobacter Vinelandii*". http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_09.pdf fecha de consulta: mayo 2015.
3. Navarro, G. (2003). Química Agrícola. En G. Navarro, Química Agrícola. Mexico: Mundi-Prensa.
4. Mexico, G. D. (2013). Atlas de riesgos de Tecamac. En Atlas de riesgos de Tecamac. Mexico: Dirección General de Protección Civil del Estado de México. Pp 10-16.
5. Abrol I. P., Yadav J.S.P, Massoud F. 1988. Salt affected soils and their management, Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO), Soils Bulletin 39.
6. Paneque, V. M., & Calaña, J. M. (2004). Abonos orgánicos. Conceptos y prácticas para su evaluación y aplicación. 1ra. ed. La Habana: Ed. ACTAF.
7. Correa, M. F. (2008). Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Editorial de la Universidad de Granada.
8. Bojórquez, A. D. A., Gutiérrez, C. G., Báez, J. R. C., Sánchez, M. Á. A., Montoya, L. G., & Pérez, E. N. (2010). Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. Ra Ximhai, 6(1), 51-56.
9. Mayz-Figueroa, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. Revista Científica UDO Agrícola, 4(1), 1-20.

10. Mantilla-Paredes, A., Cardona, G., Peña-Venegas, C., Murcia, U., Rodríguez, M., & Zambrano, M. (2008). Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia colombiana. *International Journal of Tropical Biology and Conservation*, 57 (4).
11. Vargas, P. D., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz-Suárez, J. J., & González, G. A. (2001). Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra*. 19: 327-335.

ALTERNATIVAS PARA DISMINUIR LA FERTILIZACIÓN MINERAL EN SORGO DULCE

Rosa Laura Rebolledo García¹, Sergio Uribe Gómez² y Noé Montes García³

^{1,2}INIFAP- Campo Experimental Cotaxtla ³INIFAP- Campo Experimental Río Bravo

RESUMEN

El objetivo fue evaluar las características agronómicas y el rendimiento de sorgo dulce ante el uso de fertilizantes minerales combinados en diferentes dosis con productos alternativos. Se estableció un ensayo en bloques al azar con cuatro repeticiones con el material Experimental 1. Se contó con 10 tratamientos: 1. Testigo absoluto (0-0-0), 2. Composta (20 t ha⁻¹), 3. Fertilización química (138-46-40), 4. Composta (20 t ha⁻¹) + Fertilización química (69-23-20), 5. Composta (20 t ha⁻¹) + Fertilización química (34-11-10), 6. Composta (10 t ha⁻¹) + Fertilización química (69-23-20), 7. Composta (10 t ha⁻¹) + fertilización química (103-34-30), 8. Zeolita (65 kg ha⁻¹) + Fertilización química (43-18-30), 9. Zeolita (5 t ha⁻¹) + Composta (15 t ha⁻¹) y 10. Zeolita (2.5 t ha⁻¹) + Composta (7.5 t ha⁻¹). Se determinó por planta: altura, diámetro, peso de hoja, de panoja, tallo y sólidos solubles totales; y por superficie: rendimientos de hoja, panoja y tallo. Se realizó un análisis de varianza GLM y la prueba de Tukey ($\alpha=0.15$). En las características de plantas, el tratamiento tres sobresalió sobre los demás ($p<0.15$) en altura (169.8 cm), mientras que el tratamiento seis sobresalió en diámetro (0.77 cm) y peso de panoja (6.57 g) ($p<0.15$), por otra parte, el tratamiento cuatro fue el mejor ($p<0.15$) en relación al peso de tallo con 69.66 g, no se encontraron diferencias estadísticas en la variable peso de hoja.

1. INTRODUCCIÓN

El sorgo dulce es considerado un cultivo con potencial para la generación de bioenergía. El sorgo dulce no compite con los granos, ya que puede sembrarse en áreas no aptas para otros granos y ofrece en algunos casos granos y forraje, siendo el tallo rico en azúcares el principal órgano que se aprovecha (Montes et al., 2010) (CENTA 2007). Actualmente se está usando en algunos países para la producción de etanol carburante (Giorda y Ortiz, 2012) (Varela, 2010).

El cultivo de sorgo dulce es relativamente nuevo en Veracruz, por lo que se requiere de la optimización del manejo agronómico, como control de plagas y enfermedades, densidad de población, sistemas de siembra, fecha de siembra y nutrición.

La fertilización nitrogenada promueve el contenido de sacarosa y la tasa de crecimiento en sorgo. La respuesta positiva en el rendimiento de sorgo dulce a la aplicación de fertilizante se ha observado en aplicaciones de nitrógeno (N) de 45 a 150 kg ha⁻¹. Un exceso en la cantidad de N puede estimular el crecimiento vegetativo a expensas de la acumulación de azúcares. La deficiencia de fósforo puede afectar la calidad del jugo, habiéndose recomendado dosis moderada de este nutriente (Montes *et al.*, 2010).

El abono orgánico a menudo crea la base para el uso exitoso de los fertilizantes minerales. La combinación de abono orgánico y fertilizantes minerales ofrece las condiciones ambientales ideales para el cultivo, el primero mejora las propiedades del suelo y el segundo provee los nutrientes que las plantas necesitan. No obstante, el abono orgánico por sí solo no es suficiente

para lograr el nivel de producción que se requiere para hacer el cultivo rentable, por lo que los fertilizantes minerales tienen que ser aplicados adicionalmente (FAO, 2002).

Debido a la importancia de una nutrición en el cultivo y para contribuir a la mitigación del impacto ambiental causado por los fertilizantes minerales, el objetivo fue evaluar las características agronómicas y el rendimiento de sorgo dulce ante el uso de fertilizantes minerales combinados en diferentes dosis con productos alternativos.

2. PARTE EXPERIMENTAL

En el ciclo Otoño-Invierno 2014, dentro de las instalaciones del Campo Experimental Cotaxtla del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, se estableció un ensayo en bloques al azar con cuatro repeticiones con el material Experimental 1, específicamente en las coordenadas geográficas 18°56'23.633" N, 96°11'34.206" O. Se contó con 10 tratamientos: 1. Testigo absoluto (0-0-0), 2. Composta (20 t ha⁻¹), 3. Fertilización química (138-46-40), 4. Composta (20 t ha⁻¹) + Fertilización química (69-23-20), 5. Composta (20 t ha⁻¹) + Fertilización química (34-11-10), 6. Composta (10 t ha⁻¹) + Fertilización química (69-23-20), 7. Composta (10 t ha⁻¹) + fertilización química (103-34-30), 8. Zeolita (65 kg ha⁻¹) + Fertilización química (43-18-30), 9. Zeolita (5 t ha⁻¹) + Composta (15 t ha⁻¹) y 10. Zeolita (2.5 t ha⁻¹) + Composta (7.5 t ha⁻¹). La composta empleada fue sorgo dulce con 0.71% de N, 0.19% de P, 3.90 de K, 46.6% de materia orgánica y pH de 7.79. Las fuentes empleadas para la fertilización mineral fueron urea, fosfato diamónico y cloruro de potasio. El sorgo dulce se evaluó en enero de 2015, al momento de la cosecha. Se tomaron cinco plantas al azar por tratamiento a las que se les determinó: altura, diámetro a los 0.7 m, sólidos solubles totales, peso de hoja, de panoja, tallo; se consideró la sumatoria de estos tres como peso total. Además se tomaron los pesos de hoja, panoja y tallo y se determinó la producción de biomasa total en 4m². Se realizaron análisis de varianza y la prueba de Tukey ($\alpha=0.15$) con el software SAS 9.3.

En las variables tomadas por planta, no se observaron diferencias estadísticas significativas en las variables peso de hoja y sólidos solubles totales; mientras que el diámetro, la altura, el peso de panoja, tallo, total mostraron diferencias estadísticas significativas ($p<0.15$) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Valores de F, Significancia y Coeficiente de Variación de parámetros de crecimiento de sorgo dulce bajo diferentes tratamientos de nutrición.

Variable	Valor de F	Coeficiente de Variación
Diámetro	3.57 *	12.39
Altura	2.30 *	9.70
Peso de hoja	1.08 NS	37.45
Peso de panoja	4.18 *	13.57
Peso de tallo	2.88 *	26.27
Peso total	2.62 *	25.98
SST	0.55 NS	7.65

*Estadísticamente significativo, NS=no significativo, $p\leq 0.15$

Los tratamientos Fertilización química (138-46-40) y Composta (10 t ha⁻¹) + Fertilización química (69-23-20), fueron significativamente mayores en altura en comparación a los demás tratamientos. Por otra parte en lo referente a diámetro, el tratamiento Composta (10 t ha⁻¹) + Fertilización química (69-23-20), fue significativamente mayor a los otros (Cuadro 2). El tratamiento de Composta (20 t ha⁻¹) fue estadísticamente inferior en altura y diámetro, esto difiere con lo reportado por Salcedo (2015) que encontró que en el factor altura la composta no difiere estadísticamente con el testigo absoluto y tiende a ser superior al último. Las plantas presentaron un peso significativamente mayor de panoja con el tratamiento Composta (10 t ha⁻¹) + Fertilización química (69-23-20), mientras que el tratamiento que sobresalió en peso de tallo fue el Composta (20 t ha⁻¹) + Fertilización química (69-23-20). Con respecto al peso total de planta los tratamientos Composta (20 t ha⁻¹) + Fertilización química (69-23-20), Composta (10 t ha⁻¹) + Fertilización química (69-23-20) y Fertilización química (138-46-40), fueron significativamente superiores a los otros (Figura 1).

Cuadro 2. Altura, el diámetro y sólidos solubles totales promedio por planta en cada tratamiento de nutrición.

Tratamientos	Altura (cm)	Diámetro (cm)	SST (°Brix)
Fertilización química (138-46-40)	169.85 a	0.73 ab	13.61 a
Composta (10 t ha ⁻¹) + Fertilización química (69-23-20)	168.30 a	0.77 a	13.71 a
Composta (20 t ha ⁻¹) + Fertilización química (69-23-20)	166.90 ab	0.73 ab	13.95 a
Composta (20 t ha ⁻¹) + Fertilización química (34-11-10)	160.35 ab	0.72 ab	14.17 a
Zeolita (65 kg ha ⁻¹) + Fertilización química (43-18-30)	160.10 ab	0.68 abc	13.16 a
Composta (10 t ha ⁻¹) + Fertilización química (103-34-30),	158.60 ab	0.71 ab	12.96 a
Zeolita (2.5 t ha ⁻¹) + Composta (7.5 t ha ⁻¹)	151.25 ab	0.66 abc	13.73 a
Zeolita (5 t ha ⁻¹) + Composta (15 t ha ⁻¹)	149.85 ab	0.62 abc	13.85 a
Testigo absoluto (0-0-0)	140.45 ab	0.58 bc	14.15 a
Composta (20 t ha ⁻¹)	136.40 b	0.52 c	13.69 a

Medias con la misma letra entre filas son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.15$).

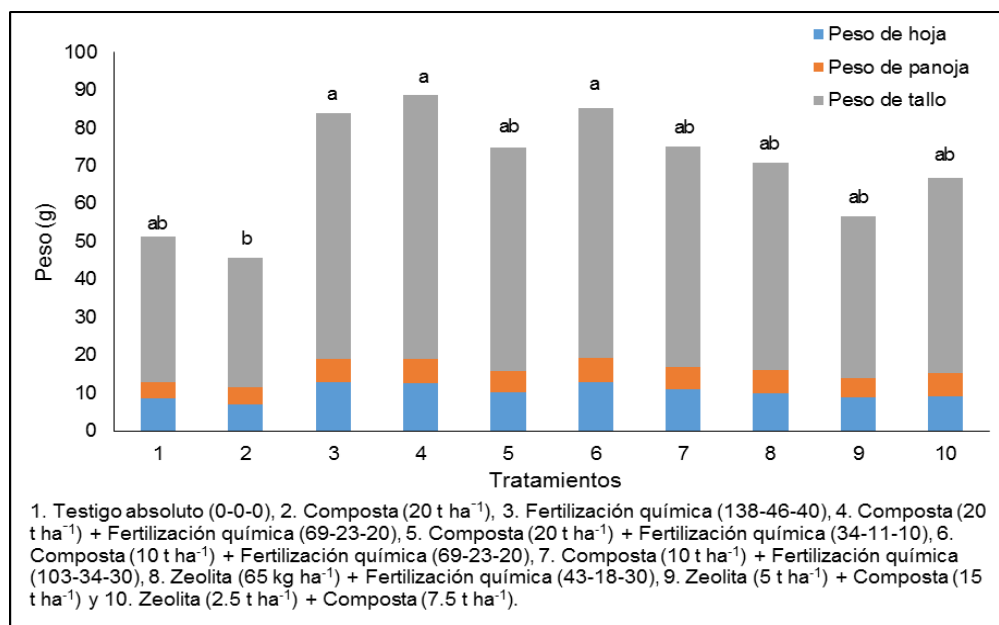


Figura 1. Producción de biomasa verde por tratamiento de nutrición por planta. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.15$).

En lo que respecta a rendimiento de biomasa verde por unidad de superficie, el análisis de varianza mostró diferencias estadísticas significativas en peso de hoja, panoja y de tallo y ninguna diferencia en peso total ($p < 0.15$) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Valores de F, Significancia y Coeficiente de Variación de parámetros de producción de biomasa de sorgo dulce sometidos diferentes tratamientos de nutrición, en una superficie de 4 m².

Variable	Valor de F	Coeficiente de variación
Peso de hoja	1.60 *	37.40
Peso de panoja	3.44 *	15.24
Peso de tallo	3.05 *	29.79
Peso total	0.94 NS	34.81

*Estadísticamente significativo, NS=no significativo, $p=0.15$

El tratamiento Composta (20 t ha⁻¹) + Fertilización química (69-23-20) fue estadísticamente superior a los otros tratamientos en las variables de rendimiento de biomasa verde: peso de hoja, peso de panoja y peso de tallo; mientras que el tratamiento Composta (20 t ha⁻¹) fue significativamente el más bajo en todas las variables. Los resultados coinciden con los encontrados por Orozco (1998) quien en banano observó que la fertilización química sola, tiene un efecto favorable mayor al de la composta y los de Bolaños et al. (2003) quienes observaron en el clon 'Dominico Harton' que al aplicar mezclas de fertilizante mineral con orgánicos los resultados eran equiparables a la nutrición mineral pura, consistente con lo encontrado con Cortéz (2010) que en

sorgo vio que la mezcla de fertilización mineral con compost afecta significativamente el peso de planta.

Cuadro 4. Producción de biomasa verde de sorgo dulce por tratamiento de nutrición, en una superficie de 4m².

Tratamientos	Peso (g)			
	Hoja	Panoja	Tallo	Total
Composta (20 t ha ⁻¹) + Fertilización química (69-23-20)	585.0 a	250.0 a	2657.5 a	2433.8 a
Composta (10 t ha ⁻¹) + Fertilización química (103-34-30)	422.5 ab	198.0 ab	2300.0 ab	2813.0 a
Fertilización química (138-46-40)	465.0 ab	215.0 ab	2210.0 ab	1872.5 a
Composta (20 t ha ⁻¹) + Fertilización química (34-11-10)	377.5 ab	203.8 ab	1900.0 ab	2601.3 a
Composta (10 t ha ⁻¹) + Fertilización química (69-23-20)	371.3 ab	197.5 ab	1852.5 ab	2185.0 a
Zeolita (65 kg ha ⁻¹) + Fertilización química (43-18-30), y	397.5 ab	193.8 ab	1775.0 ab	2716.3 a
Zeolita (2.5 t ha ⁻¹) + Composta (7.5 t ha ⁻¹)	322.5 ab	161.3 b	1550.0 ab	2561.3 a
Testigo absoluto (0-0-0)	280.0 b	158.8 b	1390.0 b	1653.8 a
Composta (20 t ha ⁻¹)	293.8 ab	178.8 b	1303.8 b	2216.3 a
Zeolita (5 t ha ⁻¹) + Composta (15 t ha ⁻¹)	331.3 ab	172.5 b	1197.5 b	2858.8 a

Medias con la misma letra entre filas son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.15$).

3. CONCLUSIONES

Se concluye que el tratamiento de 20 t ha⁻¹ de compostas combinado con la aplicación mineral de 69-23-50 de NPK, proporciona los rendimientos más altos de tallos para su empleo en la industria.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bolaños B.M.M.; Morales O.H. y Celis G.L.D. 2003. Fertilización (orgánica-química) y producción de 'Dominico hartón'. *InfoMusa* 12:1 pp.38-42
2. CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal). 2007- Guía Técnica del sorgo (*Sorghum bicolor*, L. Moench). San Andrés La Libertad, El Salvador. 40 p
3. Cortez, H.G. 2010. Efecto de la aplicación de compost de cachaza y fertilizante químico en suelos calcáreos en la corrección de clorosis férrica y rendimiento de sorgo.
4. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2002. World fertilizer use manual. Ed. Rue Marbeu. 4thEd. 77pp.
5. Giorda, L.M.; Ortiz, D. 2012. Prácticas de manejo en sorgos azucarados para la obtención de etanol en Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación Experimental Agropecuaria Manfredi. Argentina

6. Montes, G.N., Salinas, G.J., Gonzales, J. A., Loredó, P. R., Díaz, P. G. 2010. Guía técnica de producción de sorgo dulce [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] en Tamaulipas. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Río Bravo. Folleto técnico Núm. 49. Río Bravo, Tamaulipas. 46 p.
7. Orozco, R.J. 1998. Fertilizantes orgánicos y su aplicación en el cultivo de banano. Memorias del taller internacional sobre producción de banano orgánico y, ambientalmente amigable. pp 82-88.
8. Salcedo, B.A. 2015. Rendimiento del sorgo forrajero (*Sorghum Moench*, 1794) en parcela demostrativa bajo fertilización ecológica (compost).
9. Varela Morales Ramón. 2010. Estudio del Sorgo Dulce como alternativa de cultivo energético en la producción de energías alternas renovables; url: <http://www.certa.cc/Sorgo%20Dulce%20como%20alternativa%20de%20cultivo%20energetico.pdf>; 10 de mayo de 2016.

COMPOSICION QUIMICA Y FENOLICA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE GALLETAS SUPLEMENTADAS CON FRIJOL COMUN (*Phaseolus vulgaris* L.) Y SEMILLA DE CHÍA (*Salvia hispanica* L.)

Dánae Juárez López¹, David Hernandez-Lopez¹ y S. Horacio Guzmán-Maldonado²

¹Departamento de Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Celaya. Av. Tecnológico s/n. Celaya, Gto. ²Laboratorio de Alimentos. Campo Experimental Bajío (INIFAP) Km 6.5 Carretera Celaya-San Miguel Allende, Celaya, Gto.

RESUMEN

En México, el incremento en el consumo de alimentos chatarra ha aumentado el riesgo de padecer enfermedades crónicas degenerativas. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos productos con mejores propiedades nutrimentales y funcionales es primordial. Se prepararon galletas con harina de trigo integral (HT) y harina blanca (HB) por separado, harina de frijol Pinto Saltillo (HF) y semilla de chía (SCH) en proporciones 70:30:0, 60:30:10 y 55:30:15 (HT:HF:SCH), así como un control interno 100:0:0 (HT:HF:SCH). Con fines comparativos, se adquirió en el mercado local un producto similar. Se determinó el contenido de taninos condensados, fenoles solubles, flavonoides totales y antocianinas así como la capacidad antioxidante TEAC y ORAC y la composición química. Las galletas presentaron 60, 40 y 16% más taninos, fenoles y flavonoides, respectivamente, comparados con la galleta comercial. El contenido de antocianinas fue muy bajo (1.04 y 0.69 mgEC3/100g) en la galleta de harina blanca e integral, respectivamente) comparado con el resto de los compuestos fenólicos. Las capacidades antioxidantes de las galletas de frijol y chía presentaron incrementos similares. La capacidad antioxidante TEAC en las galletas de harina blanca e integral suplementadas fue de hasta 2004.2 μ ET/g y 2963.7 μ ET/100g, respectivamente, mucho mayor que la galleta comercial (60.2 μ ET/100g). La galleta suplementada tiene hasta un 20 y 15% más de fibra que la galleta comercial, mientras que el contenido de proteínas fue de 25 y 12% más que la galleta comercial, con harina integral y blanca, respectivamente. Las galletas suplementadas pueden ser una opción más nutritiva y de menor calidad nutraceutica que las galletas comerciales.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente el consumo de cereales y leguminosas se ha incrementado notablemente en la dieta de la población mexicana. El uso de ingredientes como el frijol, la chía, el maíz, el amaranto, ha promovido la elaboración de alimentos con propiedades benéficas como para ser clasificados como "alimentos funcionales". (Gonzales-Jiménez y col. 2010) Un alimento funcional es aquel que por los ingredientes que contiene pueden contribuir a la buena salud y prevenir enfermedades crónicas. Las galletas constituyen uno de los productos más versátiles clasificados como de "consumo masivo"(Maldonado, Ronald, & Pacheco de Delahaye, Emperatriz, 2000). La galleta en la actualidad es considerada una botana versátil, pero que puede carecer de la calidad nutrimental y nutraceutica. Igualmente, el aumento del interés en el consumo de fibra se ha visto incrementado en los últimos años y la galleta puede ser una fuente a la mano de ella. Por otro lado, la combinación cereal-leguminosa complementa las deficiencias de aminoácidos azufrados de la leguminosa y en el otro sentido cubre la deficiencia de lisina o triptófano de los cereales. La chía y el frijol son buena fuente de proteína, minerales y fibra (Guzmán-Maldonado, 2003, Gonzales-Jimenes, 2010); además presentan compuestos funcionales que pueden promover la salud y

disminuir el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y diabetes. (Reynoso-Camacho y col. 2003)

2. TEORÍA

A lo largo de los años, las leguminosas han sido cultivadas por el hombre y han formado parte de la cultura de varios países en el mundo. Ejemplo de estas son el frijol, el garbanzo, las habas y las lentejas (Vásquez Moreno, 2006). Dentro del grupo de las leguminosas que se consumen en el mundo, el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es el de mayor consumo, formado parte de la dieta de la población mexicana y otros países en América latina (Leterme y Muños, 2002). Por su parte la semilla de chía (*S. hispánica* L.) es una planta herbácea anual de 1 a 1,5 m de altura, con tallos ramificados de sección cuadrangular. Es considerada un “superalimento” (Beltrán-Orozco, 2003) debido a su alto contenido de aminoácidos, ácidos grasos omega 3 y 6, así como contenido en fibra (Ayerza y Coates, 2005)

3. PARTE EXPERIMENTAL

Se elaboraron y analizaron ocho galletas preparadas con harina de trigo integral (HTI) y harina blanca (HTB) por separado que fueron suplementadas con harina de frijol Pinto Saltillo (HF) y semilla de chía (SCH). Las galletas se formularon con las siguientes proporciones 70:30:0, 60:30:10 y 55:30:15 (HTI o HTB:HF:SCH). Con fines comparativos se prepararon galletas únicamente con HTI y HTB. El resto de los insumos (aceite vegetal, azúcar y sal) fueron añadidos en proporciones constantes y se adquirió en el mercado galletas comerciales de HTI y HTB. Las muestras se liofilizaron, desgrasaron y molieron y se almacenaron a – 5 C hasta su análisis. A partir del análisis químico se descarta con fines de conveniencia los tratamiento con 20% de semilla de chía y 100% harina integral.

Elaboración de las galletas. Las operaciones unitarias para la preparación de las galletas en orden fueron el amasado de los insumos, laminado, horneado, enfriamiento y empaque. La semilla de chía entera fue incorporada durante el amasado.

Compuestos fenólicos. Los taninos condensados fueron determinados con el método de Desphande y Cheryan (1985). Se empleó una curva estándar de catequina y se reportaron en mg equivalentes de catequina/100 g, BS. Los fenoles totales fueron analizados de acuerdo con el método de Folin-Ciocaltue (Singleton y col., 1999) y se reportaron como mg equivalentes a ácido gallico/100 g, BS. Los flavonoides totales evaluaron con el método sugerido por Dewato y col. (2002) y se reportaron como mg EAG/100 g, BS) y el contenido de antocianinas se determinó con el método de Abdel y Hucl (1999) y se reportaron como mg equivalentes de Cianidin-3 glucósido por 100 g de muestra (mg EC3G/ 100 g, BS).

Análisis químico. El análisis químico proximal se realizó empleando las técnicas de la AOAC (2002) a través del contenido de proteína (Nx6.25) (978.04), lípidos (920.39), cenizas (923.03) y fibra dietaria (985.29). Los carbohidratos fueron determinados por diferencia porcentual con los compuestos anteriores.

Capacidad antioxidante. El nivel de la capacidad antioxidante TEAC fue evaluada con el ensayo de decoloración con el radical catiónico ABTS•+ (Re y col., 1999). Los resultados se reportaron en μmol equivalentes de Trolox/g, BS (μmol ET/g, BS) a través de una curva patrón usando como antioxidante control el TROLOX. El ensayo ORAC se determinó con el método reportado por Ou y col. (2001). Como referencia se usó Trolox y el nivel de ORAC fue calculado usando las diferencias en el área bajo la curva del decaimiento de la fluoresceína entre el blanco y la muestra. Los resultados se reportaron en μmol equivalentes de Trolox/g, BS (μmol ET/g, BS).

4. RESULTADOS

Compuestos fenólicos.

Con respecto al contenido de taninos condensados, existe un aumento de los mismos para galleta de harina blanca HIB comparados con galleta de harina integral HIT ($P < 0.05$). Observándose un mayor contenido de los mismos, para tratamientos de galleta con harina integral (HI) (Cuadro 1). Esto probablemente debido a que la harina blanca refinada, está compuesta principalmente por almidón, el cual es pobre en taninos, además que durante el proceso de refinado, se eliminan la cascara y testa del trigo, lo que reduce aún más su contenido fenólico. Así mismo el contenido de taninos también se ve influenciado de manera positiva con la adición del frijol Pinto, como se puede observar en los tratamientos para las galletas suplementadas con chía y frijol Pinto, comparados con galleta comercial, donde se observa diferencia significativa entre ellos.

Cuadro 1. Contenido de taninos condensados (mg EC/100 g, BS) en galletas de harina de trigo integral (HTI) harina de trigo blanca (HTB) suplementadas con harina de frijol y semilla de chia.

HT:Frijol:Chia	Galleta HTI	Galleta HTB
70:30:0	305.58 ± 3.0 ^{aA}	241.53 ± 3.4 ^{aB}
60:30:10	320.22 ± 2.5 ^{bA}	285.19 ± 8.3 ^{bB}
55:30:15	352.75 ± 5.5 ^{cA}	285.91 ± 3.0 ^{bB}
50:30:20	378.01 ± 4.9 ^{dA}	362.98 ± 5.4 ^{cB}
100:0:0	231.16 ± 9.5 ^{eA}	75.11 ± 5.2 ^{dB}
Galleta comercial	115.56 ± 8.5 ^{tA}	32.0 ± 5.4 ^{eb}

EC = equivalentes de catequina; HT = harina de trigo; HTB= harina trigo blanca
Medias con letras minúsculas iguales en cada columna no presentan diferencia significativa (Tukey $p < 0.05$). Medias con letras mayúsculas iguales no presentan diferencia significativa en el mismo renglón (Tukey $p < 0.05$)

En cuanto al contenido de fenoles totales, se muestra diferencia estadísticamente significativa entre cada tratamiento de galletas suplementadas de harina de trigo integral (HTI), siendo el tratamiento con 100% HTI, similar estadísticamente a la galleta comercial, lo que sugiere que la adición de chía y frijol a las galletas, establecen diferencia positiva para cada tratamiento. El porcentaje de fenoles aumenta en casi 10 unidades cuando se adiciona semilla de chía a cada tratamiento con HTI, comportamiento que se mantiene de manera lineal conforme aumenta el porcentaje. En tanto que para en la galleta suplementada de harina blanca, no se muestra lineal, posiblemente debido a algún acomplejamiento de las proteínas del almidón, con la estructura de los compuestos fenólicos de la chía y/o el frijol. Inicialmente solo con el control de harina integral se tiene un contenido de fenoles totales de 101.71, cuando se añade 30% de frijol a la muestra, el contenido de fenoles totales aumenta a 137.80 mgEAG/100 g, cerca de 36 unidades, lo que es de esperar, ya que la harina de frijol tiene un alto contenido fenólico. No hay variación estadística para tratamientos con harina integral (HTI) contra harina blanca (HTB)

Cuadro 2. Contenido de fenoles totales (mg EAG/100 g, BS) en galletas de harina de trigo integral (HTI) o harina de trigo blanca (HTB) suplementadas con harina de frijol y semilla de chia.

HT:Frijol:Chia	Galleta HTI	Galleta HTB
70:30:0	137.80 ± 4.0 ^{aA}	78.16 ± 1.5 ^{aA}
60:30:10	147.77 ± 9.5 ^{bA}	117.47 ± 3.8 ^{bA}
55:30:15	157.01 ± 1.6 ^{cA}	118.75 ± 6.4 ^{bA}
50:30:20	167.09 ± 2.3 ^{dA}	142.9 ± 9.6 ^{cA}
100:0:0	101.71 ± 0.8 ^{eA}	137.80 ± 4.0 ^{dA}
Galleta comercial	95.3 ± 1.5 ^{eA}	64.2 ± 0.4 ^{eA}

EAG= equivalentes de ácido gálico; HT = harina de trigo; HTB= harina trigo blanca

Medias con letras minúsculas iguales en cada columna no presentan diferencia significativa (Tukey p<0.05). Medias con letras mayúsculas iguales no presentan diferencia significativa en el mismo renglón (Tukey p<0.05)

En relación al contenido de flavonoides en las galletas muestra, se encontró que el contenido de flavonoides en galleta aumenta conforme se adiciona mayor porcentaje de semilla de chía a cada muestra, siendo estadísticamente diferente cada tratamiento de galleta HTI (p<0.05). Las galletas HTB presentaron diferencia significativa en todos los tratamientos, incluyendo el control. La comparación realizada a los controles externos o galletas comerciales, mostraron valores menores de flavonoides, comparada con las galletas suplementadas con frijol y semilla de chía, lo que indica que la cantidad de flavonoides en la muestra comercial pudo verse afectada o bien ser nula.

Cuadro 3. Contenido de flavonoides totales (mg EC/100 g, BS) en galletas de harina de trigo integral (HTI) y harina de trigo blanca (HTB) suplementadas con harina de frijol y semilla de chia.

HT:Frijol:Chia	Galleta HTI	Galleta HTB
70:30:0	107.07 ± 2.9 ^{aA}	67.43 ± 4.1 ^{aB}
60:30:10	120.17 ± 3.0 ^{bA}	86.9 ± 1.2 ^{bB}
55:30:15	124.91 ± 3.0 ^{cA}	120.34 ± 2.9 ^{cB}
50:30:20	147.24 ± 13.0 ^{dA}	130.0 ± 6.4 ^{dB}
100:0:0	105.50 ± 4.6 ^{eA}	57.2 ± 3.1 ^{eB}
Galleta comercial	96.2 ± 1.2 ^{fA}	30.52 ± 1.4 ^{fB}

EAG= equivalentes de ácido gálico; HT = harina de trigo; HTB= harina trigo blanca

Medias con letras minúsculas iguales en cada columna no presentan diferencia significativa (Tukey p<0.05). Medias con letras mayúsculas iguales no presentan diferencia significativa en el mismo renglón (Tukey p<0.05)

Los resultados obtenidos para antocianinas, muestra un aumento (p<0.05) a partir del tratamiento 55:30:15, en HIT y HTB, lo que sugiere que una mayor concentración de semilla de chía, y frijol, se podría estar interfiriendo a favor en la ruta de síntesis de los diferentes flavonoides, dirigiéndola hacia la producción de antocianinas. No se reportan antocianinas en control comercial de galletas.

Cuadro 4. Contenido de antocianinas (mg EC3G/100g), BS) en galletas de harina de trigo integral (HTI) y harina de trigo blanca (HTB) suplementadas con harina de frijol y semilla de chia.

HT:Frijol:Chia	Galleta HTI	Galleta HTB
70:30:0	2.0 a	0.78 a
60:30:10	1.64 a	0.69 a
55:30:15	2.6 b	0.86 c
50:30:20	2.92 c	0.95 d
100:0:0	1.5 d	0.60 e
Galleta comercial	ND	ND

EC3G= equivalentes de cianidin 3, glucósido; HT = harina de trigo; HTB= harina trigo blanca
Medias con letras minúsculas iguales en cada columna no presentan diferencia significativa (Tukey p<0.05). Medias con letras mayúsculas iguales no presentan diferencia significativa en el mismo renglón (Tukey p<0.05)

Análisis químico.

Se observa un incremento en proteína, extracto etéreo y fibra, conforme se adiciona el porcentaje de chía a cada tratamiento ($p<0.05$). El número de carbohidratos en el tratamiento 70:30:0 para galleta de harina blanca (HIB), fluctúa como el de mayor contenido, debido a la cantidad de harina blanca en la muestra, que en su mayoría es rica en almidón, sin embargo este número decrece conforme se hace presente el frijol pinto y la semilla de chía. Así mismo el contenido de fibra se ve incrementado, al adicionar semilla de chía, lo que sugiere que la variedad de chía empleada para cada tratamiento es rica en fibra. Se reporta un contenido significativamente menor en cuanto al análisis químico de galleta comercial contra galleta suplementada. En cuanto a galleta suplementada HTI se muestra un comportamiento similar de ascendencia, al adicionar semilla de chía a cada tratamiento, a excepción de los carbohidratos, donde el tratamiento con 0% de chía muestra el mayor contenido de los mismos, De Almeda Costa y col. (2006) reportan un contenido de carbohidratos para frijol de 56.3%, sugiriendo que dicho aumento se debe al frijol Pinto.

En cuanto a fibra total, se observa mayor contenido en galletas con harina integral (HIT), lo cual es esperado, al emplearse la testa del trigo en la elaboración de las muestras, así mismo se observa una disminución en el contenido de fibra para el tratamiento 60:30:10, interesantemente se observó un aumento al adicionarle 15% de chía a la muestra, indicando que la semilla de chía aporta una cantidad importante de fibra a cada tratamiento.

Cuadro 5. Análisis químico (% bs) en galletas de harina de trigo integral (HTI) suplementadas con harina de frijol y semilla de chia.

HT:Frijol:Chia	Proteína	Extracto etereo	Fibra total	carbohidratos	Cenizas
70:30:0	20.81 ± 1.55 ^a	19.79 ± 0.32 ^a	31.0 ± 0.2 ^a	26.52	2.03 ± 0.42 ^a
60:30:10	32.03 ± 0.70 ^b	21.53 ± 0.66 ^b	23.10 ± 0.0 ^b	19.81	2.3 ± 0.01 ^b
55:30:15	34.97 ± 0.53 ^c	25.43 ± 0.60 ^c	27.7 ± 0.0 ^c	8.33	3.2 ± 0.26 ^c
Galleta comercial	9.37 ± 0.20 ^d	26.56 ± 0.12 ^d	6.25 ± 0.0 ^d	55	2.3 ± 0.12 ^d

HT = harina de trigo. Medias con letras minúsculas iguales en cada columna no presentan diferencia significativa (Tukey p<0.05)

Cuadro 6. Análisis químico (% , bs) en galletas de harina de trigo blanco (HTB) suplementadas con harina de frijol y semilla de chia.

HT:Frijol:Chia	Proteína	Extracto etereo	Fibra total	Carbohidratos	Cenizas
70:30:0	21.57 ± 3.81 ^a	22.52 ± 0.98 ^a	18.05 ± 0.0 ^a	35.46	2.4 ± 0.03 ^a
60:30:10	31.54 ± 0.61 ^b	27.55 ± 0.44 ^b	20.53 ± 0.0 ^b	18.21	2.17 ± 0.12 ^b
55:30:15	33.94 ± 2.30 ^c	28.94 ± 0.40 ^c	25.84 ± 0.25 ^c	8.38	2.9 ± 0.09 ^c
Galleta comercial	2.14 ± 0.16 ^d	21.33 ± 0.21 ^d	8.70 ± 0.02 ^d	66.63	1.2 ± 0.0 ^d

HT = harina de trigo.

Medias con letras minúsculas iguales en cada columna no presentan diferencia significativa (Tukey $p < 0.05$)

Capacidad antioxidante

En cuanto a la capacidad antioxidante TEAC se reporta de hasta 4501.3 y 3938.51 $\mu\text{mol ET/g}$ para galleta suplementada de harina integral y harina blanca respectivamente, valores semejantes al contenido antioxidante por el método ORAC para cada muestra ($P < 0.05$). Se muestra un comportamiento de ascendencia conforme se adiciona semilla de chia a cada tratamiento, hecho que es de esperarse debido al alto contenido de compuestos antioxidantes que presenta la chia, reportándose por Gonzales-Jiménez, et al., 2010 valores de 98.73 $\mu\text{mol Trolox/g}$ para la fracción desengrasada de la semilla de chia, muestra comparada con frutos como la frambuesa (84 $\mu\text{mol Trolox/g}$ muestra) y la manzana roja (40 $\mu\text{mol Trolox/g}$ muestra) que se distinguen por su alto contenido de antioxidantes. En tanto que el frijol Pinto presenta valores de hasta 61.20 $\mu\text{mol Trolox/g}$ muestra. (Figuroa-González et al., 2010). Se observa un aumento de capacidad antioxidante, conforme se adiciona semilla de chia, para ambas galletas de HIT y HIB ($P < 0.05$)

Cuadro 7. Análisis de capacidad antioxidante (% , bs) en galletas de harina de trigo integral (HTI) y galletas de harina de trigo blanca (HTB) suplementadas con harina de frijol y semilla de chia.

HT:Frijol:Chia	Galleta HTI		Galleta HTB	
	TEAC	ORAC	TEAC	ORAC
70:30:0	3460.6 ± 0.9 ^{aA}	3380 ± 0.23 ^{aA}	2177.53 ± 0.6 ^{aB}	2080 ± 0.67 ^{aB}
60:30:10	4332.0 ± 1.5 ^{ba}	4501.3 ± 0.17 ^{ba}	3896.71 ± 1.53 ^{bb}	3624.23 ± 1.5 ^{bb}
55:30:15	4465.3 ± 0.93 ^{ca}	4415.12 ± 0.91 ^{ca}	3938.51 ± 0.93 ^{cb}	3640.91 ± 0.20 ^{cb}
Galleta comercial	1302 ± 0.48 ^{da}	460 ± 0.21 ^{da}	201.25 ± 0.23 ^{db}	125.0 ± 0.21 ^{db}

HT = harina de trigo.

Medias con letras minúsculas iguales en cada columna no presentan diferencia significativa (Tukey $p < 0.05$). Medias con letras mayúsculas iguales no presentan diferencia significativa en el mismo renglón (Tukey $p < 0.05$)

5. CONCLUSIONES

La mezcla de semilla de chia y frijol Pinto, aumenta el contenido de compuestos polifenólicos, el contenido químico proximal, así como de capacidad antioxidante para cada muestra de galletas.

Los tratamientos de galletas suplementadas elaboradas con harina de trigo integral, presentan un estadísticamente significativo en cuanto al contenido nutrimental, comparado con galletas de harina blanca refinada.

Debido al análisis aquí mostrado, las galletas suplementadas con frijol pinto y semilla de chía comparadas con galletas comerciales, son una opción viable de consumo, pudiendo ser consideradas como nutracéuticas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abdel-Aal E.S.M. y Hucl P. (1999). A Rapid Method for Quantifying Total Anthocyanins in Blue Aleurone and Purple Pericarp Wheats. American Association of Cereal Chemists, Inc. 76(3): 350-354.
2. AOAC. (2002). Official Methods of Analysis. Asociation Official Analytical Chemistry. Eds Howitz W., Washington. (Métodos Empleados: 925.09, 923.03, 920.39 Y 954.01).
3. Beltrán-Orozco Mc, Romero Mr. 2003. Chía, Alimento Milenario. Revista Industria Alimentaria. Septiembre/Octubre: 20-29.
4. Desphande, S.,Cheryan, M. (1985). Evaluation of Vanillin Assay for Tannin Analysis of Dry Beans. Journal of Food Science 50(4): 905-916
5. Dewanto, V., X. Wu, K.K. Adom y R.H. Liu,. (2002). Thermal Processing Enhances The Nutritional Value Of Tomatoes By Increasing Total Antioxidant Activity. J. Agric. Food Chem., 50: 3010-3014.
6. Guzmán-Maldonado, S. H., Martínez, O., Acosta-Gallegos, J. y Paredes-López, O. (2003). Putative Quantitative Trait Loci for Some Physical and Chemical Components of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Crop Sci. 43:1029-1035.
7. Leterme, P., Muñoz, LC. (2002). Factors Influencing Pulse Consumption in Latin America. Br. J. Nutr. 88 (Suppl.3): S251-S254.
8. Maldonado,R; Pacheco,E. 2000. Elaboración de galletas con una mezcla de harina de trigo y de plátano verde.
9. Reynoso Camacho R, Ramos Gomez M Y Loarca Piña G. 2006. Bioactive Components In Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). En: R. G. Guevara G.; I. Torres P. (Eds.). Advances In Agricultural and Food Biotechnology. Ed. Research Signpost. India. Pp. 217-236.
10. Singleton, V.L., R. Orthofer y R.M. Lamuela-Raventos, (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants By Means of Folin-Ciocalteu Reagent. Metho. Enzymol., 299: 152-178.

EVALUACIÓN DEL EFECTO TÓXICO DE METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN EL EXTRACTO METANÓLICO DE *Callisia fragrans* (L Woodson), SOBRE LÍNEA CELULAR MDCK

Pérez-Luna Y.^{1*} Sánchez-Roque Y.¹ Pérez-Luna E.² Saldaña-Trinidad S.¹ Berrones-Hernández R.¹ Sánchez-Sánchez Mónica¹ & Hernández-Pérez Alexander¹.

¹ Universidad Politécnica de Chiapas, Carretera Tuxtla Villaflores Km. 1+500 entre el panteón y puente Santo Domingo. C.P. 29150. Suchiapa, Chiapas, México. ²Facultad de Agronomía. Universidad Autónoma de Chiapas.

RESUMEN

Actualmente se requiere de cultivos limpios y sanos que cubran las necesidades de una población en constante crecimiento, la contaminación de los recursos naturales debida al uso de fertilizantes químicos ha sido bien documentada así como los daños que estos causan a la salud de los productores. Por ello, es importante contar con alternativas de producción sustentables por lo que se han desarrollado trabajos experimentales en la Universidad Politécnica de Chiapas con el objetivo de determinar el efecto que tiene la aplicación de biofertilizantes (hongos micorrízicos, rizobacterias y biofermentos) y abonos orgánicos sobre el rendimiento de cultivos de importancia económica para el estado de Chiapas. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la aplicación de biofertilizantes en el crecimiento y desarrollo de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*). Se estableció un experimento con cuatro tratamientos y ocho repeticiones: testigo, Micorrizas, Azospirillum y la combinación micorriza con azospirillum, siendo así cuatro tratamientos, siendo un total de 32 plantas evaluando los siguientes parámetros: altura de planta, diámetro de tallo y número de hojas. Los resultados demuestran un efecto positivo de la inoculación con Hongos micorrízicos y Azospirillum, tanto de manera individual como en conjunto, mejorando el desarrollo de las plantas de tomate con respecto al testigo. Micorriza y Azospirillum proporcionaron un incremento del 17% y 15%, respectivamente, en la altura de las plantas.

1. INTRODUCCIÓN

El jitomate es originario de América del Sur, particularmente de Perú, Ecuador, Bolivia y Chile. Sin embargo, su domesticación fue llevada a cabo en México. El nombre de jitomate procede del náhuatl xictli, ombligo y tomatl, tomate, que significa tomate de ombligo. De todas las especies de tomate solo 5 de ellas son comercializadas (cherry, saladette, tipo pera, bola estándar y bola grande). Actualmente ha cobrado un interés el uso de microorganismos benéficos como los hongos micorrízicos como una alternativa para mejorar el crecimiento y desarrollo de los cultivos agrícolas, que nos permitan disminuir las aplicaciones de fertilizantes minerales al agroecosistema. Los hongos micorrízicos y bacterias como azospirillum son capaces de incrementar la absorción de nutrientes (N, P, K, Ca, Cu, Mg, Mn, Zn, etc.) y distribuirlos a la planta; esto es debido a que incrementan el área de exploración radical, a través de la extensión de sus hifas en el suelo (Martin y Stutz, 2004). Los hongos micorrízicos son de los microorganismos benéficos más estudiados y empleados en la actualidad. Las bacterias de vida libre o simbiótica que habitan en la rizósfera de las plantas (la parte del suelo inmediata a las raíces) pueden estimular el crecimiento de las plantas a través de mecanismos directos e indirectos tales como la síntesis de fitohormonas, la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de nutrientes, la producción de medios de transporte de nutrientes, el control de fitopatógenos del suelo, etcétera. (Olivares, 2006). Por lo

tanto, el objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar el efecto de las micorrizas y azospirillum, en el crecimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum*) en condiciones de invernadero.

2. PARTE EXPERIMENTAL

El trabajo se realizó en la Universidad Politécnica de Chiapas bajo condiciones de invernadero. Se utilizaron semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) y se establecieron 4 tratamientos: testigo (suelo esterilizado), micorrizas, azospirillum y la combinación de los dos inóculos.

Esterilización de la tierra

La tierra utilizada para el trasplante de las plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) se trajo de “El Parral”, Chiapas. Se colocaron 800 g de suelo en cada bolsa, se consideraron 8 repeticiones para cada tratamiento, el suelo se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos a 15 libras de presión.

Propagación e inoculación de las plantas.

Los inóculos utilizados para las plantas de tomate fueron pesados para los tratamientos correspondientes, para micorrizas se pesaron 0.5g y para azospirillum se pesó 0.25g, en el tratamiento de combinación Azospirillum-Micorrizas se mantuvieron las mismas cantidades. Esto se realizó a las 4 semanas después de la germinación de las plantas de tomate.

Se empleó un diseño experimental con 4 tratamientos y 8 repeticiones, las plantas se colocaron aleatoriamente. Los 4 tratamientos fueron: 1) Testigo), 2) Micorrizas, 3) Azospirillum y 4) micorrizas+azospirillum. Las unidades experimentales que conformaron cada uno de los tratamientos estuvieron compuestas por 32 plantas colocadas en macetas con 800 kg con un arreglo completamente al azar. Una vez inoculadas las plantas se mantuvieron en el invernadero a temperatura ambiente. Las plantas fueron regadas todos los días en la mañana y en las tardes.

Variables físicas evaluadas.

Cada quince días se evaluaron variables agronómicas tales como número de hojas, diámetro del tallo y altura.

Análisis estadístico.

Los datos se procesaron mediante un análisis de varianza ($p < 0.05$), con prueba de medias de LSD de Fisher, con el paquete estadístico InfoStat versión 2008.

3. RESULTADOS

La inoculación con el tratamiento de micorrizas estimuló significativamente una mayor altura en las plantas de tomate, a los 15 y 30 días después de la inoculación (Cuadro 1), respecto al inóculo de azospirillum tuvo un mayor crecimiento en la semana 2 pero en la semana 4 tuvo mejor crecimiento las micorrizas y en las combinación de estos dos inóculos en la semana 2 y 4 hubo un crecimiento menor que en los dos inóculos (tabla 1). En la Figura 1 se observa el efecto de los biofertilizantes en el crecimiento y desarrollo de las plantas inoculadas con respecto al testigo.

Cuadro 1. Desarrollo de las plantas de tomate a los 15 y 30 días después de la inoculación.

Tratamientos	Tiempo (días)	
	15	30
Testigo	4.7 ^a	10.62 ^a
Micorrizas	5.8 ^b	16.18 ^b
Azospirillum	5.9 ^b	14.75 ^b
combinación	5.7 ^b	14.06 ^b

Letras iguales en la misma columna no difieren significativamente (LSD $p < 0.05$)



Figura 1. Desarrollo aéreo de las plantas de tomate con los diferentes tratamientos (rojo: testigo, Amarillo: micorriza, Rosa: Azospirillum, Azul: Micorriza+Azospirillum)

La inoculación con el tratamiento Azospirillum estimuló significativamente un mayor número de hojas de tomate (Cuadro 2) a los 15 días; sin embargo a los 30 días después de la inoculación el tratamiento micorriza promovió un mayor número de hojas al igual que Azospirillum.

Cuadro 2. Efecto de número de hojas en las plantas respecto a los tiempos.

Tratamientos	Tiempo (días)	
	15	30
Testigo	7 ^a	14.5 ^a
Micorrizas	7 ^a	20.58 ^b
Azospirillum	8 ^b	20.75 ^b
Micorriza+Azospirillum	7 ^a	19.25 ^{ab}

Letras iguales en la misma columna no difieren significativamente (LSD $p < 0.05$)

En cuanto al diámetro del tallo de las plantas de tomate no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los primeros 15 días, sin embargo a los 30 días los tratamientos Micorriza y Azospirillum nuevamente fomentaron un mayor desarrollo de éste, siendo estadísticamente significativo con respecto al testigo (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de los tratamientos sobre el diámetro del tallo de las plantas de tomate

Tratamientos	Tiempo (días)	
	15	30
Testigo	1.37 ^a	2.8 ^a
Micorrizas	1.47 ^a	3.6 ^b
Azospirillum	1.57 ^a	3.4 ^b
Micorriza+Azospirillum	1.50 ^a	3.6 ^{ab}

Letras iguales en la misma columna no difieren significativamente (LSD $p < 0.05$)

4. CONCLUSIONES

La inoculación con micorrizas y azospirillum tanto de manera aislada como en combinación, contribuyó a un mejor desarrollo de las plantas de tomate, por lo que es necesario continuar con este tipo de estudios para conocer promover su uso y aplicación en cultivos de importancia alimentaria y económica para el estado de Chiapas, de forma tal que se pueda prescindir del uso de fertilizantes químicos cuyos efectos adversos sobre el medio ambiente y la salud de los productores han sido bien documentados.

BIBLIOGRAFÍA

1. González-Mendoza D, A García-López, C Ceceña Duran, O Grimaldo-Juarez. (2015). Hongos micorrizicos arbusculares y sus efectos en el crecimiento de diferentes cultivares. *Revista Internacional de Botánica Experimental*, 84-350.
2. Hernández, M. I. 2000. Las micorrizas arbusculares y las bacterias rizosféricas como complemento de la nutrición mineral de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) [Tesis de Maestría], INCA.
3. Terry, Elein; Leyva, A.; Díaz, María M. (2005). Uso combinado de microorganismos benéficos y productos bioactivos como biofertilizantes. *Cultivos Tropicales*, 77-81.

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES ACTIVAS A BASE DE MUCÍLAGO DE LINAZA (*Linum usitatissimum*) Y *Hamammelis virginiana*

Sayra Yañez Echeverría¹, Mayra Treviño Garza¹, Katiushka Arévalo Niño¹

¹Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

RESUMEN

En este estudio se desarrollaron películas comestibles activas (PCAs) a base de mucílago de linaza (ML) y un extracto de *Hamammelis virginiana* (Hv). El extracto presentó actividad antimicrobiana contra patógenos transmitidos por alimentos. La CMI y CMB fue de 1.18 y 19.02 mg/mL para *L. monocytogenes*. Las CMI y CMB fueron de 2.37 y 38.06 mg/mL para *S. typhi*, *S. aureus* y *E. coli*. Para el desarrollo de las PCAs se utilizó la película de ML3.0% incorporada con el extracto de Hv (2.37 mg/mL). La incorporación del extracto a las películas incrementó la actividad antimicrobiana (19.50-22.50 mm), la elongación (4.14%), espesor (0.11mm), opacidad (9.54%), actividad antioxidante (80.56%) y, la solubilidad en condiciones controladas de humedad y temperatura (14.41% a 25°C y 90% HR; 18.93% a 4°C y 90% HR), mientras que, disminuyó ($P < 0.05$) la resistencia a la tensión (7.18 MPa) y la permeabilidad (9.55×10^{-6} gH₂O/mm²/h). Finalmente, el uso de PCAs puede ser una alternativa potencial para mejorar la calidad y vida útil de los alimentos.

1. INTRODUCCIÓN.

El uso de películas y recubrimientos comestibles se ha incrementado recientemente debido al interés por mantener los alimentos inocuos y preservar sus características nutricionales y organolépticas. Una película comestible (PC) se define como una matriz delgada, elaborada de material comestible, que una vez formada puede aplicarse en los alimentos para preservar su calidad e incrementar su vida útil (Falguera *et al.*, 2011). Las PC poseen buenas propiedades mecánicas, crean una barrera a los gases, ayudan a controlar la pérdida de nutrientes, sabores y aromas en los alimentos, además de poseer actividad antimicrobiana contra microorganismos deteriorantes y algunos patógenos transmitidos por alimentos (Aguilar, 2012; Quintero *et al.*, 2010).

Existen una gran variedad de materiales que se han utilizado para la elaboración de PC, entre los cuales se encuentran; proteínas (soya, gluten de trigo, caseinatos, gelatina), lípidos (ceras, ácidos grasos, monoglicéridos) y polisacáridos (celulosa, gomas, almidón, quitosano, pectinas) (Rubio y Guerrero, 2012). El ML es una sustancia viscosa e incolora que se extrae de la semilla de linaza, el cual comprende 8% de su peso y está conformado por azúcares como ramnosa, fucosa, arabinosa, xilosa, galactosa, ácido galacturónico y glucosa. Este mucílago puede ser una alternativa para la elaboración de PC para la conservación de frutos frescos recién cortados.

Con la finalidad de incrementar la eficiencia de las películas se pueden incorporar en éstas algunos compuestos activos. Una película comestible activa (PCA) es una matriz continua que protege el alimento y prolonga su vida de anaquel debido a la liberación controlada de compuestos activos tales como antimicrobianos (sorbato, benzoato, enzimas) o compuestos bioactivos como; extractos de plantas (aceites esenciales, ácidos orgánicos, entre otros) (Anbinder, 2012). *Hamammelis*

virginiana es una planta perteneciente a la familia Hamamelidaceae cuyos principales compuestos de la corteza y hojas son taninos (10%), estos son una mezcla de ácido gálico, hamamelitanina hidrolizable y proantocianidinas. Se ha encontrado que *Hamammelis virginiana* posee un efecto antiinflamatorio, actividad antioxidante y antimicrobiano debido a sus componentes en las hojas y corteza (OMS 2004; Quinna, 2013). Por lo tanto, es una buena alternativa para su incorporación en películas comestibles. En este contexto, el objetivo de este estudio fue elaborar PCAs a base de mucílago de linaza y *Hamammelis virginiana* y evaluar sus propiedades físico-mecánicas, antimicrobianas y de barrera.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Extracción de mucílago de *Linum usitatissimum*. La extracción del mucílago se realizó mediante la técnica de precipitación etanólica, en base a reportes previos, con algunas modificaciones (Fekri *et al.*, 2008).

Elaboración de las soluciones formadoras de película (SFP). Se elaboraron tres SFP a base de mucílago de linaza: ML2.0= 2.0 g/100 g ML y 0.5g/100 g glicerol; ML2.5= 2.5 g/100 g ML y 0.5g/100 g glicerol; y ML3.0=3.0 g/100 g ML y 0.5g/100 g glicerol. Los formulados se prepararon en agua destilada, mediante agitación mecánica constante, hasta su completa disolución.

Elaboración de películas. Las películas fueron elaboradas mediante el método de vaciado en placa "casting" (utilizando las SFR; ML2.0, ML2.5 y ML3.0) en base a previos reportes (Arévalo *et al.*, 2010).

Caracterización de las películas.

Pruebas físico-mecánicas. El espesor de las películas se midió con un micrómetro Mutitoyo Digital Modelo 293 (Sánchez *et al.*, 2014). La fuerza máxima, módulo de Young, resistencia a la tensión y elongación de las películas elaboradas fueron determinadas en una Maquina Universal Shimadzu's AGS-X, *en concordancia con la Norma ASTM D 882*. Finalmente, la opacidad de las películas se midió en un colorímetro HunterLab (Colorflex® EZ) en base a lo reportado por Fakhouri *et al.*, 2015.

Evaluación de permeabilidad al vapor de agua y solubilidad. La permeabilidad al vapor de agua se determinó utilizando un método estándar modificado E 96-95 (ASTM 1995). Las pruebas de solubilidad se realizaron en agua (hasta su completa disolución) y en condiciones controladas de humedad y temperatura (4°C, 90% HR y 25°C, 90% HR) por un período de 7 días. El porcentaje de solubilidad se determinó por diferencia en peso, respecto al peso inicial de la película (día 0) (Trejo *et al.*, 2001, Aguilar *et al* 2012).

Actividad antioxidante. Se determinó mediante el método de DPPH (2,2- Difenil-1-picrilhidrazilo) a una longitud de onda de 517 nm (López Mata *et al* 2012).

Evaluación de actividad antimicrobiana, determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) del extracto de *H. virginiana*. La actividad antimicrobiana se llevó a cabo mediante la técnica difusión en agar. Se utilizaron placas de agar infusión cerebro corazón (AICC) inoculadas con *L. monocytogenes*, *S.aureus*, *S. typhi* y *E.coli* (0.01µL con 3×10^8 cel/mL) y se incubaron a 37°C por 24 hrs, para posteriormente medir el halo de inhibición (mm) (Rojas *et al.*, 2005). La CMI y CMB del extracto (152.26 - 0.14 mg/mL) se determinaron mediante la técnica de microdilución en caldo, en placas de 96 pozos (con caldo ICC e inóculo) incubadas a 37°C por 24 hrs. Para determinar la CMB, las muestras fueron sembradas en AICC para observar el desarrollo microbiano (Centurión *et al.*, 2012).

Elaboración de películas comestibles activas (PCA). Una vez seleccionada la mejor formulación (ML3.0Hv), se elaboraron las PCA (ML3.0Hv), incorporándoles el extracto de *H. virginiana* (2.37 mg/mL).

Evaluaciones de PCA. A las películas activas (ML3.0Hv) se les realizaron las determinaciones físico-mecánicas (tensión, elongación, módulo de Young, fuerza máxima, espesor y opacidad), de barrera (permeabilidad y solubilidad) y antioxidantes, de acuerdo a lo establecido para cada método.

Evaluación de la actividad antimicrobiana de las películas activas. Las películas activas (ML3.0Hv) y el control sin extracto (ML3.0) se colocaron en placas Petri con AICC previamente inoculadas con las diferentes cepas (0.01µL con 3×10^8 cel/mL). Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 hrs y posteriormente se realizó la medición del halo de inhibición (mm).

Análisis estadísticos. Las determinaciones en todos los análisis se realizaron por triplicado. Los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey, utilizando el paquete estadístico SPSS 17.0. Para la comparación de las películas ML3.0 y ML3.0Hv, los resultados se analizaron mediante una prueba de T-student para muestras independientes.

3. RESULTADOS

Extracción de polímero. El método de extracción etanólica fue efectivo para la obtención del ML, ya que se obtuvo un rendimiento de $6.08 \pm 0.61\%$.

Caracterización de las películas.

Pruebas físico-mecánicas. Como se observa en la tabla 1, la Fuerza Máxima, tensión, elongación y el espesor fueron más altos en la formulación ML3.0. Por otro lado, el módulo de Young (elástico) fue mayor para la formulación ML2.5 (636.96 N/mm^2). Respecto a la opacidad no se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los tratamientos, sin embargo, la PC ML3.0 presentó mayor opacidad (7.21%).

Tabla 1. Propiedades físico-mecánicas de las películas

Propiedades	ML2.0	ML2.5	ML3.0
F Max (N)	37.60 ± 1.93^a	54.60 ± 2.77^b	73.60 ± 0.19^c
Tensión (N/mm²)	13.61 ± 2.03^a	16.59 ± 0.30^{ab}	17.30 ± 0.90^b
Elongación (%)	$1,62 \pm 0.27^a$	2.01 ± 0.05^a	2.76 ± 0.09^b
M. elástico (N/mm²)	506.92 ± 43.72^a	636.96 ± 66.39^b	610.01 ± 25.29^{ab}
Espesor (mm)	0.051 ± 0.009^a	0.067 ± 0.003^b	0.090 ± 0.002^c
Opacidad (%)	6.49 ± 0.21^a	7.41 ± 0.49^a	7.21 ± 0.76^a

Nota: ± Desviación estándar

Las medias en la fila que no tienen un superíndice común (a,b,c) son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Evaluación de permeabilidad al vapor de agua y solubilidad.

Permeabilidad al vapor de agua. Se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos, durante el tiempo de almacenamiento. Se observó que al incrementar la concentración de ML, disminuye la permeabilidad (Figura 1). Por lo tanto, el formulado ML3.0 presentó la permeabilidad más baja durante el tiempo de prueba ($1.28 \times 10^{-5} \text{ gH}_2\text{O/mm}^2/\text{h}$).

Solubilidad en agua. En las pruebas de solubilidad, se encontró una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos, en donde ML3.0 presentó mayor tiempo de solubilidad (5:42 min) en comparación con los tratamientos ML2.0 (2:39 min) y ML2.5 (3.54 min).

Solubilidad en condiciones controladas (4°C / 90% HR). Como se observa en resultados (Figura 2), no se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos hasta el día 6 de almacenamiento. La película ML3.0 presentó menor solubilidad (13.55%, día 7) durante todo el tiempo de prueba.

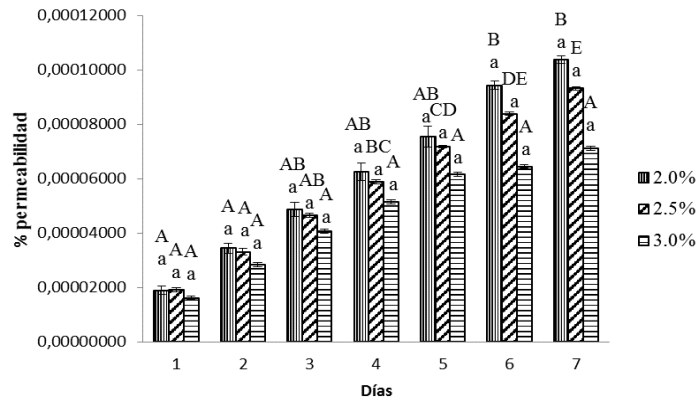


Figura 1. Permeabilidad al vapor de agua de las películas durante 7 días de almacenamiento (25 °C y 90% HR).

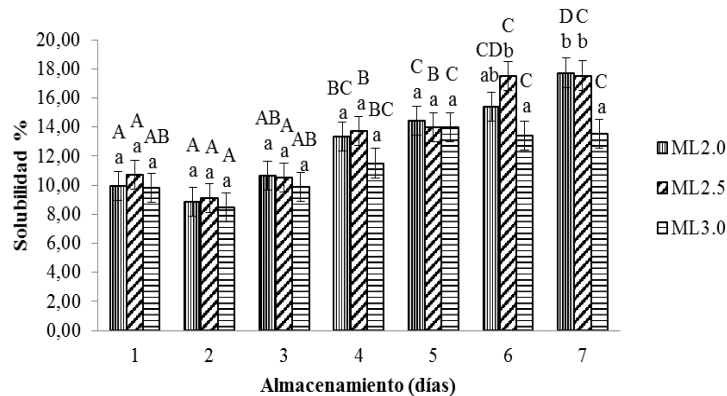


Figura 2. Solubilidad en condiciones controladas (4°C / 90% HR), durante 7 días de almacenamiento.

Solubilidad en temperatura controlada (25°C / 90% HR). Como se observa en la figura 3, se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos desde el día 1 de prueba. El tratamiento LM3.0 presentó menor solubilidad (12.83%, día 7) durante todo el tiempo de análisis.

Actividad antioxidante. No se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) en los valores de actividad antioxidante de las PCs LM2.0, LM2.5 y LM3.0, los cuales fluctuaron entre 4.46 – 4.65%.

Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de *H. virginiana*. No se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) entre la actividad antimicrobiana contra *S. typhi*, *S. aureus* y *E. coli*, donde los halos de inhibición fluctuaron entre 10.00 – 13.66 mm. Por otro lado, en *L. monocytogenes* se observaron los halos de inhibición más altos (19.00 mm), lo que indica que este microorganismo es más sensible frente al extracto.

Determinación de la CMI y CMB de *H. virginiana*. La CMI fue de 2.37 mg/mL y la CMB de 38.06 para *S. typhi*, *S. aureus* y *E. coli*. Por otro lado, *L. monocytogenes* fue más sensible al extracto con una CMI de 1.18 mg/mL y una CMB de 19.02 mg/mL.

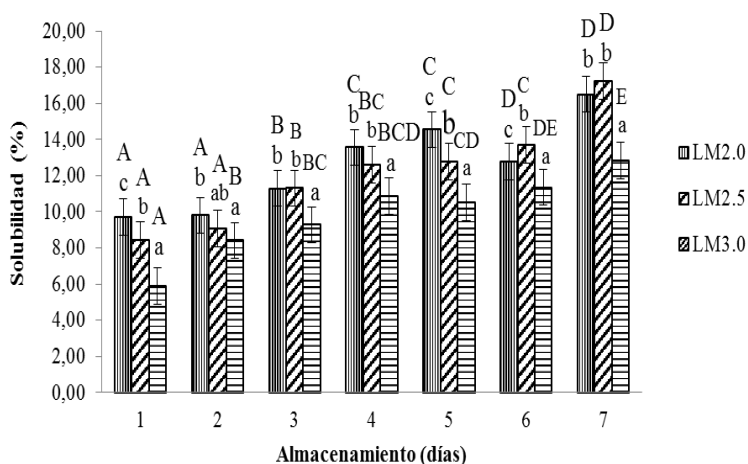


Figura 3. Solubilidad de películas en temperatura controlada (25°C / 90% HR)

Elaboración de las PCAs. Las PCAs presentaron buenas características físicas, fueron fáciles de desprender, resistentes y muy plásticas

Evaluación de propiedades físico-mecánicas de películas LM3.0HV. Como se observa en la tabla 2, la fuerza máxima, tensión y módulo elástico fueron más bajos en la formulación LM3.0HV, mientras que los valores de elongación y espesor se incrementaron con la adición del extracto. Por otro lado, la opacidad de las películas no se vio afectada por la adición del extracto.

Tabla 2. Propiedades físico-mecánicas de las películas activas.

Propiedades	ML3.0	ML3.0HV
F Max (N)	73.60 ± 0.19 ^a	37.92 ± 3.39 ^b
Tensión (N/mm²)	17.30 ± 0.90 ^a	7.18 ± 0.86 ^b
Elongación (%)	2.76 ± 0.09 ^a	4.14 ± 0.75 ^b
M. elástico (N/mm²)	610.01 ± 25.29 ^a	126.11 ± 10.04 ^b
Espesor (mm)	0.090 ± 0.002 ^a	0.110 ± 0.005 ^b
Opacidad (%)	7.21 ± 0.76 ^a	9.54 ± 3.2 ^a

Nota: ± Desviación estándar.

Las medias en la fila que no tienen un superíndice común (a, b) son significativamente diferentes (P <0.05).

Permeabilidad al vapor de agua y solubilidad de películas ML3.0HV. Como se observa en la figura 4, el tratamiento ML3.0HV fue menos permeable (9.55×10^{-6} gH₂O/mm²/h) respecto al ML3.0 durante los 7 días de almacenamiento.

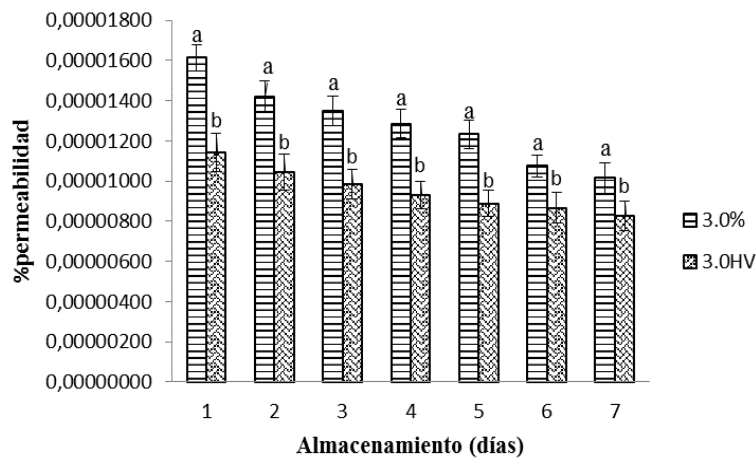


Figura 4. Comparación de la permeabilidad al vapor de agua de ML3.0HV y ML3.0.

Solubilidad en agua. El tratamiento ML3.0HV fue menos soluble (tiempo de solubilidad de 17.49 min) en comparación con las películas ML3.0 (5.42 min).

Solubilidad en condiciones controladas (4°C / 90% HR). En la figura 5 se muestra los valores de la solubilidad en condiciones controladas (4°C / 90% HR) de ML3.0HV y ML3.0 durante 7 días de almacenamiento. Las películas ML3.0HV fueron significativamente más solubles durante todo el tiempo de prueba.

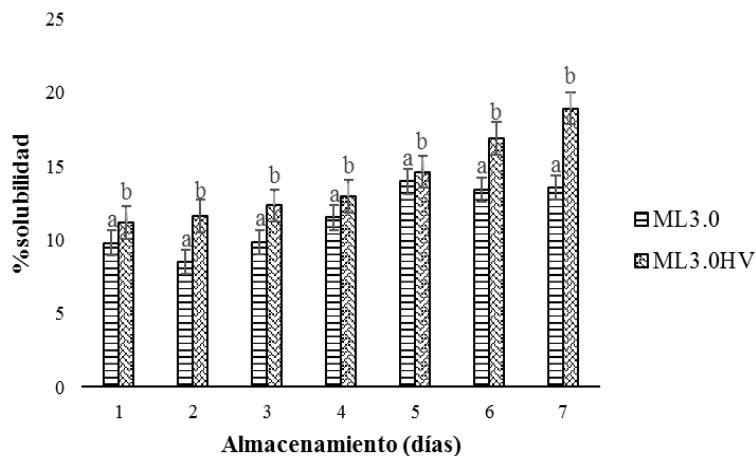


Figura 5. Solubilidad de ML3.0HV en condiciones controladas (4°C / 90% HR) en comparación con ML3.0

Solubilidad en temperatura controlada (25°C / 90% HR). En estas condiciones, la solubilidad de las películas ML3.0HV es mayor que la del tratamiento ML3.0, durante todo el tiempo de almacenamiento (Figura 6).

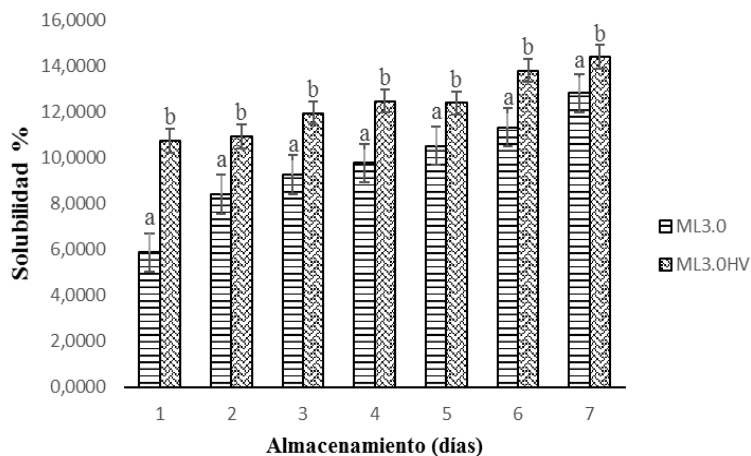


Figura 6. Solubilidad de ML3.0HV en temperatura controlada (25°C / 90% HR) en comparación con ML3.0.

Actividad antioxidante de películas ML3.0Hv. La actividad antioxidante fue significativamente diferente ($p < 0.05$) entre las películas ML3.0 y ML3.0HV. La formulación con extracto presentó

valores de actividad antioxidante significativamente más altos ($80.56 \pm 1.69 \%$) en comparación con el tratamiento ML3.0 (sin extracto; $4.65 \pm 0.32\%$).

Actividad antimicrobiana de películas ML3.0Hv. En el análisis de la actividad antimicrobiana, la película ML3.0 no presentó actividad contra los patógenos evaluados, mientras que, las películas ML3.0HV presentaron actividad contra las 4 cepas evaluadas (*S. typhi*, *S. aureus*, *E.coli* y *L. monocytogenes*), con halos de inhibición de 19.50– 22.50 mm.

4. CONCLUSIONES.

Se logró extraer mucílago de linaza con un rendimiento de 6.08 %.

Las películas elaboradas con concentración de mucílago de linaza al 3% (LM3.0%) presentaron mejores propiedades de permeabilidad al vapor de agua y, de solubilidad en agua y en condiciones controladas de temperatura y humedad (4°C/90% HR y 25°C/90% HR). Además, presentaron mayor Fuerza Máxima, tensión, elongación, espesor y actividad antioxidante. Por otro lado, la concentración de LM (2.0, 2.5 y 3.0) no influyó en la opacidad de las películas.

El extracto de *Hamammelis virginiana* presentó actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes*, *S. typhi*, *S. aureus* y *E. coli*. La CMI fue de 1.18 mg/mL para *L. monocytogenes* y 2.37 mg/mL para *S. typhi*, *S. aureus* y *E. coli*. La CMB fue de 19.02 mg/mL para *L. monocytogenes* y de 38.06 mg/mL para *S. typhi*, *S. aureus* y *E. coli*.

La incorporación del extracto de *Hamammelis virginiana* a las películas (ML3.0HV) fue efectivo para incrementar la actividad antioxidante y antimicrobiana. Sin embargo, disminuyó la fuerza máxima, tensión y permeabilidad al vapor de agua, mientras que incrementó la solubilidad y el espesor de las películas. La adición del extracto, no afectó la opacidad de las películas.

Finalmente, las películas a base de mucílago de linaza y *H. virginiana* pueden ser una alternativa potencial para su aplicación en la industria de alimentos para mejorar la calidad de los productos.

BIBLIOGRAFÍA

4. Aguilar Méndez M.A., San Martín Martínez E., Espinoza Herrera N. L., Sánchez Flores M., Ramírez Ortiz M. E. Caracterización y aplicación de películas a base de gelatina-carboximetilcelulosa para la preservación de frutos de guayaba. *Superficies y Vacío* 25, 2012, pp 1-7.
5. Anbinder P.S. Caracterización, evaluación y aplicaciones de películas poliméricas activas. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Plata, 2012.
6. Arévalo Niño K., Alemán Huerta M.E., Rojas Verde M.G, Morales Rodríguez L. Películas biodegradables a partir de residuos de cítricos: propuesta de empaques activos. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 2010, pp. 124-134.
7. Centurión Hidalgo D., Espinosa Moreno J., Mayo Mosqueda A., Frías Jiménez A., Velázquez Martínez J. Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos hexánicos de las inflorescencias de palmas comestibles de la Sierra de Tabasco, México. *Polibotanica* num 35, 2013, pp 133-142.
8. Fakhouri F. M., Costa D., Yamashita F., Martelli S., Jesus R.C., Alganer K., Collares F., Innocentini-Mei L. Comparative study of processing methods for starch/gelatin films. *Carbohydrate Polymers*, vol 95, 2, 2015, pp 681-689.

9. Falguera V., Quintero J.P., Jiménez A., Aldemar Muñoz J., Ibarz A. Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends Food Sci Technol* 22, 2011, pp 292-303.
10. Fekri N., Khayami M., Heidari R., Jamee R. Chemical analysis of flaxseed, Sweet Brasil, Dragon Head, and Quince seed mucilages. *J Biol Sci* 3, 2008, pp 166-170.
11. López Mata M., Ruiz Cruz S., Navarro Preciado C., Ornelas Paz J., Estrada Alvarado M., Gassos Ortega L., Rodrigo García J. Efecto de recubrimientos comestibles de quitosano en la reducción microbiana y conservación de la calidad de fresas. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*. Vol 14, 1, 2012, pp. 33-43
12. Organización Mundial de la Salud. Folium et Cortex Hamamelidis. In: WHO Monographs on Selected Medicinal Plants. Vol. 2, 2004.
13. Perez Cabrera L.E., Diaz Narvaez G.C., Tecante Coronel A., Gonzalez Martinez C. Effects of edible chitosan- linseed mucilage coating on quality and shelf life of freshcut strawberry.
14. Quinna N.A. Safety profile of suppository *Hamamelis virginiana* leaf extract. *J. Med. Plants Res* 2, 2013, pp 2669-2679.
15. Quintero C.J., Falguera V., Muñoz H., Aldemar. Films and edible coatings: importance, and recent trends in fruit and vegetable value chain. *Revista Tumbaga*; 5, 2010, pp 93-118.
16. Rojas J.J., García A.M., López A.J. 2005. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 4: 28
17. Rubio Anaya M., Guerrero Beltrán J.A. Polímeros utilizados para la elaboración de películas biodegradables. *Temas selectos de ingeniería de alimentos* 6, 2012, pp 173-181.
18. Sánchez Aldanna D., Contreras Esquivela J.C., Nevárez Moorillón y Aguilara C.N. Characterization of edible films from pectic extracts and essential oil from Mexican lime. *Journal of Food*, 2014, pp 17-25
19. Trejo V., Aragón N., Miranda P. Estimación de la permeabilidad al vapor de agua en películas a base de quitosán. *Rev. Soc. Quím. Méx.* Vol. 45, 1, 2001, pp 1-5.

NANOBIOSENSOR CON FLUORESCENCIA PARA LA DETECCIÓN DE *Salmonella* EN ALIMENTOS.

María Antonieta Ríos Corripio¹, Marlon Rojas López²

¹Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental. Universidad de las Américas Puebla.

²Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada.

RESUMEN

Los alimentos pueden causar enfermedades si se encuentran contaminados con microorganismos, para identificar bacterias en alimentos se utilizan métodos de microbiología que requieren tiempo. Debido a esto, surgen biosensores que detectan microorganismos en un tiempo corto. Una de las alternativas para la detección de patógenos es el uso de nanobiosensores. El objetivo de este estudio fue la construcción de un nanobiosensor usando microscopía confocal de fluorescencia para la detección de *Salmonella* en alimentos. Se construyó un nanobiosensor que consistió de nanopartículas de oro de 20 nm conjugadas a su superficie con proteína A seguido de una biofuncionalización con anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína. La caracterización del biosensor se realizó mediante UV-Visible, FTIR y TEM, el espectro ultravioleta-visible de las nanopartículas de oro mostró un cambio a bajas energías después de cubrir la superficie con proteína A y una ampliación de la banda después de la biofuncionalización con el anticuerpo, en FTIR se observaron las bandas de absorción del conjugado y el bioconjugado debido a su proximidad a las nanopartículas. Las vibraciones en 1649, 1588, y 1400 cm^{-1} fueron de C=O, N-H, y los grupos C-NH₂ de la proteína A que cubre las nanopartículas de oro. La solución coloidal del bioconjugado se utilizó para la detección de *Salmonella*, se analizaron concentraciones conocidas de *Salmonella* en un rango de 10⁸ y 10⁵ UFC/ml. El tiempo total requerido para detectar estas bacterias era menos de 1 hora, la emisión fluorescente del bacilo sugiere que esta metodología puede tener potencial para desarrollar un método universal para la detección de una amplia variedad de bacterias.

1. INTRODUCCIÓN

Los alimentos pueden causar enfermedades si no han sido elaborados bajo normas de higiene adecuadas. Este tipo de enfermedades se conocen con el nombre ETAs. *Salmonella* es uno de los patógenos alimentarios más importantes a nivel mundial y causante de enfermedades gastrointestinales en humanos (Nataro et al., 1998). La presencia de *Salmonella* en un alimento, sea en la cantidad que sea, se considera peligroso y por lo tanto no será apto para el consumo humano. Por ello, los controles microbiológicos rutinarios en la cadena alimentaria son de vital importancia para no comprometer la salud del consumidor. Los métodos estandarizados para la detección de patógenos en los alimentos, por ejemplo mediante normas ISO, son los llamados métodos de referencia. La mayoría de estos métodos se basan en métodos tradicionales de cultivo, que aunque no demandan infraestructuras especialmente caras y los consumibles son baratos, son métodos largos y laboriosos que retrasan bastante el tiempo de obtención de resultados (Tu et al., 2002). El método tradicional de detección de *Salmonella* comprende cuatro fases: una primera fase de pre enriquecimiento no selectivo, una segunda fase de enriquecimiento selectivo, un paso adicional de aislamiento en medios sólidos selectivos, y una última fase de confirmación mediante pruebas bioquímicas y serológicas. Estos procesos tradicionales de cultivo

son laboriosos y alargan la obtención de los resultados hasta una semana. Debido a esto, surge la necesidad de desarrollar nuevos tipos de biosensores (Kim et al., 2003). En este trabajo se diseñó y generó una metodología experimental para la elaboración de un biosensor basado en nanopartículas de oro las cuales fueron sintetizadas mediante el método de reducción química obteniendo partículas quasi-esféricas de un tamaño promedio entre 10-20 nm. Posteriormente estas nanopartículas de oro fueron bio-funcionalizadas con proteína A para así garantizar la conjugación orientada del anticuerpo policlonal anti-*Salmonella*. Se llevó a cabo un método de validación para obtener la concentración mínima necesaria de proteína A y anticuerpo para conferirle estabilidad y especificidad a esta nano-estructura (Ríos et al., 2013). Se emplearon diferentes técnicas de caracterización en cada etapa de la elaboración de esta nano-estructura (FTIR, UV-visible y TEM). Sin embargo la detectividad y selectividad de este biosensor se probó en soluciones contaminadas intencionalmente con la bacteria patógena *Salmonella*, empleando microscopía de fluorescencia. Este biosensor o nano-inmuno-sensor puede ser usado como un selectivo y práctico método para la detección de *Salmonella* en alimentos y agua contaminados con este microorganismo.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Para la síntesis de las nanopartículas de oro se utilizó el método de reducción química. La conjugación se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Ríos et al., 2013 para obtener una estimación adecuada de la cantidad de proteína A que debe suministrarse a la solución coloidal para recubrir la superficie de las nanopartículas de oro y así mantener la estabilidad de estas. Una concentración de 10 µg/ml de anticuerpo anti-*Salmonella* marcado con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) fue bioconjugada a la superficie del sistema nanopartícula de oro-proteína A.

Preparación bacteria *Salmonella*.

La cepa de *Salmonella* fue obtenida del laboratorio de Biotecnología del Tecnológico de Monterrey campus Puebla. Esta cepa tiene la siguiente identificación: *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium* ATCC 14028. El conteo de bacterias se realizó mediante el método de recuento de colonias llamado nefelometría. Se obtuvo la concentración de bacterias en el caldo de nutrientes inicial y estimado para ser 3×10^9 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml. Se prepararon diferentes diluciones para obtener diferentes concentraciones de bacterias desde 3×10^8 a 3×10^4 UFC/ml y así determinar el límite de detección del biosensor. Las diferentes diluciones fueron almacenadas a 4 °C hasta su posterior utilización.

Instrumentación

Espectrofotometría UV-visible.

Se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible, marca Thermo Scientific, modelo Evolution 606 para el registro de la absorción óptica de las soluciones coloidales de nanopartículas y sus conjugados en un rango de longitud de onda de 190-900 nm. Con un volumen de 400 µl y un tiempo de adquisición de 90 segundos.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Las observaciones TEM se realizaron en un microscopio marca ZEISS modelo EM 900 operando a 80Kv.

Espectroscopia infrarroja (FTIR).

Se utilizó un espectrómetro Infrarrojo con Transformada de Fourier, marca Bruker Modelo Vertex-70, la técnica de muestreo fue por Reflectancia Total Atenuada (ATR). El espectrómetro está equipado con detector de sulfato de triglicina deuterado (DTGS) que funciona con una resolución

de 4 cm⁻¹. Una gota de 3 µl es suficiente para obtener espectros FTIR con referencia con alta razón señal/ruido. Ciento veinte mediciones fueron realizadas para cada espectro en el rango espectral 650—4000 cm⁻¹.

Microscopia de fluorescencia.

Un microscopio confocal fue acoplado con un laser de Argon/Krypton con una emisión de 488 nm para la excitación de fluorescencia del isotiocianato de fluoresceína. Este microscopio fue aplicado para adquirir las imágenes para el reconocimiento de la bacteria por el bioconjugado.

3. RESULTADOS

Las nanopartículas de oro presentan una banda de absorción o resonancia de plasmon superficial (SPR) en el espectro UV-Visible y en el rango de longitud de onda de 510-550 nm. La figura 1 muestra un espectro típico de absorción UV-visible obtenido para una solución coloidal de nanopartículas de oro. Los espectros UV-visible analizados presentaron una sola banda simétrica de resonancia de plasmón superficial a 520 nm atribuido a la oscilación colectiva de los electrones de conducción 6s en las nanopartículas de oro. Esta absorción es característica para nanopartículas de tamaños entre 10-20 nm.

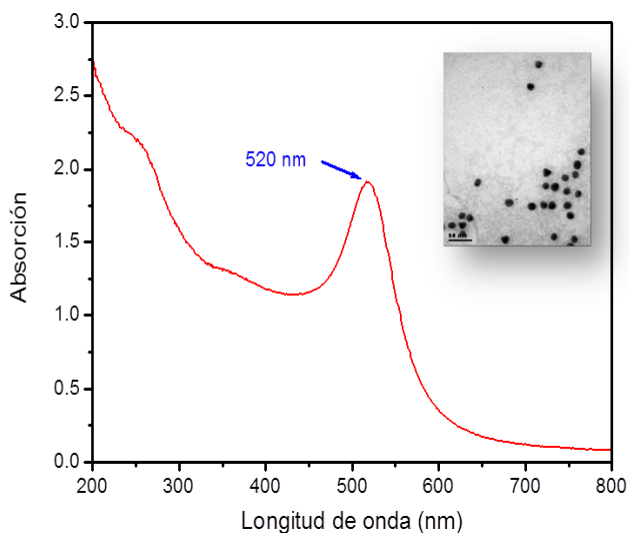


Figura 1. Espectro típico de absorción UV-visible de una solución coloidal de nanopartículas de oro.

Espectrofotometría UV-visible en el caso de los conjugados proteína-nanopartículas de oro, permite observar un desplazamiento en la longitud de onda, el cual podría atribuirse a un *amortiguamiento* del plasmón superficial (nube electrónica) de la partícula, indicando que la nanopartícula se encuentra recubierta por la proteína A, además que la forma de la banda de absorción de las nanopartículas no es modificada una vez que es unida la proteína a la superficie de estas, se espera observar un corrimiento hacia longitudes de onda mayores debido a la adherencia de la proteína A en la superficie de las nanopartículas. En la figura 2 se observa claramente este desplazamiento de la banda de absorción de las nanopartículas pasando de 520 a 526 nm, lo cual indicó que la proteína A se ha adherido a la superficie de las nanopartículas de oro.

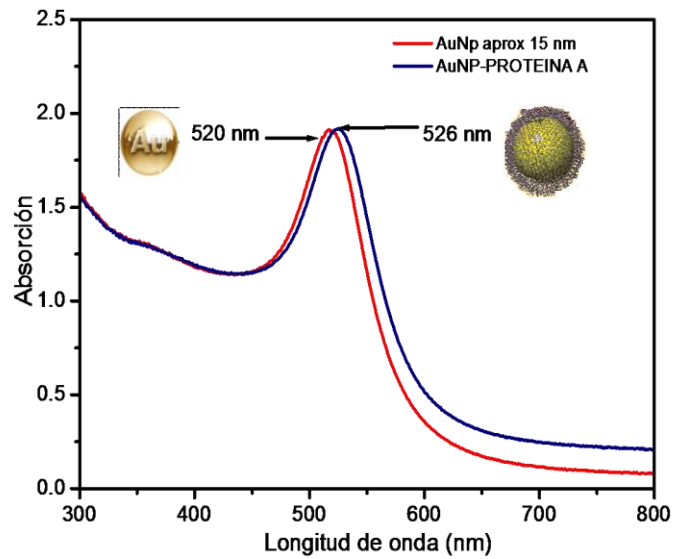


Figura 2. Espectro UV-Visible de nanopartículas de oro (rojo), y del recubrimiento de la superficie de la nanopartículas de oro con proteína A (azul).

Las nanopartículas de oro con y sin proteína A fueron caracterizadas mediante microscopía electrónica de transmisión. En la figura 3 se muestran nanopartículas de oro con y sin proteína A, podemos observar que al agregarle la proteína A, se forma un halo alrededor de ellas que no se presenta cuando la proteína no ha sido agregada.

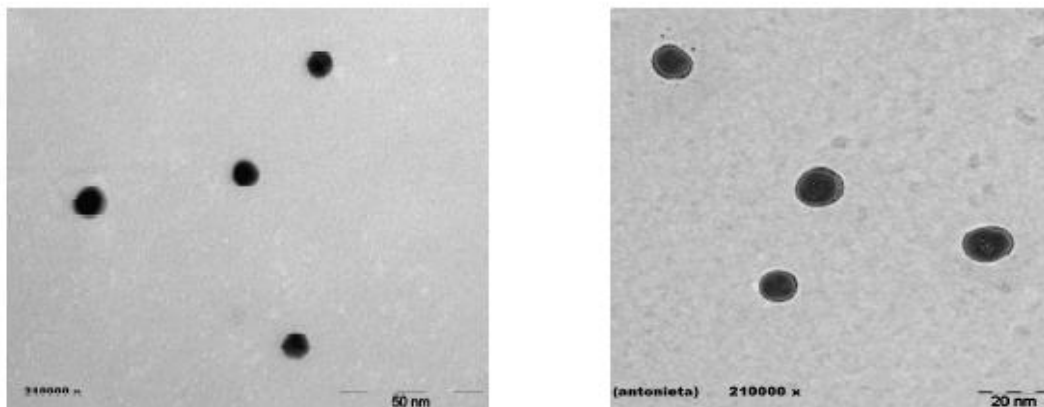


Figura 3. Imágenes TEM de nanopartículas de oro sin (izquierda) y con proteína A a una concentración de 6 $\mu\text{g/ml}$ (derecha).

En la figura 4 se presentan los espectros FTIR de las nanopartículas de oro, conjugado y arreglo, así como los estándares de la proteína A y del anticuerpo anti-salmonella, todos en la región de 500 a 2000 cm^{-1} . Cada espectro presenta semejanzas y diferencias entre cada uno de ellos. En primer lugar tenemos el espectro de las nanopartículas de oro se observan las bandas asignadas al citrato en 1403 y 1589 cm^{-1} , posteriormente se observa el espectro del conjugado donde vemos

que se hacen presentes las bandas correspondientes a los grupos citratos observados en el espectro de las nanopartículas, pero presenta algunas diferencias, después de la unión con la proteína A, se observa una banda en 1649 cm^{-1} que corresponde a la banda de la amida I que no está presente en el espectro de las nanopartículas, también se observa una disminución de la banda en 1112 cm^{-1} y la aparición de una nueva banda a 1044 cm^{-1} . En el espectro del estándar de la proteína A se observan las bandas asignadas a la amida I y II en 1649 y 1539 cm^{-1} respectivamente en donde solo la banda amida I es visible en el espectro del conjugado, desapareciendo la banda correspondiente a la amida II, en el espectro del estándar de la proteína A podemos observar que no se presentan bandas en la región de los azúcares y esto es obvio porque nuestra proteína no presenta hidratos de carbono en su estructura. Posteriormente se muestra el espectro del arreglo el cual es formado por las nanopartículas unidas a su superficie con proteína A y anticuerpo anti-*Salmonella* se puede observar la presencia de la banda de 1589 cm^{-1} que corresponde a la presencia del citrato que proviene de las nanopartículas de oro, también se observa la banda en 1649 cm^{-1} asignada a la amida I, esta banda también se hace presente en el espectro del conjugado, nuevamente desaparece la banda amida II y la banda correspondiente al citrato en 1403 cm^{-1} está presente pero presenta un ensanchamiento, este espectro a diferencia del conjugado presenta bandas en la región de los azúcares coincidiendo en algunas bandas con el estándar del anticuerpo en esta misma región algunas bandas sufren algunos ligeros corrimientos como consecuencia de la unión del anticuerpo al conjugado.

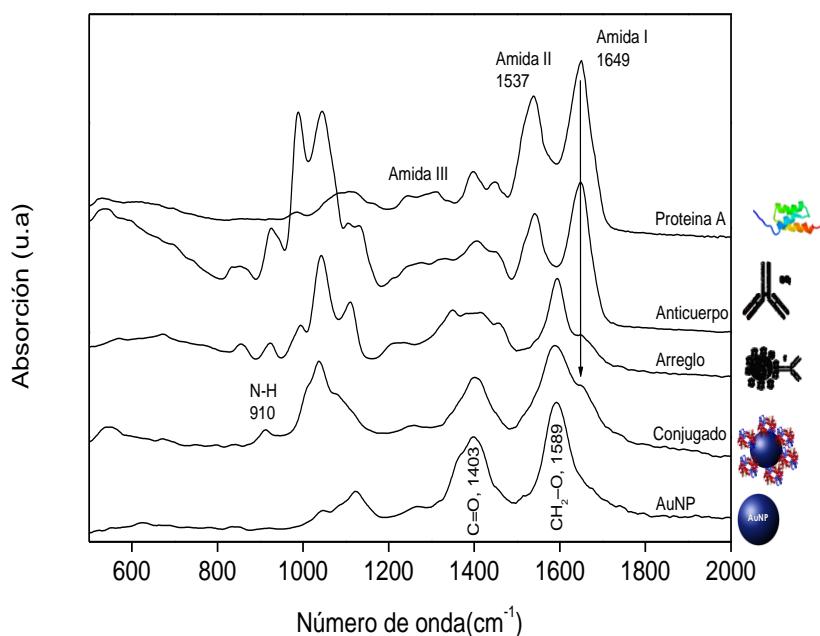


Figura 4. Espectros FTIR de nanopartículas de oro, conjugado nanopartículas de oro- proteína A, estándar Proteína A, arreglo nanopartículas de oro-proteína A-ab anti-*Salmonella*, estándar anticuerpo anti-*Salmonella*.

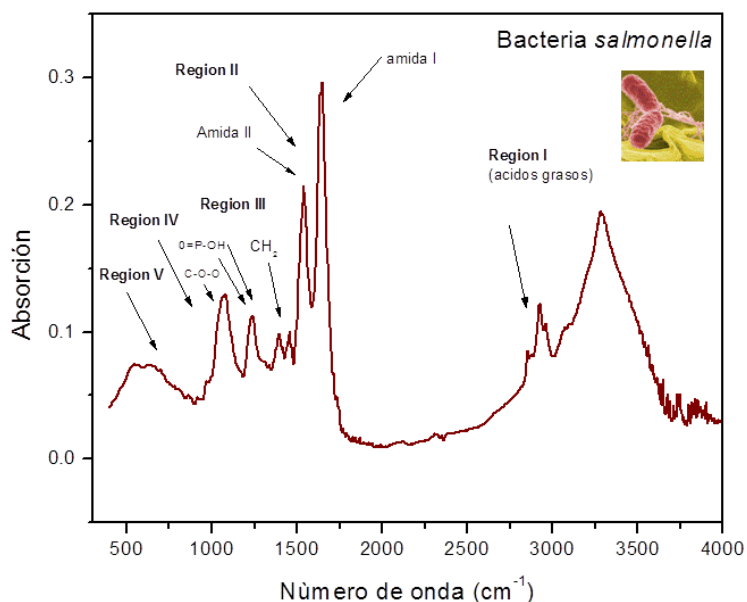


Figura 5. Espectro típico FTIR de una bacteria Gram-negativa *Salmonella*.

Posteriormente se caracterizó mediante FTIR a la bacteria *Salmonella*, en la figura 5 se observa la presencia de varias bandas características, y la mayoría de ellos representan vibraciones de grupos funcionales en los componentes principales de biomoléculas como proteínas, ácidos grasos, ácidos nucleicos e hidratos de carbono.

Los espectros FTIR medidos para las células intactas de bacterias son generalmente complejos y los picos son amplios debido a la superposición de las contribuciones de todas las biomoléculas presentes en una célula bacteriana. En la ausencia de agua, Naumann et al., recomiendan que los cinco grandes regiones de absorbancia en los espectros FTIR que deben ser analizados para la identificación de bacterias son: región espectral 3000-2800 cm^{-1} es la región de ácidos grasos (región I); 1700-1500 cm^{-1} contiene las bandas amida I y II de proteínas y péptidos (II Región); 1500-1200 cm^{-1} es una región mixta de ácido graso de vibraciones de flexión, proteínas y compuestos de fosfato (región III); 1200-900 cm^{-1} contiene bandas de absorción de los hidratos de carbono en paredes celulares microbianas (IV Región), y 900 a 700 cm^{-1} es la "región de huellas digitales" que contiene absorbancias débiles pero muy singulares que son características de bacterias específicas (región V). Regiones I y II son los más útiles para la identificación de bacterias de rutina; Sin embargo, las otras regiones se pueden utilizar para entender mejor las variaciones menores en la estructura y composición de la bacterias. La región de huella digital es significativa para la discriminación de los microorganismos a nivel de cepa.

Se llevo a cabo la prueba de fluorescencia para la detección de *salmonella* mediante el arreglo AUNP's-proteína A-anticuerpo-*anti-salmonella* FITC. La prueba consistió en evaluar mediante fluorescencia diferentes concentraciones de bacteria *Salmonella*, desde 3×10^8 UFC/ml hasta 3×10^5 UFC/ml. En las figuras 6 y 7 podemos observar diferentes imágenes de fluorescencia en campo claro y campo oscuro donde la detección entre el biosensor y la bacteria se hizo evidente. Se observa a la bacteria teñida en color verde, estas bacterias teñidas coinciden en ambos campos y en la superposición de estos, también se observa la forma de bacilo característica de la bacteria.

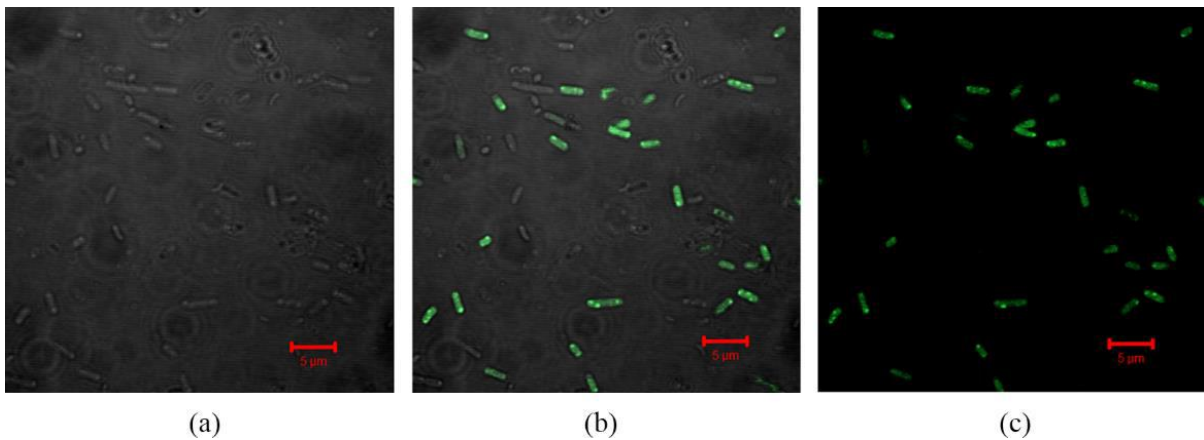


Figure 6. Imágenes de microscopía de fluorescencia de bacteria *Salmonella* a una concentración de 3×10^8 UFC/ml, con nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpo anti-*Salmonella* marcado con FITC. : (a) campo claro, (b) superposición de fluorescencia y (c) campo oscuro.

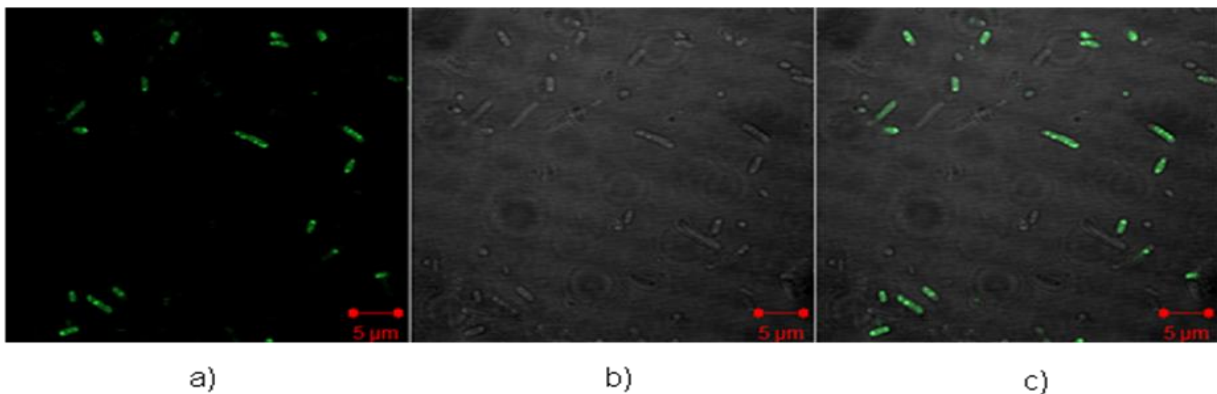


Figure 7. Imágenes de microscopía de fluorescencia de bacteria *Salmonella* a una concentración de 3×10^5 UFC/ml, con nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpo anti-*Salmonella* marcado con FITC. : (a) campo claro, (b) superposición de fluorescencia y (c) campo oscuro.

4. CONCLUSIONES

Con el nanobiosensor se realizó la detección de *Salmonella*. El tiempo total requerido para detectar estas bacterias fue de menos de 1 hora, la emisión fluorescente del bacilo sugiere que esta metodología puede tener potencial para desarrollar un método universal para la detección de una amplia variedad de bacterias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kim, M., Oh, S. & Durst, R. A. J. Microbiol. Biotechnol. 13, 2003, pp. 509–516.
2. Nataro, J. P. & Kaper, J. B. Clin. Microbiol. Rev. 11, 1998, PP. 142–201.

3. Naumann D, Schultz C, Helm D. What can infrared spectroscopy tell us about the structure and composition of intact bacterial cells. Mantsch HH, Chapman D. eds. *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*. Wiley-Liss, New York, NY, 1996, pp. 279-310.
4. Ríos-Corripio M. A., García-Pérez B. E., Jaramillo-Flores M. E., Gayou V. L., Rojas-López M. UV-Visible intensity ratio (aggregates/single particles) as a measure to obtain stability of gold nanoparticles conjugated with protein A. *J Nanopart Res*, 2013, 15:1624.
5. Tu, S.-I., Golden, M., Andreotti, P. & Irwin, P. *J. Rapid Methods Automat. Microbiol.* 10, 2002, pp. 37-48.

COMPORTAMIENTO DE *ESCHERICHIA COLI* BAJO EL EFECTO DE LOS CAMPOS MAGNÉTICOS

J.C. Martínez¹, J. Bernal², P. Villegas¹, T. Córdova²

¹Instituto Politécnico Nacional-UPIIG, ²Universidad de Guanajuato- División de Ciencias e Ingenierías.

RESUMEN

Se sabe que *Escherichia coli* es una enterobacteria Gram positiva y es uno de los microorganismos más utilizados en la industria de tipo alimenticia y farmacéutica además de ser utilizada como modelo de laboratorio perfecto debido a su fácil manejo y a sus condiciones de operación a las cuales se les puede manipular. Sus condiciones de crecimiento para este trabajo se consideran a 35°C así como a pH de 6.7 y una velocidad de agitación de 75-90 rpm. El motivo de este trabajo consiste en brindar y esclarecer que el cultivo de *E. coli* en condiciones sometidas a campos de alta frecuencia de 100, 800, 1500, 2450 y 2500 Hz permite un mayor crecimiento de la bacteria. También se busca establecer modelos matemáticos asociados para explicar el crecimiento total de la biomasa y la tasa de crecimiento de la bacteria con el fin de exponer de forma más acertada el comportamiento de las células sin la necesidad de recurrir a los modelos tradicionales obtenidos de *E. coli* tales como los modelos de Monod, Tessier, Contois, etc.

1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

Escherichia coli, también conocida por su abreviación en lenguaje técnico como, *E. coli*, es quizá el microorganismo bacteriano más estudiado por el ser humano. Se trata de una enterobacteria que se encuentra generalmente en el tracto intestinal de diversos animales, así como en sitios donde las condiciones ambientales no son tan extremas, y en consecuencia se le suele encontrar en las aguas negras así como en autopsias o biopsias de los tejidos intestinales de los animales o seres humanos estudiados, por ello, es que se dice que se trata de un microorganismo ubicuo. Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram (gram negativo) dado que no posee su pared de peptidoglicano tan gruesa y entonces le es posible reaccionar ante la safranina de la tinción Gram. Las condiciones de crecimiento óptimas de *E. coli* descritas en el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey se mencionan a continuación: a) Temperatura: 30-37 °C como condición óptima de crecimiento; b) pH: 6.3-7.2 como condición óptima, aunque se sabe que puede crecer a condiciones de pH un poco más bajas; c) Exposición a aire. No tiene mayor efecto dado que se trata de un anaerobio facultativo; d) Condiciones de presión. Presión atmosférica=1atm o a veces ± 0.1 atm. *E. coli* también es muy estudiada debido a sus parámetros cinéticos relativamente estables; esto significa que aparentemente resulta sencillo determinar sus diversas fases de crecimiento y en consecuencia también otros parámetros cinéticos como: a) Velocidad específica de crecimiento; b) Tiempo de duplicación; c) Constante de crecimiento asociada al consumo de sustrato; d) Velocidad máxima de crecimiento (Esta última al hacer uso de diversos estudios cinéticos de la bacteria en condiciones repetidas). Algunas de las industrias más importantes que se han dedicado a la utilización de esta bacteria son: a) Producción de ácido cítrico; b) Producción de insulina; c) Producción de ácido láctico; d) Producción de anticuerpos. Cabe destacar que la gran mayoría de los modelos cinéticos que se han desarrollado para explicar cómo es que se comportan las células han sido obtenidas a partir de *E. coli*; el modelo matemático

más conocido y quizá más utilizado en la industria es el modelo de Monod. El modelo de Monod explica que la velocidad específica de crecimiento no es más que el producto de la velocidad específica de crecimiento máxima encontrada para un organismo y la razón de la cantidad de sustrato consumido del medio y la suma de la constante para consumo de sustrato con la cantidad de sustrato consumido. Este modelo se obtuvo a partir de realizar diversas cinéticas y determinar mediante análisis del medio cuanto era el sustrato que se consumía, pero, también cabe mencionar que este modelo se utiliza únicamente a partir de considerar que se trata de un cultivo realizado en lote, así como que el microorganismo ya se encuentra en su fase exponencial, por lo que este tipo de modelados si bien parece ser una buena aproximación a la realidad de la etapa exponencial viene a ser un pequeño inconveniente en el desarrollo de otras etapas de crecimiento de las células. Para ser un poco más específicos, el modelo de Monod. Y para explicar esto un poco más, se atribuye que dadas las condiciones del cultivo en la fase exponencial se puede encontrar que la tasa de crecimiento de la biomasa existente en el cultivo se asocia a la siguiente ecuación tras de diversos arreglos matemáticos:

$$\mu = \ln\left(\frac{x}{x_0}\right)$$

Dónde: a) μ es la velocidad específica de crecimiento del microorganismo; b) x es la cantidad de biomasa presente en el tiempo n ; c) x_0 es la cantidad de biomasa existente en el tiempo $t=0$. Con todo esto es que se puede apreciar que la ecuación para explicar el comportamiento de *E. coli* así como el de muchos otros microorganismos se encuentra asociado una ecuación de la línea recta. Con todo esto es que a pesar de realizar análisis cinéticos para cepas diversas de *E. coli* es que se tienen cinéticas de crecimiento muy parecidas y con modelos matemáticos asociados.

Justificación.

Actualmente para la industria biotecnológica, así como farmacéutica o alimenticia, resulta de vital importancia la capacidad de tener cultivos celulares de diversa índole de forma rápida y evitando tanto como sean posibles mutaciones o contaminaciones de los mismos. La rápida obtención de este tipo de cultivos celulares (dígase bacterianos, fúngicos o de células animales) permite a su vez una mayor velocidad de producción de diversos productos de interés: enzimas, biofármacos, bioetanol, biogas, etc. por ende es que la búsqueda de técnicas que permitan lograr una mejor y más fácil adquisición de los mismos se ha vuelto tan importante. Se sabe que el uso de los campos magnéticos en cultivos celulares tiene diversas consecuencias en sus parámetros cinéticos y por ende su comportamiento es diferente a los reportados de manera estándar. En el caso de cultivos bacterianos específicamente hablando de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* se sabe que los campos magnéticos de baja frecuencia inhiben el crecimiento de la cepas (Ludek et al., 2001; El-Sayed et al., 2006; Olselys et al., 2006; Luigina et al., 2008; Segatore et al., 2012; Istiaque et al., 2013), por ello es que en este trabajo se pretende abordar el uso de campos magnéticos de alta frecuencia para observar los posibles cambios en los parámetros cinéticos de diferentes tipos de cultivos bacterianos y de células animales, así como brindar una explicación biológica y matemática a dichos cambios con el fin de demostrar que los campos de alta frecuencia pueden llegar a brindar una respuesta inversa los cambios reportados anteriormente generados por los campos magnéticos de baja frecuencia y en consecuencia presentar una solución a la necesidad de poder conseguir cultivos celulares funcionales al máximo y evitando tanto como sea posible la mutación en los cultivos así como la contaminación de los mismos.

Objetivo.

Demostrar la eficiencia de los campos magnéticos en el régimen de inducción del espectro electromagnético (10^2 - 10^3) en la obtención de cultivos puros de *Escherichia coli*, de escasa o nula mutación y con tasas de crecimiento superiores a las condiciones de control.

Objetivos Específicos.

Realizar las cinéticas de crecimiento de *E. coli* en condiciones estandarizadas y con estimulaciones magnéticas de tipo intermitente y continuo a diversas bandas de frecuencia.

Obtener la binarización de imágenes del crecimiento de *E. coli* obtenidas de las cinéticas de crecimiento en las tres condiciones de cultivo para realizar el análisis de densidad celular.

Realizar un modelado matemático multivariable de las cinéticas bacterianas de las tres condiciones de crecimiento para demostrar de forma analítica la efectividad de los campos magnéticos en el crecimiento de *E. coli*.

Validar los modelos matemáticos obtenido a partir de un programa de simulación para las tres condiciones de crecimiento llevadas a cabo durante las cinéticas con *E. coli*.

Hipótesis.

Los campos magnéticos en el régimen de inducción del espectro electromagnético (10^2 - 10^3) de tipo vórtex influyen en el crecimiento celular acelerado de *Escherichia coli*.

2. MATERIALES Y EQUIPO.

Alcohol 70%, Cloro, Agua destilada, Agar nutritivo, Caldo nutritivo, Celdas para espectrofotómetro, Matraz Erlenmeyer de 250, 500 y 1000 mL, Cajas de Petri, Tubos eppendorff, Tubos falcon de 15 mL, Tubos de ensayo de 10-15 mL, Micropipeta 100-1000, 20-200 μ L, Puntas para micropipeta 100-1000, 20-200 μ L, Espectrofotómetro UV-VIS, Shaker, Agitador magnético, Campana de flujo laminar, Computadora, Software MATLAB, Software ImageJ

3. PROTOCOLO.

Para llevar a cabo el desarrollo de la cinética de crecimiento estandarizada se parte de las especificaciones presentadas en el manual de Bergey, así como en los procedimientos clásicos de microbiología, algunos presentados en manuales diversos como en el libro escrito por Prescott. El desarrollo del modelo matemático ajustado parte de un modelo matemático teórico, el cual posteriormente se le genera un ajuste con base a los datos experimentales, dicho modelo matemático parte de realizar el análisis de las constantes de crecimiento obtenidas entre cada periodo de medición del crecimiento celular.

El análisis de imágenes por computadora se lleva a cabo a partir de buscar una nueva forma de medir las constantes de crecimiento y poder tener un modelo comparativo con el cual establecer de mejor forma la validez del modelo.

El modelo matemático multivariable se puede obtener a partir de considerar las condiciones y variables medibles así como las no medibles, con esto se obtiene un modelo de mayor precisión, para llevar a cabo este modelo es necesario hacer uso de los modelos matemáticos generados anteriormente y de un software de cálculos computacionales complejos y con interfaz gráfica alta (MATLAB o SCILAB).

El modelo de simulación se lleva a cabo tomando como partidas los modelos matemáticos obtenidos anteriormente, así como el uso de plataformas de programación y simulación de alto nivel con interfaz gráfica poderosa, tales como MATLAB, SCILAB, MATHCAD, con este tipo de simulaciones es posible determinar la factibilidad en el escalamiento de las operaciones y equipos necesarios para llevar a cabo el proyecto así como su posibilidad para poder establecer un sistema con base a los datos obtenidos a escala laboratorio.

REFERENCIAS

1. Ludek S., Vladimír V. and Jan S. Effects of low-frequency magnetic fields on bacteria *Escherichia coli*. *Bioelectro-chemistry* 55, 161–164(2001).
2. El Sayed, *et al.* Comparison of the low-frequency magnetic field effects on bacteria *Escherichia coli*, *Leclercia adecarboxylata* and *Staphylococcus aureus*. *Bioelectrochemistry* 63, 337–341(2006).
3. Olselys; R. Justo, *et al.* Growth of *Escherichia coli* under extremely low-frequency electromagnetic fields. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 134, 155-163 (2006).
4. Luigina Celleni, *et al.* Bacterial response to the exposure of 50 Hz electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics*, 29, 302-311, (2008).
5. Segatore B. *et al.* Evaluations of the effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on growth and antibiotic susceptibility of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Internacional Journal of Microbiology*. 12. (2012).
6. Istiaque Ahmed, *et al.* Evaluation of the effects of extremely low frequency (ELF) pulsed electromagnetic fields (PEMF) on survival of the bacterium *Staphylococcus aureus*. *EPJ Nonlinear Biomedical Physics*, 1(5), (2013).
7. Pérez H., Cordova T., López S., Martínez J., Rosas E., Espinoza A., Villagomez J., Sosa M., Topsis S., Bernal J. Portable device for magnetic stimulation: Assessment survival and proliferation in human lymphocytes. *Rev. Sci. Instrum.* 84, 094701(2013).

EFFECTO DE RESIDUOS SOLIDOS ORGÁNICOS BIOSECADOS EN EL CRECIMIENTO DE LECHUGA.

R. Contreras-Cisneros¹, F. Robles-Martinez¹, O. Franco¹ y B. Piña-Guzmán¹

¹ Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología UPIBI-Instituto Politécnico Nacional.

RESUMEN

La cantidad de RSU que se generan en la Ciudad de México es de 12,816 ton/día, donde un 52% se atribuye a RSO. Solo un 25% de RSO se va a plantas de compostaje, mientras que el resto se lleva a sitios de disposición final, los cuales, si no cuentan con una correcta operación, los residuos contribuyen a la contaminación del aire, suelo y agua.

El manejo de Residuos sólidos urbanos (RSU), la escasez y mala operación de los sitios de disposición final en México, enfrentan grandes retos, llevando a la población a buscar tecnologías de manejo alternas. Una posible solución a esta problemática es el biosecado de residuos. Éste es un proceso aerobio cuya finalidad es la eliminación de agua aprovechando el calor metabólico de los microorganismos. En este trabajo, el material biosecado (MB) se propuso como mejorador de suelos, mezclándolo en tres diferentes proporciones y se evaluó, durante 90 días, el crecimiento de *Lactuca sativa L. var. buttercrunch* en las mezclas preparadas (MB+Suelo), teniendo como control a la composta (CO). Los resultados obtenidos de los parámetros monitoreados (%N, %C, %P ancho, largo y número de hojas) permite afirmar que el MB puede ser propuesto como un mejorador de suelos, por su comportamiento similar a la composta.

1. INTRODUCCIÓN

El biosecado es un bioproceso que consiste en la reducción de humedad de los residuos aprovechando el calor metabólico generado en las reacciones exotérmicas microbianas y el paso de aire a través de una pila de residuos. Mediante el biosecado, se lleva a cabo una degradación aerobia parcial de la materia orgánica (MO) procesada.

El metabolismo microbiano para el proceso de biosecado es similar al del proceso de compostaje, sin embargo, el primero tiene como objetivo la eliminación de agua de los residuos biológicos con alto contenido de agua, utilizando el calor generado durante la degradación aerobia de sustancias orgánicas, logrando la conversión más baja de carbono orgánico. Mientras que el compostaje busca obtener la mayor conversión de carbono orgánico mediante la estabilización y madurez de los materiales compostados^{1,2}

El proceso de biosecado es altamente dependiente de parámetros como la aireación, la temperatura y la humedad inicial. Estos factores deben por lo tanto controlarse a lo largo del proceso a fin de mantener una óptima actividad microbiana para obtener un material estabilizado y parcialmente biodegradado con el menor contenido de humedad.

El biosecado de residuos agroindustriales y agrícolas en pilas, podría representar una buena opción de tratamiento, en el caso particular donde se busque reducir de manera significativa el volumen y masa de los residuos para ahorrar costos en el transporte a su disposición final³, o como método de estabilización de material biodegradable para obtener un producto útil como

combustible⁴, la recuperación de energía a partir de materiales de desecho, contribuye a la preservación de los recursos naturales para reducir emisiones, tales como metano y dióxido de carbono².

Hasta la fecha, el material estabilizado obtenido como resultado del proceso de biosecado, ha sido utilizado con fines energéticos y como proceso previo a la disposición final de RSO y RSU. La propuesta del presente proyecto es utilizar el material biosecado (MB) como mejorador de suelos, pues es bien sabido que debido a las intensivas labores agrícolas y explotación agroindustrial, hay una disminución constante de la MO en la mayoría de los suelos agrícolas, lo cual ha incrementado la necesidad de empleo de fertilizantes agrícolas para restituir al suelo la MO perdida. Una alternativa para dar solución a este problema podría ser la aplicación del MB, contribuyendo así a la valorización de un residuo de manejo especial y al mejoramiento de suelos empobrecidos, para la producción de productos agrícolas.

La lechuga (*Lactuca sativa L.*) es una planta vascular la cual necesita macronutrientes y micronutrientes para crecer, los cuales absorben del suelo mediante las raíces de la planta; muchas veces el suelo no cuenta con estos nutrientes y la planta puede crecer con deficiencia de estos. Un factor importante para la absorción de nutrientes es la biodisponibilidad de estos y las características físicas y químicas del suelo. Naturalmente las plantas y animales que mueren son desintegrados por microorganismos para realizar el proceso de humificación, sin embargo no todos los suelos tienen esa capacidad debido a su composición física, química y biológica. Por ello, recurrir al uso de fertilizantes orgánicos es muy común en el mundo debido a que proveen a los suelos de nutrientes y promueven una asimilación de estos a la planta. Sin embargo, se ha reportado que se tienen efectos adversos en la germinación y crecimiento de las plantas cuando se le añade materia orgánica fresca o abono inmaduro al suelo, debido a que se pueden generar metabolitos fitotóxicos como el amoníaco⁵.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Para obtener el MB y la composta se elaboraron y monitorearon 2 pilas de biosecado y una de composta de 357.2 kg con una composición de 56% cáscara de naranja, 24.9% mulch (residuos lignocelulósicos triturados) y 19.1% pasto.

Se utilizó un diseño experimental unifactorial con 5 tratamientos (I-Suelo 100%, II,III y VI-Mezclas de MB y suelo en proporciones de 10:90, 20:80 y 30:70 respectivamente y V-CO y suelo 30:70) con 10 repeticiones por tratamiento como lo muestra la Tabla 1. La proporción de CO empleada en este estudio se determinó con base en lo propuesto en el Manual de compostaje del agricultor⁶

Tabla 1. Proporciones de las pilas de biosecado y composta.

Tratamiento	Suelo	MB	Composta
I	100%	0%	0%
II	90%	10%	0%
III	80%	20%	0%
VI	70%	30%	0%
V- Control	70%	0%	30%

Se germinaron las semillas de *Lactuca sativa L. var. buttercrunch* en semilleros con agrolita esteril y 27 días después de la germinación se realizó el trasplante de las plántulas a las macetas con los tratamientos mencionados en la Tabla 1.

Se evaluó el crecimiento de *Lactuca sativa* L. var. *buttercrunch* en los tratamientos durante 90 días, monitoreando cada tercer día los siguientes parámetros: ancho, largo y número de hojas, utilizando un Vernier. Al finalizar los 90 días, se determinó el contenido (%) de C y N y P en las hojas, conforme a la NOM-021-RECNAT 2000.

3. RESULTADOS

Se realizó análisis de varianza con 95% de confianza para determinar si hay variación entre los tratamientos, posteriormente se realizó a prueba de Tukey que permite hacer comparaciones múltiples para saber cuáles tratamientos eran diferentes entre sí.

El análisis estadístico muestra que para el ancho y largo de las hojas, todos los tratamientos son significativamente diferentes al tratamiento V, con respecto al número de hojas, solo los tratamientos, I y III son significativamente diferentes al tratamiento V. Entonces los tratamientos II y IV influyen de manera similar al control positivo (V) en el # de hojas. Al realizar la comparación contra el tratamiento I, se muestra diferencia significativa en el ancho, largo y # de hojas para todos los tratamientos. Esto demuestra que los tratamientos II, III y IV muestran un efecto positivo a las características propias del suelo empleado en el presente proyecto.

Al comparar los tratamientos con MB (II, III y IV), se muestra que para ancho y largo de las hojas no hay diferencia significativa entre los tres tratamientos, sin embargo al evaluar en número de hojas, se observa diferencia significativa entre el tratamiento II y III. En el gráfico 1 se muestra el ancho, largo y número de hojas de cada tratamiento.

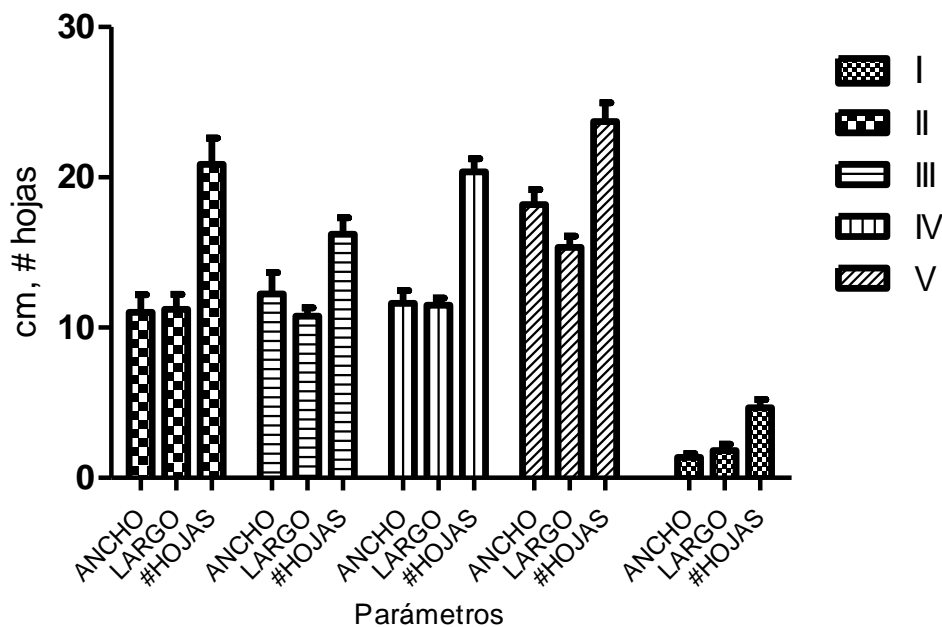


Gráfico 1. Ancho, Largo y # de Hojas en los tratamientos.

El menor crecimiento de las plantas fue en el tratamiento I, con respecto al resto de los tratamientos, puede atribuirse a que en el soporte (Suelo 100%), el paso del aire fue menor en comparación con los tratamientos en los que el MB o la CO pueden estar actuando como materiales estructurantes. Por lo anterior, es posible que en el tratamiento I se hayan formado

zonas de anaerobiosis cerca de la raíz de las lechugas impidiendo su crecimiento. Así mismo la falta de aplicación de algún fertilizante orgánico en el suelo, redujo la cantidad de MO y nutrientes disponibles para la planta.

Con respecto a los nutrientes determinados mediante análisis foliar, en la Tabla 2 se observa que no hay diferencia significativa en el %N, %C y %P encontrado en todos los tratamientos.

Tabla 2. Monitoreo y caracterización de plantas después de 90 días de crecimiento en los diferentes tratamientos.

Parámetro	I	II	III	IV	V (Control)
%N	6.4	10.5	9.5	10.3	10.2
%C	39.3	39.2	40.6	37.6	39.1
%P	0.12	0.086	0.101	0.089	0.107

4. CONCLUSIONES

El MB puede ser utilizado como mejorador de suelos ya que presenta un efecto benéfico adicional a las características propias del suelo utilizado en el presente proyecto para el crecimiento de lechuga.

Las plantas de *Lactuca sativa* var. *buttercrunch* no presentan variación significativa en los parámetros monitoreados al aplicar 10% o 30% de MB.

BIBLIOGRAFÍA

1. He, P., Tang, J., Zhang, D., Zeng, Y., Shao, L. (2010) Release of volatile organic compounds during bio-drying of municipal solid waste. *Journal of environmental sciences*. **22**, 752-759.
2. Bilgin, M y Tulun S. (2015) Biodrying for municipal solid waste: volume and weight reduction. *Environmental Technology*. **36**. pp 1691-1697.
3. Robles-Martínez, F., Gerardo-Nieto O., Piña-Guzmán A.B., Montiel-Frausto, L., Colomer-Mendoza, J. F. y Orozco-Álvarez C. (2013). Obtención de un combustible alternativo a partir de biosecado de residuos hortofrutícolas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. **29**, 79-88.
4. Herrera, L., Colomer, F.J., Robles, F., Gallardo, A. y Alberola, C. (2011) Secado de residuos de jardinería en reactor mediante procesos biológicos.
5. Zucconi, F., Monaco, A., Forte, M. y Bertoldi M. (1985) Phytotoxins during the stabilization of organic matter. *Composting of agricultural and other wastes*. Elsevier Applied Science Publishers, London, 73-80 pp.
6. Román, P., Martínez, M., Pantoja, A. (2013) Manual del compostaje del agricultor. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Santiago de Chile. 108 pp.

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA RELACIÓN MOLAR Fe/Sr EN LA PREPARACIÓN DE HEXAFERRITAS DE ESTRONCIO EN MEDIO ALCALINO MEDIANTE SÍNTESIS HIDROTÉRMICA

D. de J. Bordallo-Vélez^a, Z. Matamoros-Veloz^a, J.C. Rendón Ángeles^b, K. Yanagisawa^c

^aInstituto Tecnológico de Saltillo, V. Carranza 2400, Saltillo, Coahuila México. ^bCINVESTAV-IPN, Unidad Saltillo, Ramos Arizpe, Coahuila. ^cResearch Laboratory of Hydrothermal Chemistry, Faculty of Science, Kochi University

RESUMEN

En esta investigación se presenta el efecto de la relación molar de Fe/Sr de hexaferritas de estroncio tipo M ($\text{SrFe}_{12}\text{O}_{19}$), el polvo de hexaferrita fue obtenido mediante síntesis hidrotérmica en condiciones alcalinas a temperatura de 240° C por 24 h, empleando solución de NaOH como agente mineralizador y utilizando soluciones precursoras de nitrato de hierro $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ y nitrato de estroncio $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$.

Los resultados de Difracción de rayos X (DRX) muestran que la relación molar Fe/Sr utilizada en las soluciones precursoras afecta la formación de la fase de hexaferrita debido a que se requiere un exceso de estroncio para la formación de las ferritas hexagonales, además la fase Fe_2O_3 fue encontrada como impureza en muestras con una relación molar Fe/Sr cercana al valor estequiométrico. Además, mediante observaciones por microscopía electrónica de barrido (MEB) se determinó que la evolución de la morfología de las partículas obtenidas de hexaferrita de estroncio con respecto a la relación molar Fe/Sr obteniendo un polvo con tamaño de partícula promedio de $< 5 \mu\text{m}$.

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de la clasificación de materiales magnéticos, las ferritas hexagonales o hexaferritas son los materiales magnéticos más producidos a nivel mundial, empleándose como imanes permanentes, en cintas magnéticas, materiales de almacenamiento de datos y como componentes en los dispositivos electrónicos, en particular los de operación a alta frecuencia de microondas. A pesar de que la hexaferrita de bario es el material cerámico con propiedades magnéticas más utilizado, la hexaferrita de estroncio con fórmula $\text{SrFe}_{12}\text{O}_{19}$ se considera un material con propiedades magnéticas superiores a la ferrita de bario, teniendo un valor alto de anisotropía magneto-cristalina, resistividad eléctrica, elevada temperatura de Curie, una excelente estabilidad química y resistencia a la corrosión; características deseables para aplicaciones específicas con enfoque principal en el campo de las telecomunicaciones, así como de registro de datos y dispositivos de microondas [2].

Las ferritas hexagonales tienen la estructura cristalina de la magnetoplumbita composición del tipo $(\text{MO})_6\text{Fe}_2\text{O}_3$ donde M representa iones divalentes de Ba, Sr, Pb. Este tipo de óxidos tiene una estructura hexagonal compuesta por la acumulación de varias capas de estructura espinela. Dado que poseen una fuerte anisotropía son considerados como materiales duros [3],

Para la preparación de Hexaferritas de estroncio el método de reacción en estado sólido, es comúnmente empleado el cual implica la cocción de un precursor de estroncio y otro de hierro a

alta temperatura (1200°C) pero la obtención de partículas finas mono dispersas puede no ser fácil. Así varios métodos de baja temperatura como son sol gel, pirolisis de aerosol, cristalización de vidrio se han sugerido [4-5].

2. PARTE EXPERIMENTAL

A continuación se describe la metodología seguida para llevar a cabo el presente trabajo de investigación, llevando a cabo la síntesis hidrotérmica de hexaferrita de estroncio con fórmula $\text{SrFe}_{12}\text{O}_{19}$. Empleando 240° C de temperatura de síntesis, 24 horas de tiempo de reacción, 2.5 en la concentración molar del agente mineralizador, a diferentes relaciones molares de Fe/Sr de 12 a 8 a partir de soluciones precursoras con base en nitratos de hierro y estroncio. Además los polvos obtenidos mediante la síntesis hidrotérmica se caracterizan mediante las técnicas de difracción de rayos-x (DRX), Espectroscopía Infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) y microscopía electrónica de barrido (MEB).

3. RESULTADOS

Mediante la caracterización estructural de la hexaferrita de estroncio tipo M ($\text{SrFe}_{12}\text{O}_{19}$), se presenta un estudio detallado de la evolución estructural obtenida mediante el análisis de los patrones de difracción de rayos X (DRX). Un análisis completo de la evolución de la fase cristalográfica pura con respecto a la influencia de la relación molar Fe/Sr., y grado cristalización

En la figura 1 se muestran los patrones de difracción de la hexaferrita de estroncio sintetizada a partir de soluciones precursoras de nitrato de hierro y estroncio, tomando en consideración la temperatura de síntesis constante de 240 °C, por un tiempo de reacción de 24 horas, empleando una solución de NaOH 2.5 M como agente mineralizante, variando la relación molar de las soluciones precursoras de Fe/Sr de 12-8.

Se observó que en una relación molar estequiométrica Fe/Sr= 12 las reflexiones se pueden indexar en la fase de hexaferrita (JCPDS 80-1196), sin embargo como impureza aparece el compuesto de hematita Fe_2O_3 y el carbonato de estroncio; a medida que la relación molar hierro-estroncio disminuye, la fase secundaria de hematita (α) es menor hasta la relación igual a 8 donde la fase es casi completamente de hexaferrita de estroncio.

Este resultado está en acuerdo con resultados reportados por Darinka Primc [6], quien trabajo la fase de hexaferrita de estroncio en una relación molar de Fe/Sr= 3.

Se evidencia que es necesario un largo exceso de estroncio para evitar la formación de hematita. Este exceso de estroncio puede tener una sobre la disminución de la formación de la fase hematita puede ser debido a que el estroncio presenta una solubilidad parcial cuando precipita con el hidróxido a diferencia de los iones de Hierro. Con estos resultados es posible determinar las condiciones necesarias para la formación de la fase de hexaferrita con el propósito de obtener una fase pura posteriormente.

La influencia de la relación molar Fe/Sr en la síntesis de hexaferrita de estroncio en condiciones hidrotérmicas sobre el comportamiento microestructural.

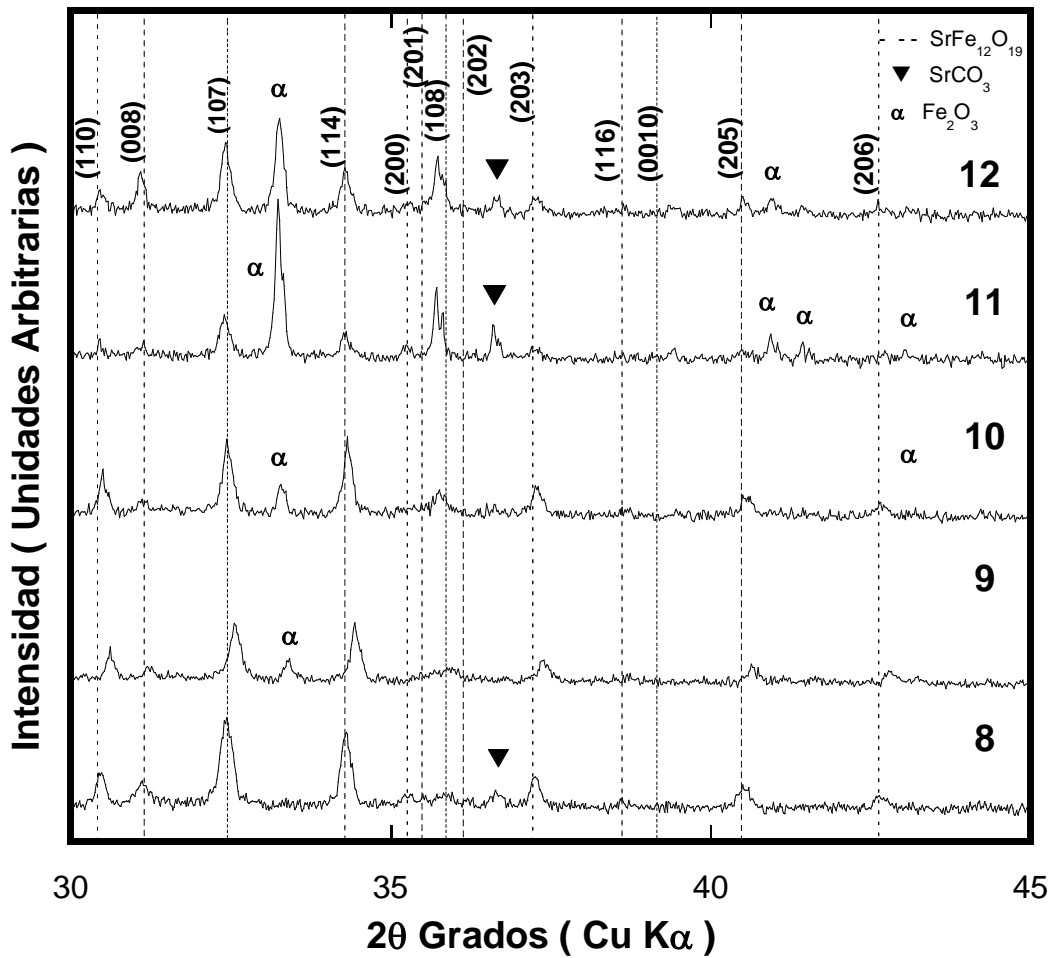


Figura 1. Patrones de difracción de rayos x de hexaferrita de estroncio a 240 °C por un tiempo de 24 horas, NaOH 2.5 M, variando la relación molar Fe/Sr 12-8

La figura 2, muestra la morfología de las muestras con diferentes relación molar Fe/Sr desde 12 a 8, empleando una solución mineralizadora 5 M de NaOH a 240° C por un tiempo de 24h en condiciones hidrotérmicas fueron investigadas mediante observaciones por microscopía electrónica de barrido (MEB). Se muestra en la figura 2 a, b, c, d, e con diferentes relaciones de Fe/Sr 12:1, 11:1, 10:1, 9,1, 8:1 respectivamente. Las micrografías revelan que las muestras sintetizadas presentaron morfología de plaquetas hexagonales, estas plaquetas tienen un tamaño alrededor de <5 μm. La figura 2a-c muestra que la partícula es más grande cuando hay una concentración molar de Fe más alta y a medida que hay un aumento de la cantidad de Sr las partículas se vuelven más definidas como se puede apreciar en la figura 2e perteneciente a la relación molar Fe/Sr =8 por encima de esta relación molar se encuentran partículas con forma más redondeada que son características de la fase hematita que se presenta en las muestras y que se confirma mediante el análisis estructural de difracción de rayos X.

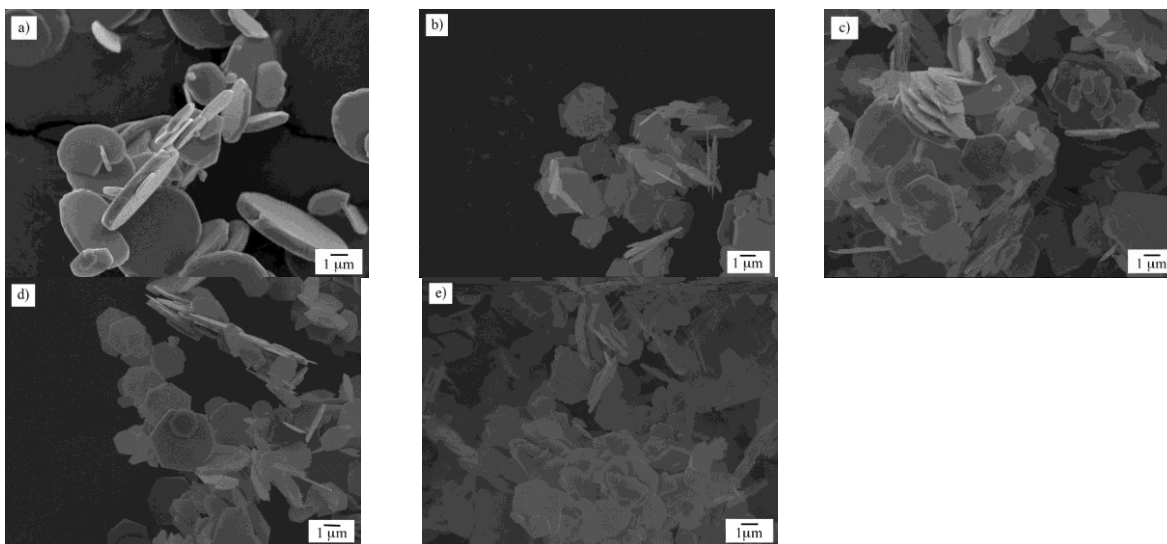


Figura 2. Micrográficas de los productos de reacción de las soluciones de Hierro y estroncio en condiciones hidrotérmicas a 240 °C, 24 h con un solución NaOH 2.5 M a diferente relación molar de Fe/Sr a) 12, b) 11, c) 10, d) 9, e) 8

3. CONCLUSIONES

Se realizó un estudio de la obtención de la hexaferrita de estroncio a partir de precursores a base de nitratos.

Mediante la técnica de Rayos X, fue posible la identificación de los polvos obtenidos, encontrando que los parámetros experimentales de temperatura, y tiempo de reacción no presentan una influencia importante en la formación de fase de hexaferrita de estroncio. No obstante experimentos realizados con la relación molar de Fe/Sr =8 evidenciaron claramente que todas las reflexiones corresponden a la hexaferrita de estroncio.

Del análisis microestructural se puede confirmar que la relación Fe/Sr tiene una influencia significativa en la morfología de las partículas de la hexaferrita sintetizadas, debido a que con una relación de entre 8 se obtuvieron partículas con una morfología tipo plaquetas hexagonales y con el incremento de Fe en la relación molar la partícula obtenida se muestra más redondeada teniendo partículas de hematita.

BIBLIOGRAFÍA

1. Muhammad Javed Iqbal, "Physical and electrical properties of Zr–Cu substituted strontium hexaferrite nanoparticles synthesized by co-precipitation method" *Chemical Engineering Journal* 136 (2008) 383–389.
2. Muhammad Javed Iqbal, "Physical, electrical and dielectric properties of Ca-substituted strontium hexaferrite (SrFe₁₂O₁₉) nanoparticles synthesized by co-precipitation method" *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 322 (2010) 1720–1726.

3. Robert C. Pullar, "Hexagonal ferrites: A review of the synthesis, properties and applications of hexaferrite ceramics", *Progress in Materials Science* 57 (2012) 1191–1334.
4. Darinka Primc, "Low-Temperature Hydrothermal Synthesis of Ultrafine Strontium Hexaferrite Nanoparticles", 2011 Wiley-VCH Verlag 3802 GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
5. Guolong Tan, "Structure and multiferroic properties of barium hexaferrite ceramics", *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 327 (2013) 87–90.
6. A. Baykal, "Hydrothermal Synthesis of SrFe₁₂O₁₉ and Its Characterization", *J Supercond Nov Magn* (2012) 25:2081–2085.

LA PARTICIPACIÓN DE LA MUJER EN LA INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA EN EL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES AGRÍCOLAS Y PECUARIAS*

Elsa Angélica Contreras Contreras¹, Alejandra Vélez Izquierdo¹, Antonio Espinosa García¹,
Venancio Cuevas Reyes², Raymundo Vázquez Gómez³

¹INIFAP-CENID Fisiología y Mejoramiento Animal. ²INIFAP-Valle de México. ³INIFAP-CENID Microbiología

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue analizar la participación de investigadoras del INIFAP en el sector agropecuario e identificar sus aportaciones al mismo a través de los productos generados de proyectos de investigación y transferencia de tecnología. Se aplicó el método de investigación de las ciencias sociales, cuya fuente de información son las personas y los procesos establecidos en el desarrollo de los proyectos de investigación y transferencia de tecnología implementados por el INIFAP, de tal manera que se utilizó información secundaria y de fuentes directas. El análisis de la información fue estadístico descriptivo bajo el enfoque de género que considera las interrelaciones existentes entre hombres y mujeres y los distintos papeles que socialmente se les asignan, las variables analizadas tienen que ver con caracterización: tipo de proyecto, área y programa de investigación; eficiencia: publicación de artículos, libros, folletos, generación de fichas tecnológicas, apoyo a la transferencia. En el INIFAP existe el Programa de Estímulos al Desempeño del Investigador (PEDPI), el cual tiene como objetivo de evaluar el desempeño de los investigadores y en base a su productividad otorga de dos hasta ocho salarios mínimos, por eso se concluye que las diferencias que existen entre mujeres y hombres están más orientadas con las cuestiones de mérito de cada uno.

1. INTRODUCCIÓN

La investigación en el área agropecuaria y forestal en México se lleva a cabo en Centros Públicos de Investigación como es el caso del INIFAP, Universidades Agrícolas como el Colegio de Postgraduados, Universidad Autónoma de Chapingo y la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en facultades de ciencias veterinarias de las universidades estatales y por agencias públicas de investigación. Sin embargo el actor más importante es el INIFAP, que a la fecha cuenta con ocho Centros de Investigación Regional y cinco Centros Nacionales de Investigación Disciplinaria, tres de ellos de vocación pecuaria, uno forestal y otro enfocado al estudio de Agua, Suelo, Plantas y Atmosfera. Actualmente laboran en él 889 investigadores de los cuales solo el 19% son mujeres. La incorporación de las mujeres a la ciencia es un fenómeno propio del siglo XX y aunque no se ha llegado a una paridad en su presencia en el campo de la investigación, a nivel mundial el índice de participación ha aumentado significativamente, aproximadamente 30% en América Latina, en el Caribe representan 46%, en Asia 15%, en Europa 32% y en África las estimaciones señalan 29% (Sánchez, Guzmán y Corona 2009, 73). En el caso de México las mismas autoras señalan que solo el 22% del total de investigadores son mujeres.

Los estudios sobre mujeres en la ciencia son recientes y su análisis ha variado dependiendo del momento histórico y de las posiciones desde las que se han realizado. El interés hacia el tema ha estado impulsado por varios fenómenos sociales: por un lado, el auge del movimiento feminista y, por otro, la incorporación de las mujeres a las universidades, como estudiantes y académicas

(Sánchez, Guzmán y Corona 2009, 72). Actualmente los estudios sobre las mujeres en la ciencia son abordados desde la perspectiva de género y hacen hincapié en las desigualdades que afectan a las mujeres en este ámbito, en un estudio realizado por Hebbe Vessori y Maria Victoria Canino en 2005, hacen referencia a la presencia femenina en las instancias de poder de las instituciones de ejecución o de gestión de la investigación, en Brasil Gilda Olinta (2005) analiza el desequilibrio existente entre las presencia masculina y femenina en la investigación científica y tecnológica brasileña. En México autores como Ivonne Vizcarra Bordi y Graciela Vélez Bautista en 2007 evaluaron indicadores de género que pueden estar correlacionados con los procesos de productividad científica en la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM); por su parte Judith Zubieta y Patricia Marrero en 2005, analizaron la participación de la mujer en la educación superior y en la ciencia en México. Sin embargo son pocos los estudios de género que abordan la participación de la mujer en la ciencia y tecnología a través de indicadores de producción científica, el trabajo de Olaya (2003) analizó los resultados de la convocatoria de grupos y centros de investigación a la luz de la participación de hombres y mujeres.

Para Castañeda y Castañeda (2007) el concepto de productividad se refiere al “desarrollo de destrezas metodológicas y agrupación de esfuerzos alrededor de sistemas de objetivos, planes, tecnologías, estructura de procesos, controles, otros, enmarcados en significativos análisis de las demandas sociales” (p. 28). En tanto, Albornoz, (2002), remarca que la productividad académica define la calidad de las instituciones. En un instituto como el INIFAP, tener estadísticas, indicadores y estudios específicos sobre la situación de las mujeres con respecto a los varones respecto al tema de productividad permite contar con herramientas para la reorientación y formulación de políticas públicas e institucionales para fomentar su desarrollo y para tener evidencias que muestren en qué dirección se mueven. En este sentido el objetivo de este trabajo fue analizar la participación de investigadoras del INIFAP en el sector agropecuario e identificar sus aportaciones al mismo a través de los productos generados de proyectos de investigación y transferencia de tecnología.

2. METODOLOGÍA

Se aplicó el método de investigación de las ciencias sociales, cuya fuente de información son las personas y los procesos establecidos en el desarrollo de los proyectos de investigación y transferencia de tecnología implementados por el INIFAP, de tal manera que se utilizó información secundaria y de fuentes directas. Se analizaron los protocolos e informes de los proyectos y se aplicaron cuestionarios y entrevistas a una muestra de representativa de los investigadores.

Los datos para el análisis se tomaron de tres bases de datos, información facilitada por la Dirección de Sistemas a solicitud de la Coordinación de Planeación y Desarrollo del INIFAP; una primera base con la información de 1394 proyectos registrados en el Sistema Institucional de la Gestión Integral (SIGI) en el periodo 2012-2014, la segunda base con la misma información pero tomando en cuenta solo los 824 proyectos con estatus de baja satisfactoria registrados en el mismo sistema y para el mismo periodo, y la tercera base de datos con la información de los 206 investigadores encuestados, a continuación se presenta el proceso que se realizó para determinar la muestra.

El tamaño de muestra se calculó de un marco muestral de 824 proyectos de un período de 2012 al 2014, se utilizó la fórmula (a) para una población finita y conocida.

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 \cdot N \cdot p \cdot q}{d^2(N-1) + Z_{\alpha}^2 \cdot p \cdot q} \dots\dots\dots (a)$$

Donde:

n= Tamaño de la muestra

N =Tamaño de la población

Z = valor de Z en la tabla de distribución normal estándar para una confianza del 95%

p = Prevalencia esperada del parámetro a evaluar con valor de 0.5

$q = 1-p$

d = Error muestral del 10%.

Una vez obtenido el tamaño de la muestra n , se estimaron por proporciones el tamaño de la muestra para cada uno de los años, 2012, 2013 y 2014, considerados como estratos con un 20% de reemplazo. La elección de los investigadores a enviarles el cuestionario por estrato (año), se realizó mediante números aleatorios en el programa Excel y se les aplicó una Prueba de Rachas en el Programa SPSS versión 11, para verificar que la selección de los individuos de la muestra fuera aleatoria y no se repitiera. Se obtuvo una muestra total de 206 investigadores que representan el 24.6% de la población total. La muestra total distribuida por año fue de 91 investigadores para el 2012, 61 en 2013 y 51 en 2014, con el 20% de reemplazo considerado para cada estrato la elección aleatoria para cada año se realizó para los totales presentados en la tabla 1.

Tabla 1. Submuestras con reemplazos para cada uno de los años

Año	2012	2013	2014
Submuestra	91	61	51
20% de reemplazo	18	12	10
Total con reemplazo	110	73	61

Fuente: elaboración propia.

En el análisis de la información se presentan tanto estadísticas básicas como indicadores de género. Las estadísticas básicas corresponden a la desagregación de los datos por sexo, con el propósito de realizar análisis comparativos básicos. En el caso de los indicadores de género se trata de variables de análisis que describen la situación de las mujeres y hombres en la sociedad, las variables analizadas tienen que ver con caracterización: tipo de proyecto, área y programa de investigación; y productividad: publicación de artículos, libros, folletos, generación de fichas tecnológicas, apoyo a la transferencia y eventos de capacitación.

3. RESULTADOS

Caracterización de los investigadores e investigadoras del INIFAP.

Ubicación geográfica

El Instituto tiene presencia nacional a través de la Investigación Científica que se realiza en los Centros de Investigación Regional (CIR) y la formación interdisciplinaria que se tiene en los Centros Nacionales de Investigación Disciplinaria (CENID), cubre las diferentes regiones agroecológicas. Cuenta con ocho Centros de Investigación Regional (CIR'S) y 38 campos experimentales, así mismo, existen cinco Centros Nacionales de Investigación Disciplinaria

(CENID´S) y un Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), los cuales se caracterizan por su alto grado de especialización en una disciplina en particular. De acuerdo a la ubicación geográfica se encontró que el 36% de las investigadoras se concentra en la región norte del país, 32% en la parte sur y 23% en el centro, en el caso de los hombres 42% se encuentran en el norte, 30% en el sur y solo 10% en el centro del país.

Tipo de proyecto

En el INIFAP, existe investigación orientada a cinco tipos de proyectos, los que se orientan a la investigación ya sea básica o aplicada y los de transferencia de tecnología, dependiendo del tipo de proyecto se clasifican los usuarios, que puede ser la comunidad científica, estudiantes, técnicos, productores, empresas y gobierno. En relación con este punto en la tabla 2 se observa el tipo de proyecto y la distribución por hombres y mujeres.

Tabla 2. Porcentaje de hombres y mujeres por tipo de proyecto.

Tipo de proyecto	Mujeres	Hombres
Investigación Básica	19%	7%
Investigación Aplicada	47%	45%
Transferencia de tecnología	21%	32%
Validación	12%	15%
Productos y Servicios	0%	1%

Fuente: elaboración propia.

La única diferencia significativa es que las mujeres realizan más proyectos de investigación básica y los hombres más proyectos de transferencia de tecnología. De acuerdo con Bordi y Vélez (2007) una de las características de las investigaciones realizadas por mujeres es que tienden a desarrollar proyectos de laboratorio de fácil manejo físico o proyectos que no demanden mucha presencia en campo.

Programa y área de investigación

Existen cuatro programas de investigación: agrícola, pecuario, forestal y multisectorial. En el periodo 2012-2014 66% de los proyectos fueron del área agrícola, los proyectos multisectoriales fueron el 27%, pecuarios 26% y solo 13% fueron del área forestal, en la tabla 3 se puede observar la distribución de los proyectos entre hombres y mujeres.

Tabla 3. Porcentaje de participación de mujeres y hombres en los proyectos.

Programa de investigación	Mujeres	Hombres
Agrícola	44%	22%
Pecuario	13%	13%
Forestal	12%	1%
Multisectorial	19%	8%

Fuente: elaboración propia.

Productividad científica

Los centros de investigación juegan un papel importante a través de la generación de conocimientos se debe dar respuesta a las demandas de la sociedad. De acuerdo con Albornoz (2002) el rol de la investigación es generar conocimiento puro y aplicado para poder ubicar al país en el área internacional y globalizadora. La investigación permite contrastar situaciones actuales, detallar los problemas y esbozar el camino futuro. En este sentido como indicador que permita determinar la cantidad de la investigación se presentan el índice de productividad, para Cano (2011) la producción científica constituye la demostración de la excelencia, producto tangible y mensurable o arte, talento y el entrenamiento de los mejores, para las posiciones más destacadas y con liderazgo, y que existe gracias a las investigaciones que se realizan los investigadores y docentes. Albornoz (2002) remarca que la productividad define la calidad de las instituciones.

En el INIFAP los proyectos son de dos tipos, los proyectos de investigación básica o aplicada y los proyectos de transferencia de tecnología, a continuación se presentan los resultados encontrados en este sentido.

Entregables de los proyectos de investigación

Una de las funciones principales de las instituciones que realizan investigación es generar conocimientos que se utilicen y contribuyan al bienestar de la población. En el INIFAP, existen una serie de herramientas que permiten la difusión y transferencia del conocimiento a los usuarios y beneficiarios, estas herramientas son los entregables de los proyectos que genera y reporta el investigador en el Sistema Institucional de la Gestión Integral (SIGI), son 23 tipos de entregables tanto para los proyectos de investigación como para los de transferencia. A continuación se enlistan:

- Generación de genotipos de plantas y animales, ecotipos y vacunas.
- Desarrollo de maquinaria o implementos.
- Desarrollo de tecnologías de producción
- Publicaciones de artículos.
- Trabajos in extenso y resúmenes
- Libros y capítulos

- Memoria no científica
- Propiedad Intelectual
- Eventos de capacitación a técnicos y/o productores
- Conferencista en eventos científicos
- Establecimiento de parcelas o módulos con eventos demostrativos
- Responsable y conductor del modelo institucional de apoyo a la transferencia de tecnología
- Atención a agentes de cambio
- Participación en eventos masivos de transferencia de tecnología
- Publicaciones de difusión técnica
- Folletos
- Desplegables, notas periodísticas, radiofónicas, televisivas y web
- Fichas tecnológicas
- Videos originales de difusión técnica
- Transferencia de tecnología
- Asesoría o dirección de tesis
- Cursos cortos

De toda la lista presentada, los investigadores al inicio del proyecto reportan el tipo y número de entregables que se generaran con el proyecto en cuestión y al término del proyecto en el SIGI aparecen los entregables que se generaron en total. Esta herramienta sirve al Instituto para dar seguimiento respecto al cumplimiento de metas y en lo que respecta a los objetivos del presente trabajo permitió analizar la producción científica tanto de hombres como de mujeres. A continuación en la tabla 4 se presentan los resultados de los proyectos de investigación.

La productividad científica es muy importante para argumentar y apoyar los resultados derivados de los proyectos de investigación. En lo que respecta a los entregables comprometidos y reportados en los proyectos de investigación, se encontró que los trabajos in extenso y resúmenes y los eventos de capacitación son los que mayor porcentaje reportan, las publicaciones junto con la formación de recursos humanos propician efectos multiplicadores en la sociedad. En cuanto a las diferencias encontradas entre mujeres y hombres, se aprecia que en el caso de la publicación de artículos las mujeres comprometen más de lo que al final del proyecto reportan, y en lo que respecta a los eventos de capacitación son los hombres quienes comprometen más de lo que realmente hacen. Los resultados arrojan lo que en la literatura se menciona (Cano, 2011), es cierto que la producción científica ha aumentado tanto por el incremento de autoras como de trabajos publicados, aunque las mujeres siguen publicando menos que los hombres. Los estudios de género que abordan el tema de la producción científica de la mujer demuestran que la productividad científica de la mujer es inferior a la de los hombres (Torres-Salinas et al, 2011), sin embargo en el caso del INIFAP y concretamente en los proyectos de investigación, las mujeres son más productivas al momento de reportar entregables como resultado de la investigación.

Tabla 4. Porcentaje de entregables comprometidos y reportados en los proyectos de investigación en el periodo del 2012-2014.

	MUJERES INVESTIGACIÓN		HOMBRES INVESTIGACIÓN	
	COMPROMETIDOS	REPORTADOS	COMPROMETIDOS	REPORTADOS
Publicaciones de artículos	30%	13%	17%	16%
Trabajos in extenso y resúmenes	36%	51%	27%	39%
Eventos de capacitación a técnicos y/o productores	33%	43%	41%	33%
Establecimiento de parcelas o módulos con eventos demostrativos	33%	13%	30%	19%
Publicaciones de difusión técnica	13%	9%	11%	10%
Folletos	46%	25%	44%	17%
Fichas tecnológicas	9%	25%	10%	24%
Asesoría o dirección de tesis	26%	29%	12%	15%

Fuente: elaboración propia.

Entregables de los proyectos de Transferencia de Tecnología

En el INIFAP la parte de transferencia de tecnología es un componente básico del quehacer del instituto pues los proyectos de este tipo son los tienen como objetivo desarrollar algún componente tecnológico que atienda las necesidades y demandas de los usuarios, en este caso los productores. Debido a la naturaleza de los proyectos el tipo de entregables reportados varía con respecto a los proyectos de investigación. En la tabla 5 se aprecian los resultados. Los productos derivados de estos proyectos están más orientados a difundir el conocimiento y la tecnología tanto a los técnicos como a los productores, por eso el establecimiento de parcelas o módulos demostrativos, los eventos de capacitación las fichas tecnológicas y los folletos sobresalen, pues son productos dirigidos directamente a los usuarios, dejando por debajo a las publicaciones de artículos y trabajos in extenso. Es importante observar que en lo que respecta a la productividad entre mujeres y hombres, no existen diferencias significativas en el porcentaje de productos reportados, como fue el caso en los proyectos orientados a la investigación.

Según Arranz (2004), citado por Sierra et al, 2009, p. 125, las desigualdades entre mujeres y hombres en términos de distribución y productividad en el ámbito de la ciencia, tienen tres explicaciones. La primera radica en una posición existencialista, donde las desigualdades se explican en base a características biológicas, psicológicas o de socialización que ha provocado que las mujeres antepongan roles familiares como la maternidad a la formación académica y científica. La segunda explicación es de corte igualitario, supone que la fuente de esas desigualdades está en la propia evolución de la sociedad y sostiene que aún no ha habido tiempo para una transformación de la misma. Y por último la tercera explicación tiene que ver más con un sistema científico-meritocrático donde reina la objetividad del sistema-basado en el mérito tanto de hombres como de mujeres y las diferencias observadas tienen que ver con una mayor preparación intelectual del hombre.

Tabla 5. Porcentaje de entregables comprometidos y reportados en los proyectos de transferencia de tecnología en el periodo del 2012-2014.

	MUJERES TRANSFERENCIA		HOMBRES TRANSFERENCIA	
	COMPROMETIDOS	REPORTADOS	COMPROMETIDOS	REPORTADOS
Publicaciones de artículos	0%	3%	3%	3%
Trabajos in extenso y resúmenes	16%	37%	26%	37%
Eventos de capacitación a técnicos y/o productores	45%	58%	66%	58%
Establecimiento de parcelas o módulos con eventos demostrativos	68%	32%	57%	32%
Publicaciones de difusión técnica	8%	3%	4%	3%
Folletos	55%	32%	48%	32%
Fichas tecnológicas	18%	24%	14%	24%
Asesoría o dirección de tesis	0%	0%	1%	0%

Fuente: elaboración propia.

De acuerdo a los resultados del trabajo, las diferencias encontradas respecto a la productividad entre mujeres y hombres en el INIFAP, tienen una explicación más del tipo científico-meritocrático

de acuerdo con la descripción de Arranz, pues ambos cuentan con los mismos recursos y posibilidades para gestionar y ejecutar los proyectos.

Si se habla en términos generales de productividad Cano (2011) señala que algunos de los problemas están relacionados con la cantidad de productos que debe generar el proyecto de acuerdo al monto a financiar, cuando la productividad se podría expresar como la cantidad, calidad e impacto de los productos obtenidos por proyectos en relación con la cantidad de recursos utilizados. Se menciona lo anterior debido a que en los dos tipos de proyectos en el periodo de análisis (2012-2014) se comprometieron más productos de los que se reportaron al final, la explicación de esto puede estar relacionada como dice Bravo con el monto a financiar, con el tiempo de duración del proyecto, con las habilidades del investigador o en general con los recursos con los que cuenta para llevar a cabo el proyecto.

4. CONCLUSIONES

A partir de los resultados en el periodo de análisis de los proyectos que comprende del 2012 al 2014, se puede concluir que a pesar de que en el INIFAP dentro de la planilla de investigadores hay más hombres que mujeres, la productividad entre ambos es muy similar, con algunas diferencias en lo que corresponde a la publicación de artículos, producto fundamental cuando se refiere a proyectos de investigación. En los proyectos de transferencia de tecnología hombres y mujeres tuvieron porcentajes similares en lo reportado al final del proyecto. Lo que es importante mencionar es que tanto en los proyectos de investigación como en los de transferencia de tecnología, hombres y mujeres comprometen más productos de los que reportan, esto está relacionado más con cuestiones de financiamiento, duración del proyecto, apoyo de colaboradores, que con una cuestión de género. En el INIFAP existe el Programa de Estímulos al Desempeño del Investigador (PEDPI), el cual tiene como objetivo de evaluar el desempeño de los investigadores y en base a su productividad otorga de dos hasta ocho salarios mínimos, por eso se concluye que las diferencias que existen entre mujeres y hombres están más orientadas con las cuestiones de mérito de cada uno.

BIBLIOGRAFÍA

1. F. Albornoz, "Las mujeres y la universidad española: estructura de dominación y disposiciones feminizadas en el profesorado universitario", *Política y Sociedad*, 2004, Vol., 41,2.
2. M. Cano, "Análisis de género y productividad científica de las profesoras españolas del área de biblioteconomía y documentación", *cuadernos de Gestión de información*, 2011, pp. 29-34.
3. G. Castañeda y R. Castañeda, "Gerencia de investigación: Criterios gerenciales aplicados a la investigación", *ORBIS/Ciencias Humanas*, Vol. 2,6, 2007, pp. 18-47.
4. G. Olinta. "La inserción de las mujeres en la investigación científica y tecnológica en Brasil: indicios de transformación" en: *Ciencia, Tecnología y género en Iberoamérica*, Universidad Nacional Autónoma de México, 2005.
5. H. Vessori. y M. Canino, "La otra, el mismo. El género en la ciencia y la tecnología en Venezuela" en: *Ciencia, Tecnología y género en Iberoamérica*, Universidad Nacional Autónoma de México, 2005.
6. A. Olaya, "Los vértices de la meritocracia". *Utopía y Praxis Latinoamericana*, 7(17), 2003, pp.121-124.

7. J. Sierra *et al*, "Diferencias por sexo en los criterios y estándares de productividad científica y docente en profesores funcionarios en España", *Psicothema*, Vol., 21,1, 2009, pp. 124-132.
8. M. Sánchez y T. Corona, "Inserción de las mujeres en la ciencia", *Gac Méd, México*, Vol., 145, 1, 2009.
- 9.
10. D. Torres *et al*, "Análisis bibliométrico de la situación de las mujeres investigadoras de ciencias sociales y jurídicas en España", *Revista Española de documentación científica*, Vol., 34,1, 2011, pp. 1-18.
11. V. Bordi y G. Vélez, "Género y éxito científico en la Universidad Autónoma del Estado de México", *Estudios feministas*, Vol., 15, 2007, pp. 581-608.
12. J. Zubieta y P. Marrero, "Participación de la mujer en la educación superior y la ciencia en México", *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, Vol., enero-junio, 2005.

EVALUACIÓN DEL USO DE RESIDUOS DE *Opuntia streptacantha* PARA LA OBTENCIÓN DE PECTINA

Jaquelinne Mota Navarrete¹, Claudia Rosario Muro Urista¹, Rosa Elena Ortega Aguilar¹

¹Laboratorio de Investigación de Ingeniería Ambiental, Instituto Tecnológico de Toluca, Av. Tecnológico s/n Ex. Rancho La Virgen, Metepec, Estado de México, C.P. 52140, México.

RESUMEN

En México los residuos agroalimentarios, representan un grave problema ambiental, debido a la gran cantidad que se genera a partir de su cosecha hasta su aplicación. Sin embargo, muchos de ellos por su origen y de acuerdo a sus características fisicoquímicas, podrían ser utilizados como una fuente de diversos productos para el sector alimenticio. Específicamente la fruta del nopal y su cáscara (*Opuntia*) que contienen una fuente de fitoquímicos que podrían ser aprovechados para la preparación de productos de alto valor agregado. Particularmente, los polisacáridos que contienen, tales como las pectinas, son una fuente de hidrocoloides, viscosificantes y/o gelificantes que pueden ser utilizados para diversas aplicaciones. El objetivo de este trabajo fue evaluar los residuos de *Opuntia Streptacantha* (OS) como fuente de obtención de pectina. La metodología se basó en dos etapas principalmente, la extracción de la pectina y su caracterización utilizando la técnica de FTIR, grado de metoxilación, % de ácido galacturónico y % cenizas. Entre los resultados obtenidos, se encontró que las pectinas provenientes de OS, son de alto metoxilo, por lo que son capaces de formar geles. De acuerdo a la cantidad de ácido galacturónico y bajo porcentaje de cenizas se encontró que la pureza de este producto es alta, por lo que pudiera aplicarse para diferentes usos.

1. INTRODUCCIÓN

Las cáscaras, bagazo, frutas y vegetales dañados y/o no consumidos, que corresponden a la materia seca que proviene de la cosecha y los residuos secundarios que son obtenidos del procesamiento del producto o post-cosecha, representan un grave problema ambiental ya que no se cuenta con políticas adecuadas para su manejo y en la mayoría de los casos son mezclados con basura inorgánica dificultando aún más su manejo y disposición. Dichos residuos son generados en grandes volúmenes, sólo una mínima parte es reutilizada en la producción de alimento animal y/o compostas, sin embargo, de acuerdo a sus características que generalmente son nutritivas y en algunas veces terapéuticas y químicas, podrían ser utilizadas como una fuente de diversos productos para el sector alimenticio.

Específicamente fruta del nopal y su cáscara (*Opuntia*) contienen una cantidad considerable de ácidos grasos poliinsaturados y antioxidantes naturales como la vitamina E, tocoferoles y la vitamina C, constituyendo una interesante fuente de fitoquímicos que podrían ser utilizados para la preparación de productos de alto valor agregado. Sin embargo, se estima que se pierde gran parte de este fruto en el campo que va a parar en la basura junto con la cascara de fruta, a pesar de que son conocidas las cualidades alimenticias y medicinales que poseen, por lo que podrían aprovechar integral y eficientemente para elaborar productos con valor agregado para el sector agroalimentario, farmacéutico y cosmético, debido a su poder antioxidante, entre otras cualidades. La tuna se consume principalmente como fruta fresca y en menor cantidad, es utilizada en la elaboración de melcocha, miel, jalea y bebidas fermentadas. A la fecha, se ha estudiado la

extracción y caracterización de aceites a partir de sus semillas y piel. Adicionalmente, los residuos de opuntia también han sido estudiados para extracción y caracterización de mucílagos, extracción de pigmentos y para la preparación de mermeladas.

Particularmente, los polisacáridos que contiene la cascara y el fruto, podrían dar pauta a su aprovechamiento como una fuente nueva de hidrocoloides, viscosificantes y/o gelificantes.

2. TEORÍA

Debido a la amplia diversidad de climas, México es un país rico en productos relacionados con especies vegetales. Un caso específico es el nopal (*Opuntia Streptacantha*), el cual crece en zonas semiáridas, es un cultivo que requiere un cuidado mínimo, tolera suelos pobres, está adaptado a lluvias escasas y sus necesidades de nutrientes pueden ser fácilmente suplementadas con estiércol o cenizas. De acuerdo a su uso, es posible introducir en los distintos ambientes variedades mejoradas para sistemas de producción de múltiples propósitos y obtener frutas, forrajes y pencas tiernas para consumir como verdura (Peña-Valdivia *et al.*, 2012).

El fruto del nopal (tuna) varía en forma y fisiología de acuerdo a la especie, existe una variedad que crece en áreas silvestres como la *Opuntia Streptacantha por lo que* su consumo es básicamente por la población aledaña y no comercializada. En general la tuna posee propiedades bioactivas, es un alimento rico en vitaminas, minerales y proteínas; son una fuente de fibra soluble (mucílago). Entre los mucílagos de la tuna se encuentran las pectinas, las cuales se obtienen por extracción acuosa, con pH ácido o agentes quelantes, o bien, a temperaturas altas.

Las pectinas son polisacáridos, se conforman por una mezcla de polímeros ácidos y neutros muy ramificados. Constituyen el 30% del peso seco de la pared celular primaria de células vegetales, y una vez extraídas, pueden presentar una alta o baja metoxilación. La pureza de las pectinas, se puede determinar, en base a la cantidad de ácido galacturónico y de cenizas presentes en el producto.

La capacidad de gelificación de las pectinas se determina por su grado de metoxilación, las de alto metoxilo son aquellas en las cuales más del 50% de los grupos carboxilo del ácido galacturónico del polímero se encuentra esterificados con metanol. Estas pectinas son capaces de formar geles en condiciones de pH entre 2.8 y 3.5 y un contenido de sólidos solubles (azúcar) entre 69 y 70 °Bx (Ferreira 2007). La presencia de azúcar ejerce efecto “deshidratante” sobre la molécula polimérica, lo que favorece las interacciones polisacárido-polisacárido de manera hidrófoba, y crece una estructura tridimensional que rodea las moléculas de sacarosa altamente hidratadas (Badui 2006).

Las pectinas de alto metoxilo se pueden dividir en dos grupos: las de gelificación rápida, que tienen un tiempo de gelificación menor a cinco minutos y un grado de esterificación con metanol entre 68 y 75%, y las de gelificación lenta, que tienen un tiempo de gelificación mayor a cinco minutos y un grado de esterificación con metanol entre 60 y 68% (Ferreira 2003).

Las pectinas de bajo metoxilo son aquellas en las cuales menos del 50% de los grupos hidroxilos están esterificadas con metanol. Para la formación de gel requieren la presencia de cationes divalentes, generalmente se emplea el calcio. En este caso la formación del gel ocurre por la formación de enlaces de dichos cationes con moléculas de pectina adyacentes formando una red tridimensional con los grupos carboxilo de la pectina (Badui 2006; Ferreira 2007). En este caso los geles se pueden obtener entre pH 1.0 a pH 7.0 o aun superior; el pH no afecta la textura del gel ni el intervalo de sólidos solubles y puede fluctuar entre 0 y 80% pero la presencia de calcio (40 y 100 ppm) es el factor predominante en la formación del gel. Si no hay calcio no se produce gelificación, aunque se puede emplear magnesio en este proceso. La cantidad de calcio necesaria depende de la cantidad de sólidos solubles así, para 30% de sólidos solubles requieren de 40 a 100 mg/L de calcio y para 45% de sólidos solubles de 20 a 40 ppm de calcio (Ferreira 2007).

Las pectinas de bajo metoxilo pueden dividirse en tres grupos: las de gelificación rápida que posee una alta reactividad con iones calcio y contienen un grado de esterificación aproximadamente del 30%; las de gelificación media, que posee en una reactividad intermedia con iones de calcio y contiene un grado de esterificación aproximada del 32%; y por último, las de gelificación lenta que posee una reactividad media con iones calcio y contienen un grado de esterificación aproximada del 35% (Gaviria 2005).

Las materias primas que se utilizan para extraer pectinas a escala industrial, son usualmente los subproductos de la industria de alimentos, tales como cáscaras de cítricos y manzana. Las preparaciones comerciales de pectinas poseen generalmente más del 70% de ácido galacturónico en peso. Las condiciones de extracción típicas son pH= 1.5 a 3, temperatura entre 60-100 °C y tiempos de extracción entre 0.5 a 6 h (Schols y Voragen, 2002).

3. PARTE EXPERIMENTAL

Esta etapa se constituye por dos etapas. La extracción de pectina a partir de residuos de *Opuntia Streptacantha* y la caracterización del producto obtenido.

Extracción de la Pectina

Los residuos de OS fueron recolectados directamente del campo (de una parcela del Estado de México), se recolectaron en 2 periodos, uno en el mes de Julio cuando aún estaba verde y otra fue en el mes de Septiembre cuando ya estaba madura. Se tomó un solo lote de 5 kg separando a su vez esta cantidad en lotes pequeños de medio kg colocados en bolsas de polietileno debidamente etiquetadas para pruebas subsecuentes. Los lotes se conservaron en refrigeración a -15 °C hasta su uso.

Para llevar a cabo la extracción de pectinas se utilizaron dos tipos de muestras referidas a la tuna, 1) uso de todo el fruto, 2) uso de la cascara únicamente. A su vez, para cada caso se probó la extracción con fruto verde y fruto maduro.

En todos los casos, el procedimiento de extracción inició con el lavado de los residuos con agua de la llave y en el caso de la tuna, se les quitaron las espinas con un cuchillo, se cortaron en trozos pequeños y se trituraron perfectamente en una licuadora Osterizer BLENDER.

Posteriormente, los residuos triturados se pesaron (30 gramos) y se colocaron en un matraz de 250 mL al que se le adicionará 100 mL de agua destilada como disolvente. La mezcla se hirvió por 20 minutos a 85 °C, con el propósito de inactivar las enzimas pectinesterasas que hidrolizan los grupos éster metílicos, formando metanol y por ende, pectinas de menor metoxilo. Con este procedimiento también se inactivó la poligalacturonasa, que rompe los enlaces glucosídicos entre moléculas galacturónicas, despolimerizando la cadena a fracciones más cortas y, finalmente, llegando al monómero del ácido galacturónico (Carbonell *et al.*, 1990). Después de la inactivación enzimática, las muestras se enfriaron y filtraron, el filtrado se desechó y los sólidos se guardaron para la correspondiente extracción, utilizando los siguientes métodos con el fin de comparar los rendimientos y la calidad del producto obtenido en cada caso.

Método I, el establecido por Lira-Ortiz *et al.*, (2014), el cual consistió en someter los sólidos obtenidos de la etapa anterior, a una extracción secuencial de 3 etapas. En primera etapa, la extracción se realizó con agua destilada (100 mL) a temperatura ambiente, durante 2 horas. En la segunda etapa el extracto en solución fue eliminado y los sólidos se suspendieron en agua destilada (100 mL) durante 2 horas a 60 °C. En la tercera etapa, el extracto en solución se eliminó y a los sólidos se resuspendieron en una solución acuosa de ácido acetilendiamino tetracético (EDTA) 1.0% (100 mL) durante 2 horas a 70 °C (pH 4.0).

El método II, se basó en el anterior modificando la concentración de EDTA al 1.5%, la temperatura de 80 a 85 °C, el tiempo de suspensión a 1 hora y el pH a 2,5 (para ajustar el pH se empleó una solución de Ácido clorhídrico 37.1%).

El método III, se siguió el procedimiento anterior, con la excepción, de que el ácido clorhídrico fue sustituido por ácido cítrico 1 M.

Una vez que se enfrió la mezcla proveniente de cada método, ésta se filtró y el líquido recuperado de la filtración, se mezcló con alcoholo etílico absoluto en la misma proporción, acidulando la solución a un pH 2 a 2.5 con el mismo ácido utilizado en la extracción para cada caso, y dejando reposar por una noche para precipitar las pectinas.

Una vez que se tuvo la precipitación, las muestras se decantaron, el sólido obtenido las pectinas. Para recuperar una mayor cantidad de pectinas, el sobrenadante se sometió nuevamente al mismo proceso de extracción en forma secuencial hasta agotar las pectinas (4 a 5 extracciones).

Posteriormente todos los extractos se mezclaron para obtener un producto de cada método de extracción. El producto se secó a dos temperaturas de prueba, 30 y 45 °C; ya seco, se trituró en un mortero, se pesó y se guardó en un recipiente cerrado para su posterior análisis.

Los residuos obtenidos de la precipitación (sobrenadante), se mezclaron para obtener un solo residuo, el cual sometido a una destilación simple a 78 °C (Temperatura de ebullición del etanol) para recuperar el etanol y usarlo nuevamente.

Finalmente de cada muestra se obtuvo el rendimiento de pectina obtenido de acuerdo a la ecuación 1.

$$\text{Rendimiento} = \frac{MPE}{MR} \times 100 \quad (1)$$

Donde:

MPE =masa de la pectina extraída (g)

MR =masa de los residuos (g)

Caracterización de pectinas

Las pectinas obtenidas se analizarán bajo las siguientes parámetros y técnicas. 1) Análisis de grupos funcionales mediante FTIR, 2) grado de metoxilación, 3) % de ácido galacturónico, 4) % de azúcares totales y 5) % cenizas.

Análisis de grupos funcionales mediante FTIR. Se utilizó el espectrofotómetro FT-IR Varian 640-IR equipado con un ATR. Las regiones espectrales utilizadas fueron 4000 a 500 cm^{-1} , con 20 exploraciones y una resolución de 4 cm^{-1} . Se usó el software "Resolutions Pro". Los datos fueron procesados en Origin Pro 8, para su presentación.

Grado de metoxilación. Se empleó el método Owens *et al.*, (1952). Para lo que se realizaron los siguientes pasos:

1.- Peso equivalente (Titulación A). Se pesaron 0.5 g de muestra de pectina en un matraz de 250 mL, se humedeció con 5 mL de etanol. Se le agregó 1.0 g de NaCl y 100 mL de agua destilada, se mezclaron perfectamente sin dejar grumos y se agregaron unas gotas de rojo fenol. Se tituló con NaOH 0.1 N hasta un vire de color rosa permanente. El peso equivalente fue calculado con la ecuación 2:

$$PE = \frac{(PMP * C \text{ de NaOH})}{V \text{ NaOH}} \quad (2)$$

Donde:

PE = Peso Equivalente

PMP = Peso de la Muestra de Pectina

C = Concentración

V = Volumen

2.- Contenido de Metoxilo (MeO) (Titulación B). Se utilizó la solución neutralizada obtenida del peso equivalente y se le agregó 25 mL de NaOH 0.25 N, se dejó reposar por 30 minutos. Se le adiciono 25 mL de HCl 0.25 N y se tituló nuevamente con NaOH 0.1 N hasta un vire de color rosa permanente. El porciento de metoxilo fue calculado usando la ecuación 3:

$$\%CM = \frac{V \text{ del NaOH} * P}{PMP} * 100 \quad (3)$$

Donde:

CM = Contenido de Metoxilo

V = Volumen gastado

P = Peso

PMP =peso de la muestra de pectina

3.- Contenido de ácido anhidrodouronico (AUG).Fue calculado usando el valor del peso equivalente y el contenido de metoxilo (Ecuación 4).

$$AUG\% = \frac{176 * 100z}{z} \quad (4)$$

Donde 176 es el peso molecular del AUG y Z (Ecuación 5):

$$Z = \frac{PMP}{A + B} \quad (5)$$

Donde:

PMP = Peso de la muestra de pectina (mg)

A = meq de la titulación A

B = meq de la titulación B

4.- Para el cálculo del grado de esterificación se utilizó la Ecuación 6.

$$DE(\%) = \frac{176 * MeO\% * 100}{31 * AUG\%} \quad (6)$$

% de Ácido Galacturónico (AGU). Se determinó en diferentes fracciones pécticas mediante el método espectrofotométrico de determinación cuantitativa de ácidos urónicos propuesto por Kintner y Van Buren (1982), el cual se basa en la reacción de AGU con el reactivo cromóforo m-hidroxidifenil para dar un compuesto coloreado, que tiene un máximo de absorbancia en la longitud de onda correspondiente a 476 nm. Para la cual se elaboró una curva de calibración de 0 a 100 mg/mL. Se empleó el espectrofotómetro UV-Vis Lambda PerkinElmer.

Para llevar a cabo la separación de fracciones pécticas contenidas en la mezcla extraída, se consideró su solubilidad en agua, en solución de oxalato y solución ácida mediante el método de Yu *et al.*, (1996).

Pectinas solubles en agua. Se adiciono 20 mL de agua destilada a 80 mg de pectina seca para obtener las pectinas solubles en agua, agitando por un minuto y centrifugando a 4000 rpm durante 10 minutos, se recolecto el sobrenadante en un matraz aforado de 100 mL. El proceso se repitió otra vez y se aforo con agua destilada.

Pectinas solubles en oxalato, el residuo anterior se dispersaron con 20 mL de solución acuosa que contiene 0.25% de oxalato de amonio y 0.25% de ácido oxálico. Se mantuvo a reflujo durante una hora en ebullición. Se enfrió y se centrifugo en las mismas condiciones anteriores. El sobrenadante se recolecto en un matraz aforado de 100 mL. Se repitió el procedimiento y se utilizó agua destilada para aforar.

Pectinas totales, se añadieron 2 mL de ácido sulfúrico concentrado a 5 mg de pectina seca con agitación suave, se adiciono 0.5 mL de agua destilada cuidadosamente. Se agito durante 10 minutos, y se colocó en un matraz aforado de 25 mL, utilizando agua destilada para el aforo. Se dejó reposar 24 horas para su lectura y se filtró.

Pectinas no extraíbles, se obtuvo por diferencia de pectinas totales menos pectinas solubles en agua y menos pectinas solubles en oxalato.

% de Azúcares Totales. Se determinó a través de una curva de calibración de la absorbancia en función de la concentración para la cual se prepararon soluciones de 10-70 mg/L utilizando manosa como estándar. Como blanco para las lecturas se utilizó agua destilada aplicándole el mismo tratamiento. Para la aplicación del método Dubois *et al.*, (1956) (Método Fenol-Sulfúrico), se mezclaron 2mL de muestra con 2mL de fenol al 5% en tubos digestores y se colocaron en una gradilla sumergida en un baño de agua fría. A los tubos se les añadieron 5 mL de H₂SO₄, se dejaron reposar por 15 min y se analizaron en un espectrofotómetro UV-Vis Lambda 35 PerkinElmer a una longitud de onda de 492 nm (Se hizo un barrido previo para determinar la longitud de onda de máxima absorción).

% Cenizas. Para determinarlas se utilizó una mufla Felisa. Se pusieron a peso constante las capsulas que se utilizaron poniéndolas a calcinar en un ciclo de 12 horas a 550 °C. Se dejaron enfriar en un desecador durante 30 minutos, se pesaron las capsulas y la muestra y se pusieron a calcinar en un ciclo de 12 hora a 500 °C. Se enfriaron por 30 minutos en el desecador y se pesaron. Para obtener el % de cenizas se utilizó la ecuación 7.

$$\%Cenizas = \frac{(C_c - C)}{m} \times 100 \quad (7)$$

Donde:

C_c = masa de la capsula con cenizas (g)

C = masa de la capsula (g)

m = masa de la muestra (g)

RESULTADOS

4. Extracción de pectina

Los resultados de rendimiento en la obtención de pectinas son presentados de acuerdo a la Tabla 1, considerando los tres métodos de extracción.

Los datos de rendimiento, corresponden a todo el fruto de OS, incluyendo la masa y cáscara, así como el fruto verde, debido a que bajo estas condiciones se obtuvo mayor rendimiento. Lo anterior se explica, ya que durante la maduración normal de los frutos las pectinas son degradadas, lo cual contribuye a cambios de textura como el ablandamiento y la liberación de jugo. Esta degradación ocurre por la acción de dos enzimas: la pectinmetil-esterasa (PME) que cataliza la “demetilación” de las pectinas y la poli-galacturonasa (PG) que reduce a menor tamaño las pectinas demetiladas en una reacción de “depolymerización (Ashraf *et al.*, 1981; Roe y Brummer, 1981).

Considerando el rendimiento obtenido en los métodos de una sola extracción, se observa porcentaje similar con los tres métodos, por lo que no hubo diferencia en los métodos de extracción.

Tabla 1. Rendimiento obtenido en la extracción de pectinas de OS.

Método de extracción	I	II	III
% de rendimiento	3.21	3.10	3.28

Caracterización de las pectinas

En base a los resultados del análisis FTIR de las muestras de pectina obtenidas con los tres métodos, se encontró que las muestras provenientes de los métodos II y III sufrieron degradación debido al uso de ácido para llevar a cabo la extracción, reflejándose en la ausencia de bandas representativas del ácido galacturónico como compuesto principal de la pectina. Por su parte la pectina obtenida mediante el método I, mostro un espectro semejante al del ácido galacturónico, como se presenta en la figura 1. El espectro IR presentó las bandas representativas de la pectina, como las que se encuentra entre 3300 y 3400 característico del radical OH, la banda que se encuentra en 2940 característicos del grupo metil (-CH) en la región que corresponde a los grupos carboxilos libres (COO-) y esterificados (COOR) ubicados entre las bandas de 1650 y 1750 cm^{-1} , respectivamente. Las vibraciones características de los monosacáridos y polisacáridos generalmente se presentan en la región entre los 1200 y 900 cm^{-1} debido a los fuertes enlaces presentados en el grupo C-O que se relaciona con los azúcares. Los 1100 cm^{-1} la cual corresponde a una absorción de grupos éster. A una longitud de onda de 1650 cm^{-1} se asocian los grupos carboxilos, acetilos y feruloílos (Kanmani *et al.*, 2014; Lira-Ortiz *et al.*, 2014., Cárdenas *et al.*, 2008., Jiang *et al.*, 2012).

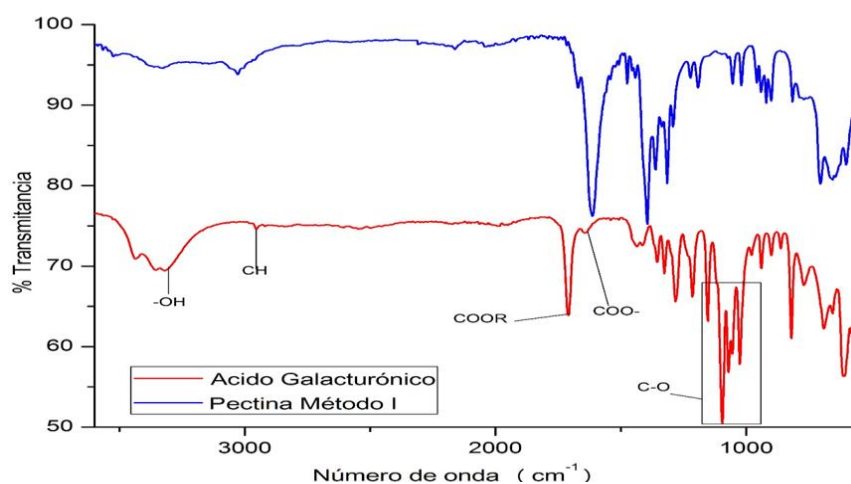


Figura 1. Espectros FTIR de la pectina obtenida por el método I comparada con el de ácido galacturónico.

En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos en la caracterización de la pectina extraída por el método I que fue la que de acuerdo a los análisis realizados de FTIR tuvo mejor resultado.

Tabla 2. Resultados de la caracterización de la pectinas obtenida.

Análisis	% Grado de metoxilación	Ácido Galacturónico (g/g)	%de Azúcares Totales (g/g)	% Cenizas
Resultados	55.60	PT=0.589 PSA=0.319 PSO=0.133 PNS=0.035	0.750 (65.2 %=ácido galacturónico y 34.8%=otro tipo de carbohidratos)	8.91

De acuerdo a los resultados presentados en la tabla 2 se puede determinar que las pectinas obtenidas corresponden a las de alto metoxilo (capaces de formar geles en condiciones de pH bajos (entre 2.8 y 3.5) y con altas concentraciones de azúcar (Ferreira 2007)). Al comparar la cantidad de ácido galacturónico con la cantidad que se obtuvo de las pectinas del nopal por Abrajám (2008) los valores obtenidos son muy semejantes (PT= 0.458, TSA= 0.377, PSO=0.067 y PNS=0.066 todos en g/g).

Comparando los resultados con los obtenidos por Lira-Ortiz *et al.*, (2014) la diferencia es notoria ya que el autor obtuvo 0.654 g/ g de Ácido Galacturónico, lo cual se atribuye a que fue obtenido de otra especie de tuna que es más grande. Otra diferencia es el método utilizado en la determinación de ácido galacturónico, que en la investigación referida fue realizada mediante HPLC, generando probablemente menos error en la medición, ya que la determinación del contenido péctico en alimentos presenta dificultades derivadas de la estructura de la molécula de la pectina (Ibarz *et al.*, 2006). La matriz vegetal suele contener grandes cantidades de almidón, azúcares, celulosa y otros carbohidratos asociados a la pectina que interfieren en la determinación analítica (Kitner y Van Buren, 1982). Esto presenta un problema en el análisis de ácido galacturónico; debido a lo anterior,

en este trabajo, también se determinó el parámetro de azúcares totales, que dio como resultado un porcentaje semejante al reportado por Abrajám (2008).

En relación al % de cenizas, Lozada (2007) obtuvo mayor cantidad de cenizas (12.89%) en pectinas provenientes de tuna, sin embargo en este trabajo, se obtuvo 8.91%, indicando un producto con menor cantidad de impurezas.

5. CONCLUSIONES

Para la extracción de la pectina de los residuos de *Opuntia Streptacantha*, se encontró que el mayor rendimiento se obtiene usando todo el fruto y en estado inmaduro.

De los tres métodos utilizados en la obtención de pectina, los tres tuvieron un rendimiento muy similar por lo que se tomó el resultado del análisis de FTIR para elegir el método adecuado para su extracción, considerando el espectro de ácido galacturónico. En base a lo anterior, la muestra de la pectina obtenida por el método I, fue semejante a la del ácido galacturónico que representa la principal estructura química de la pectina. .

Dentro de la caracterización de la pectina se encontró que es de alto metoxilo, por lo que son capaces de formar geles en condiciones de pH bajos (entre 2.8 y 3.5) y con altas concentraciones de azúcar.

De acuerdo a la cantidad de ácido galacturónico se establece que la pureza de la pectina es alta.

Se obtuvo bajo porcentaje de ceniza, lo que representa que la pectina obtenida contiene baja concentración de impurezas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abrajám-Villaseñor M. A. 2008. Efecto del método de extracción en las características químicas y físicas del mucílago de nopal (*Opuntia ficus indica*) y estudio de su aplicación como recubrimiento comestible. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, Depto. De Tecnología de Alimentos.
2. Ashraf M., Khan N., Ahmad M. y Elahi M. 1981. Studies on the pectinesterase activity and some chemical constituents of some pakistani mango varieties during storage ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 29, pp. 526-528.
3. Badui S. 2006. Química de los alimentos. Pearson. Addison Wesley. Cuarta edición. México. pp. 92-96.
4. Carbonell E., E. Costell y L. Durán. 1990. Determinación del contenido en pectinas en productos vegetales. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*. Vol. 30 Cap.1, pp.1-9.
5. Cárdenas A., Goycoolea F.M. y Rinauto M. 2008. On the gelling behavior of nopal (*Opuntia ficus-indica*) low methoxyl pectin. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 73, pp. 212-222.
6. Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebes P., Smith F. 1956. Calorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analysis Chemical*. Vol. 28, pp. 350- 356.
7. Ferreira S., Correira A., Fonseca M. 2003. Response surface modeling of glycerolysis catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized in different polyurethane foams for the production of partial glycerides. *Journal Molecular Catalysis-Enzymatic*. Vol. 21, pp 71-80.
8. Ferreira, S. 2007. Pectinas; aislamiento, caracterización y producción a partir de frutas tropicales y de los residuos de su procesamiento industrial; Universidad nacional de Colombia. Facultad de ciencias. Colombia.

9. Gaviria N., López L. 2005. Extracción a escala laboratorio de la pectina del maracuyá y escalado preliminar a planta piloto. Universidad Eafit. Medellín.
10. Ibarz A., Pagán F. Tribaldo y J. Pagán. 2006. Improvement in the measurement of spectrophotometric data in the m-hydroxydiphenyl pectin determination methods. *Food Control*. Vol. 17, pp. 90-893.
11. Jiang X., Chen P., Yin M., Yang Q. 2012. Constitutive expression, purification and characterisation of pectin methylesterase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris* for potential application in the fruit juice industry. *Journal Science Food and Agriculture*. Vol. 93 pp. 375–381.
12. Kanmani P. Dhivya, Aravind J. and Kumaresan K. 2014. Extraction and analysis of Pectin from Citrus Peel: Augmenting the Yield from *Citrus limon* Using Statistical Experimental Design. *Iranica Journal of Energy y Environment*. Vol.5, Capítulo 3, pp. 303-312.
13. Kintner, P.K. y Van Buren, J.P. 1982. Carbohydrate Interference and its correction in pectin analysis using the m-hydroxydiphenyl method. *Journal of Food Science*. Vol. 47, pp.756-759.
14. Lira-Ortiz A. L., Reséndiz-Vega F., Ríos-Leal E., Contreras-Esquivel J. C., Chavarría-Hernández N., Vargas-Torres A., Rodríguez-Hernández A. I. 2014. Pectins from waste of prickly pear fruits (*Opuntia albicarpa* Sheinvar "Reyna"): Chemical and rheological properties. *Food Hydrocolloids*. Vol. 37, pp. 93-99.
15. Lozada M. 2007. Extracción y caracterización reológica de polisacáridos de pectina de la cascara de tuna (*Opuntia spp*).
16. Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, Vol.31, No.3, p. 426-428.
17. Owens H. S., McCready R. M., Shepard A. D., Schultz T. H., Phippen E. L., Swenson H. A., Miers J. C., Erlandsen R. F. and Maclay W. D. 1952. Methods used at western regional research laboratory for extraction of pectic materials. p. 9. Washington DC: USDA Bureau of Agricultural and Industrial Chemistry
18. Peña-Valdivia C. B. Trejo C., Arroyo-Peña B., Sánchez B. A., Balois R. 2012. Diversity of Unavailable Polysaccharides and Dietary Fiber in Domesticated Nopalito and Cactus Pear Fruit (*Opuntia spp.*). *Chemistry and Biodiversity*. Vol. 9, pp. 1599-1510.
19. Roe B. y Bruemmer J.H. 1981. Changes in pectic substances and enzymes during ripening and storage of 'Keitt' mangos. *Journal of Food Science*. Vol. 46, pp. 186-189.
20. Schols H. A., Voragen A. G. J. 2002. The chemical structure of pectins. In: "Pectins and their manipulation", Seymour G. B., Knox J. P. (ed.) pp. 1-25. Blackwell Publishing CRC Press. Estados Unidos de América.
21. Yu L., Reitmeier C.A. y Love M.H. 1996. Strawberry textura and pectin content as affected by electron beam irradiation. *Journal of Food Science*. Vol. 61, pp. 844-846.

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y VALOR NUTRICIONAL DE EXTRUIDOS DE FRUTA DESHIDRATADA

Gloria Elizalde Mendiola¹, Rosa María García Martínez¹ y Jesús Mejía¹

¹ Facultad de Químico Farmacobiología, UMNSH.

RESUMEN

La demanda de alimentos inocuos y nutritivos es cada vez mayor en el mundo, los problemas de salud, tales como obesidad, diabetes, anemia y enfermedades del corazón van en constante aumento. Los productos extruidos han tenido gran aceptación en la población y los encontramos en los productos comerciales principalmente y de alto contenido calórico. Nuestro objetivo es transformar un recurso natural como es la fruta, en un producto comercial en forma extruida, desarrollando productos con un buen valor nutricional y de bajo valor energético, considerando como materia prima la gran variedad de frutas, que existen en nuestro estado de Michoacán como la fresa, piña, manzana y plátano. Las actividades a desarrollar contemplan: selección de la fruta, el lavado, pelado, rebanado, deshidratado y extruido. Durante el procesamiento de la fruta, para evitar las reacciones de oxidación, la fruta rebanada se puso en solución de cítrico 6-8%, inhibiéndose las reacciones de oxidación, durante la deshidratación, extrusión y el tiempo de anaquel. Se extruyó la fruta y se desecó a temperatura entre 40 y 50⁰ C obteniéndose una humedad final de 10-15% mostrando buena consistencia, plasticidad definida y color y sabor atractivos. Los extruidos se realizaron en un extrusor de gusano, obteniéndose filamentos de 0.70 cm de diámetro y hasta 50 cm de largo, sin gradientes de presión y temperatura considerables que alteraran las propiedades del extruido. Del proximal se desprende un contenido energético de 325 kcal/100 g. Los extruidos conservaron su valor nutricional, destacándose el aporte de fibra y bajo contenido energético de lípidos.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente las enfermedades de salud pública en México como la obesidad, diabetes y enfermedades del corazón van en constante aumento, siendo nuestro país uno de los principales consumidores de productos ricos en carbohidratos, grasas y azúcares, esto debido a una falta de cultura alimenticia y sustentada por el bajo poder adquisitivo de los salarios. Esta cultura alimenticia cumple funciones nutricionales, hedónicas y simbólicas así como también determina lo comestible, las formas de preparación, distribución, consumo tradiciones y tabús. Desde la cultura se clasifican los alimentos de buenos o malos en función de una tradición, experiencia o una percepción colectiva (Calvo y cols., 2012). Sin embargo los nuevos estilos de vida han provocado que se abandonen ciertos hábitos de alimentación saludables que anteriormente han formado parte de nuestra historia y tradición, estos desequilibrios y desajustes alimentarios están relacionados con la aparición de un gran número de enfermedades. Y es así como en consecuencia de esta situación que surgen los alimentos “funcionales” los cuales pueden compensar estos desequilibrios alimentarios y así garantizar la ingesta de nutrientes recomendadas por expertos en nutrición.

Las campañas de concientización para la población en general, por parte de las instituciones de salud y gobierno, a través de los medios de difusión, cumplen a medias esta tarea tan importante,

que es la de incidir en los hábitos de alimentación. Lo anterior se debe a que a la par de los slogans de salud, se anuncian la gran variedad de productos de bajo poder nutricional.

Si bien es cierto que las empresas transformadoras de maíz y trigo principalmente cumplen una parte básica en la alimentación de la población, en la producción de tortilla, pan y cereal, también se han enfocado a generar gran parte de los productos denominados chatarra; como cheetos, doritos, chicharrones y fritos, acondicionados con saborizantes, colores y texturas, atractivas para el consumidor. Las tecnologías que se emplean hoy en día, son muy diversas, entre las que se encuentra casi en forma común la extrusión. Esta es una tecnología flexible mediante la cual pueden obtenerse gran variedad de productos a partir de diferentes materias primas (granos y derivados), con sabores, texturas, aromas, formas y características nutricionales extremadamente diversas.

Los productos extruidos han tenido una gran aceptación en la población y los encontramos en los productos de Kellogg's principalmente o en forma de golosina como Sabritas y Barcel, por mencionar los más comunes. Si bien es cierto que se han hecho esfuerzos por ofertar algunos de estos productos fortificados nutricionalmente, aún hay mucho por hacer en las instituciones educativas a través la investigación de nuevas tecnologías, en conjunto con la iniciativa privada e instancias de gobierno del sector alimentario del país.

El presente proyecto retoma gran parte de este entorno productivo y plantea el desarrollar, productos extruidos con un buen valor nutricional, considerando como materia prima la gran variedad de frutas, que existen en el estado de Michoacán. Es importante resaltar que la intención primordial de este trabajo es el de ofertar en el mercado fruta extruida, que conserve su valor nutricional y pueda ser fortificada mediante la adición de insumos naturales que resalten, sus propiedades cualitativas y cuantitativas fisicoquímicas. Gran parte de este trabajo se cimienta en los análisis bromatológicos, que determinarán el valor alimenticio de los productos generados y permitirán establecer los parámetros de control para la obtención óptima de estos extruidos.

2. TEORÍA

La palabra extrudir proviene del latín "extrudere" y significa empujar o presionar hacia afuera, expeler o expulsar. La extrusión se define, como un proceso que involucra el transporte de un material, bajo ciertas condiciones controladas, forzándolo a pasar por una boquilla de una dada geometría y con un caudal masivo pre-establecido, durante este transporte se produce la cocción parcial o total de los componentes de la mezcla (Harper, 1981). Los procesos de extrusión y los equipos de extrusión fueron desarrollados simultáneamente en varias industrias y países durante los dos últimos siglos. Básicamente sus usos fueron para procesar materiales viscosos, como plásticos, hules y alimentos como pastas de trigo. Los extrusores tienen como objetivos principales en la industria alimentaria el mezclado, homogenizado de las materias primas y la cocción de la mezcla. El proceso de extrusión se puede efectuar por dos vías, húmeda y seca. El proceso de extrusión en seco consiste en la producción de calor (140-145°C) causada por la fricción bajo presión (30-40 atmosferas). Este toma menos de 30 segundos, de modo que los nutrientes no se dañen ni se destruyan. La extrusión seca emplea niveles de humedad por debajo del 20%. Este procedimiento riguroso, corta y muele, para que las paredes de las células se rompan, aumentando así, la disponibilidad de nutrientes (Brauna, 2002).

Cuando el material paso por estas fases ha sido cocido totalmente, y permite así, la digestibilidad de los nutrientes y reducir los componentes antinutricionales. El calor y la presión producida en el extrusor provocan la destrucción de microorganismos tales como bacterias, mohos y levaduras.

El proceso de extrusión en húmedo, consiste en el mismo procedimiento que la extrusión en seco, solamente que cuando el grano molido entra en la cámara de acondicionamiento donde la presión es baja (presión atmosférica), se inyecta vapor de agua y de allí se traslada directamente al barril

de extrusión donde también se agrega vapor de agua, pero pasteurizada. En la extrusión en húmedo es muy importante conseguir que el producto a procesar este muy bien molido, que se pueda regular la temperatura de las diferentes secciones del proceso para conseguir la máxima calidad nutritiva del producto, y que el agua y el vapor sean adecuados para conseguir el nivel de humedad necesario, la presión y la superficie de apertura de la matriz idóneos para que el producto salga con la máxima calidad y el mínimo costo (Brauna, 2002).

En botánica el fruto es el órgano procedente de la flor, o de partes de ella, que contiene a las semillas, hasta que maduran y luego contribuye a diseminarlas y se clasifican en función de su naturaleza, estado, composición y características botánicas. Químicamente están constituidas por agua en un 80-80%, carbohidratos simples o azúcares, fibra dietética, minerales, vitaminas y antioxidantes.

La presente investigación es presentar alternativas y propuestas de innovación de productos extruidos de fruta, que conserven sus propiedades nutricionales, ante el procesamiento de la fruta, mediante las técnicas de corte, secado en estufa a baja temperatura y extruido mecánico.

En primer instancia durante el corte de fruta en rodajas (orejones), se rompe el equilibrio químico de las estructura, por el rompimiento de redes C-C, C-H, C-N, dobles enlaces, de tal forma que el sistema queda expuesto a reacciones de degradación, debido a la presencia de radicales libres. Las reacciones de oxidación principalmente se favorecen con el aumento de temperatura durante el secado y procesado durante la molienda de la fruta y extruido, en la cual además de cambios de temperatura, se generan gradientes de presión.

El planteamiento de inhibición de las reacciones de oxidación, se justifica en función del pH o potencial de hidrogeno, ya que entre mayor actividad del ion hidrogeno exista, las reacciones de oxidación son menores. Para lo cual se plantea la creación de un sistema de amortiguamiento sobre la fruta, esto se logra al sumergirla en una solución de ácido cítrico del 6 a 8%, debido a que los iones acetato restablecen el equilibrio del sistema y forman un sistema de buffer, tampón o de amortiguamiento con este ácido débil.

Además de esto se sabe que la extrusión genera mayor astringencia debido a la liberación de ácidos orgánicos, como el ácido tánico, málico, que favorecen las condiciones de acidez.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Para el desarrollo experimental se trabajó con frutas tradicionales adquiridas en el Mercado de Abastos de la ciudad de Morelia, Mich. Las frutas se seleccionaron en estado alimonado, en seguida se lavaron y desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 13% por 5 minutos. Dependiendo del tipo de fruta se peló; como en el caso de la piña, mango y plátano, la fresa solamente se despató y la manzana se descorazonó. El rebanado se realizó en forma perpendicular al centro de la fruta en el caso de la piña y manzana, y paralelo a su centro el plátano y mango, en una rebanadora eléctrica con espesor de rebanada de 2mm. Para la fresa, el corte en paralelo, pero por el tamaño de la fruta se realizó con cuchillo convencional. La fruta se colocó en una solución de ácido cítrico al 6%, por espacio de 3-5 minutos con la finalidad de inhibir la oxidación, a excepción de las frutas acidas como la fresa y piña.

Previo a la extrusión, la fruta se deshidrató en estufa a una temperatura 50-60°C. Se consideró el realizar deshidratados con humedades del 5, 10, 15, 20 y 30%, de tal manera que permitiera determinar el rango de humedad que favorece el extruido. El proceso de extrusión se llevó a cabo en un extrusor de un tornillo, tipo de gusano helicoidal, con cuchilla y dado de acero inoxidable con panel circular para la producción de extruido en forma de filamentos (churros) de 1cm de diámetro, con motor de 1 caballo de fuerza. Se extruyó fruta en forma simple (sin insumos), para determinar los posibles cambios nutricionales durante el procesado.

Posteriormente, los extruidos obtenidos fueron analizados fisicoquímicamente para evaluar su grado nutrimental. El análisis proximal se fundamentó en las técnicas establecidas del AOAC (Association of Oficial Analytical Chemists), así como, también por el AOCS (American Oil of Oficial Chemists Society).

4. RESULTADOS

La fruta debe encontrarse entre un 40 y 50% de la etapa del climaterio, se dice que se encuentra alimonada (Figura 1), nutrimentalmente las condiciones son óptimas y se facilita su manejo, durante el procesamiento; su consistencia o textura es fuerte, ligeramente acida, predominan los azúcares, colores vivos y olores atractivos y mayores tiempos de anaquel.



Figura 1. Fruta alimonada.

El corte de las rebanadas de fruta, presentaron buena consistencia, contrariamente al manejo con fruta madura, donde se propicia la perdida de consistencia de los orejones, principalmente, en el plátano, mango y manzana, que al tratarlos con la solución de ácido cítrico y colocarlos en el los bastidores del deshidratador, perdieron completamente la forma. Las frutas cítricas como la fresa, la piña, al no someterlas a este tratamiento, tienen mayor estabilidad en su manejo. El corte de la fruta en orejones, rompe el tejido celular y genera una superficie inestable químicamente, que se estabiliza y se enriquece con vitamina C, al reaccionar con el ácido cítrico.

En lo que respecta a la deshidratación previa al proceso de extrusión, en el Gráfico 1 se presenta la curva característica de éste, aquí se muestran las etapas de eliminación de H₂O, a una temperatura de 50–60°C.

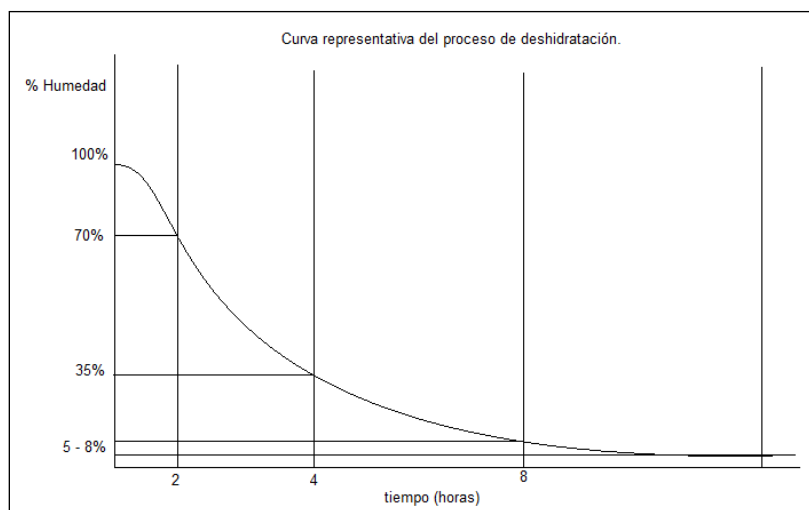


Gráfico 1. Curva representativa del proceso de deshidratación.

Se observa que durante las primeras 2 horas el contenido de humedad es del 70%, y representa la zona de precalentamiento. Este es el tiempo necesario para que toda el agua de la fruta, alcance la temperatura a la que se igualan la presión de vapor, con la del medio ambiente. Durante las siguientes cuatro horas se alcanzan valores de humedad del 35%, durante este periodo de tiempo las moléculas de agua en la superficie se evaporan con un flujo de masa constante, hasta alcanzar el punto conocido como humedad crítica para nuestra estufa. Esta no es una propiedad física de la naturaleza de la fruta y si del tamaño de las partículas que la forman y de las condiciones específicas del aire caliente utilizado en la deshidratación. Se continuo con el calentamiento durante otras 4 horas, en este periodo de tiempo se obtuvo la máxima deshidratación, alcanzándose una humedad entre un 5-8%.

Para determinar el contenido de humedad adecuado para el extruido de la fruta se realizaron pruebas con muestras con contenidos de humedad de 5, 10, 15% y mayores al 20%. Las muestras con un 5% de humedad arrojaron resultados similares, observándose un gradiente alto de temperatura 65°C (alcanzando temperaturas de hasta 85°C) del extruido durante la molienda, de consistencia muy plástica en caliente, con buenas propiedades degustativas y atractivas, sin embargo, al enfriarse existe un gran endurecimiento, aumentando su hidrofobicidad. Las muestras con concentraciones de un 10 y 15% de humedad presentaron, un extruido con buena consistencia, plasticidad con forma definida, de colores y sabor atractivos, la fluidez dentro del extrusor, permitió obtener filamentos (churros) de buen tamaño comercialmente de hasta 40-50 cm, no se generaron altas presiones y el gradiente de temperatura del extruido, fue de entre 5 y 8°C (hasta 33°C). En referencia a los extruidos de contenidos de humedad mayor al 20%, no presentaron buena consistencia, la molienda fue incompleta, observándose fruta poco molida, de apariencia pastosa y sin un agregado uniforme, no se observaron cambios de presión y temperatura. Las pruebas realizadas nos permitieron concluir que para la extrusión de fruta, los contenidos de humedad ≥ 10 y $\leq 20\%$ son favorables, para obtener un extruido satisfactorio, en forma cualitativa. De tal manera, como se ilustra en el Grafico 2, se pueden establecer tres regiones que relacionan el contenido de humedad y molienda, que nos permiten visualizar las características físicas del extruido.

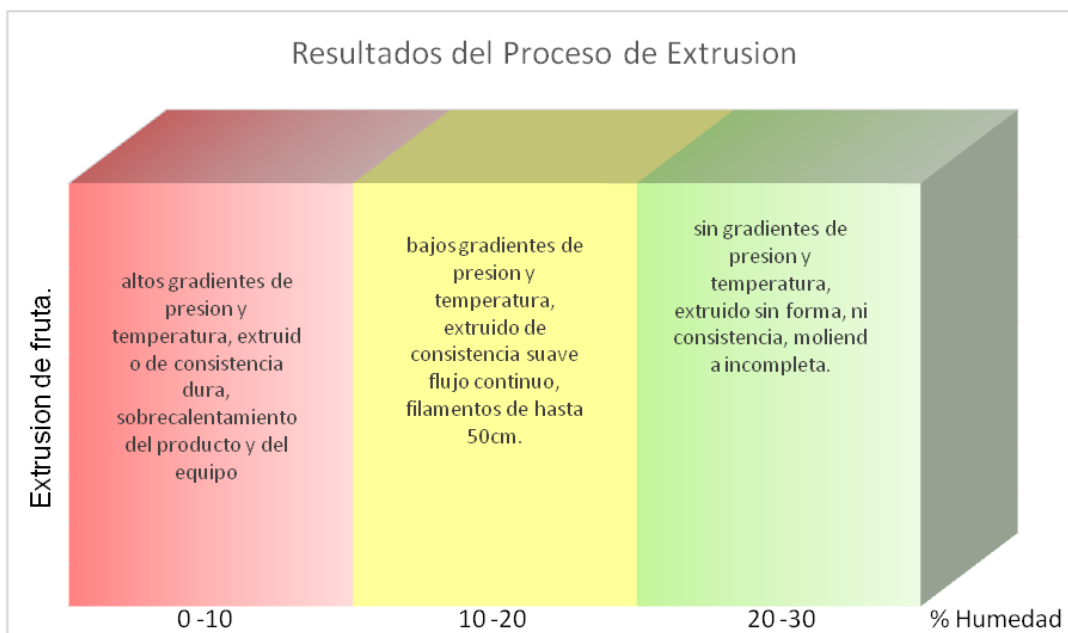


Gráfico 2. Resultados del proceso de extrusión.

En las Tabla 1 y Tabla 2, se presentan los resultados del análisis proximal realizados para las muestras de fruta natural, deshidratada y extruida.

	FRESA			PIÑA		
	Natural	Deshidratada	Extruida	Natural	Deshidratada	Extruida
Contenido energético	43 Kcal/100g	324.8 Kcal/100g	330.6 Kcal/100g	55.7 Kcal/100g	323.1 Kcal/100g	328.85 Kcal/100g
Ph	3.30	3.50	3.40	3.20	3.80	3.60
Humedad	89.60	13.50	12.20	84.60	10.60	9.20
Carbohidratos	8.70	71.40	73.80	13.20	77.92	79.47
Fibra cruda	2.00	4.90	4.50	1.30	6.60	6.60
Proteína	0.70	4.40	3.90	0.50	2.10	2.00
Lípidos	0.60	2.40	2.20	0.10	0.38	0.33
Cenizas	0.40	3.40	3.40	0.20	2.40	2.40

	MANZANA			MANGO			PLÁTANO		
	Natural	Deshidratada	Extruida	Natural	Deshidratado	Extruido	Natural	Deshidratado	Extruido
Contenido energético	66.2 Kcal/100g	346.8 Kcal/100g	350.8 Kcal/100g	64.1 Kcal/100g	312.45 Kcal/100g	319.11 Kcal/100g	134.6 Kcal/100g	341.7 Kcal/100g	344.75 Kcal/100g
Ph	4.0	3.7	3.5	4.6	3.9	3.8	4.7	3.7	3.6
Humedad	82	5.80	4.80	82,52	14.40	13.40	63.90	11.40	10.60
Carbohidratos	15.80	83.54	84,90	15.00	75.13	76.77	32.00	79.28	80.81
Fibra cruda	1.60	6.10	5.90	1.20	6.30	5.80	1.50	1.10	1.10
Proteína	0.30	1.00	1.00	0.80	1.70	1.60	1.20	5.20	4.50
Extracto etéreo	0.20	0.96	0.80	0.10	0.57	0.53	0.20	0.42	0.39
Cenizas	0.17	2.60	2.60	0.36	1.90	1.90	1.20	2.60	2.60

5. CONCLUSIONES

En función de los resultados obtenidos la producción de extruidos de fruta natural, conservan sus propiedades nutricionales, ante el procesamiento de deshidratación, molienda y extrusión. El aporte nutricional en general, es superior a las frituras comerciales, debido a que su procesamiento e insumos se apegan a las condiciones más naturales y que la gran ventaja de los extruidos de fruta con respecto a estos productos comerciales estriba en las condiciones de procesamiento natural, conservando sus propiedades vitamínicas, de características netamente antioxidantes, los bajos contenidos en grasas y aceites, son aceites esenciales naturales, que no son sometidos a tratamientos térmicos de refinación.

La posición geográfica de nuestro estado de Michoacán, rico en la producción de frutas, permite la innovación y el desarrollo de una amplia variedad de estos productos. La factibilidad económica para su producción y comercialización es buena industrialmente, siempre y cuando se aprovechen los precios de huerta y la temporada alta de producción de fruta.

BIBLIOGRAFÍA

1. Calvo, S. Gomez, C. Royo,M.. (2012). Nutrición, salud y alimentos funcionales. Madrid: UNED., p. 26, 27 y 28
2. Brauna, R.O.2002. Técnicas de procesamiento de granos que mejoran la eficiencia alimentaria en la producción animal. Facultad de Agronomía-UNLPan.
3. Harper, M.J. 1981. Extrusion of Foods, Volume I, CRC, Press Inc. Boca Raton Florida, USA.

METABOLITOS SECUNDARIOS DE TINGUARAQUE (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) CON PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS

Francisco A. Olmedo-López¹, Rafael Salgado-Garciglia² y Pedro A. García-Saucedo¹

¹Facultad de Agrobiología presidente Juárez, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y

² Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

RESUMEN

Introducción: La familia Solanaceae tiene representantes cultivados y silvestres en todo el territorio mexicano, el “tinguaraque” (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) es una planta que habita zonas boscosas y de transición, en áreas perturbadas actúa como pionera, gracias a la presencia de metabolitos secundarios que le ayudan a defenderse de agentes adversos en medios hostiles. Esta cualidad, ha sido aprovechada al usar al tinguaraque como portainjertos para conferir resistencia al jitomate comercial contra patógenos del suelo como *Alternaria solani* y *Fusarium* sp., obteniendo resultados satisfactorios. En la actualidad, metabolitos secundarios entre los que destacan flavonoides, terpenoides y aminas (compuestos de defensa) se han empleado como agentes antimicrobianos contra patógenos de humanos y plantas. **Métodos:** se ha evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos, hexánicos, clorofórmicos y metanólicos obtenidos por maceración de tejido deshidratado radicular y aéreo de plantas de tinguaraque en estadio de floración, frente a los microorganismos *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* y *Pseudomonas* sp., por el método de difusión de disco (Kirby Bauer); posteriormente, de manera preliminar se analizó el extracto hexánico de raíz por cromatografía de gases (GC).

Resultados: al evaluar el diámetros de los halos de inhibición, se encontró que el extracto hexánico de raíz posee efectos antagónicos sobre *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* y *Pseudomonas* sp. (21.9 y 12.17 mm de inhibición respectivamente) estadísticamente superiores al resto de los extractos y al control negativo (DMSO), pero inferiores a los controles positivos trimetoprima/sulfametoxazol (25 µg) y ceftriaxona (30 µg) respectivamente. La cromatografía de gases (GC) reveló la presencia de aminas en el extracto hexánico de raíz, metabolitos secundarios que en la literatura se reportan como compuestos de defensa. **Conclusión:** de manera preliminar y a la espera de enriquecer los resultados, se concluye que el tinguaraque acumula metabolitos secundarios con capacidad antimicrobiana en diferentes tejidos.

Palabras clave: Solanaceae, extracto, inhibición, metabolito secundario, tomate silvestre.

1. INTRODUCCIÓN

La producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, es una de las estrategias que tienen las plantas para defenderse. En investigaciones previas se han encontrado metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana en solanáceas silvestres como el cerezo de Jerusalén (*Solanum pseudocapsicum*) y la ortiga de bull (*Solanum carolinense*) (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003; Aliero *et al.*, 2006; Kariyat *et al.*, 2013).

El tinguaraque (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) se distribuye en zonas de clima templado como bosques y áreas de transición, además es común encontrarle como planta pionera en áreas

perturbadas. Su capacidad adaptativa y resistencia a factores adversos ha sido aprovechada al emplearse como portainjerto de jitomate comercial (*Solanum lycopersicum*), estudios previos demuestran que las plantas injertadas presentan resistencia a patógenos del suelo como *Alternaria solani* y *Fusarium* sp., en contraste con plantas no injertadas (Álvarez-Hernández *et al.*, 2009; Álvarez-Hernández, 2013).

La utilización de solventes afines a la polaridad de los metabolitos secundarios ha permitido su extracción a partir de material deshidratado y pulverizado mediante la maceración, para su posterior estudio (Ríos y Aguilar-Guadarrama, 2006).

2. REVISIÓN DE LITERATURA

Las plantas silvestres son aquellas que se desarrollan de manera natural en el ecosistema, están adaptadas para subsistir en el medio que las rodea y por ende desarrollan diversos mecanismos para sobrevivir (Gold *et al.*, 2004). Algunas plantas silvestres son de interés, debido a la presencia de compuestos bioactivos, tales como nutraceuticos y antimicrobianos. Los primeros son aquellos que al consumirse proveen un efecto benéfico sobre la salud humana (Lozano-Teruel, 2011); y los segundos son los compuestos químicos producidos por las plantas (metabolitos secundarios), que pueden inhibir o matar a un microorganismo (Agris, 2008).

La familia de las solanáceas, destaca por su capacidad para desarrollarse en condiciones adversas y por tanto en el tipo y concentración de fitoquímicos, de ahí que exista un constante interés en el estudio de sus compuestos. Solanaceae es una familia que abarca 96 géneros y 2200 especies (Long-Towell, 2001). Michoacán ocupa el quinto lugar nacional en diversidad de solanáceas silvestres, de las cuales los géneros más comunes son: *Cestrum*, *Datura*, *Jaltomata*, *Lycianthes*, *Physalis*, *Lycopersicon* y *Solanum* (Martínez *et al.*, 2011). Dentro del

género "*Solanum*" destaca el tinguaraque o "jitomate silvestre" (*Solanum lycopersicum* Var. *Cerasiforme*), ya que en comparación con el tomate o jitomate comercial su desarrollo no se ve limitado por los problemas fitosanitarios (Álvarez-Hernández *et al.*, 2009; Álvarez-Hernández, 2013).



Figura 1.- Partes de la planta de tinguaraque (*Solanum lycopersicum* variedad *cerasiforme*): follaje, frutos y semillas.

El tinguarake (Figura 1) es una planta anual herbácea, que pertenece al género *Solanum*. Se distribuye en zonas boscosas, de transición y áreas perturbadas. Se asocia a campos de cultivo donde es considerada “maleza”. Crece sin problemas en zonas infestadas por varias plagas asociadas al cultivo del tomate. Está reportada en el estado de Michoacán para las regiones de: El Valle de Apatzingán, el Valle de los Reyes y la Ciénaga de Chápala (Álvarez-Hernández et al., 2009).

Es una planta que posee pelos glandulares resinosos. Crece más de un metro de altura, con porte erecto o trepador, sus hojas son alternas, de hasta 25 cm de largo, divididas en varios folíolos de diferentes tamaños que a su vez pueden estar divididos principalmente en la base, sus ápices son puntiagudos y el margen es aserrado a ligeramente hendido. Las flores se disponen en forma de inflorescencias racimosas, ubicadas generalmente en las bifurcaciones de los tallos, o en los nudos; el cáliz de éstas es de cinco sépalos angostamente triangulares y puntiagudos; Los frutos son carnosos, jugosos y globosos, a veces alargados y de color rojo al madurar con numerosas semillas. La planta es aromática al someterse a daño mecánico, liberando el típico aroma a tomate (Correll y Johnston, 1970).

Las investigaciones previas de esta planta se han encaminado a estudios relacionados con la calidad de sus frutos (Crisanto-Juárez et al., 2010) e incidencia de enfermedades en su cultivo y su uso como portainjerto de plantas de tomate (Álvarez-Hernández 2013; Cortez-Madrigal, 2010).

La resistencia de plantas como el tinguarake a diversos factores, puede deberse a la presencia de metabolitos secundarios, compuestos orgánicos que aparentemente no tienen una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos, síntesis de proteínas, carbohidratos y lípidos, también presentan “distribución restringida”, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran cada grupo de plantas, suelen ser sintetizados en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a una determinada familia, género o especie de plantas (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009). Su naturaleza química es variable. Las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario del carbono y los metabolitos secundarios como tales se pueden agrupar en cuatro grupos: terpenos (entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales) compuestos fenólicos (cumarinas, flavonoides, lignina y taninos), glicósidos (por ejemplo saponinas, glicósidos cardíacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos) y alcaloides (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009).

Entre sus funciones destacan la atracción de animales benéficos (por ejemplo insectos polinizadores), la repelencia a depredadores (produciendo en la planta un sabor u olor amargo, o creando toxicidad), pigmentación de tejidos, y participan en la defensa contra patógenos (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009).

Estudios previos en algunas especies de solanáceas silvestres y domesticas han demostrado la presencia de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. Por ejemplo, en frutos de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.), pimiento campana (*Capsicum frutescens* var. *grossum* Mill.) y chile picante (*Capsicum annum* L.) se han detectado terpenos que actúan como fitoalexinas como el β -caroteno, zeaxantina, luteína, cantaxantina, β -criptoxantina, en frutos de chiles picantes además se pueden encontrar oleorresinas como la capsaicina, que además de actuar como antifúngico puede funcionar como bioinsecticida (Arauz-Cavallini, 1998; Zapata et al., 2007; Troconis-Torres, 2012; Zhang y Hamauzu, 2003). El listado de compuestos antimicrobianos es más amplio al estudiar solanáceas silvestres. Por ejemplo, en el “cerezo de Jerusalén” (*Solanum pseudocapsicum*) se han detectado monoterpénoides y derivados de éstos como: el α -pineno, antibiótico de amplio espectro; 1,8-cineol que puede actuar como Insecticida y repelente de insectos; el α -terpineno con propiedades antifúngicas; acetato de bornilo con cualidades antibacteriales y antivirales (Aliero et al., 2006; Nissen et al., 2010; Urben, 2007; Klocke et al., 1987; Sfara et al., 2009; Shan-Shan et al., 2005; Lo Cantore et al., 2004; Duke, 2015; Pandey,

2015; Badui, 1988; Xiudong *et al.*, 2011); por otro lado, al estudiar las secreciones volátiles de la "ortiga de bull" (*Solanum carolinense*) se han encontrado diterpenos como el β -springeno, capaz de inhibir la bacteria *Staphylococcus epidermidis*; y el aromadendreno, compuesto antibiótico de amplio espectro (Kariyat *et al.*, 2013; Mulyaningsih *et al.*, 2010; Khaoukha *et al.*, 2014).

Los diferentes metabolitos secundarios presentes en los tejidos de una planta pueden ser extraídos mediante el uso de solventes, estos extraen compuestos afines a su polaridad, los no polares pueden extraer terpenos de bajo peso molecular; por otro lado, medianamente polares pueden separar terpenos de polaridad intermedia como lactonas, alcoholes y ácidos carboxílicos y finalmente, solventes polares pueden ser útiles para obtener compuestos polares como flavonoides, alcoholes y alcaloides entre otros (García, 2001; Ríos y Aguilar-Guadarrama, 2006; Aguilar-Guadarrama y Ríos, 2007; Zavala-Núñez, 2009).

Una vez obtenidos los extractos, se realizan las pruebas como curvas de calibración para actividad antioxidante, pruebas con animales para cuestiones médicas y ensayos con microorganismos para capacidad antimicrobiana para verificar si poseen bioactividad. Según su polaridad pueden ser identificados por diferentes técnicas: Para las fracciones no polares es recomendable emplear cromatografía de gases (GC) y para las más polares la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (McNair y Miller, 1998; Hernández-Pérez, 2005).

JUSTIFICACIÓN

El análisis de metabolitos secundarios es un área de creciente importancia en el ámbito científico, a tal grado que una parte del presupuesto económico destinado a este rubro, está enfocado a su investigación, lo cual se ve reflejado en el creciente número de trabajos que se han publicado en revistas especializadas con resultados satisfactorios. Este campo además seguirá en expansión debido a la variabilidad de metabolitos secundarios que es posible encontrar en diferentes materiales vegetales y posibles usos.

Aunque el estado de Michoacán ocupa el quinto lugar nacional en diversidad de especies silvestres de solanáceas (Martínez *et al.*, 2011), los estudios se han enfocado a pruebas de germinación, calidad de fruto y ensayos como porta injertos, dando poca atención a la parte de biocontrol de patógenos de importancia agronómica. Por su parte, el tinguarake (*Solanum lycopersicum* variedad *cerasiforme*) es una plantas nativa que se ha empleado en la gastronomía tradicional, a esta planta se le han realizado algunas de las pruebas ya mencionadas, pero se ha dejado de lado la caracterización de productos del metabolismo secundario y su potencial uso. En este sentido el presente trabajo pretende aportar nuevas evidencias en el tipo de metabolitos secundarios presentes en el tinguarake y su posible aplicación en el control de patógenos.

HIPÓTESIS

Los metabolitos secundarios presentes en diferentes tejidos de tinguarake tienen propiedades antimicrobianas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana de extractos de distinta polaridad procedentes de tejido aéreo y radicular de la planta de tinguarake (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*).

Objetivos específicos

Estandarizar un protocolo para la obtención de metabolitos secundarios de diferente polaridad en tinguarake.

Determinar la probable actividad antimicrobiana de extractos de distinta polaridad obtenidos de dos tejidos de plantas de tinguaraque

Analizar extractos con actividad antimicrobiana por técnicas cromatográficas con el fin de identificar los compuestos de interés presentes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal empleado constó de plantas deshidratadas de tinguaraque (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) en estadio de floración germinadas a partir de semillas de frutos colectados en la población de Los Bancos (19°10'00"N-102°12'00"W), municipio de Parácuaro, Michoacán, México. Un espécimen herborizado se depositó en el Herbario del Instituto de Ecología, A.C., México (IE-BAJÍO) ubicado en la ciudad de Pátzcuaro, Michoacán, México. A este se le asignó el número de referencia "254838".

Se trabajó con la bacteria *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*, Gram positiva y fitopatógeno del jitomate comercial, también con una bacteria Gram negativo perteneciente al género *Pseudomonas* (patógenos del genero *Solanum*) (Maki *et al.*, 1974; Borboa-Flores *et al.*, 2009; Melgarejo-Nárdiz *et al.*, 2010)

Para la obtención de extractos se emplearon tres solventes con diferente polaridad: n-hexano, cloroformo y metanol (Ríos y Aguilar-Guadarrama, 2006.; Aguilar-Guadarrama y Ríos, 2007). El método de extracción empleado fue la maceración en frío, colocando el material vegetal en contacto con el solvente durante seis días sin agitación y en condiciones de obscuridad a una temperatura de 6 °C. Posteriormente los extractos se filtraron en un sistema de embudo acoplado a bomba de vacío con discos de papel filtro Whatman 40. La concentración de los extractos se realizó con un rotavapor y los extractos se resuspendieron en una solución acuosa de dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% (González-Villa, 2004).

La capacidad antimicrobiana de los extractos resuspendidos y de los controles se probó por el método de Kirby-Bauer, en cajas Petri con medio de cultivo PDA (papa-dextrosa-agar), como control negativo se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% y para los controles positivos se usaron multidiscos marca Bio-Rad Gram positivo y Gram negativo; los extractos y el control negativo se colocaron en discos estériles elaborados con papel absorbente (Bio-Rad blot) de 7 mm de diámetro, impregnados cada uno con 30 µl de su respectivo tratamiento. Después de 7 días se midieron los halos de inhibición obtenidos con la ayuda de un vernier electrónico. Los ensayos se realizaron por triplicado y los datos obtenidos se analizaron con el paquete estadístico SAS 9.1 (Bauer *et al.*, 1966).

El extracto hexánico procedente de raíz, se sometió a cromatografía de gases (GC) para su análisis cualitativo (McNair y Miller, 1998; Hernández-Pérez, 2005).

4. RESULTADOS

El análisis estadístico de la comparación de los diferentes diámetros de inhibición, demostró que el extracto hexánico de raíz tiene un efecto antagónico sobre *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* y *Pseudomonas* sp. (Figuras 2, 3, 4 y 5) estadísticamente superior al resto de los extractos y al control negativo (2 A y 4 A), pero inferior a los controles positivos trimetoprima/sulfametoxazol (25 µg) y ceftriaxona (30 µg) respectivamente (Figuras 2 B y 4 B);

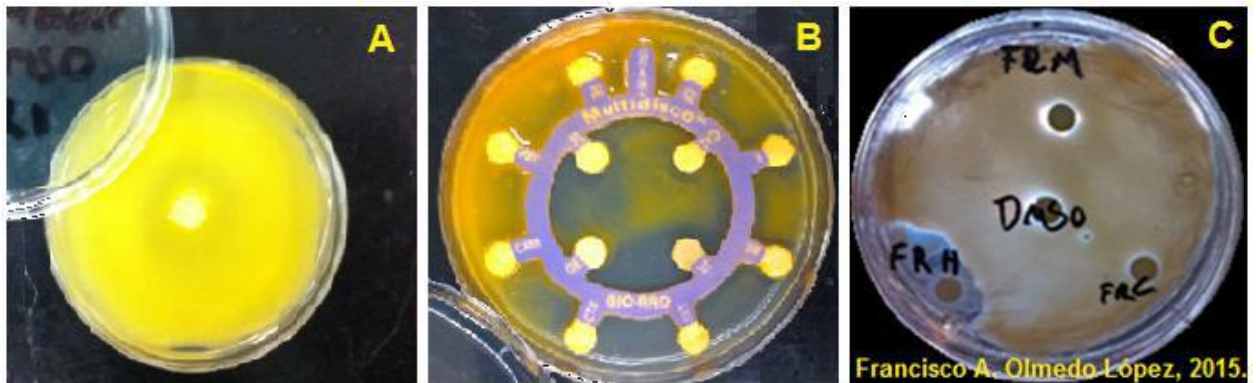


Figura 2.- Efecto de los controles (negativo y positivo) y extractos provenientes de tejido radicular deshidratado de tinguaraque (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) en estadio de floración sobre la bacteria *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*. **A:** Efecto de 30 μ l de dimetilsulfóxido al 10% (disco al centro), la bacteria crece de manera normal hasta cubrir el disco impregnado con la solución; **B:** Antibiograma Bio-Rad Gram positivo denotando superioridad los 25 μ g de trimetoprima/sulfametoxazol (SXT) sobre el resto de los productos; **C:** efecto de extractos provenientes de la raíz de plantas, donde el extracto hexánico (parte inferior izquierda) presenta diferencia significativa aparente con respecto al extracto clorofórmico y metanólico (parte superior e inferior derecha respectivamente).

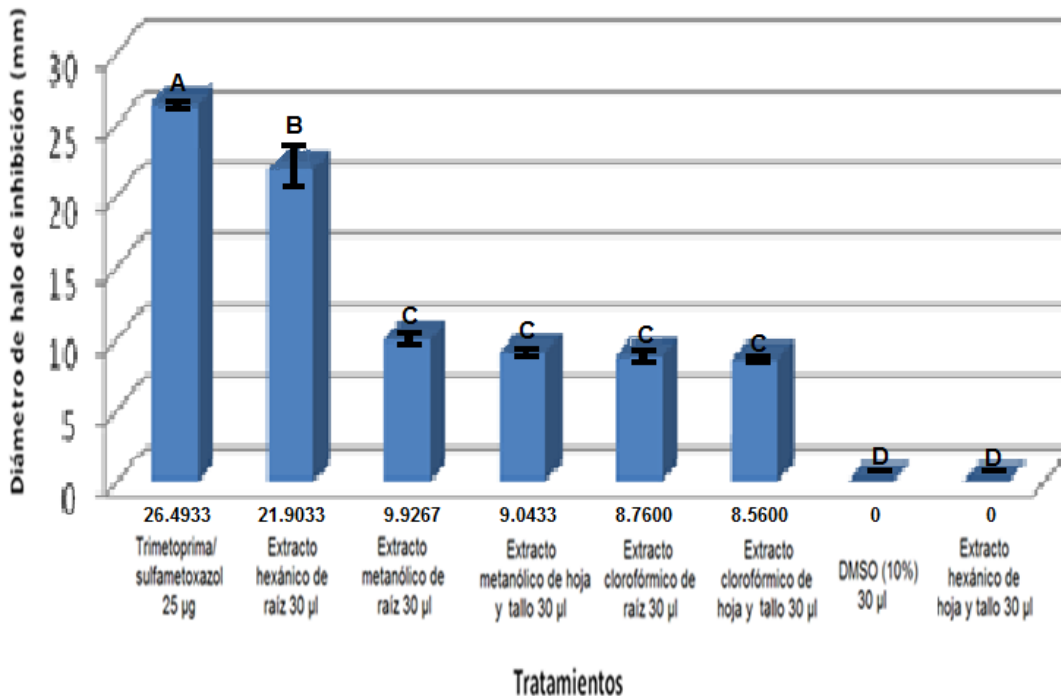


Figura 3.- Efecto inhibitorio de los controles y extractos de plantas deshidratadas de “tinguaraque” (*Solanum lycopersicum* var. *Cerasiforme*) en estadio de floración sobre la bacteria *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*.



Figura 4.- Efecto de los controles (negativo y positivo) y extractos provenientes de tejido radicular deshidratado de tinguaraque (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) en estadio de floración sobre la bacteria *Pseudomonas* sp. **A:** Efecto de 30 μ l de dimetilsulfóxido al 10% (disco al centro), la bacteria crece de manera normal hasta cubrir el disco impregnado con la solución; **B:** Antibiograma Bio-Rad Gram negativo denotando superioridad los 30 μ g de ceftriaxona (CRO) sobre el resto de los productos; **C:** efecto de extractos provenientes de la raíz de plantas, donde el extracto hexánico (parte inferior izquierda) presenta diferencia significativa aparente con respecto al extracto clorofórmico y metanólico (parte superior e inferior derecha respectivamente).

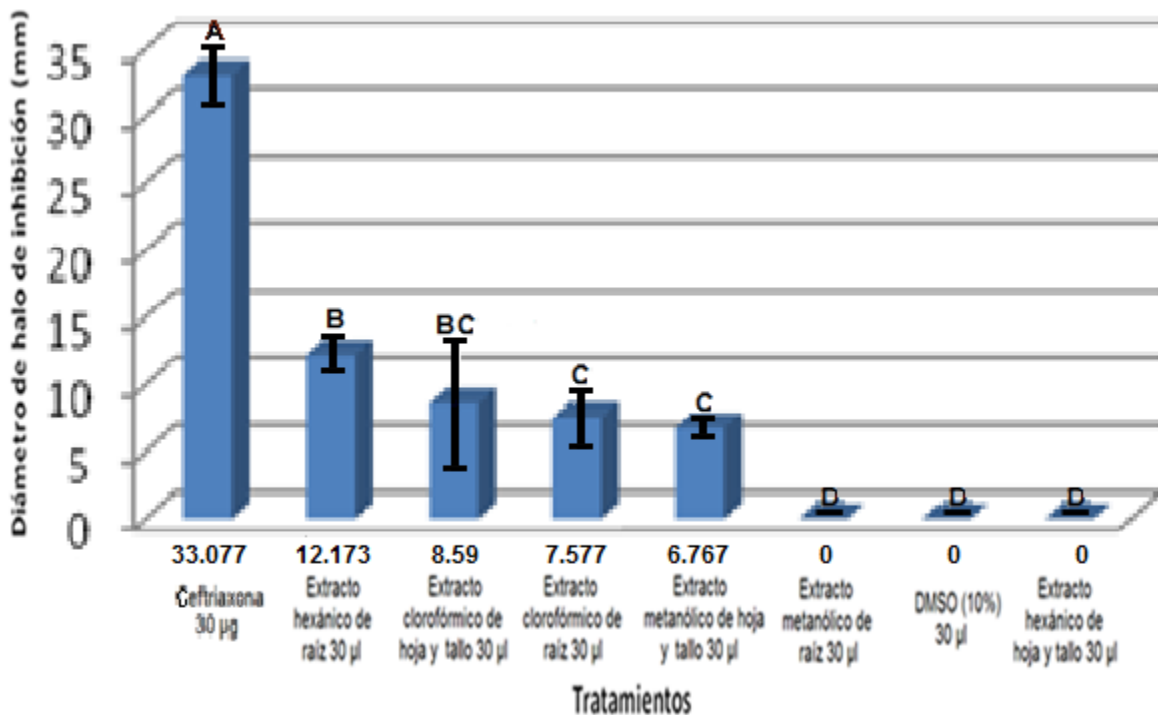


Figura 5.- Efecto inhibitorio de los controles y extractos de plantas deshidratadas de “tinguaraque” (*Solanum lycopersicum* var. *Cerasiforme*) en estadio de floración sobre la bacteria *Pseudomonas* sp.

La relación de compuestos presentes en el extracto hexánico de raíz reveló la presencia de **dimetilfumarato**, hemiterpeno derivado del isopreno al que se le atribuyen propiedades antimicrobianas (Campo *et al.*, 2009), además de otros compuestos con aplicaciones en diversas áreas.

5. CONCLUSIONES

De manera preliminar y a la espera de enriquecer los resultados, se concluye que el tinguarake acumula metabolitos secundarios con capacidad antimicrobiana en tejidos específicos, por tanto el objetivo general queda cubierto.

La metodología propuesta permitió la extracción de compuestos con capacidad antimicrobiana de tejidos de tinguarake. Por lo tanto, queda cubierto el primer objetivo específico.

Se determinó que la diferencia de la actividad antimicrobiana del extracto hexánico de raíz es superior a otras fracciones procedentes de otros órganos y afines a otros solventes, por tanto el segundo objetivo específico queda cubierto.

El extracto de raíz hexánico se analizó por medio de la cromatografía de gases (GC) y se determinó que tal órgano acumula dimetilfumarato durante el estadio de floración, por lo tanto el tercer objetivo específico queda cubierto.

REFERENCIAS

1. Agrios, G.N. 2008. Fitopatología 2ª edición en español. Editorial Limusa. Noriega Editores, México D.F. ISBN-13: 978-968-18-5184-2 pp.809-810, 813.
2. Aguilar-Guadarrama, A.B., Ríos, M.Y. 2007. Terpenos y flavonoides glicosídicos de *Tetrapteryx heterophylla* (GRISEB.) W.R. Anderson (Malpighiaceae). Revista Cubana Plant Med v.12 n.3 Ciudad de la Habana jul.-sep. ISSN 1028-4796.
3. Aliero, A.A., Asekun, O.T., Grierson, D.S., Afolayan, A.J. 2006. Chemical composition of the hexane extract from the leaves of *Solanum pseudocapsicum*. Asian Journal of Plant Sciences, 5: 1054-1056.
4. Álvarez-Hernández, J.C. 2013. Comportamiento agronómico e incidencia de enfermedades en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) INJERTADAS. Acta agronómica. 61 (2), p 117-125
5. Álvarez-Hernández, J.C., Cortez-Madrugal, H., García-Ruiz, I. 2009. Exploración y caracterización de poblaciones silvestres de jitomate en tres regiones de Michoacán, México. CIIDIR-IPN, Polibotánica No.28. ISSN 1405-2768
6. Arauz-Cavallini, L.F.1998. Fitopatología: un enfoque agroecológico. Primera edición. Editorial de la Universidad de Costa Rica. ISBN: 9977-67-539-2. San José Costa Rica. pp. 180.
7. Ávalos-García, A., Pérez-Urria, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145. ISSN: 1989-3620
8. Badui, S. 1988. Diccionario de los alimentos, Editorial Alhambra Mexicana, 1ª ed. ISBN 968 444 071 5
9. Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol; 45: 493- 496.
10. Borboa-Flores, J., Rueda-Puente, E.O., Acedo-Félix, E., Ponce, J.F., Cruz, M., Juárez, O.G.
11. García-Ortega, A.M. 2009. Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 32 (4): 319 – 326.

12. Campo, M., González, J., Pons, A. 2009. El dimetilfumarrato (dmf) en productos industriales de consumo como modelo para el estudio de la evolución de una alerta. *Revista Profesión veterinaria*, ISSN 2253-7244, Vol. 16, N°. 72, 2009, págs. 80-83.
13. Correll, D.S. Johnston, M.C. 1970. *Manual of the vascular plants of Texas*. Texas Research Foundation, Renner, USA.
14. Cortez-Madrugal, H. 2010. Variedad silvestre de jitomate, empleado para proteger cultivos comerciales: desarrollo de injertos y mico-insecticidas para el manejo integrado de plagas y enfermedades del jitomate. CIIDIR, Unidad Michoacán. Instituto Politécnico Nacional Publicado 03-DIC-2010.
15. Crisanto-Juárez, A.U., Vera-Guzmán, A.M., Chávez-Servia, J.L., Carrillo-Rodríguez, J.C. 2010. Calidad de frutos de tomates silvestres (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme* Dunal) de Oaxaca, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, vol. 33, núm. 4, septiembre, 2010, pp. 7-13, Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. México. ISSN: 0187-7380.
16. Duke, J.A. 2015. Dr. Duke's phytochemical and ethnobotanical databases. Base de datos en línea sustentada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América, Consulta electrónica <<http://www.ars-grin.gov/duke/>>12 de Julio de 2015.
17. Falconi, C.E., Visser, R.G.F., Van Heusden, S. 2015. influence of plant growth stage on resistance to anthracnose in andean lupin (*Lupinus mutabilis*). *Crop and Pasture Science* 66, 729–734.
18. García, J. 2001. Efecto del dimetilsulfóxido en la respuesta quimioluminiscente y el consumo de oxígeno de neutrófilos humanos activados. *Rev. costarric. cienc. méd* vol.22 n.1-2 San José Jun.
19. Gold, K., León-Lobos, P., Way, M. 2004. *Manual de recolección de semillas de plantas silvestres: para conservación a largo plazo y restauración ecológica*. Boletín INIA N° 110, Centro Regional de Investigación Intihuasi, Centro de Investigaciones Agropecuarias, Ministerio de Agricultura. ISSN 0717 – 4829. La Serena, Chile.
20. González-Villa, A.A. 2004. Obtención de aceites esenciales y extractos etanolicos de plantas del amazonas. Universidad Nacional de Colombia sede Manizales. Departamento de ingeniería química. Abril. pp. 8-9
21. Hernández-Estrada, A., González-Palomares, S. 2012. Determinación de compuestos volátiles en noni (*morinda citrifolia* L.) mediante microextracción en fase sólida (spme) y cromatografía de gases-espectrometría de masas (gc-ms). *Tecnointelecto*. Vol. 9, No 2, pp. 10-14 ISSN: 1665-983X
22. Hernández-Pérez, J.M. 2005. Cromatografía líquida de alta eficacia. *Revista Educación continuada en el laboratorio clínico*. Ed Cont Lab Clin 2005;8:49-62.
23. Kariyat, R.R., Mauck, K.E., Balogh, C.M., Stephenson, A.G., Mescher, M.C., De Moraes, C.M. 2013. Inbreeding in horsenettle (*solanum carolinense*) alters night-time volatile emissions that guide oviposition by *Manduca sexta* MOTHS. *Proc. Biol. Sci.* 2013 Apr. 27;280(1757):20130020. Epub. Feb. 27.
24. Khaoukha, G., Ben-Jemia, M., Amira, S., Laouer, H., Bruno, M., Scandolera, E., Senatore, F. 2014. Characterisation and antimicrobial activity of the volatile components of the flowers of *magydaris tomentosa* (desf.) dc. collected in sicily and algeria. *Nat Prod Res.* 2014;28(15):1152-8. doi: 10.1080/14786419.2014.919289. Epub 2014 May 28.
25. Klocke, J.A., Darlington, M.V., Balandrin, M.F. 1987. 8-cineole (eucalyptol), a mosquito feeding and ovipositional repellent from volatile oil of hemizonia fitchii (*Asteraceae*). *Journal of Chemical Ecology* 13 (12): 2131.
26. Lo Cantore, P., Lacobellis, N.S., De-Marco, A., Capasso, F., Senatore, F. 2004. Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller Var. *vulgare* (Miller) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004-12-29. PMID: 15612768.
27. Long-Towell, J. 2001. Una semblanza de las solanaceae. Instituto de investigaciones históricas, UNAM. Coyoacán, México, D.F. UNAM, Mex.
28. Lozano-Teruel, J. A. 2011. *La nutrición es conciencia*. 2ª Edición. Universidad de Murcia. Ed: Servicio de Publicaciones (EDIT.UM). Murcia, España. ISBN en trámite.

29. Maki, L.R., Galyan, E.L., Chang-Chien, M.M., Caldwell, D.R. 1974. Nucleación de hielo inducida por *Pseudomonas syringae*. *Applied Microbiology* 28 (3): 456–459. PMID 4371331
30. Martínez, M., Rodríguez, A. Vargas, O., F. Chiang. 2011. Catálogo nomenclatural de las solanaceae de México. Universidad Autónoma de Querétaro. Informe Final SNIB-CONABIO. Proyecto HS004. México, D.F.
31. McNair, H.M. & Miller, J.M. 1998. *Basic gas chromatography*. Canada: John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-17261-8.
32. Melgarejo-Nárdiz, P., García-Jiménez, J., Jordá-Gutierrez, M.C., López-González, M.M., Andrés-Yebes, M.F., Durán-Vila, N. 2010. *Patógenos de plantas descritos en España*. Ed. Ministerios de Medio Ambiente y Medio rural y Marino. 850 pp.
33. Mulyaningsih, S., Sporer, F., Zimmermann, S., Reichling, J., Wink, M. 2010. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology* (Impact Factor: 2.88). 11/2010; 17(13):1061-6. DOI: 10.1016
34. Nissen, L., Zatta, A., Stefanini, I., Grandi, S., Sgorbati, B., Biavati, B. 2010. Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). *Fitoterapia* 81: 413–419.
35. Pandey, A. 2015. *Catálogo de productos de AOS Products Private Limited*. Proveedor Mr. Abhilash Pandey. Ghaziabad, La India. Consulta electrónica: 12 de Julio de 2015. <<http://spanish.alibaba.com/product-tp/natural-geranyl-acetate-114619765.html>>
36. Ríos, M.Y., Aguilar-Guadarrama, A.B. 2006. Alcaloides indólicos, terpenos, esteroides y flavonoides de las hojas de *Hamelia patens* Jacquin. *Rev. Cubana Plant Med.* v.11 n.1 La Habana ene.-abr. ISSN 1028-4796.
37. Sepúlveda-Jiménez, G. Porta-Ducoing, H., Rocha-Sosa, M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 21, núm. 3, dic. pp. 355-363.
38. Shan-Shan, Y., Wen-Fei, G., Yi, L., Yuan-Xun J. 2005. Flavor characteristics of lapsang souchong and smoked lapsang souchong, a special Chinese black tea with pine smoking process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (22).
39. Sfara, V., Zerba, E. N., Alzogaray, R.A. 2009. Fumigant insecticidal activity and repellent effect of five essential oils and seven monoterpenes on first-instar nymphs of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Medical Entomology* 46 (3): 511–515
40. SNAVMP (Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas). 2015. *Glomerella acutata*. Consulta electrónica 19 de Diciembre de 2015: <<http://www.sinavimo.gov.ar/plaga/glomerella-acutata>>
41. Troconis-Torres, I.G. 2012. Huella genética de cultivares de *capsicum annum* L. y su relación con el perfil de carotenoides y fenoles. Instituto Politécnico Nacional. Escuela nacional de ciencias biológicas. México, D.F.
42. Urban, P. 2007. *Bretherick's handbook of reactive chemical hazards* 1.7ª edición. Butterworth-Heinemann. p. 1154.
43. Víchová, J., Staňková, B., Pokorný, R. 2012. First report of *colletotrichum acutatum* on tomato and apple fruits in the Czech Republic. *The American Phytopathological Society. Plant Disease*, may 2012, volume 96, number 5, page 769 .
44. Xiudong, Y., Min-Cheol, K., Ki-Wan, L., Sung-Myung, K., Won-Woo, L., You-Jin J. 2011. pISSN: 1226-2617 eISSN: 2093-0860 Antioxidant activity and cell protective effect of loliolide isolated from *Sargassum ringgoldianum* subsp. *Coreanum*. *The Korean Society of Phycology. Algae* 2011, 26(2): 201-208 DOI: 10.4490/algae.2011.26.2.
45. Zapata, L. M., Gerard, L., Davies, C., Schwab, M. D. C. 2007. Estudio de los componentes antioxidantes y actividad antioxidante en tomates. (UNER). *Ciencia docencia tecnol.* n.35 Concepción del Uruguay. Nov. ISSN: 1851-1716.
46. Zavala-Núñez, A. 2009. Estudios etnobotánicos de la universidad autónoma chapingo. *Entrevista. Revista digital universitaria*. ISSN: 1607-6079. 10 de septiembre. Vol. 10, No. 9.

47. Zhang, D. y Hamazu, Y. 2003. Phenolic compounds, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant properties of green, red and yellow bell peppers. *Science of Functional Foods* Received 12. February 2003, accepted 16 April 2003., Graduate School of Agriculture, Shinshu University, 8304 Minami-minowa, Kami-ina, Nagano 399-4598 Japan.

EVALUACION DE DOS MEDIOS DE CULTIVO EN LA EFICIENCIA DE FLOCULACION Y PRODUCCION DE EXOPOLISACARIDOS EN TRES CONSORCIOS DE MICROALGAS

Julián Zaragoza Carmona¹, Ulrico López Chuken², Julio Beltrán Rocha², Adriana Marisol Rangel Rodríguez¹, Eugenia Olguín Palacios³, Ma. del Socorro Flores González¹ y Katiushka Arévalo Niño¹

¹Instituto de Biotecnología, Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, N.L. México. ²Laboratorio de Ciencias Ambientales, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, N.L. México ³Instituto de Ecología, AC, Xalapa, Veracruz, México

RESUMEN

Las microalgas representan una alternativa para el tratamiento de aguas residuales municipales y/o industriales por su capacidad de remoción de nutrientes; la biomasa producida posee un alto valor comercial pudiendo ser utilizada con fines bioenergéticos¹. Uno de los retos más importantes respecto a la producción de biomasa microalgal y de otros metabolitos en particular, consiste en la cosecha de la biomasa. La floculación es considerada uno de los tratamientos de cosecha de microalgas prometedores por su bajo costo. La presencia de exopolisacáridos (EPS) ha sido relacionada con los procesos de floculación². El objetivo de este trabajo fue evaluar dos medios de cultivo; su eficiencia de floculación, producción y caracterización de exopolisacáridos producidos por tres consorcios de microalgas previamente seleccionados por su capacidad de remoción de nutrientes en aguas residuales. La mayor productividad de biomasa para los tres consorcios se determinó en el medio LC con un máximo 3.1 g/L; de igual forma la mayor eficiencia de floculación se presentó en medio LC superando el 50% en los tres casos, alcanzando un 73% en el consorcio 01A; en rendimiento de EPS, también en el medio LC se obtuvieron los valores más altos.

1. INTRODUCCION

Grandes cantidades de agua son utilizadas para propósitos agrícolas, municipales e industriales generando volúmenes inmensos de aguas residuales. El exceso de nutrientes en aguas residuales como nitrógeno y fosforo pueden causar eutrofización en ríos causando daños a los ecosistema³. Eutrofización es un serio problema ambiental que se ha esparcido a mediados del siglo XX a la fecha. Los impactos ecológicos causados por eutrofización pueden ser categorizados en base a tres aspectos 1) reducción de la biodiversidad y sustitución de especies dominantes; 2) aumento de la toxicidad del agua; 3) incremento en la turbidez del agua y disminución de la esperanza de vida en ríos y lagos. Uno de los mayores requerimientos en tratamiento de aguas residuales es la remoción de nutrientes y metales pesados para llegar a límites permisibles de estos.

Las microalgas han probado ser eficientes en la remoción de nitrógeno, fosforo y metales tóxicos de una gran variedad de aguas residuales⁴⁻⁶. Tienen potencial de ser una materia prima ambientalmente amigable para la producción de biodiesel y han tenido un interés creciente para su producción comercial. Comparadas con otras materias primas para producción de biodiesel las microalgas tienen las siguientes ventajas: 1) no compiten con cultivos y tierra arable así como agua dulce, ya que pueden ser cultivados en agua salobre y tierras no cultivables; 2) pueden crecer

rápidamente y tienen contenido de aceites entre un 20-50% de su peso seco⁷; 3) tienen la habilidad de fijar CO₂, reduciendo así las emisiones de gases de efecto invernadero y mejorar la calidad del aire; 4) pueden utilizar nutrientes de la mayoría de aguas residuales, proveyendo una alternativa para el tratamiento de estas; 5) subproductos del cultivo de microalgas después de la extracción de lípidos, es decir, residuos de biomasa de microalgas, pueden utilizarse como una fuente de nitrógeno, tal como una alimentación rica en proteínas para ganado o fertilizante para los cultivos⁸.

Los retos científicos y tecnológicos que se requieren vencer para lograr disminuir los costos de producción de biomasa algal, así como de producción de biodiesel a costos competitivos, están relacionados a dar respuestas creativas y rentables para lograr: a) aumentar la productividad de biomasa microalgal con el mayor contenido de lípidos del perfil adecuado; b) lograr mayores rendimientos de biomasa microalgal en reactores que ofrezcan costos de inversión y de operación competitivos; c) diseñar nuevos procesos de cosecha de biomasa por medio de biofloculación o uso de cepas con capacidades intrínsecas de autofloculación⁹.

La problemática en la recuperación de biomasa microalgal y sus metabolitos está relacionada con aspectos como el tamaño pequeño de las células (2-20 μ diámetro) y el alto contenido de agua que debe ser removido, lo cual hace que la cosecha de las microalgas sea un proceso costoso, contabilizando aproximadamente del 20 al 30% o hasta el 52% del costo total de producción.¹⁰⁻¹²

Los métodos más comunes de cosecha de la biomasa microalgal incluyen centrifugación (especialmente en el caso de las microalgas unicelulares); sin embargo es uno de los métodos de mayor costo además de que puede causar daño a las células, filtración cuando se han formado flóculos o se trata de microalgas o cianobacterias relativamente grandes o filamentosas y en algunos casos, sedimentación por gravedad, flotación o técnicas de electroforesis. Sin embargo, la centrifugación es el proceso más costoso y generalmente se aplica sólo cuando se recuperan metabolitos de alto valor agregado¹³. En consideración a que la mayoría de las microalgas oleaginosas son pequeñas o no filamentosas, la filtración no es un método fácilmente aplicable a la producción de biodiesel a partir de microalgas.⁹

La floculación es una técnica utilizada ampliamente en diversas industrias, su aplicación en la recuperación de biomasa microalgal se basa en la premisa de que las microalgas y cianobacterias tienen cargas idénticas en la superficie que ocasiona se repelan unas a otras; los floculantes bloquean estas cargas dejando que las células se adhieran unas a otras generando flóculos¹⁴. Particularmente los cationes estimulan la actividad floculante al neutralizar y estabilizar las cargas negativas de los grupos funcionales formando puentes entre las células¹⁵.

En la actualidad, el proceso de floculación tradicional que utiliza sales metálicas que contaminan la biomasa está siendo investigado por diversos grupos buscando realizar modificaciones que permitan disminuir las problemáticas antes mencionadas⁹. Se sabe también que la floculación es particularmente sensible al pH, el incremento de pH mejora la capacidad de floculación de las células. La floculación por medio del incremento del pH puede ser una alternativa atractiva debido a que es una técnica de bajo costo y que a la vez elimina el uso de floculantes. Otra ventaja de este método es que el medio puede ser reciclado ya que no contiene otros floculantes como contaminantes químicos, sin embargo este método ha sido probado en muy pocas cepas de microalgas¹⁶.

Los polisacáridos extracelulares (EPS), son polímeros complejos, que en su mayoría contienen ácido urónico, radicales acetilo o derivados sulfatados y otras moléculas peptídicas, consistentes de seis o más tipos de monosacáridos (De Philippis et al. 2001). Son responsables de la adhesión de cianobacterias durante la floculación. Las superficies de las microalgas estén cargadas negativamente; sugiere que estos pueden ser utilizados como floculantes para la agregación celular.

El objetivo de este trabajo fue evaluar dos medios de cultivo en la eficiencia de floculación y propiedad de producir exopolisacáridos.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Preparación del inóculo

Peso seco de los consorcios

Ajuste de inóculo inicial

Se utilizaron tres consorcios recolectados por el Laboratorio de Ciencias Ambientales de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL. Se determinó en peso seco la cantidad de g/L de biomasa de cada consorcio evaluado, ajustando un inóculo inicial para cada consorcio de 0.316 g/L.

Cultivo en reactores de 18 L

Cultivo por 27 días en medios LC y BBM modificado.

El cultivo de los consorcios utilizados llevo a cabo en reactores de 18 L con un volumen de trabajo de 15 L; aireación continua a 0.06 vvm, agitación a una velocidad de 100 rpm, con un fotoperiodo 24/0 de 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y una temperatura de $30^\circ\text{C}\pm 2^\circ\text{C}$.

Evaluación de la efectividad de floculación

Para la evaluación de la efectividad de floculación, se realizó por medio de la técnica propuesta por Sirin¹⁷. Se tomó una alícuota de 100 mL y agito a 150 rpm por 2 min, después se colocó en una probeta de 100 mL. Se tomó una muestra a los 15 min a 1/3 y 2/3 de altura y se determinó absorbancia a 750 nm, se realizó lo mismo a los 30 min. La eficiencia de floculación se determina mediante la fórmula 1.

$$1. - \text{Eficiencia de floculación (\%)} = \left(1 - \frac{A - C}{B - C}\right) \times 100$$

Donde A es DO_{750} de la muestra, B es la DO_{750} del cultivo inicial y C es la DO_{750} de los blancos

Producción de exopolisacáridos (EPS)

La extracción de EPS se realizó por el método utilizado por Chaiklahan (1) con algunas modificaciones en el volumen total de etanol para precipitado, utilizando 3 volúmenes en lugar de 1.

Se resuspendió la biomasa en buffer PBS pH 7.4 0.15 M por 24 h en agitación lenta. Al término de la agitación se colocaron las muestras en baño de agua para tratamiento térmico por 2 h a 90°C . Se centrifugaron las muestras a 7000 rpm por 15 min, se recuperó el sobrenadante, al cual se le agregaron 3 volúmenes de etanol absoluto y se dejaron las muestras en refrigeración por 24 h.

Después de las 24 h, las muestras se centrifugaron a 7000 rpm por 15 min a 4°C y se recuperó el precipitado el cual fue colocado en tubos eppendorf previamente pesados para determinar el rendimiento en peso seco del producto obtenido. Se dejaron a 60°C para la evaporación de etanol, posteriormente se pesaron para obtener el rendimiento¹⁸.

3. RESULTADOS

Se observó una mayor eficiencia de floculación en los consorcios cultivados en el medio LC, siendo el consorcio 01A, el que mayor eficiencia presentó, con un 72%; seguido por los consorcios 12A y PTAR, para el medio BBM, de igual manera la mayor eficiencia se registró en el consorcio 01A con un 48% (fig. 1). El medio LC contiene una cantidad mayor de sales Ca^+ y Mg^+ esto podría ser uno de los factores influyendo en la mayor eficiencia de floculación. Ya que existen reportes en donde se atribuyen a estas sales el aumento en la floculación de algunas especies de microalgas.¹⁹⁻²¹

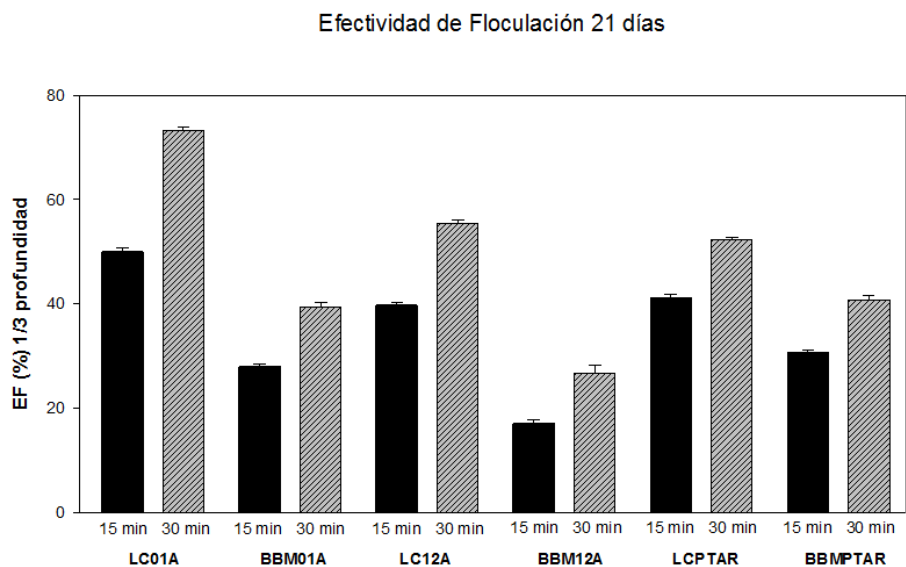


Fig.- 1. Eficiencia de floculación de los consorcios cultivados.

En cuanto al rendimiento de exopolisacáridos producidos por los consorcios en los diferentes medios, se obtiene una mayor cantidad de EPS en el medio LC (tabla 1) aunque estos rendimientos son bajos comparados con aquellos obtenidos por otras microalgas.²²⁻²⁴

Tabla 1.- Rendimiento de exopolisacáridos obtenido de los diferentes consorcios cultivados.

	Medio de Cultivo					
	LC	BBM	LC	BBM	LC	BBM
Consortio	01A	01A	12A	12A	PT	PT
EPS g/L	0.063±0.007	0.024±0.004	0.071±0.01	0.017±0.008	0.062±0.004	0.028±0.006

4. CONCLUSIONES

Se obtuvo una mayor producción de biomasa en los cultivos en medio LC.

El medio influyó en la eficiencia de floculación de los consorcios cultivados, siendo mejor el medio LC en especial para el consorcio 01A.

Los rendimientos de exopolisacáridos obtenidos son bajos en comparación con la literatura por lo que la floculación probablemente se deba a la composición del medio y la adaptabilidad de las células a este.

BIBLIOGRAFIA

1. Delrue, F.; Álvarez-Díaz, P.D.; Fon-Sing, S.; Fleury, G.; Sassi, J.-F. "The Environmental Biorefinery: Using Microalgae to Remediate Wastewater, a Win-Win Paradigm". *Energies* 2016, 9, 132.
2. Roeselers G, Van Loosdrecht MCM, Muyzer G "Phototrophic biofilms and their potential applications". *J Appl Phycol* 20, 2007, pp. 227–235-
3. T. Cai, S.Y. Park, Y. Li "Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects" *Ren Sus En Rev* 19, 2013, pp. 360–369.
4. Zhou W, Min M, Li Y, Hu B, Ma X, Cheng Y, et al. "A hetero-photoautotrophic two-stage cultivation process to improve wastewater nutrient removal and enhance algal lipid accumulation". *Bioresour Technol*, 110, 2012, pp. 448–55.
5. Boelee NC, Temmink H, Janssen M, Buisman CJN, Wijffels RH. "Scenario analysis of nutrient removal from municipal wastewater by microalgal biofilms". *Water*, 4, 2012, pp. 460–73.
6. Sturm BSM, Lamer SL. "An energy evaluation of coupling nutrient removal from wastewater with algal biomass production". *Appl En*, 88, 2011, pp. 3499–506.
7. Chisti Y. "Biodiesel from microalgae" *Biotechnol Adv* 25, 2007, pp. 294–306
8. Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. "Commercial applications of microalgae". *J Biosci Bioeng*, 101, 2006, pp.87–96
9. M. M. Loera-Quezada, and E.J. Olguín. "Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades." *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 1, 2010, pp. 91-116
10. E. Molina Grima, E. H. Belarbi, F. G. Ación Fernández, A. Robles Medina, and Yusuf Chisti. 2003. "Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics." *Biotech Adv.* 20, 2013, pp. 491-515. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00050-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00050-2).
11. Greenwell, H. C., L. M. Laurens, R. J. Shields, R. W. Lovitt, and K. J. Flynn. "Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges." *J R Soc Interface.* 7, 2010, pp. 703-26. doi: 10.1098/rsif.2009.0322.
12. E. J. Olguin, "Dual purpose microalgae-bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a biorefinery." *Biotechnol Adv.* 30, 2012, pp. 1031-46. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.05.001.
13. N. Uduman, Ying Qi, Michael K. Danquah, Gareth M. Forde, and Andrew Hoadley, "Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels." *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 2, 2010. doi: 10.1063/1.3294480.
14. A., D. Schlesinger, A. Eisenstadt, Bar-Gil, H. Carmely, S. Einbinder, and J. Gressel. 2012. "Inexpensive non-toxic flocculation of microalgae contradicts theories; overcoming a major hurdle to bulk algal production." *Biotechnol Adv*, 2012, pp. 1023-30. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.01.011.

15. H., Salehizadeh, and Shojaosadati, S. A. "Extracellular biopolymeric flocculants: Recent trends and biotechnological importance." *Biotechnol Adv*, 2001, pp. 371-385. doi:
16. Z. Wu, Y. Zhu, W. Huang, C. Zhang, T. Li, Y. Zhang, and A. Li. 2012. "Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium." *Bioresour Technol*, 110, 2012, pp.496-502. doi: 10.1016/j.biortech.2012.01.101
17. S, Sirin, Trobajo R, Ibanez C, Salvadó J "Harvesting the microalgae *Phaeodactylum tricorutum* with polyaluminum chloride, aluminium sulphate, chitosan and alkalinity-induced flocculation". *J Appl Phycol*, 24, 2012, pp. 1067–1080
18. R, Chaiklahan, C, Nattayaporn, T, Panya, L, Veara, Suvit Tia, and B, Boosya. 2013. "Polysaccharide extraction from *Spirulina* sp. and its antioxidant capacity." *International J Biol Macromol*, 58, 2013, pp. 73-78.
19. D, Vandamme, I, Foubert, I, Fraeye, Meesschaert B, Muylaert K. "Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: role of magnesium and calcium and practical implications". *Bioresour Technol*. 105, 2012, pp. 114-119.
20. S. L. Guo, X. Q. Zhao, C. Wan, Z. Y. Huang, Y. L. Yang, M. A. Alam, S. H. Ho, F. W. Bai, and J. S. Chang,. "Characterization of flocculating agent from the self-flocculating microalga *Scenedesmus obliquus* AS-6-1 for efficient biomass harvest." *Bioresour Technol*. 145, 2013, pp. 285-9.
21. S. Rakesh, S. Sudhir, Dolly W. Dhar, Radha Prasanna, and A. K. Saxena. 2013. "Comparative evaluation of inorganic and organic amendments for their flocculation efficiency of selected microalgae." *J Appl Phycol*, 26, 2013, pp. :399-406.
22. A. Banerjee, R. Sharma, Y. Chisti, and U. C. Banerjee, "Botryococcus braunii: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals." *Crit Rev Biotechnol*, 22, 2002, pp. 245-79. d
23. Z, Chi., C. D. Su, and W. D. Lu. 2007. "A new exopolysaccharide produced by marine Cyanothecce sp. 113." *Bioresour Technol*, 98, 2007, pp. 1329-32.
24. K. C. Díaz Bayona, and L. A. Garcés. 2014. "Effect of different media on exopolysaccharide and biomass production by the green microalga *Botryococcus braunii*." *J Appl Phycol*, 26, 2014, pp. 2087-2095.

EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL Y ANTIOXIDANTES EN LA PLANTA DE TOMATE (*Solanum lycopersicon* L. Mill) ENRIQUECIDA CON SELENIO

Rahim Foroughbakhch Pournavab

Universidad Autónoma de Nuevo León

RESUMEN

La biofortificación tiene como finalidad incrementar la concentración de elementos biodisponibles en las plantas de cultivo para elevar la calidad nutricional. El selenio es un elemento traza de gran impacto para el metabolismo antioxidante de las plantas y su acumulación es pobre en especies como el tomate, de igual manera este elemento es esencial para los humanos, por lo que adicionarlo en las plantas forma parte de los programas de biofortificación. El propósito de este trabajo fue analizar experimentalmente la capacidad del selenito de sodio para incrementar la concentración de Se y modificar la actividad antioxidante en plantas de tomate. Para ello se usaron plantas de la variedad híbrido Toro y se aplicaron tres tratamientos 0, 2 y 5 mg L⁻¹ de selenito de sodio (Na₂SeO₃) utilizando como vehículo el agua de riego, los tratamientos fueron aplicados bajo un diseño experimental completamente al azar. Se llevaron a cabo tres muestreos 40, 80 y 120 días después del trasplante y la subsecuente cuantificación de la acumulación de selenio y macronutrientes en hojas, tallos y frutos así como su impacto en la producción de frutos. Se determinó la altura de la planta, los diámetros de tallos, firmeza, sólidos solubles de frutos y la materia seca total de los diferentes tejidos. Para cada variable se llevó a cabo un análisis de varianza y posteriormente una prueba de comparación de medias de Tukey. La expresión de los genes en los frutos. Los resultados mostraron un incremento en la acumulación de Se, encontrándose hasta un 53.1% de aumento en la concentración en los frutos bajo el tratamiento 5 mg L⁻¹ en comparación con el testigo, sin embargo, este incremento no tuvo un impacto notorio en la producción y el rendimiento del tomate, a pesar de la existencia de una correlación de Spearman de 0.96 entre la producción de fruto y la concentración de Se. Los valores del potencial oxidoreducción se redujeron en promedio desde -41.4 mV para el tratamiento testigo y hasta -68.0 mV con el mayor tratamiento. Mientras tanto, la concentración de Se sí influyó positivamente en los parámetros de calidad.

1. INTRODUCCIÓN

El consumo de alimentos saludables con alto contenido de nutrientes antioxidantes contribuye a la protección de las células del daño oxidativo y a la prevención de diversas enfermedades (Broadley et al. 2006). Los radicales libres provocan reacciones oxidativas en cadena que son eliminados por la acción del sistema antioxidante de defensa (Sahnoun et al. 1997), incluyendo enzimas tales como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX), de esta manera, al activarse este sistema antioxidante de defensa, puede proporcionarle a las plantas una mayor tolerancia frente al estrés ambiental por consecuente la generación de frutos de calidad. Las enzimas antioxidantes generalmente usan elementos traza tales como selenio (Se) así mismo cofactores, como es el caso de la GPX (Arthur 2003). Se piensa que el selenio es un elemento asociado con el metabolismo antioxidante (Lin et al. 2012; Feng et al. 2013) a través de su papel como cofactor de selenoenzimas (Combs 2001); su deficiencia podría inducir daños en el balance celular redox.

No se han establecido cuantitativamente los requerimientos por Se, más bien se han recomendado los niveles de ingesta en diferentes regiones del mundo. La ingesta recomendada por el National Research Council (1989) de los E.U.A es de 70 μg día⁻¹ para hombres y 55 μg día⁻¹ para mujeres; durante el embarazo y lactancia esta dosis se estima en 75 μg día⁻¹. Mientras que Combs (2001) y Broadley et al. (2006) recomiendan hasta 300 μg por día para reducir el riesgo de diversas enfermedades como el cáncer. En humanos, la referencia de consumo en promedio de Se es de 60 a 75 μg por día, de acuerdo con los datos proporcionados por el National Research Council (1980); sin embargo, estos valores se encuentran muy por debajo de los niveles de consumo citado por Combs (2001) y Broadley et al. (2006). Hay países donde la falta de selenio en los suelos ha provocado problemas de salud para el ganado y en casos extremos también en la población humana como lo son: Nueva Zelanda, Finlandia, parte de E.U.A como en Beltsville y en la provincia de Keshan China (Combs y Combs 1986). El consumo en Caracas, Venezuela es 3 veces más alto que en Beltsville (Mondragón y Jaffé 1976). En Latinoamérica se observaron los valores más bajos de Se en Guatemala y moderadamente bajos de Ecuador y Brasil, mientras que muestras de Colombia, Venezuela y México poseen niveles superiores al promedio (Jaffé et al. 1969).

Con base en lo anterior se ha planteado como estrategia para la mejora de la ingesta de selenio el enriquecimiento de los cultivos alimenticios con este elemento. El objetivo principal del presente trabajo fue: generar los conocimientos básicos acerca de los cambios en la expresión génica y en la capacidad antioxidante de la planta de tomate al aplicar selenio como selenito de sodio. Dicha especie fue utilizada como modelo biológico por ser caracterizada como no acumuladora de selenio.

2. TEORIA

El origen del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicon* L. Mill) se localiza en la región andina que comprende a los países de Chile, Colombia, Ecuador, Bolivia y Perú (Vavilov 1951) donde se encuentra la mayor variabilidad genética de tipos silvestres (Valadez 2001). Sin embargo muchos autores declaran que el centro de origen probablemente fue México, ya que aquí alcanzó un elevado grado de domesticación antes de ser llevado a Europa (Villarreal 1982). El Nombre tomate proviene de tomatl, en la lengua náhuatl de México (Nuez 2001).

Los antioxidantes son compuestos que permiten la vida celular en un ambiente oxidante y son los responsables de la eliminación de los radicales libres los cuales se producen, de manera natural, en los sitios de actividad energética celular. La función química de los antioxidantes es ceder potencial reductor a los compuestos oxidantes capaces de dañar a los componentes celulares (Benavides et al. 2009). Los organismos poseen numerosos sistemas de defensa antioxidantes regulables, enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa, GSH peroxidasa, quinona reductasa y hemoxigenasa) y no enzimáticos (selenio, zinc, ácido ascórbico, α -tocoferol y carotenoides) que son los encargados de evitar estos factores (Murillo et al. 2007). Estas respuestas de defensa se desencadenan por factores bióticos tales como patógenos, plagas y simbiosis o por factores abióticos como alta o baja temperatura, radiación, salinidad, entre otros y no necesariamente en condiciones que originan estrés (Benavides et al. 2009).

El papel del selenio como un antioxidante en pastos sugiere que la adición al suelo puede mejorar la calidad del forraje, por la disminución de la senescencia y persistencia de la pastura (Cartes et al. 2005). Estudios realizados indican que este elemento se asocia a cambios en el estado redox celular, esto a su vez se relaciona con la habilidad de las plantas a tolerar el estrés ambiental. El selenio es un constituyente esencial de un número de enzimas, algunas de las cuales tienen funciones antioxidantes (Raymond 2002). Recientemente se ha demostrado que el selenio aumenta la capacidad antioxidante y la tolerancia al estrés en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) y plantas de ballico (*Lolium perenne* L.) además en un estudio realizado aplicando selenio en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*), los resultados sugirieron que el Se es un antioxidante y

que activa los mecanismos de protección, que pueden curar el estrés oxidativo en los cloroplastos (Seppanen et al. 2003).

En general, los carotenoides han cobrado gran importancia debido a que son antioxidantes que neutralizan los radicales libres que dañan a las células, y de ellos, el licopeno es el que tiene las propiedades más sobresalientes. El tomate es una fuente importante de licopeno además de otros carotenoides como el β caroteno (Madhavi y Salunkhe 1998). Ambos, el licopeno y el β caroteno son importantes antioxidantes de defensa en contra de la peroxidación lipídica en las células (Agarwal et al. 2005). El licopeno es un hidrocarburo alifático que pertenece a la familia de los carotenoides, tiene una estructura que consiste en una larga cadena de dobles enlaces conjugados con dos anillos extremos abiertos. La estructura del licopeno ($C_{40}H_{56}$, peso molecular: 536.85) es la más larga de los carotenoides; este hidrocarburo insaturado contiene 13 dobles enlaces carbono-carbono, de los cuales 11 están conjugados y dispuestos en una matriz lineal (Figura 3). Estos dobles enlaces conjugados son responsables del vibrante color rojo de licopeno (Clinton 1998). El licopeno es un compuesto lipófilo que es insoluble en agua, pero soluble en disolventes orgánicos y tiene una capacidad de extinción constante al doble que la del β caroteno y 10 veces mayor al α tocoferol (Hadley et al. 2003). La capacidad de extinción está directamente relacionada con la posición de los niveles de energía del estado excitado, que dependen de la longitud de la cadena doble de carbono conjugado (Young y Lowe 2001).

El selenio es un elemento mineral natural, distribuido en la naturaleza en la mayoría de las rocas y suelos; en forma pura existe en forma de cristales hexagonales de color gris metálico a negro, pero en la naturaleza generalmente esta combinado con sulfuro o con minerales de plata, cobre, plomo y níquel. Este mineral fue identificado como nuevo elemento químico en 1818 por J. J. Berzelius en Gripsholm, Suecia. Fue aislado del residuo color rojo producido durante la oxidación del dióxido de azufre proveniente de piritas de cobre para la producción de ácido sulfúrico (Terry et al.2000).

El Se es un elemento químico del grupo 16, encontrándose justo abajo del azufre en la tabla periódica, dándole así propiedades químicas similares a este último elemento (Cruz-Jiménez 2005), el selenio tiene variedad en sus estados de oxidación como seleniuro (Se^{2-}), selenio elemental (Se^0), selenito (Se^{4+}) y selenato (Se^{6+}). Las formas oxidadas del selenio (Se^{4+} y Se^{6+}) son absorbidas por las plantas debido a su elevada solubilidad, sin embargo el Se^0 y el Se^{2-} son insolubles, por lo cual difícilmente son absorbidas por las plantas (Broadley et al. 2006).

El selenio (Se) se encuentra ampliamente distribuido entre los materiales de la corteza terrestre aunque de forma poco uniforme (Magos y Berg 1988). En la mayoría de suelos las concentraciones de Se, varían entre 0.01 y 2 mg Kg⁻¹ (Mayland 1994), mientras que concentraciones elevadas de Se, se asocian generalmente a suelos formados a partir de materiales sedimentarios de origen marino (Presser 1994). Fordyce (2005) señala que en la mayoría de los suelos del mundo las concentraciones de selenio son bajas, alcanzando de 0.01 a 2.0 mg Kg⁻¹ y una media de 0.4 mg Kg⁻¹, aunque pueden encontrarse concentraciones >1200 mg Kg⁻¹, en suelos denominados seleníferos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Siembra, trasplante y establecimiento del cultivo

Se sembraron semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L. Mill.) tipo saladette híbrido variedad "Toro" de crecimiento determinado. La siembra se realizó en charolas de poliestireno de 200 cavidades, verificando el crecimiento y el respectivo cuidado de la plántula durante un periodo de 40 días.

Se colocó una malla sombra de polipropileno color negro que tenía un factor de sombra de 25%. Además, en el área se colocaron termómetros y medidores de humedad relativa. La temperatura

máxima y mínima y la humedad relativa fueron encontradas oscilando entre 18-25°C y 50-65%, respectivamente.

Se seleccionaron las plántulas de las más uniformes en tamaño y desarrollo, se sumergió el cepellón en una solución enraizadora y se trasplantaron en las macetas de 20 L. El trasplante se realizó a los 40 días después de la siembra.

La nutrición del cultivo se llevó a cabo mediante la aplicación de la solución nutritiva universal Steiner (Steiner 1961), ajustada a un valor de pH de 5.5 a 6.5 con ácido sulfúrico, con el objetivo de asegurar la disponibilidad de los elementos minerales en la solución nutritiva y mantener el ión selenito en su forma protonada (Preciado-Rangel et al. 2006). La concentración de la solución aplicada fue acorde a la etapa fenológica: 25% en las etapas iniciales y alcanzando el 75% después de la floración. A las plantas se les aplicaron los siguientes tratamientos como se explica en el siguiente Cuadro.

Cuadro 1. Tratamientos aplicados en una solución nutritiva de riego sobre el cultivo de la planta de tomate.

T1 Testigo Solución Steiner + 0 mg L⁻¹ de selenio
T 2 mg L⁻¹ Solución Steiner + 2 mg L⁻¹ de selenio
T 5 mg L⁻¹ Solución Steiner + 5 mg L⁻¹ de selenio

Al cabo de 40, 80 y 120 días después del trasplante se registraron para cada fecha la información sobre el tejido foliar, el tallo y el fruto, esto con el fin de poder realizar ciertos análisis morfométricos sobre los componentes de la planta. Las variables evaluadas fueron obtenidas en tres muestreos realizados en las tres fechas mencionadas. Tomando de cada muestreo tejido foliar, de tallo y de fruto para los distintos análisis.

De cada tratamiento, se eligieron 3 plantas completamente al azar y se etiquetaron desde el inicio del trasplante. De cada uno de los tres muestreos correspondientes se realizaron mediciones de la altura de la planta (ALT) desde la base del tallo hasta la última hoja en la parte aérea de la planta con la ayuda de una cinta métrica reportando los valores en centímetros.

De igual forma sobre las plantas elegidas para la medición de altura de la planta, se midió el diámetro del tallo (DT) en la base de la planta. A los frutos colectados se midió el diámetro polar (DP) y ecuatorial (DE) de cada uno utilizando un vernier digital (Autotec, modelo Caliper digital 150 mm) reportando los valores en centímetros. Estos frutos fueron seleccionados en el momento de cada muestreo, se eligieron 3 de los frutos completamente maduros según la denominación "red" por cada planta de cada tratamiento totalizando 9 frutos por tratamiento.

La firmeza se midió utilizando un penetrómetro manual QA Supplies, model FT011), se tomó firmemente el fruto y se introdujo el penetrómetro de un solo impulso hasta la marca delimitante de la puntilla de 8mm, se tomó la lectura y se reportó en kg cm⁻¹.

De las muestras obtenidas para la estimación de materia seca total, se tomó una porción de 5 g y se maceró en un mortero de porcelana. Se tomó 1 g del macerado y esta muestra fue sometida a digestión ácida con ácido nítrico y perclórico en una proporción 3:1 usando una plancha de calentamiento a 100 °C. Posteriormente la solución fue filtrada con papel filtro Whatman (No 42 sin cenizas) y aforada a una solución de trabajo de 100 mL con agua desionizada. La lectura se realizó utilizando un espectrómetro de Inducción de Plasma (ICP) marca THERMO JARELL ASH, Modelo IRIS Advantage, siguiendo el procedimiento 984.27 de la AOAC (2000). Los nutrientes cuantificados fueron K, Mg y Ca además de la correspondiente cuantificación de selenio.

4. RESULTADOS

Producción del fruto

Aunque el número de frutos (NF) y peso de frutos (PF) por planta no fueron modificados estadísticamente por los tratamientos de Se (Cuadro 2), se encontró una correlación de Spearman positiva entre la variable NF y la concentración de Se ($R = 0.9637$, $\alpha \leq 0.05$), mostrando un aumento gradual en el rendimiento del fruto bajo la aplicación de tratamientos (17 frutos) con selenio en comparación con el testigo (12 frutos). Este efecto de aumento puede ser observado a pesar de que no se detectó una diferencia significativa ($p \geq 0.05$) entre el testigo y los tratamientos. De la misma manera sucedió en la producción de fruto, medida en gramos por planta, que va desde 869 a 1184 g por planta.

Cuadro 2. Números de fruto por planta (NF) y peso de frutos por planta (PF) en tomate con aplicación de tres tratamientos de selenio (0, 2 y 5 mg L⁻¹) en la solución nutritiva.

Tratamiento	Número de frutas/planta	Peso de frutas/planta (g)
0 mg L-1	12.00±2.9a	869.20±224.6a
2 mg L-1	17.67±3.9a	1061.53±349.8a
5 mg L-1	16.67±3.6a	1184.83±378.9a

Cuantificación de variables agronómicas y de calidad de frutos

Se registraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos asociados a la aplicación de Se en comparación con el tratamiento testigo, con un incremento significativo en los valores de longitud de tallo (ALT), diámetro de tallo (DT), sólidos solubles totales de fruto (SST), firmeza, diámetro de frutos (DP y DE), y el contenido de materia seca total (Cuadro 3 y 4).

Cuadro 3. Variables agronómicas y calidad de frutos evaluadas bajo la aplicación de selenio en solución nutritiva.

Tratamiento	Altura (cm)	Diámetro (mm)	Diámetro polar (cm)	Diámetro ecuatorial(fru)	Firmeza kg/ cm ²	Sólidos Solubles Tot
Control	61.1±3.9b*	11.8±0.9b	5.49±0.7b	5.42±0.5b	2.9±0.2c	4.3±0.1b
2 mg L-1	67.5±3.0a	13.4±0.8a	6.24±0.5a	5.93±0.3a	4.3±0.3b	5.1±0.4a
5 mg L-1	65.2±2.9a	13.3±0.8a	6.38±0.4a	5.96±0.7a	4.5±0.3a	4.9±0.6a

*Las medias seguidas de la misma literal no son diferentes según Tukey ($p \geq 0.05$).

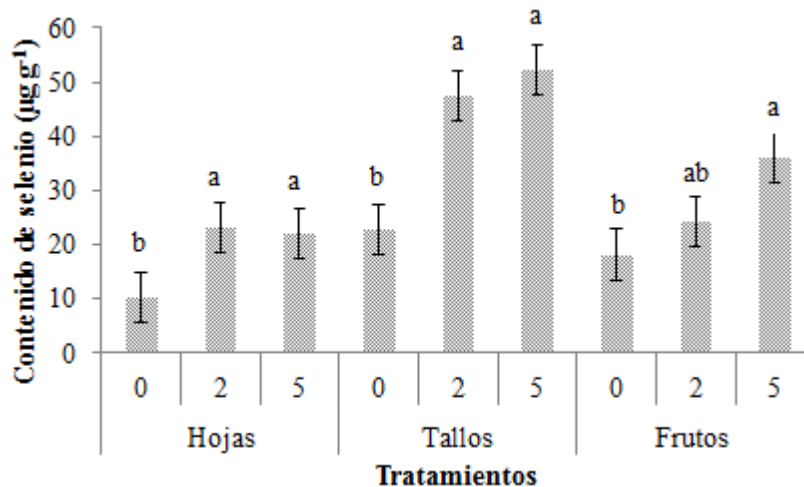
Cuadro 4. Comparación de medias de la materia seca total (MST) bajo la aplicación de selenio en solución nutritiva

Tratamiento	Materia seca total (%)		
	Hoja	Tallo	Fruto
Control	43.7±14.5 b*	26.6±3.0 a	32.8±6.1 a
2 mg L-1	48.1±19.1 ab	28.3±3.6 a	28.9±4.5 a
5 mg L-1	50.9±19.2 a	29.9±6.5 a	30.0±4.9 a

Cuantificación de selenio y macronutrientes

La concentración de Se en los diferentes componentes de la planta expresada en $\mu\text{g g}^{-1}$, indicó diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos. Referente a la distribución de Se en las plantas, se obtuvo más selenio en los tallos y menor concentración en los frutos y hojas (Figura 1).

Figura 1. Concentración de selenio en hojas, tallos y frutos de tomate con aplicaciones de selenio en solución nutritiva.



Los contenidos de macronutrientes mostraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre tratamientos en componente tallos y frutos.

Las correlaciones entre la concentración de Se en los diferentes tejidos de la planta, fueron todas significativas (hoja/tallo, $r=0.50$; hoja/fruto, $r=0.68$; tallo/fruto, $r=0.59$), lo que sugiere una ausencia de competencia por el Se entre los diferentes órganos y una acumulación de Se de los órganos en proporción directa a su disponibilidad (Cuadro 5).

Cuadro 5. Concentración de macronutrientes y selenio en los diferentes órganos de la planta de tomate

Órgano	Trat	N	P	K	Ca	Mg	Se
Hoja	0	3.36±0.66 ^a *	0.76±0.27 ^a	3.57±0.23 ^a	5.16±2.76 ^a	0.58±0.19 ^c	9.90±0.10 ^b
	2	3.24±0.46 ^a	0.82±0.18 ^a	4.42±1.94 ^a	4.72±1.43 ^a	0.68±0.16 ^b	20.9±0.12 ^a
	5	3.09±0.48 ^a	0.91±0.34 ^a	3.47±0.85 ^a	3.54±1.50 ^a	0.71±0.34 ^a	20.4±0.13 ^a
Tallo	0	2.36±0.59 ^a	0.70±0.10 ^a	3.84±0.20 ^{ab}	3.30±1.68 ^a	0.49±0.16 ^a	21.7±0.12 ^b
	2	2.50±0.50 ^a	0.77±0.19 ^a	4.47±1.47 ^a	3.90±1.64 ^a	0.31±0.06 ^a	45.6±0.15 ^a
	5	2.49±0.41 ^a	0.72±0.11 ^a	3.40±0.67 ^b	2.82±2.16 ^a	0.37±0.06 ^a	52.3±0.31 ^a
Fruto	0	2.20±0.42 ^a	0.59±0.03 ^a	2.95±0.56 ^{ab}	0.86±0.3 ^a	0.40±0.13 ^a	16.8±0.05 ^b
	2	1.87±0.34 ^a	0.47±0.04 ^a	3.44±0.46 ^a	1.26±1.3 ^a	0.34±0.13 ^a	24.5±0.10 ^{ab}
	5	2.11±0.45 ^a	0.56±0.15 ^a	2.90±0.55 ^b	2.82±0.03 ^a	0.33±0.15 ^a	35.8±0.14 ^a

*Medias con la misma letra en cada columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($p > 0.05$). Las concentraciones de N, P, K, Ca y Mg están dadas en porcentaje, el selenio en $\mu\text{g g}^{-1}$.

5. CONCLUSIONES

Las variables de crecimiento, altura de la planta, diámetro de tallos, firmeza de frutos y sólidos solubles de frutos respondieron positivamente a la aplicación de selenio, mientras que esta aplicación no causó interferencia con la absorción de N, P, K, Ca y Mg. La adición de selenio en la solución nutritiva incrementó significativamente la concentración de este elemento en los diferentes órganos de la planta; el tratamiento 5 mg L⁻¹ permitió hasta el doble de la concentración de este elemento en frutos comparado con el tratamiento control. Esta concentración de selenio en frutos fue positivamente correlacionada con la concentración en hojas y tallos. Además, el Se resultó en un incremento en la actividad enzimática de catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa en frutos con el mayor tratamiento aplicado (60.9, 33.4 y 26.0% de aumento respectivamente), a pesar que los análisis de marcadores de estrés oxidativo tales como peróxido de hidrógeno y/o peroxidación lipídica son necesarios para un mejor entendimiento de este cuadro antioxidante. Los frutos bajo ambos tratamientos de Se (2 y 5 mg L⁻¹) mostraron mayor acumulación de ácido ascórbico respecto al testigo y, en el caso del tratamiento de 5 mg L⁻¹ un 66.9 % más de licopeno. Por su parte, el mayor nivel de transcritos de los genes *gpx*, *sod* y *apx* ocurrió con el tratamiento de 2 mg L⁻¹. Los demás genes fueron expresados aunque en un nivel menor.

BIBLIOGRAFIA

1. A. Agarwal, S. A. Prabakaran, T.M. Said. Prevention of oxidative stress injury to sperm. *Journal of Andrology* 26(6), 2005, pp:654-660.
2. A.O.A.C. 2000. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists* 17th ed. 2000,. Gaithersburg, M.D. USA.
3. J.R. Arthur. 2003. Selenium Supplementation: Does Soil Supplementation Help and Why?. *Proc. Nutr. Soc.* 62:393-397.
4. Benavides-Mendoza A, Ramírez H, Robledo-Torres V, Fuentes-Lara LO. 2009. Antioxidantes en las plantas. *Modernos de Nutrición Vegetal, A.C.*, pp. 13-26. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. Texcoco, México.
5. M.R. Broadley, P.J. White, R.J. Bryson, M.C. Meacham, H.C. Bowen, S.E. Johnson, Biofortification of UK Food Crops with Selenium. *Proc. Nutr. Soc.* 65, 2006, pp: 169-181.
6. T.A. Brown, A. Shrift. Selenium; toxicity and tolerance in higher plants. *Biol. Rev.* 57, 1982, pp:59-84.
7. P. Cartes, C. Shene. M. Mora. Selenium Distribution in Ryegrass and its Antioxidant Role as Affected by Sulfur Fertilization. *Plant Soil* 285, 2006 pp: 187-195.
8. G.F. Combs, S. Combs. *The Role of Seleniúll in Nutrition.* Academic Press, New York, 1986, 342 p.
9. G.F. Combs. Selenium in Global Food Systems. *Brit. J. Nutr.* 85:17-547. COVECA (Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria). 2010. Monografía del tomate rojo. <http://faostat.fao.org>.
10. F. Fordyce. Selenium deficiency and toxicity in the environment. In: *Essentials of medical geology*, Selinus, O., B. Alloway, J. Centeno, R. Finkelman, R. Fuge, U. Lindh and P Smedley (Eds.). Elsevier. pp 373-415.
11. C.W. Hadley, S.K. Clinton, S.J. Schwartz. The consumption of processed tomato products enhances plasma lycopene concentrations in association with a reduced lipoprotein sensitivity to oxidative damage. *J Nutr.* 133, 2003, pp:727-32.
12. W.G. Jaffé, J.F. Chávez, M.C. Mondragón. Contenido de selenio en muestras de ajonjolí (*Sesamum indicum*) procedente de varios países. *Arch Latinoam Nutr* 19, 1969 pp:299-305.

13. D.L. Madhavi, D.K. Salunkhe. Tomato. Food science and technology-New Yorkmarcel dekker. Handbook of vegetable science and technology. 1998,pp.171-201. Marcel Dekker EUA.
14. L. Magos, G.G. Berg. Selenium. in Biological Monitoring of Toxic Metals, T.W. Clarkson, L. Friberg, G.F. Nordberg y P.R. Soger, (eds.) Plenum Press, New York, NY, 1988, pp. 383-405.
15. H.F. Mayland. Selenium in plant and animal nutrition. in Selenium in the Environment, W.T. Frankenberger, Jr. y S. Benson (eds.) Marcel-Dekker, Inc. New York, NY, 1994, pp. 29-45.
16. M.C. Mondragón, W.G. Jaffé. Consumo de selenio en la ciudad de Caracas en comparación con otras ciudades del mundo. Arch Latinoam Nutr 26, 1976, pp:341-352.
17. E. Murillo, O. Lombo, M. Tique, J.J. Méndez. Potencial antioxidante de la Bauhinia Kalbreyeri Harms (FABACEAE). Información Tecnológica 18, 2007, pp:65-74.
18. National Research Council (US). Committee on Dietary Allowances, Food and Nutrition Board. *Recommended dietary allowances* Vol. 2941, 1980. National Academies.Washington D.C.
19. F. Nuez. El cultivo de tomate. Segunda edición Editorial Mundi Prensa. 2001., pp: 32-60.
20. P. Preciado, E. Favela, A. Benavides-Mendoza. *Manual para la Preparación de Soluciones Nutritivas*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro,Saltillo, México, 2006, 146pp.
21. T.S. Presser. Geologic origin and pathways of selenium from California Coast Ranges to the west-central San Joaquin Valley. in Selenium in the Environment, W.T., 1994.
22. P.M. Raymond. Selenium in cáncer prevention: A review of the evidence and mechanism of action. J. Proceedings of the nutrit. Soc. 64, 2002, pp: 527-542.
23. Z.Sahnoun, K. Jamoussie, K.M. Zegal. Free Radicals and Antioxidants: Human Physiology and Therapeutic Aspects. Therapie 52, 1997, pp: 251-70.
24. M. Seppanen, M. Turakainen, H. Hartikainen. Selenium effects on oxidative stress in potato. J. Plant and Sciense 165, 2003, pp: 311-319.
25. A.A. Steiner. A Universal Method for Preparing Nutrient Solutions of a Certain Desired Composition. Plant Soil 15, 1961, pp: 134-154.
26. N. Terry, A.M. Zayed, M.P. De Souza, A.S.Tarun. Selenium in Higher Plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol 51, 2000, pp: 401-432.
27. N.L. Vavilov. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. Tanslated by K. Start. Chron. Bot 13, 1951, pp:1-366.
28. R.R. Villarreal. Origen y distribución de tomate. Primera edición en español. Costa Rica. 1982, pp. 66-75.

EFFECTO DE LA RADIACIÓN UV-B Y C SOBRE EL CAMBIO FISIOLÓGICO DE SEMILLAS PINO, GIRASOL, TRIGO Y SOYA

Rahim Foroughbakhch Pournavab¹, Elly Bacopulos Mejia², Adalberto Benavides Mendoza² y Jorge Alberto Villarreal Garza²

1 Universidad Autónoma de Nuevo León. 2 Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila,

RESUMEN

Se estudió el efecto inductor de irradiación UV-C sobre la germinación de semilla así como sus efectos morfológicos en las estructuras de plántulas de *Pinus maximartinezii*, *Helianthus annuus*, *Triticum aestivum* y *Glycine max*. Se aplicaron 16 tratamientos a base de la dosis de radiación desde 1, 3, 15, 30, 60 m hasta 1500m y un testigo. Terminado el proceso de irradiación se efectuó la prueba de germinación estándar. Los parámetros a evaluar fueron vigor y capacidad de germinación, desarrollo de plántulas y semilla sin germinar. Para ello, se utilizó un diseño completamente aleatorio con 4 repeticiones la información se analizó en un paquete estadístico SAS. Los valores promedios fueron comparados mediante la prueba de Tukey. Los resultados revelan que para Soya los tratamientos 2 (5m), como la dosis mínima (T6-450m) así mismo la dosis máxima (T11-600m) resultaron ideal, donde observaron mayor resistencia de las plántulas. En el caso de Girasol se determinó que la dosis mínima (T4-90m) representa reacciones adecuadas vs la dosis máxima y letal (T16-450m). Se determinó para el Trigo que T2 (30m) representa la dosis mínima el T7 (180m) como la dosis máxima y T11 como la dosis letal. Para la variable de Vigor no existe diferencia significativa entre los tratamientos (100% de vigor), para la variable de germinación se observa que el testigo (T1) presenta un menor germinación a los 10 días de evaluación (80%). Para la variable PN los T-11 y T-12 manifestaron un 50% de PN, el T8 un 71%. Para PA los T11 y T12 obtuvieron los mejores resultados. Los cambios sufridos por las plántulas fueron la curvatura del hopocotilo por la zona debajo de los cotiledones.

1. INTRODUCCIÓN

La radiación UV-B es de importancia primordial a pesar de su pequeña proporción, debido a sus graves efectos perjudiciales sobre el crecimiento y desarrollo de plantas (Nawkar et al., 2013). La radiación UV-C es la porción más energética del espectro que no se encuentra de manera natural en la biosfera, sin embargo, se utiliza de forma artificial por su importante acción bactericida y germicida (Ruiz López et al., 2010). Además, la influencia de la radiación UV sobre crecimiento parece estar mediada por fitohormonas ya sea a través de la fotodestrucción o reacciones enzimáticas (Sarghein et al., 2011). Cuando la radiación UV-C interactúa con los tejidos vegetales origina daños por ionización y dimerización de pirimidinas en las moléculas de ADN así como disminución de la síntesis de proteínas y la alteración de sus estructuras, (Sgroppo y Sosa, 2009; Fonseca, 2009).

La inducción de daño en el ADN por la radiación UV solar es un acontecimiento clave que influye drásticamente en los procesos normales de la vida de todos los organismos. Sin embargo, es posible obtener un efecto benéfico de la aplicación subletal de un agente que induce estrés físico o químico (Luckey, 1980) y a la vez induce la acumulación de compuestos asociados al estrés como los flavonoides y fenólicos (Rajesh et al., 2010). La acumulación de una serie de fitoalexinas

propicia las adaptaciones típicas de la inducción de resistencia así mismo la modificación de paredes celulares e incluso la muerte celular (Rivera *et al.*, 2007). Dosis más altas de radiación UV-B o UV-C, resultan en daño celular, una fuerte irradiación con UV-C ejerce una serie de efectos negativos.

En base a lo presentado, en esta investigación se pretende determinar el impacto de la radiación UV-C y UV-B sobre la germinación y vigor al ser aplicada en diferentes dosis sobre semillas de girasol (*Helianthus annuus* L), trigo (*Triticum aestivum* L.), pino piñonero (*Pinus maximartinezii* Rzedowski.) y soya (*Glycine max* L.), para así obtener la dosis de estas radiaciones para cada especie mencionada.

2. TEORIA

Numerosas investigaciones han reportado efectos de la radiación UV-B sobre plantas, a nivel molecular, fotosíntesis, área foliar, producción y distribución de biomasa así como una gran variedad de cambios en los parámetros fisiológicos y morfológicos; (González *et al.*, 2009; Caldwell *et al.*, (2007). Estos efectos pueden conducir a pequeñas reducciones en la producción de brotes y los cambios en el equilibrio de la competencia de las diferentes especies (Frohn Meyer y Staiger, 2003). Tapia *et al.*, (2002) mencionan al trigo como una especie tolerante a la radiación UV-B en la banda de menor energía la cual está en el rango 290-320nm. Jordan, (1996) menciona que el efecto de la radiación de UV-B aumento en el crecimiento y la fisiología de muchas plantas, bajo condiciones de invernadero y de campo.

De acuerdo con Ballare *et al.*, (2001), la radiación UV es un factor abiótico que ha recibido mayor atención durante los últimos años. Esto debido principalmente a la preocupación por el agotamiento del ozono estratosférico y al aumento de la radiación UV-B, pero también porque se ha reconocido que la radiación UV es un factor ambiental que puede variar por muchas otras razones y por lo tanto puede influir en interacciones ecológica (Thorsten *et al.*, 2008).

Los efectos de la radiación UV en las plantas implican vías y mecanismos de señalización comunes a otros tipos de estrés, por lo que es probable que la aplicación de radiación UV a niveles no destructivos (Menor a 1 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) pueda inducir tolerancia a diversos factores, bióticos o abióticos (Kachavara, 2009). Rastogi *et al.*, (2010) señalan que la radiación UV induce la activación de mecanismos de defensa con dos principales estrategias de protección; blindaje por los flavonoides y compuestos fenólicos. La acumulación de las fitoalexinas podría estar acompañada por la inducción de otros sistemas de defensa, tales como la modificación de las paredes celulares, síntesis de enzimas de defensa e incluso la muerte celular, tal como fue observado por (Costa *et al.*, 2006) quienes al irradiar con UV-C cotiledones de girasol causó la inducción del sistema antioxidante.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Caracterización de semilla y la obtención de lote homogéneo.

En esta etapa se procedió a la caracterización física de semillas de las especies (Figura I) a la par se realizaron pruebas pre-germinativas identificándose el porcentaje de germinación con que cuenta la semilla e iniciar con los tratamientos de irradiación. Para cada lote de semillas se se determinaron el tamaño (ancho, grosor y largo), forma, color, textura y el peso esto con el objetivo de obtener lotes homogéneos. Una vez obtenido el lote de semilla se procedió a la evaluación de la germinación en dicho lote.



Largo, ancho y espesor.

Forma, color y textura.

Figura 1. Morfología de la semilla de soya, trigo, girasol y pino.

Tratamientos aplicados y obtención de las dosis de radiaciones UV-B y UV-C

Los tratamientos se definieron como las dosis mínima (T2), máxima (T3), letal (DL50= T4) y un testigo (T1). La dosis mínima fue definida como el primer indicio de cambio o modificación en las estructuras de las plántulas provenientes de las semillas irradiadas; la dosis máxima fue establecida como aquella en donde los cambios en las estructuras de las plántulas fueron más visibles (80%); la dosis letal se aplicó cuando presentó el 50% ó más de las semillas que no mostraron germinación (Tabla 1).

Tabla 1. Dosis de radiación UV-C y tiempos de exposición para las semillas a la irradiancia constante de 1.6W/m².

Especie	Tratamiento						
	(T1) Testigo	(T2) Dosis Mínima KJ/m ²	tiempo(s)	(T3) Dosis Máxima KJ/m ²	tiempo (s)	(T4) DL50 KJ/m ²	tiempo(s)
Soya	Sin radiación	1.44	900	43.2	27000	57.60	36000
Trigo	Sin radiación	2.88	1800	17.28	10800	43.2	27000
Girasol	Sin radiación	2.88	1800	8.64	5400	43.2	27000
Pino	Sin radiación	0.288	180	0.864	540	1.056	660

Tabla 2. Dosis de radiación UV-B y tiempos de exposición de las semillas a la irradiancia constante de 1.5W/m².

Especie	Tratamiento						
	(T1) Testigo	(T2) Dosis Mínima KJ/m ²	tiempo(s)	(T3) Dosis Máxima KJ/m ²	tiempo (s)	(T4) DL50 KJ/m ²	tiempo(s)
Soya	Sin radiación	5.4	3600	43.2	28800	56.7	37800
Trigo	Sin radiación	1.35	900	8.1	5400	37.8	25200
Girasol	Sin radiación	1.35	900	0.27	180	8.1	5400
Pino	Sin radiación	0.63	420	0.99	660	1.17	780

Para la obtención de las dosis se realizaron ensayos preliminares en donde las semillas de cada especie fueron irradiadas con UV=B y UV-C durante diferentes tiempos: 0, 5, 10, 15, 30, 60 y 90 minutos, hasta llegar a un límite de 29 horas de exposición. Todos los tratamientos fueron evaluados mediante la prueba de germinación estándar de acuerdo con ISTA, (1999), donde se colocaron 100 semillas en papel seedburo k-22 previamente humedecido utilizando un diseño de bloque completo con un arreglo factorial con 4 repeticiones, colocados en cámara de germinación a 25±2°C. Se registraron el número de plántulas normales y anormales así como el número de semillas no germinadas, siguiendo la metodología de Moreno (1996) y Huron (2009). Los conteos se llevaron a cabo los primeros 5, 7, 8, 10 hasta 29 días para verificar la capacidad germinativa, además de las variables de longitud media de plúmula, radícula y peso seco.

4. RESULTADOS

El análisis de varianza efectuada sobre la prueba de G.E. (tabla 3) mostró diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) en lo referente al vigor de la plata entre las especies ($F=210.02$), con un promedio de 100%, 98.6, 76 y 55% respectivamente para la soya, el trigo, el girasol y el pino. Se destacó igualmente diferencias significativas entre los tratamientos con un valor $F=6.36$, y una interacción con $F=8.66$. Sin embargo, el análisis no reveló diferencias significativa ($p > 0.05$) entre *Glycine max* y *Triticum aestivum* con valores promedios 99.6 y 98.2% respectivamente.

Tabla 3. Valores promedio de las variables de la prueba de Germinación Estándar realizada en semillas de soya, trigo, girasol y pino irradiadas con UV-C.

TRAT	Vigor ± D.E.	Cap. Ger ± D.E	PN ± D.E	LMP ± D.E	LMR ± D.E	PS ± D.E
SOYA						
T1- Testigo	100±0 a	100±0 a	88±0.92 ab	16±1.52 a	19±1.31 a	2.7±0.15 a
T2-D mínima.	100±0 a	100±0 a	72±2.35 b	14±2.60 ab	19±1.27 a	2±0.24 a
T3-D.máxima.	100±0 a	100±0.46 a	76±1.59 b	12±1.05 b	19±0.75 a	2 ±0.37 a
T4- DL50	100±0 a	98.5±0.51 a	70±3.20 b	12.2±2.59 b	20.1±1.24 a	2 2.5±0.41 a
TRIGO						
T1- Test	96±0.99 a	96±0.92 a	92±2.23 a	9±0.97 c	14±1.42 bc	0±0.03 cd
T2-D mínima.	98.5 ± 0.74 a	97 ± 1.11 a	81 ± 1.16 ab	7.81 ± 0.58 c	4.5 ± 0.89 bc	0.2±0.03 cd
T3-D.máxima.	100±0.46 a	100±0.51 a	84±0.51 ab	8±0.81 c	15±0.97 bc	0±0.03 cd
T4- DL50	100±0.517 a	100±0.46 a	80±1.76 ab	8±1.34 c	14±0.88 bc	0±0.03 cd
GIRASOL						
T1- Test	72±1.38 b	68±1.55 b	40±2.43 c	7±1.66 c	11±1.88 c	0±0.12 cd
T2-D mínima.	76±1.59 b	76±1.58 b	40±3.10 c	7±2.14 c	14±1.27 bc	0±0.14 cd
T3-D.máxima.	76±3.33 b	72±3.52 b	36±2.81 cd	6±1.82 cd	16±7.82 ab	0±0.12 cd
T4- DL50	80±1.19 b	68±2.12 b	28±2.44 de	5±1.54 de	12±2.19 c	0±0.11 d
PINO						
T1- Test	72±1.77 b	72±1.77 b	36±2.56 cd	3±0.96 ef	4±0.48 d	2±0.70 a
T2-D mínima.	32±4.22 d	72±1.77 d	12±1.95 e	1±0.48 f	1±0.94 d	1±0.57 bc
T3-D.máxima.	64±4.40 bc	72±1.77 bc	32±3.13 cd	3±1.30 ef	4±0.74 d	2±0.75 a
T4- DL50	52±3.18 c	72±1.77 c	20±2.10 de	2±0.73 f	3±0.78 d	1±0.56 b

Vigor%=Vigor germinativo (%); GER %=Capacidad de germinación (%), PN= Plántulas Normales, LMP= Longitud Media de Plúmula, LMR= Longitud Media de Radícula y PS= Peso Seco. D.E=

Desviación estándar; Pc= Primer conteo; Sc= Segundo conteo. Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas (P<0.05).

Los valores promedio para PN fue mayor en trigo (84%), seguido de la soya (76.5%) y finalmente por el girasol y el pino (36 y 25% respectivamente), al igual que las variables anteriores ésta presentó diferencia significativa entre los tratamientos (F=13.55, P<0.01), especies con (F=304.4, P<0.01) y en su interacción con (F=2.76, P<0.01).

En las variables de LMP y LMR se presentaron diferencias significativas tanto entre los tratamientos como entre especies y en su interacción (Tabla V) con los valores promedios para soya 13.5 y 19.2 cm de longitud, en trigo con 8.2 y 14.3 cm, en girasol un 6.2 y 13.2 cm y para pino con 2.2 cm LMP y 3 cm LMR. Mientras el PS presentan promedios de 2.2 g para soya, en trigo obtuvo 0.07 g de promedio, en girasol 0 g, mientras que el pino tuvo 1.5 g de PS. Estas variables al igual que las anteriores mostraron diferencias significativas entre tratamientos con (F=12.12 y 13.3, P<0.01), entre especies (F=449.8 y 239.9, P<0.01) y su interacción con (F=2.68 y 6.98, P<0.01).

La comparación de valores medios, mostraron que las especies formaron grupos según la variable evaluada como en Germinación con (F=488.05, P<0.01) y en LMR con (F=30.62, P<0.01) donde el trigo y la soya son estadísticamente iguales y desde el punto de vista de PS donde el trigo y el girasol son estadísticamente iguales.

En esta investigación tomamos como dosis óptimas los tratamientos T3 correspondiente a la dosis máxima para las especies de soya, trigo, pino y girasol.

5. CONCLUSIONES

Para la radiación UV-C la dosis mínima para la Soya fue 1.44 KJ/m² en 900 segundos; para trigo y girasol 2.88 KJ/m² en 1800s; para pino 0.288 KJ/m² en 180s. Como dosis máxima para soya 43.2 KJ/m² en 2700s; para trigo 17.28 KJ/m² en 10800s; para girasol 8.64 KJ/m² en 5400s; para pino 0.864 KJ/m² en 540s. La dosis letal 50 (DL50) para soya 57.60 KJ/m² en 36000s; para trigo y girasol 43.2 KJ/m² en 27000s; para pino 1.056 KJ/m² en 660s.

Las dosis obtenidas en este estudio con radiación UV-B resultaron ser en semilla de soya como dosis mínima 5.4KJ/m² en 3600 segundos; para trigo y girasol 1.35 KJ/m² en 900s; para pino 0.63 KJ/m² en 420s. Como dosis máxima para soya 43.2 KJ/m² en 28800s; para trigo 8.1 KJ/m² en 5400s; para girasol 0.27 KJ/m² en 180s; para pino 0.99 KJ/m² en 660s. La dosis letal 50 (DL50) para soya 56.7 KJ/m² en 37800s; para trigo 37.8 KJ/m² en 25200s y girasol 8.1 KJ/m² en 5400s; para pino 1.17 KJ/m² en 780s.

Se considera como dosis óptima las correspondientes a las dosis máximas de radiación UV-C utilizadas en este estudio. Los efectos de esta sobre la germinación y vigor en las especies de soya, trigo y pino, fueron menos dañinos presentando los mayores beneficios para la especie de girasol con una dosis mínima de 2.88 KJ/m² en 1800s.

Se considera como dosis óptima las correspondientes a las dosis mínimas de radiación UV-B utilizadas en este estudio. Los efectos de esta sobre la germinación y vigor en las cuatro especies fueron favorables, donde se obtuvieron las mejores respuestas y menores daños en las plántulas.

Los efectos presentes en las plántulas de semillas irradiadas con UV-B y UV-C se manifestaron en soya como curvaturas y daño necrótico en el hipocotilo y entrecruzamiento de los cotiledones los cuales restringieron la emergencia del epicotilo, así como fisuras en la radícula. En el girasol se presentaron enroscamientos, fisuras y curvaturas del hipocotilo además de malformaciones y

rupturas de sus tejidos lo cual provocó crecimientos asimétricos. En pino se presentaron fisuras desde la base de la radícula y curvatura del hipocotilo.

Debido a que las radiaciones UV-C y UV-B afectan a la semilla y las plantas en sus funciones es necesario continuar con más estudios para poder entender con mayor eficiencia los efectos a largo plazo y poder garantizar la inducción de tolerancia a diferentes factores.

BIBLIOGRAFIA

1. C.L. Ballaré, M. Cecilia, P.S. Searles, J.G. Zaller, C.V. Giordano, T. Matthew, M.M. Caldwell, O.E. Sala, A.L. Scopel. Impacts of solar ultraviolet-B radiation on terrestrial ecosystems of Tierra del Fuego (southern Argentina): An overview of recent progress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 62, 2001, pp. 67–77.
2. L. Costa, A.R. Vicente, P.M. Civello, A.R. Chaves, G.A. Martínez. UV-C treatment delays postharvest senescence in broccoli florets. *Postharvest Biol. Technol.* 39, 2006 pp.204-210.
3. M.M. Caldwell, J.F. Bornman, C.L. Ballaré, S.D. Flint y G. Kulandaivelu . Los ecosistemas terrestres, el aumento de la radiación ultravioleta solar y las interacciones con otros factores del cambio climático. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2007, 6, pp. 252-266. DOI: 10.1039/B700019G.
4. J. Fonseca. Efecto de la luz UV-C en la calidad de hortalizas. *Revista Productores de Hortalizas. Meister Media Wordide. Vol. Primer trimestre 2009*, pp 15-20.
5. H. Frohnmeyer, D. Staiger. Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant Physiol.* 133, 2003, pp:1420–1428.
6. J.A. González, M. Rosa, M.F. Parrado, M. Hilal, F.E. Prado. Morphological and physiological responses of two varieties of a highland species (*Chenopodium quinoa* Willd.) growing under near-ambient and strongly reduced solar UV–B in a lowland location. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 96, 2009, pp: 144–151.
7. International Seed Testing Association (ISTA). International rules for seed testing 1999. *Seed Science and Technology* 27, Supplement. of vigor test methods. 2. ed. Zurich, 1995. 117 p.
8. B.R. Jordan. The effects of ultraviolet-B radiation on plants: a molecular perspective. *Advances in Botanical Research* 22, 1996 pp: 97–162.
9. N. Kacharava, S.H. Chanishvili, G. Badridze, E. Chkhubianishvili, N. Janukashvili. Effect of seed irradiation on the content of antioxidants in leaves of Kidney bean, Cabbage and Beet cultivars. *Australian Journal of Crop Science* 3(3), 2009 pp: 137-145.
10. T.D. Luckey. Hormesis with Ionizing Radiation. CRC press, Boca Raton. Mittler, R. (2005). Oxidative stress. 1980, Available from <http://www.ag.unr.edu/mittler/oxistress.pdf>.
11. E.M. Moreno. Análisis físico y fisiológico de semillas agrícolas. Tercera edición, UNAM. Ciudad Universitaria, México, D.F., 1996 pp 393.
12. G.M. Nawkar, P. Maibam, J.H. Parque, V.P. Sahi, S.Y. Lee, C.H. Kang. UV-Induced Cell Death in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 2013, pp:1608-1628, doi:10.3390/ijms14011608.
13. P. Rajesh, R. Rastogi, K. Ashok, B. Madhu, y P. Sinha. “Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair,” *Journal of Nucleic Acids*, vol. 2010, Article ID 592980, 32 pages, 2010. doi:10.4061/2010/592980.
14. R.P. Rastogi, A.R. Kumar, M.B. Tyagi y R.P. Sinha. Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair *Journal of Nucleic Acids*, Volume 2010, Article ID 592980, 32 pages DOI:10.4061/2010/592980.
15. D.M. Rivera, M. Gardea, A. Martínez, M. Rivera. Efectos Bioquímicos postcosecha de la irradiación UV-C en frutas y hortalizas. *Rev. Fitotec. Méx.* Vol. 30(4), 2007, pp: 361-372.

16. G.A. Ruiz López, A.G. Qüesta, S. Rodriguez. Efecto de luz UV-C sobre las propiedades antioxidantes y calidad sensorial de repollo mínimamente procesado. Rev. Iber. Tecnología Postcosecha Vol 11(1), 2010, pp: 101-108.
17. S.H. Sarghein, J. Carapetian y J. Khara. "The Effects of UV Radiation on Some Structural and Ultrastructural Parameters in Pepper (*Capsicum longum* A.DC.)," Turkish Journal Biology, Vol. 35, No. 1, 2011, pp. 69-77.
18. S.C. Sgroppo y C.A. Sosa. Zapallo Anco (*cucurbita moschata*, d.) Fresco Cortado Tratado con Luz UV-C. Facena, Vol. 25, pp. 7-19, 2009, 7 exa.unne.edu.ar/revisfacena/25/7-19.pdf
19. F.M.L. Tapia, R.E. Orellana y G.M.H. Castillo. Fotosensibilidad de Plantines de Trigo (*triticum aestivum* L.) expuestos a Radiación Ultravioleta del Tipo B. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Santa Rosa 11315, Santiago, Chile. Casilla 1004.
20. R. Thorsten. Ambient ultraviolet radiation induces protective responses in soybean but does not attenuate indirect defense. Environmental Pollution 155, 2008 pp: 290-297.

RESPUESTA BIOLÓGICA DEL CONSUMO DE PASTAS COMERCIALES TIPO ESPAGUETI ALTAS EN FIBRA MEDIDA POR BIOENSAYOS EN RATAS EN CRECIMIENTO

María del Refugio Falcón Villa, Kevin Ricardo Díaz Gálvez, Manuel Leonardo Contreras Chávez, Jesús Manuel Barrón Hoyos, Guadalupe Amanda López Ahumada

Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora.

RESUMEN

El desarrollo de nuevos productos altos en fibra se ha incrementado en los últimos años, esto atribuido principalmente a los efectos benéficos a la salud. La pasta es un alimento tradicional favorecido por ser fácil de transportar, manejar, almacenar y cocer. Las pastas comerciales entran dentro de estos nuevos productos altos en fibra. Aunque es reconocido el efecto beneficioso de la fibra en la dieta humana, un aumento en el consumo de estos productos altos en fibra puede afectar la respuesta biológica de su consumo. Esta investigación tiene como propósito evaluar el contenido de fibra dietética total en pastas comerciales tipo espagueti altas en fibra y evaluar su respuesta biológica mediante bioensayos en rata. Se seleccionaron 5 pastas comerciales tipo espagueti, se determinó proteína y fibra dietética. Los indicadores biológicos evaluados fueron, Digestibilidad (Materia Seca DMS, Aparente DNA y Verdadera DNV) y Razón Neta de Proteína (RNP). Las pastas analizadas tuvieron de 3.0-14.5% de fibra insoluble y 1.0-3.0% de fibra soluble. Se observó una disminución en las digestibilidades, a medida que aumentaba el contenido de fibra en las pastas, variando de 96.0-92.6% en DMS, de 89.3-86.5% en DNA y de 93.4-90.5 en DVN. En la respuesta de RNP se observó un aumento, aún en el consumo de la pasta con mayor contenido de fibra, variando de 1.85 a 2.25. El consumo de estas pastas comerciales, incluyendo las más altas en fibra, son recomendables, ya que estos productos, como fuente concentrada de fibra dietética no afectaron la utilización de la proteína de la dieta.

1. INTRODUCCIÓN

La pasta es un alimento tradicional favorecido por ser fácil de transportar, manejar, cocer y por sus propiedades de almacenamiento. En años recientes ésta se ha hecho más popular debido a sus propiedades nutricionales, ya que es considerada como un alimento de bajo índice glucémico (Tudorica et al. 2002; Goñi et al. 2003; Torres et al. 2007).

El cereal mas adecuado para la elaboración de la pasta es el trigo, ya que sus proteínas tienen la capacidad de interactuar entre ellas y con otros componentes como los lípidos para formar complejos de lipoproteínas viscoelásticas (gluten), que contribuyen al desarrollo de la masa y previenen la disgregación de la pasta durante la cocción en agua caliente. La sémola *durum*, producto granular color amarillo oscuro, de estructura vitrea resultante de la molienda del endospermo del grano de trigo durum, es la materia prima ideal para fabricar pasta de buena calidad (Granito et al. 2003).

Dentro de los cereales, el trigo es muy importante para la dieta alimentaria del pueblo mexicano, pues es la base para la elaboración de una gran variedad de productos. El consumo humano de este cereal no se realiza directamente, y requiere de un proceso previo de transformación que comienza con la molienda del grano para la obtención de la harina y otros subproductos como son

el salvado y salvadillo, los cuales tienen especial importancia por ser una de las mejores fuentes de fibra dietaria (Serna, 1996).

Los componentes de la fibra se encuentran concentrados en la envoltura de la cariósida o pericarpio; por lo tanto, los productos refinados adolecen de este tipo de compuestos dado a que son removidos en procesos de decorticado y molienda. Sin embargo, la industria procesadora actual está desarrollando alimentos suplementados con subproductos de molienda con el objeto de producir alimentos con alta cantidad de fibra dietética, debido a que la gente cada día se hace más conciente de la relación entre alimentos y salud (Serna, 1996).

Estudios han reportado que la fibra dietética disminuye la utilización de nutrientes, incluyendo proteína (Wong y Cheung, 2003). Dietas altas en fibra han mostrado que incrementan la excreción en nitrógeno fecal, disminuyendo la digestibilidad de nitrógeno dietario en humanos y en animales de laboratorio (Shah y col. 1982; Mariotti y col. 2001; Frias y Sgarbieri, 1998).

La producción de alimentos basados en granos enteros, ricos en fibra, aumentó en un 100% a nivel mundial. En el 2002 había solo 231 tipos de productos basados en granos enteros disponibles en el mercado mundial, para el 2010 el número se elevó a 3,272 (Feng, 2011).

El desarrollo de nuevos productos requiere de investigaciones analíticas que permitan identificar la cantidad óptima de los componentes de la fibra dietética, que aporte importantes beneficios para la salud. Es importante conocer si las cantidades y/o los tipos de los componentes de la fibra dietética presentes en estos productos altos en fibra, no alteran la digestibilidad y utilización de proteínas y en general la calidad de las proteínas de la dieta. Es importante que los resultados de estas investigaciones sean del conocimiento de los consumidores para que conozcan y puedan seleccionar aquellos productos altos en fibra, que además de aprovechar los beneficios de la fibra, no disminuyan la calidad proteica de la dieta.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Se seleccionaron del comercio local 5 pastas comerciales tipo espagueti 4 de ellas altas en fibra. Se realizó un análisis de composición química a todas las muestras por los métodos de la AACC, 2000. El contenido de fibra dietética se determinó por el método propuesto por Prosky et al., (1988), basado en el método 985.29. AOAC (1997).

Dietas experimentales. Se prepararon dietas experimentales empleando 2 pastas comerciales tipo espagueti altas en fibra como fuente de proteína y una dieta experimental de una pasta comercial tipo espagueti sin fibra como control; además se elaboró una dieta basada en caseína empleada como control de calidad proteica y una dieta basal que contiene todos los nutrientes excepto proteína a esta dieta se le denomina dieta libre de nitrógeno (DLN). Las dietas se elaboraron de acuerdo a la composición dada por el AOAC (1990). Todas las dietas experimentales y la dieta de proteína de caseína se elaboraron basándose en el contenido de nitrógeno total de las pastas de prueba, calculando para que estas dietas obtengan un 10% de proteína (Hackler, 1978).

Bioensayo en ratas. El estudio de alimentación de 14 días se realizó con 40 ratas Sprague Dawley recién destetadas, de 21- 23 días de edad, con peso promedio de 45-55 g, las ratas fueron proporcionadas por la Unidad de Experimentación Animal del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora. Se pesaron las ratas y se distribuyeron en bloques al azar en 8 grupos de 4 ratas, los cuales se emplearon para cada una de las dietas experimentales y se mantuvieron en forma individual en jaulas de acero inoxidable con malla en la base. La dieta y el agua se suministraron ad-libitum, la temperatura del laboratorio fue de 25 °C, con una humedad relativa de 65-80%, y ciclos de iluminación de 12 h luz-oscuridad. El experimento de alimentación se repite ocho veces para un mismo lote de dieta experimental.

Digestibilidad de Materia Seca (DMS). La digestibilidad de materia seca se obtiene de la relación del alimento total consumido menos el peso de las heces excretadas con respecto al alimento total consumido (Church y Pond, 1974).

Digestibilidad In vivo. Se determinó la digestibilidad Aparente (DA) y verdadera (DV). La DA considera la cantidad de alimento digerido, calculado por la diferencia entre el alimento consumido y lo eliminado por el animal. La DV se determina considerando el nitrógeno excretado en heces proveniente del recambio metabólico, éste se determina en las heces del grupo de animales mantenidos con la dieta libre de nitrógeno, durante el desarrollo del experimento. (Pellet, 1980).

Determinación de Razón Neta de Proteína (RNP). Es calculado por las variaciones en peso, este coeficiente considera la eficiencia de la proteína en el mantenimiento y crecimiento del animal experimental. El aumento en peso por el consumo de las dietas experimentales es medido cada tercer día durante los 14 días del experimento, Bender y Doell (1957).

Análisis Estadístico. Para el análisis estadístico de los bioensayos de las dietas experimentales de las pastas comerciales tipo espagueti altas en fibra, se realizará un análisis de varianza en bloques con un nivel de significancia de 5 %, seguido de una comparación de medias por el método de Tukey ($\alpha \leq 0.05$) utilizando para ello, el paquete estadístico JMP versión 5.0 (2002).

3. RESULTADOS

Contenido de Proteína y Fibra Dietética. De las pastas comerciales tipo espagueti altas en fibra analizadas las RO y WW mostraron valores altos de proteína de 15.0% y la pasta BA presentó 13.15%. Estos resultados fueron similares a los reportados por Granito et al. (2003) quienes reportaron valores de proteína de 14.4% en pastas basadas en sémola de trigo, mientras que Torres et al. (2014) y Granito et al. (2014) reportaron valores promedio de 16.29% de proteína.

El contenido de fibra dietética total de estas pastas comerciales tipo espagueti varió de 4.0% para la pasta basada en sémola de trigo y de 8.2% a 17.5% para pastas elaboradas con trigo entero. Esta diferencia se puede explicar en términos de las proporciones de los ingredientes empleados en su formulación. Estos valores concuerdan con los resultados obtenidos por Granito y Ascanio (2009) quienes reportaron 4.1% de fibra total para pasta de sémola de trigo; Granito et al. (2003) desarrollaron pastas basadas en trigo, maíz, yuca y frijol, presentando valores de fibra desde 4.16% hasta 14.6%, resultados similares a los reportados en este estudio.

Los resultados mostraron que las pastas comerciales adicionadas con salvado de trigo tuvieron los mayores contenidos de fibra dietética insoluble que varió de 8.2% a 17.5%. En cambio la pasta basada en sémola e trigo mostró el valor más bajo de fibra insoluble (3.0%).

El contenido de fibra dietética soluble para estas pastas varió de 1.0% para la pasta basada en sémola de trigo a 3.0% para la pasta con salvado de trigo.

Calidad de la proteína mediante bioensayos en ratas. La digestibilidad de la materia seca es un indicador de la capacidad nutricional de los alimentos, la cual proporciona información de la absorción de todos los nutrientes presentes en el producto evaluado y su posible asimilación. En esta investigación las dietas basadas en pastas comerciales mostraron valores de % de digestibilidad de materia seca de 92.6% – 96.0%, la dieta de la pasta sin fibra mostró el mayor valor, presentando diferencia significativa con respecto a los valores obtenidos por las dietas de las pastas altas en fibra.

Una de las determinaciones biológicas más importantes en la calidad de los alimentos es la digestibilidad de nitrógeno, esta determinación es un indicador que revela una de las características de la calidad nutricional de los alimentos desde el punto de vista de absorción de nutrientes. La digestibilidad es un indicador de la calidad de la proteína, representa la proporción

de la proteína de la dieta que es digerida y absorbida por el animal de experimentación. Entre las dietas experimentales la dieta de la pasta sin fibra registró los valores más altos de digestibilidad de nitrógeno aparente (DNA) y verdadero (DNV) de 88.3% y 93.4% respectivamente, resultados menores a los encontrados para una pasta de sémola, las cuales variaron en un rango de 95.47% a 98.55%, de acuerdo con Granito y Torres, 1998. Entre las dietas elaboradas con pastas altas en fibra, la dieta de la pasta con mayor contenido de FDT, presentó los valores más bajos de DNA y DNV (86.5 a 90.5%, respectivamente). Aparentemente, dietas con altos % de FDT registraron baja digestibilidad de nitrógeno. En general tanto la DNA y la DNV mostraron una relación inversa con respecto al % de FDT de estas pastas comerciales, durante los 14 días del bioensayo, por lo que altos contenidos de FDT ejerce un efecto negativo, causando una reducción significativa en el % de digestibilidad de nitrógeno (Tabla 1).

El método de razón neta de proteína (RNP) se fundamenta en que existe una relación lineal para el incremento de peso del animal en función de la calidad de la proteína consumida. Los resultados de RNP mostraron una calidad de proteína baja para estas pastas comerciales con fibra, en relación con la dieta control de caseína. Las dietas de las pastas comerciales presentaron valores de RNP de 1.85 - 2.25 unidades de RNP. La dieta basada en la pasta con mayor contenido de fibra dio el valor más alto de RNP (2.25). La dieta de la pasta sin fibra mostró el valor más bajo de RNP (1.85). Estos resultados concuerdan con los reportados por Granito y Torres, 1998, quienes reportaron un valor de 1.88 para una pasta basada en sémola de trigo y un valor de 2,58 para pastas a las cuales se le adicionó materias primas subutilizadas. (Tabla 1).

A pesar de la reconocida baja calidad de la proteína en los cereales como fuente de proteína en la dieta de humanos, estos productos de pastas comerciales mostraron una aceptable calidad proteica, medida como Razón Neta de Proteína en bioensayos en ratas. Los resultados de estos bioensayos mostraron que la pasta alta en fibra presentó diferencia significativa en la utilización de la proteína medida como RNP, en comparación a la pasta basada en sémola de trigo como ingrediente principal. Este estudio mostró la variabilidad en la calidad de la proteína que puede ser encontrada en productos con determinadas cantidades de fibra.

Tabla 1. Consumo de Nitrógeno, Nitrógeno en Heces, Peso Ganado, Consumo de Proteína, % Digestibilidad de Nitrógeno Aparente (DNA) y Verdadera (DNV) y Razón Neta de Proteína (RNP) de Dietas Elaboradas con Pastas Comerciales tipo Espagueti Altas en Fibra, Medido en Bioensayos en Ratas.

Dietas	Consumo Nitrogeno (g)	Nitrógeno en Heces (g)	Peso Ganado (g)	Consumo Proteína (g)	DNA %	DNV %	RNP _c
BA	1.51 ^a	0.15 ^b	9.15 ^b	9.10 ^a	89.3 ^a	93.4 ^a	1.85 ^c
RO	1.40 ^b	0.16 ^b	9.65 ^b	9.30 ^a	88.7 ^a	93.0 ^a	1.92 ^b
WW	1.54 ^a	0.20 ^a	13.32 ^a	9.10 ^a	86.5 ^b	90.5 ^b	2.25 ^a
Caseína	2.45	0.25	49.70	15.26	89.81	92.06	4.29

Valores con diferente letra en la misma columna presentan diferencia significativa (p < 0.01). Los valores son promedio de ocho determinaciones. Peso de heces en base seca.

4. CONCLUSIONES

Las pastas comerciales tipo espagueti mostraron diferencias significativas en el contenido de FDI y FDS. Estas diferencias son muy probablemente debidas a las proporciones de los ingredientes empleados para la elaboración de estos productos. El posible efecto adverso de estas fuentes de fibra dietética sobre la calidad de la proteína de la dieta, empleando bioensayos en ratas, mostró influencia en la digestibilidad de la proteína pero no en la utilización de la proteína medida como Razón Neta de Proteína. El consumo de estas pastas comerciales es ampliamente recomendado, especialmente los elaborados con salvado de trigo por sus altos contenidos de FDI y proteína.

BIBLIOGRAFÍA

1. AACC, "Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists", 8a Ed. The Association, St. Paul, MN. 2000.
2. AOAC, "Official Methods of Analysis of AOAC", 16 th ed. Vol. 1, Sec. 12.1.07, Method 960.52. 1997.
3. A. E. Bender & B. H. Doell, "Biological evaluation of protein: A new concept", Brit. J. Nutr, Vol. 11, 1957, pp.140-148.
4. D.C. Church & W.G. Pond, "Basic animal nutrition and feeding," *Basic animal nutrition and feeding.*, 1974, pp. 1-2.
5. T. Feng, "Present status and prospects for cereal product development in China", Cereal Foods World, Vol. 56, 6, 2011, pp. 252-255.
6. A.C.D. Frias & V.C. Sgarbieri, "Guar gum effects on food intake, blood serum lipids and glucose levels of Wistar rats", Plant Foods for Humans Nutrition, Vol. 53, 1988, pp.15-28.
7. I. Goñi & C. Valentin-Gamazo, "Chickpea flour ingredient slows glycemic response to pasta in healthy volunteers", Food Chemistry, Vol. 81, 4, 2003, pp. 511-515.
8. M. Granito & V. Ascanio, "Desarrollo y transferencia tecnológica de pastas funcionales extendidas con leguminosas", Archivos Latinoamericanos de Nutrición, Vol. 59, 1, 2009, pp. 71.
9. M. Granito, S. Pérez & Y. Valero, "Calidad de cocción, aceptabilidad e índice glucémico de pasta larga enriquecida con leguminosa", Revista Chilena de Nutrición, Vol. 41, 4, 2014, pp. 425-432.
10. M. Granito, A. Torres & M. Guerra, "Desarrollo y evaluación de una pasta a base de trigo, maíz, yuca y frijol", Interciencia, Vol. 28, 7, 2003, pp. 372-379.
11. M. Granito, A. Torres & M. GUERRA, "Elaboración de pastas a partir de la sustitución de sémola de trigo por materias primas subutilizadas", Rev. Tec. Ing. Univ. Zulia, Vol. 21, 1998, pp. 195-203.
12. L. R. Hackler, "An Overview of the AACC/ASNT Collaborative Study Protein Quality Evaluation", Food Tech., Vol. 12, 1978, pp. 62-64.
13. F. Mariotti, M.E. Pueyo, D. Tomé, R. Benamouzig & S. Mahé, "Guar gum does not impair the absorption and utilization of dietary nitrogen but affects early endogenous urea kinetics in humans", Am J Clin Nutr., Vol. 74, 2001, pp. 487-493.
14. P.L. Pellett & V.R. Young, "Nutritional evaluation of protein foods", Food and Nutrition Bulletin, 1980 (Suppl. 4).
15. SAS. JMP. "A Bussiness Unit of SAS". Version 5.0.1 by Statistical Analysis System, Institute Inc. Cory. NC, USA. 2002.
16. S. S. R. Serna, S. S. R. *Química, Almacenamiento e Industrialización de los Cereales*. Ed. A.G.T. Editor, S.A. México. 1996, pp. 288-292, 439-443

17. N. Shah, M.T. Atallah, R.R. Mahoney & P. L. Pellett, "Effect of dietary fiber components on fecal nitrogen excretion and protein utilization in growing rats", *Journal of Nutrition*, Vol. 112, 1982, pp. 658-66.
18. A. Torres, J. Frias, M. Granito & C. Vidal-Valverde, "Germinated *Cajanus cajan* seeds as ingredients in pasta products: Chemical, biological and sensory evaluation", *Food Chemistry*, Vol. 101, 1, 2007, pp. 202-211.
19. A. Torres, J. Parra, D. Rojas, R. Fernández-Gómez & Y. Valero, "Efecto de la suplementación de sémola de trigo con *Arthrospira platensis* sobre calidad, aceptabilidad y composición física y química de espaguetis, VITAE (01214004), Vol. 21, 2, 2014.
20. C. M. Tudorica, V. Kuri and C.S. Brennan, "Nutritional and physicochemical characteristics of dietary fiber enriched pasta", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 50, 2002, pp. 347-356.
21. K.H. Wong & P.C.K. Cheung, "Effect of fiber-rich brown seaweeds on protein bioavailability of casein in growing rats", *International Journal of Food Science and Nutrition*, Vol. 54, 4, 2003, pp. 269-279.

DIFUSIÓN DEL SISTEMA MILPA INTERCALADA CON ÁRBOLES FRUTALES

Carmen A. Hernández¹ y Andrés Zambada Martínez¹

1 INIFAP- Campo Experimental Cotaxtla.

RESUMEN

El sistema milpa intercalada con árboles frutales (MIAF), es una tecnología de producción agrícola para pequeños productores desarrollada por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias y el Colegio de Posgraduados, se ha llevado a cabo en zonas templadas, en menor medida en zonas tropicales, el presente trabajo es un diagnóstico basado en encuestas a asistentes de eventos demostrativos a través de los cuales se ha buscado difundir esta tecnología en la región de los Tuxtla en el estado de Veracruz; la asistencia a los eventos de difusión de 2013, 2014 y 2015 es de entre 100 y 150 personas agricultores, técnicos y estudiantes; en dos años se han aplicado encuestas a un 30 % de los asistentes al evento, para evaluar la aceptación de esta tecnología en la región, los resultados indican que al evento han acudido de 20 localidades de los municipios de San Andrés y Santiago Tuxtla principalmente. Los asistentes señalan un 37.5 % de los asistentes han acudido al evento al menos 3 veces; de los componentes del MIAF, el que gusta más es la producción de maíz; aunque el 95 % de los asistentes está interesado en implementar este sistema no se ha podido dar una adopción masiva en las fincas de los productores pues el 56.2% señalan que la principal dificultad del sistema es la adquisición de planta y un 29 % la falta de recursos económicos. En general los eventos demostrativos han sido calificados como "buenos", en cuanto a calidad de información y atención a usuarios; lo que hace que la tarea de la adopción de tecnologías deba ir acompañada de otros factores además de los eventos demostrativos.

1. INTRODUCCIÓN

La historia del sistema MIAF, comienza como una alternativa ecológica para la producción agrícola de zonas montañosas; las cuales se han caracterizado por ser propiedad de pequeños productores de no más de 5 hectáreas, los cuales basan su producción en cultivos básicos como maíz y frijol, tratando de conservar sus variedades criollas o tradicionales la introducción de nuevos conocimientos, siempre ha sido una limitante; sin embargo en la actualidad nos encontramos con nuevas generaciones y problemas más acentuados relacionados con la baja productividad del suelo, erosión y pérdida de materia orgánica; con ello el desabasto en alimentos basado en la falta de integración de las nuevas generaciones al ámbito productivo en la agricultura local y a estragos climatológicos que perjudican a la producción, al ambiente, la población y el desarrollo económico de un lugar.

Aunque se ha tratado de promover el sistema de cultivo intercalado con árboles frutales ha sido poco el grado de multiplicación de estos ejemplos y experiencias adecuadas para zonas montañosas con un enfoque ecológico que permita conservar los suelos, evitar escurrimientos y con ello los derrumbes o desprendimientos de tierra que ocasionan daños en las vías de comunicación, decesos humanos y pérdidas económicas cuantiosas; podríamos citar muchas de las ventajas de este sistema; pero más que nada es hora de hablar de compromisos y acciones de aquellos que podemos participar en ello.

Rol de las instituciones participantes

INIFAP.

A través del módulo experimental presenta opciones de frutales adaptados a la zona, así como el conocimiento técnico para hacer frente a las necesidades de innovación y tecnología que se requieran. Amplio conocimiento y experiencia en variedades o híbridos de maíz y frijol para la zona central de Veracruz.

Organización de Productores.

Consolidar un grupo de trabajo son los aspectos más cruciales para el éxito de un proyecto productivo, pues del trabajo en grupo pueden derivarse beneficios en común y ayuda mutua entre los integrantes, los cuales requieren capacitación constante para ir avanzando y consolidándose; a través del aprendizaje que conlleva aciertos y tropiezos; sin embargo persevera el espíritu de interés e iniciativa para buscar mejorar sus condiciones de vida, el entorno, su economía, alimentación y proveer a la sociedad alimento, servicios ambientales y activación de la economía en medida del crecimiento que se tenga.

Instituciones municipales y estatales relacionadas con el agro.

Aquellas encargadas de salvaguardar los recursos naturales, económicos productivos y a la sociedad misma con miras a proveerle las herramientas necesarias para desarrollarse en el aspecto social, económico y productivo; así como facilitar el aprovechamiento de los recursos a su alcance para generar una sociedad equilibrada en el entorno en que se desarrolle; si bien es cierto la política gubernamental en curso tiene a bien la puesta en marcha de la cruzada contra el hambre, las instituciones que aquí la representan pueden favorecer la aplicación del sistema MIAF, en la zona de los Tuxtlas, a través de favorecer la multiplicación y reproducción de esta tecnología con los productores interesados.

2. TEORÍA

En una evaluación de aceptación formal de la tecnología ya podemos considerar la integración de variables asociadas a la incertidumbre del comportamiento y del entorno (confianza y riesgo percibido) con los constructos de la aceptación de la tecnología (utilidad, facilidad de uso y actitud) para explicar de qué depende la adopción de las redes sociales por parte de los individuos (Lorenzo *et al.*, 2011). Hablando de tecnología o innovaciones aplicables físicas a los parámetros pueden aplicar pues los productores también conciben las mismas preocupaciones.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Los eventos demostrativos consisten en programar una fecha apropiada en que pueda mostrarse los avances en investigación y los módulos o parcelas donde se tiene físicamente los componentes de la innovación; en el caso del MIAF encontramos un módulo demostrativo ubicado en la localidad de Axochio, Municipio de San Andrés Tuxtla en el Estado de Veracruz, el módulo es 1.2 Has en las cuales se tienen establecidos en sistema MIAF lo siguiente:

Cuadro 1. MIAF establecido en módulo experimental Axochio.

Número	Sistema de manejo ^z	Año de establecimiento	Especie frutal	Patrón anual de cultivos ^y	Labranza ^x
1	MIAF	2003	Chicozapote	M - M	Mínima - TM
2	MIAF	2003	Chicozapote	M - F	Mínima - TM
3	MIAF	2011	Limón persa	M - M	Mínima - TM
4	MIAF	2011	Limón persa	M - F	Mínima - TM
5	MIAF	2011	Carambolo	M - M	Mínima - TA
6	MIAF-LC	2011	Carambolo	M - M	Sin
7	LT-SF	2003	No aplica	M - M	Mínima - TM
8	LT-CF	2003	No aplica	M - M	Mínima - TM

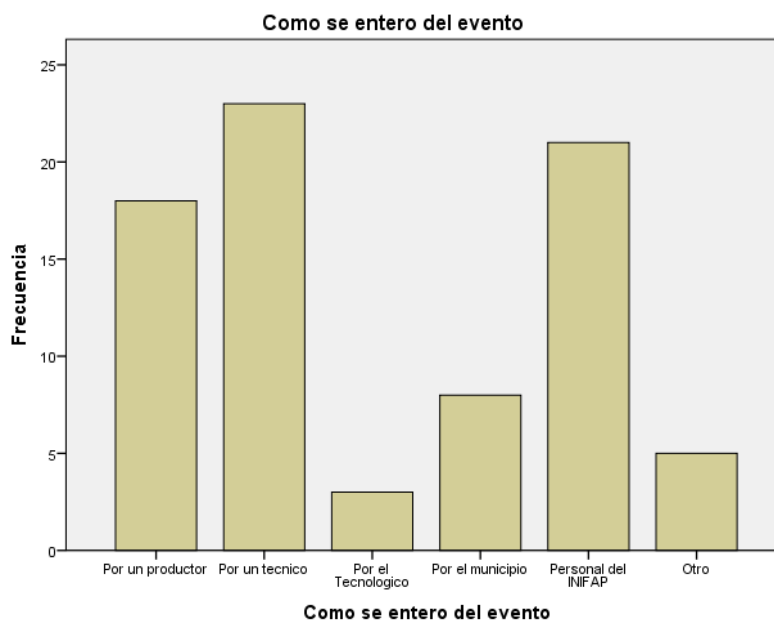
^z MIAF: milpa intercalada en árboles frutales, LC: labranza de conservación, LT: labranza tradicional, SF: sin fertilización, CF: con fertilización. ^y M - M: maíz sucesión maíz y M - F: maíz relevo frijol. ^x TM: tracción mecánica y TA: tracción animal.

En estas parcelas se muestra el MIAF, con frutales diferentes y el sistema al que el productor está acostumbrado que serían las parcelas con maíz tradicional; así pues en los eventos se tiene una afluencia de 100 a 150 personas, por lo que nuestra muestra correspondió a 30 encuestados en 2013 y 48 encuestados en 2015; las preguntas fueron las mismas en ambos años; con el fin de conocer los avances o el posicionamiento de esta tecnología en la región.

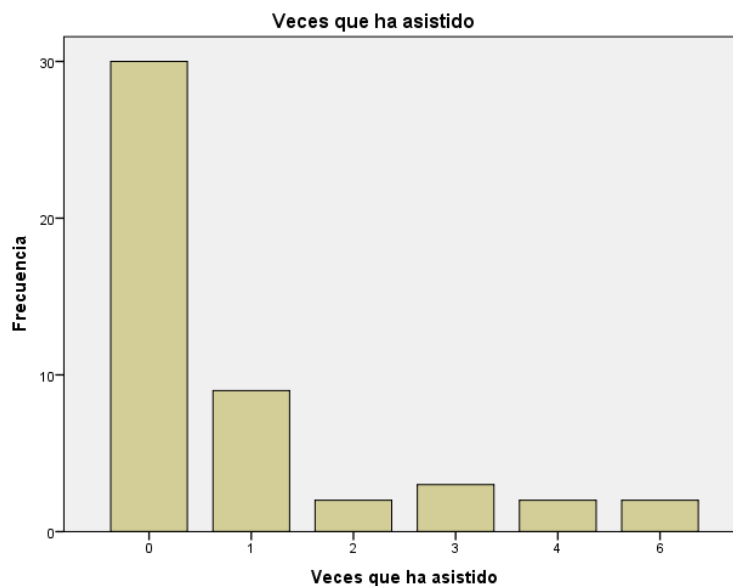
4. RESULTADOS

En el caso de la agricultura el productor considera como riesgo el involucrarse en trabajo, tiempo y recurso económico a una innovación o nueva tecnología.

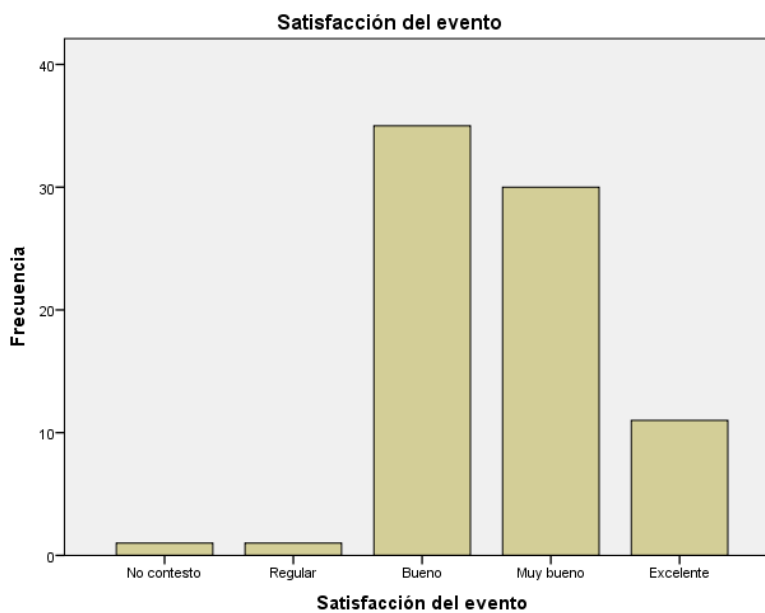
Basado en la encuesta obtuvimos lo siguiente:



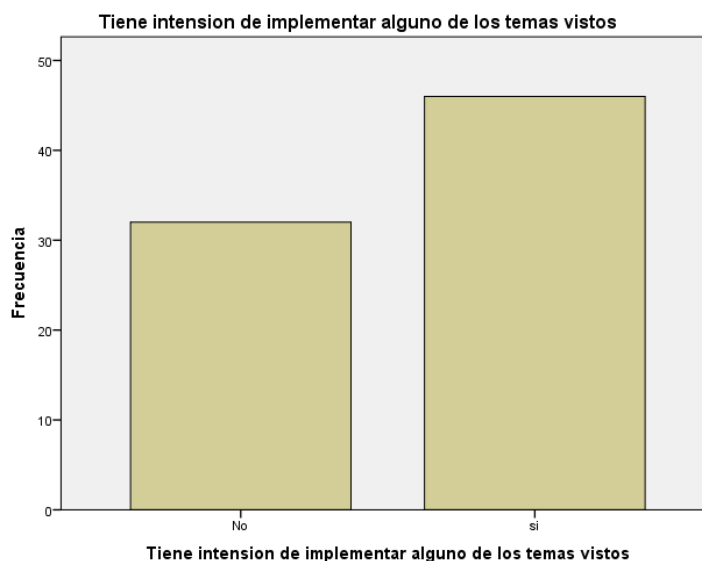
La labor de difusión del INifap es representativa sin embargo los técnicos y los productores de la zona son los principales encargados de invitar o garantizar la afluencia de productores.



El número de veces que ha asistido se convirtió en una pregunta importante para ver si no año con año se recibía a los mismos concurrentes, lo que reduciría el impacto que se está teniendo.



Sin lugar a dudas era también importante evaluar si la calidad del evento es Buena ante los receptores.



Finalmente la aplicación o disposición a realizar las innovaciones transmitidas es crucial para considerar como una innovación adoptada.

5. CONCLUSIONES

La difusión de una tecnología o conocimiento práctico como lo representa el sistema MIAF; el cual abarca la parte ambiental: conservación de suelos y reforestación, la parte productiva y económica: producción de cultivos frutales, maíz, frijol y otros; la parte social: suficiencia alimentaria, generación de autoempleo y desarrollo de capacidades; debe estar en una plataforma exclusiva para motivar el interés no solo del pequeño productor; sino de jóvenes o productores que conscientemente aceptan la idea de adoptar un sistema de producción complejo.

Así mismo la metodología de evento demostrativo será siempre el mejor ejemplo físico y palpable del logro de un sistema de producción; pero requiere considerar la parte de dirigirse a organizaciones de productores, productores consientes, productores lideres e innovadores o partir de una concientización y organización cimentada en principios como ayuda mutua, trabajo y colaboración que ayuden a que el sistema funcione en grupo y no como casos aislados. Profundizar un estudio de adopción que contenga parámetros de Uso de los componentes de la tecnología; grado de utilidad percibida, actitud o respuesta al cambio o empleo de la tecnología, grado de intensión de uso, riesgo percibido, confianza.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lorenzo R. C., Ma. C. Alarcón A. y M.A. Gómez B. 2011. Adopción de redes sociales virtuales: ampliación de modelo de aceptación de la tecnología integrando confianza y riesgo percibido. Cuadernos de economía y dirección de la empresa.
2. Albors G. J. y X Molina M. 2001. La difusión de la innovación factor competitivo en redes interorganizativas. El caso de la cerámica de Valencia. Economía Industrial 3(39): 167-175

INTEGRIDAD DE LAS VELLOSIDADES INTESTINALES EN BECERROS HOLSTEIN INFECTADOS NATURALMENTE POR *Cryptosporidium* spp. SOMETIDOS AL TRATAMIENTO DE FERMENTOS DE *Saccharomyces cerevisiae*

Sonia Vázquez Flores^a, María de Jesús Guerrero Carrillo^b, Carolina Guizar Bravo^a, Ana Patricia Baños Quintana^a, Paola Jazmin Aranda Vargas^b.

^aESIABA-Tecnológico de Monterrey-Campus Querétaro, Querétaro, Qro. ^bFacultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue caracterizar la integridad de las vellosidades intestinales en becerros neonatos naturalmente infectados con *Cryptosporidium* spp., que fueron sometidos a un suplemento diario de fermentos de *Saccharomyces cerevisiae* durante 28 días. El estudio se llevó a cabo en un establo lechero en Querétaro, donde se seleccionaron 15 becerros desde el nacimiento para uno de tres grupos de estudio: (T1) fermentos de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*; (T2) manano-oligosacáridos; y (C) maltodextrina. Al final del estudio los becerros fueron sacrificados humanitariamente obteniéndose muestras de duodeno, yeyuno e íleon para análisis histopatológico. Los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina, observándose al microscopio a 40X. Se analizaron 10 campos por corte para identificar las dimensiones (largo y ancho) de las vellosidades intestinales y criptas, realizándose una clasificación por integridad: enrasadas, fragmentadas y atrofiadas. El número de vellosidades por campo varió entre 10.1 y 12.5, siendo menor el número en C (valor $p < 0.05$). El duodeno fue similar en cuanto a integridad, mientras que T1 fue más larga y ancha que en T2 y C. En relación con el yeyuno e íleon, el T1 presentó menos vellosidades fragmentadas y atrofiadas, y más íntegras (valor $p < 0.05$). En el íleon T1 y T2 fueron diferentes al C (valor $p < 0.0001$) en dimensión de las criptas. *Cryptosporidium* spp. estuvo presente en 80×10^3 a 4×10^9 oocistos/ml en todos los becerros. El producto muestra resultados prometedores para defenderse de la destrucción del protozoario.

1. INTRODUCCIÓN

Cryptosporidium spp. es un género de protozoarios que infectan a los enterocitos de toda clase de vertebrados. Estos parásitos son causantes de infección gastro-intestinal auto-limitante en individuos inmunocompetentes; sin embargo, la infección puede volverse crónica e incluso causar la muerte en individuos inmunodeprimidos (Ryan y Xiao, 2014). Desde las primeras observaciones de *Cryptosporidium parvum* hechas por Tyzzer en 1907, estos parásitos no se consideraron relevantes hasta la década de 1980, cuando los casos de criptosporidiosis se comenzaron a ligar con diarreas crónicas en pacientes diagnosticados con VIH/SIDA (Tzipori y Widmer, 2008). A pesar de los grandes avances en la caracterización genómica y el estudio del ciclo de vida del parásito, la criptosporidiosis continúa siendo un problema de salud serio especialmente para los niños que habitan en países en vías de desarrollo (Caccio y Widmer, 2014).

La criptosporidiosis puede ser transmitida por diferentes hospederos, siendo los animales los más importantes reservorios del parásito para los humanos. Junto con *Eimeria* spp. y *Giardia* spp., es uno de los tres protozoarios más prevalentes en becerros lactantes en México (Vázquez-Flores, 2011). Este patógeno es una de las causas más frecuentes de enfermedades transmitidas por el agua. Los países en desarrollo pueden estar en mayor riesgo de infección debido a un mal

tratamiento de agua y de higiene de los alimentos, aunque la criptosporidiosis está distribuida mundialmente (Clancy y Hargy, 2008).

2. TEORÍA

Se han desarrollado múltiples investigaciones para identificar tratamientos efectivos contra criptosporidiosis en humanos. Actualmente, los casos crónicos se tratan con agentes quimioterapéuticos y terapia antirretroviral de alta actividad (HAART por sus siglas en inglés), obteniendo esta última los mejores resultados en pacientes inmunocomprometidos (Stockdale *et al.*, 2008). En animales, los estudios para probar tratamientos contra *Cryptosporidium* spp. se han hecho principalmente en roedores de laboratorio y rumiantes. Se ha demostrado que el lactato de halofuginone, uno de los principales productos utilizado actualmente como preventivo, tiene una actividad limitada contra el parásito, uno de los inconvenientes es que es un poderoso inmunosupresor (Almawly *et al.*, 2013; Chu *et al.*, 2015). Los tratamientos con decoquinatos no han logrado un control eficiente sobre *Cryptosporidium* spp., probablemente porque estos compuestos actúan sobre la mitocondria. A diferencia de otros organismos apicomplexa que poseen tres secuencias del genoma (nuclear, mitocondrial y apicoplasto), *Cryptosporidium* spp. presenta únicamente genoma nuclear y un organelo rudimentario denominado proto-mitocondria (Kissinger, 2008). Las medidas preventivas en humanos y animales consisten en disminuir el contacto con oocistos viables a través de la limpieza y desinfección de áreas de contacto, así como el cuidado de la higiene en los alimentos y fuentes de agua (Stockdale *et al.*, 2008).

Los productos de fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* (SCFP, por sus siglas en inglés) son conocidos aditivos alimentarios, utilizados ampliamente en la dieta de rumiantes para beneficiar la fermentación ruminal y su rendimiento productivo. Se ha demostrado que estimulan el crecimiento de bacterias ruminales (Callaway y Martin, 1997) así como el desarrollo del rumen y longitud de las papilas en becerros lecheros (Brewer *et al.*, 2014). Además, diversos estudios de becerros lecheros, lechones y pollos demuestran que la incorporación de con SCFP a la dieta incrementa la función inmune inespecífica (Magalhães *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2009). Aun cuando su funcionamiento no está claro, se ha encontrado que la suplementación con SCFP en becerros lecheros incrementa significativamente la producción láctea (Poppy *et al.*, 2012); sin embargo, el efecto de SCFP en el desarrollo de las vellosidades intestinales de rumiantes aún no se encuentra esclarecido, aunque se ha encontrado que en lechones favorecen el desarrollo de la mucosa intestinal y la proliferación de macrófagos relacionados con un intestino saludable (Bontempo *et al.*, 2005).

Existe una amplia gama de condiciones que pueden modificar la estructura de las vellosidades intestinales y las criptas intestinales (Chen, 2002). *Cryptosporidium parvum* genera cambios histopatológicos en la vellosidad intestinal que afectan la absorción de nutrientes. Entre ellos están el enrasamiento y atrofia del enterocito, además de hiperplasia de la cripta e inflamación de la lamina propia (Tarver, 1998). Estas vellosidades se pueden modificar por el uso de probióticos como es el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pediococcus* spp. y *Bacillus* spp. La vellosidad intestinal en lechones se observó elongada y con hiperplasia en la cripta sin relación con un proceso patológico. Este cambio se considera benéfico, dado que permite responder inmunológicamente a los retos bacterianos y virales que pueden causar una disbiosis transitoria (Domeneghini, 2006). El efecto de SCFP en el desarrollo del epitelio intestinal podría encontrar nuevos beneficios para rumiantes relacionados con su sistema inmune y defensa contra patógenos, en particular en condiciones de infección natural de criptosporidiosis.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Animales de estudio

El estudio se llevó a cabo en un establo lechero de 1100 vacas en producción en Querétaro, México. 15 becerros Holstein fueron removidos de sus corrales de parto y asignados aleatoriamente a sus becrreras individuales recibiendo uno de tres tratamientos: el primero consistió de un producto de fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* (T1); el segundo, de un suplemento comercial con manano-oligosacáridos (MOS) y levaduras (T2); y finalmente maltodextrina como control (C). Los tratamientos fueron suministrados en calostro, leche y concentrado pre-iniciador diariamente por 28 días.

Muestreo y análisis de secciones intestinales

Al finalizar el periodo neonatal los becerros fueron sacrificados humanitariamente en las instalaciones del establo, y trasladados a la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. Al realizar la necropsia, de inmediato se tomaron muestras de duodeno, yeyuno e íleon para el análisis histopatológico. Consecutivamente, las muestras de intestino delgado se aislaron para su perfusión con formol al 10% para fijar las vellosidades. Todas las muestras fueron sometidas a una tinción con hematoxilina-eosina (HE).



Diagrama 1. Preparación de muestras de intestino delgado para análisis histopatológico.

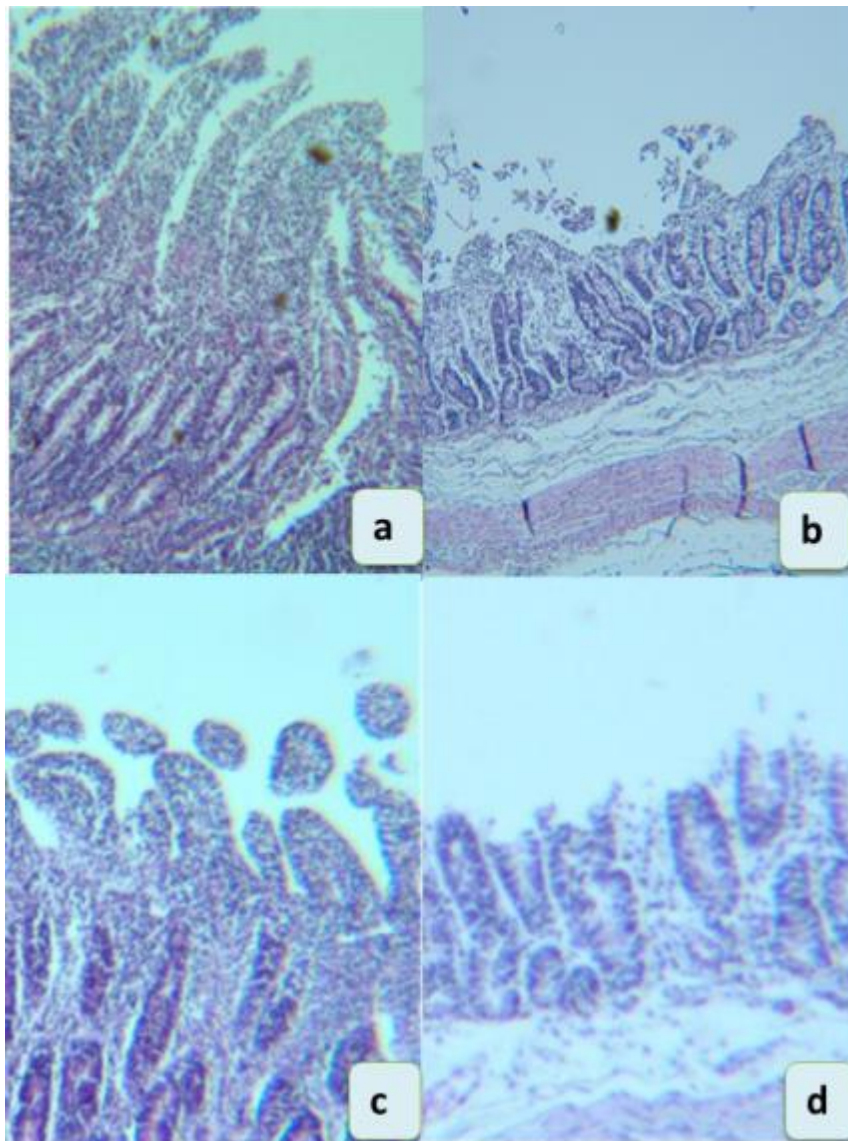
El examen histológico fue realizado en un microscopio óptico Carl Zeiss a 40x con el software Zen para el procesamiento de las imágenes en el sistema operativo Windows 7. Primero, se seleccionaron 5 campos por corte de intestino delgado, dando un total de 75 campos por corte y por animal. Para la selección del campo focal, se utilizó aquel con la mayor cantidad de vellosidades intestinales íntegras. Una vez seleccionado el campo, se midieron el largo y ancho de las vellosidades intestinales y la altura de las criptas; para ello, se eligieron de 5 a 3 vellosidades intestinales y de 5 a 3 criptas que presentaran la mayor integridad. Se midieron longitud y ancho de la vellosidad intestinal, largo de cripta y número de vellosidades totales por campo.

La clasificación de las vellosidades intestinales se hizo de acuerdo a su integridad, con un sistema que las clasificó como: íntegras, atrofiadas, fragmentadas y enrasadas. Se caracterizaron todas las vellosidades existentes en cada muestra y se contabilizaron en la categoría correspondiente. La medición de vellosidades y caracterización se llevaron a cabo con un analista ciego.

Cuantificación de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

El muestreo para la cuantificación de oocistos de *Cryptosporidium* spp. tuvo lugar a los 0, 7, 10, 14 y 28 días de nacidos los becerros y consistió en tomar una muestra fecal directamente del recto con la ayuda de un guante de palpación. Las muestras fueron inmediatamente refrigeradas para su estudio posterior. La cuantificación se llevó a cabo a través de un sistema de concentración y limpieza de los oocistos con una versión modificada del método de Sheather para después proceder a su lectura en una cámara de Neubauer.

Se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos mediante análisis paramétricos como HSU's MCB y el test de Wilcoxon para análisis no paramétricos en el software JMP 11.0.0 (licencia N15DC1JJ0R).



Imágenes 1-4. Caracterización de vellosidades intestinales de acuerdo a su integridad: **a)** íntegras; **b)** atrofiadas; **c)** interrumpidas y **d)** enrasadas.

4. RESULTADOS

Dimensión de vellosidades y longitud de criptas

El número de vellosidades varió entre 10.1 y 12.5 por campo, siendo menor el número en el tratamiento C (p -valor <0.05). En la Tabla 1, se resume el análisis de las mediciones de las

vellosidades intestinales y criptas de acuerdo con el análisis paramétrico Hsu's MCB y el test de Wilcoxon para análisis no paramétricos.

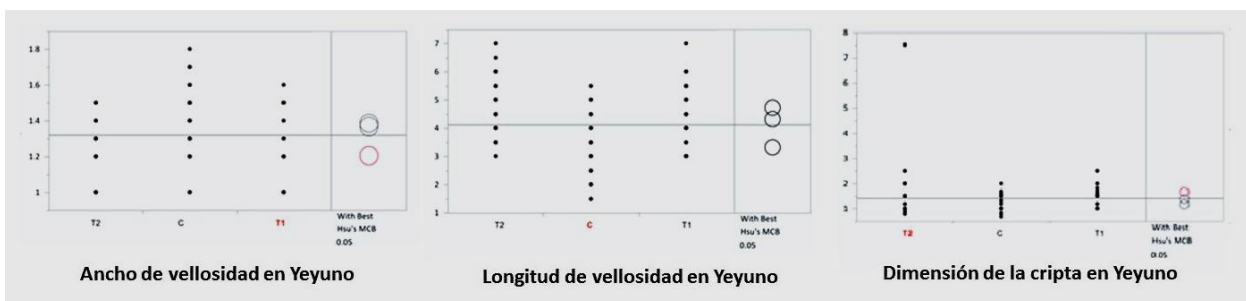
En cuanto a la altura de las vellosidades intestinales, en el yeyuno, son más altas en T1 que en T2 y C (p-valor < 0.0001) (Gráfica 1) y en el íleon, la altura en T1 y T2 fue mayor que en C (p-valor < 0.0001) (Gráfica 2). Pasando al ancho de las vellosidades, en el duodeno son más anchas en T1, en comparación con T2 y C (p-valor > 0.02); mientras que en el yeyuno, son más anchas en el control C y T1 que en T2 (p-valor < 0.0001). En cuanto a la longitud de criptas, en el yeyuno, fueron más grandes en T2 que en C y T1 (p-valor < 0.0001).

Tabla 1. Análisis de las mediciones de vellosidades intestinales y criptas.

	Altura de la vellosidad	Ancho de la vellosidad	Longitud de la cripta
Duodeno	Sin diferencia significativa	T1 > T2 y C (p > 0.02)	Sin diferencia significativa
Yeyuno	T1 > T2 y C (p < 0.0001)	C y T1 > T2 (p < 0.0001)	T2 > C y T1 (p < 0.0001)
Íleon	T1 y T2 > C (p < 0.0001)	Sin diferencia significativa	Sin diferencia significativa

Integridad de vellosidades

En el duodeno no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos en cuanto a integridad. En el yeyuno, el grupo T1 presentó un número de vellosidades íntegras significativamente mayor a T2 y al control (p=0.002) (Gráfica 2). En esta misma sección intestinal, el grupo T1 mostró un número significativamente menor de vellosidades interrumpidas que el T2 y el control (p < 0.05), mientras que el número de vellosidades atrofiadas fue significativamente menor para T1 y T2 comparados con el control (p < 0.05) (Tabla 2).



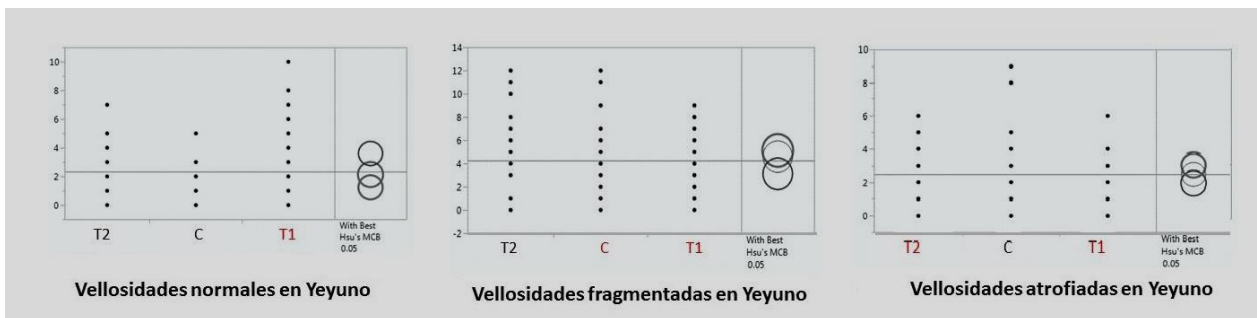
Gráfica 1. Caracterización de ancho, largo de la vellosidad intestinal y tamaño de cripta en yeyuno.

En el íleon se observó un comportamiento similar al yeyuno. El grupo T1 presentó un número de vellosidades íntegras altamente significativamente mayor a T2 y al control (p < 0.001). La cantidad

de vellosidades enrasadas fue mucho mayor en T2 que T1 y control ($p < 0.05$), mientras que el número de atrofiadas no mostró diferencias significativas entre tratamientos.

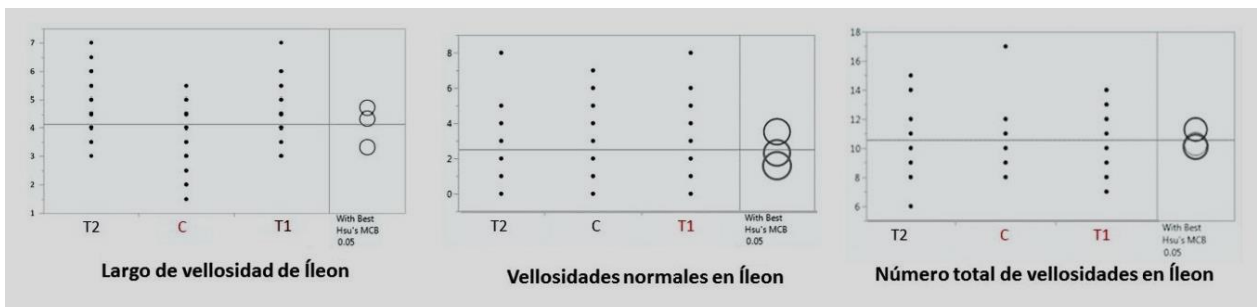
Tabla 2. Análisis de la integridad de vellosidades intestinales

	Íntegras	Atrofiadas	Fragmentadas	Enrasadas	Total de vellosidades
Duodeno	Sin diferencia significativa	Sin diferencia significativa	Sin diferencia significativa	Sin diferencia significativa	Sin diferencia significativa
Yeyuno	T1>T2 y C ($p=0.002$)	T1 y T2 < C ($p<0.05$)	T1<T2 y C ($p=0.044$)	Sin diferencia significativa	Sin diferencia significativa
Íleon	T1>T2 y C ($p=0.0008$)	Sin diferencia significativa	Sin diferencia significativa	T2>T1 y C ($p=0.0008$)	T1>T2 y C



Gráfica 2. Integridad de vellosidades en Yeyuno bajo los tres tratamientos.

En cuanto al número total de vellosidades, en duodeno y yeyuno no hubo diferencias significativas, mientras que en íleon los tratamientos T1 y control presentaron el mayor número de vellosidades ($p < 0.05$). Este último tuvo una mayor dispersión de datos que el T1 (Gráfica 3). *Cryptosporidium* spp. estuvo presente en 80×10^3 a 4×10^9 oocistos/ml en todos los becerros. El producto muestra resultados prometedores para defenderse de la destrucción del protozoario.



Gráfica 3. Caracterización de longitud e integridad de la vellosidad intestinal en Íleon.

5. CONCLUSIONES

El tratamiento con los productos de fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* mostró mayor cantidad de vellosidades intestinales por campo, así como mayor número de vellosidades normales en el caso de yeyuno e íleon. En duodeno, yeyuno e íleon las vellosidades fueron más altas con el tratamiento estudiado en comparación con el control. La integridad de las vellosidades intestinales, particularmente del íleon, donde se ha reportado que *Cryptosporidium* spp. causa daño severo independientemente de la prevalencia y el número de oocistos, fue mejor en el caso de los becerros neonatos tratados con productos de fermentación de *Saccharomyces cerevisiae*, mostrando así prometedores resultados como sistema preventivo contra *Cryptosporidium* spp.

BIBLIOGRAFÍA

1. Almawly, J., Prattley, D., French, N.P., Lopez-Villalobos, N., Hedgespeth, B. and Grinberg, A., 2013. Utility of halofuginone lactate for the prevention of natural cryptosporidiosis of calves, in the presence of co-infection with rotavirus and Salmonella typhimurium. *Veterinary parasitology*, 197(1), pp.59-67.
2. Brewer, M. T., Anderson, K. L., Yoon, I., Scott, M. F., & Carlson, S. A. (2014). Amelioration of salmonellosis in pre-weaned dairy calves fed *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products in feed and milk replacer. *Veterinary microbiology*, 172(1), 248-255.
3. Bontempo, V., Di Giancamillo, A., Savoini, G., Dell'Orto, V., & Domeneghini, C. (2006). Live yeast dietary supplementation acts upon intestinal morpho-functional aspects and growth in weanling piglets. *Animal Feed Science and Technology*, 129(3), 224-236.
4. Cacciò, S. M., & Widmer, G. (2014). *Cryptosporidium: parasite and disease*. Wein: Springer, V-VII.
5. Callaway, E. S., & Martin, S. A. (1997). Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *Journal of Dairy Science*, 80(9), 2035-2044.
6. Clancy, J. L. & Hargy, T. M. (2008). Waterborne: Drinking Water. *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. Fayer, R. & Xiao, L. (eds). USA: CRC Group, 305-333.
7. Chen, X.-M., Keithly, J. S., Paya, C. V. y LaRusso, N. F. (2002). *Cryptosporidiosis*. *New England Journal of Medicine* 346(22): 1723-1731.
8. Domeneghini, C., Di Giancamillo, A., Arrighi, S. y Bosi, G. (2006). Gut-trophic feed additives and their effects upon the gut structure and intestinal metabolism. *State of the art in the pig, and perspectives towards humans*.
9. Gao, J., Zhang, H. J., Wu, S. G., Yu, S. H., Yoon, I., Moore, D., & Qi, G. H. (2009). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on immune functions of broilers challenged with *Eimeria tenella*. *Poultry science*, 88(10), 2141-2151.
10. Kissinger, J. C. (2008). Genomics. *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. Fayer, R. & Xiao, L. (eds). USA: CRC Group, 45-44.
11. Magalhaes, V. J. A., Susca, F., Lima, F. S., Branco, A. F., Yoon, I., & Santos, J. E. P. (2008). Effect of feeding yeast culture on performance, health, and immunocompetence of dairy calves. *Journal of dairy science*, 91(4), 1497-1509.
12. Poppy, G. D., Rabiee, A. R., Lean, I. J., Sanchez, W. K., Dorton, K. L., & Morley, P. S. (2012). A meta-analysis of the effects of feeding yeast culture produced by anaerobic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* on milk production of lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, 95(10), 6027-6041.
13. Ryan, U. & Xiao, L. (2014). Taxonomy and Molecular Taxonomy. *Cryptosporidium: parasite and disease*. Wein: Springer, 3-31.

14. Shen, Y. B., Piao, X. S., Kim, S. W., Wang, L., Liu, P., Yoon, I., & Zhen, Y. G. (2009). Effects of yeast culture supplementation on growth performance, intestinal health, and immune response of nursery pigs. *Journal of Animal Science*, 87(8), 2614-2624.
15. Stockdale, H. D., Spencer, J. A. & Blagburn, B. L. (2008). Prophylaxis and Chemotherapy. *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. Fayer, R. & Xiao, L. (eds). USA: CRC Group, 255-279.
16. Tarver, A.P., Clark, D.P., Diamond, G., Russell, J.P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Cohen, K.S.,
17. Jones, D.E., Sweeney, R.W., Wines, M. and Hwang, S., 1998. Enteric β -Defensin: Molecular Cloning and Characterization of a Gene with Inducible Intestinal Epithelial Cell Expression Associated with *Cryptosporidium parvum*. *Infection and immunity*, 66(3), pp.1045-105.
18. Tzipori, S., & Widmer, G. (2008). A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. *Trends in Parasitology*, 24(4), 184–189.
19. Vázquez-Flores, S. (2011). Criptosporidiosis, giardiosis y coccidiosis. En M, Medina. *Clínica, cirugía y producción de becerras y vaquillas lecheras* (pp. 292-313). 1ª ed México:12 Editorial, A.C.

EFFECTO PLAGUICIDA DE LÁMPARAS LED EN LAS PLANTAS

Juan Carlos Ramírez-Granados, Blanca E. Gómez Luna, Rafael A. Veloz García, J. Ramón Gasca Tirado, M. Isabel García Vieyra, Diana K. Torres Páramo y Diego Téllez González

Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías,
Universidad de Guanajuato, Campus Celaya-Salvatierra

RESUMEN

Aquí presentamos nuestros hallazgos asociados al efecto plaguicida de las lámparas LED cuando son usadas para irradiar plantas. Para nuestros experimentos cultivamos plantas de jitomate tipo saladette y las irradiamos con una combinación de luz solar y lámparas construidas con arreglos de LED's de alta intensidad que emiten en bandas con ancho espectral de 30 nm. Las plantas fueron organizadas en cuatro grupos. El primer grupo fue usado como control o referencia y por lo tanto fue irradiado sólo con luz solar. Los tres grupos de plantas restantes fueron irradiados con luz solar y lámparas LED con longitudes de onda central de 395, 470 y 630 nm. Estas bandas forman parte de la radiación fotosintéticamente activa y coinciden con las bandas de absorción de pigmentos foliares tales como las clorofilas A y B, xantofilas, carotenoides y antocianos. Estos experimentos fueron realizados en campo abierto y con condiciones de humedad y temperatura normales durante 2 meses. Observamos que las lámparas de 470 nm inhiben el desarrollo de plagas tales como *Myzus persicae*, *Bractericerci cockerelli*, *Frankliniella occidentalis*, *Lepidoptera* y *Liriomyza trifolii*. En cambio, las lámparas con longitud de onda de 395 y 630 nm no tuvieron efectos plaguicidas significativos sobre dichas plagas. Así pues, nuestros resultados indican que la energía radiante con longitud de onda próxima a 470 nm puede contribuir al control sustentable de plagas en las plantas.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la agricultura se encuentra en crisis por factores, tales como las condiciones climáticas (desastres naturales, sequías e inundaciones), la falta de herramientas, infraestructura inadecuada, la limitada disponibilidad de agua debido al agotamiento de los recursos hídricos, las temperaturas extremas, la iluminación deficiente, entre otros.

Además de lo anterior, otro de los principales problemas que se presentan en los cultivos son las afecciones por plagas, enfermedades y malezas, pues reducen la vitalidad y capacidad de producción de las plantas. Las plagas están constituidas principalmente por insectos, ácaros, nematodos, caracoles, aves y roedores, ver Fig. 1.

Las enfermedades pueden ser causadas por microorganismos como virus, bacterias, micoplasmas, viroides y hongos; mientras que las malezas son aquellas plantas que resultan indeseables en un campo debido a que compiten con las plantas cultivadas en el uso de espacio, nutrientes y agua.[1]

Por otra parte, la plaga agrícola es una población de organismos fitófagos (se alimentan de plantas) que disminuye la producción del cultivo, reduce el valor de la cosecha e incrementa su costo de producción, criterios esencialmente económicos. Es por eso que el control de plagas es de suma importancia en la agricultura.

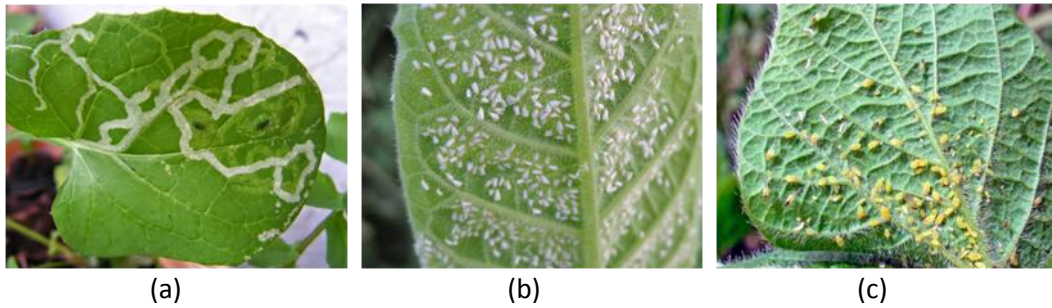


Figura 1. Ejemplo de plagas típicas encontradas en cultivos. a) Minador de hoja (*Liriomyza trifolii*), b) Mosca blanca (*Bemisia tabaci*), y c) Pulgón amarillo (*Melanaphis sacchari*).

A lo largo de la historia se han desarrollado muchos métodos de control de plagas mediante sistemas naturales o artificiales que dan como resultado la prevención, represión, contención, destrucción o exclusión de una plaga. Dichos métodos pueden implicar el uso de barreras, control de temperatura, desarrollo de plantas resistentes, uso de predadores, parasitoides, patógenos e insecticidas, entre otros.[2]

Para satisfacer la demanda de alimentos en el mundo, los productores necesitan adoptar nuevas tecnologías para el control de plagas que sean sustentables y amigables con los consumidores y el medio ambiente. Por esta razón, en este trabajo estudiamos la posibilidad de utilizar ciertos tipos de energía radiante para el control de plagas en las plantas evitando así el uso de plaguicidas químicos que pueden ser tóxicos si se usan de manera inapropiada. En nuestros experimentos empleamos lámparas LED con longitudes de onda centrales de 395, 470 y 630 nm en combinación con luz solar para irradiar a cuatro grupos de plantas e investigamos sus efectos sobre varias plagas.

2. TEORÍA

El aumento de la población mundial implica una mayor demanda de alimentos. Sin embargo, el rendimiento de las tierras está limitado por la superficie agrícola disponible, las características del suelo, el nivel de agua freática, el clima y el manejo de plagas.[3-4] Una alternativa para aumentar la producción de alimentos es incrementar el rendimiento de los cultivos. Para lograrlo es necesario conocer las necesidades de las plantas, los factores que promueven su crecimiento y los factores que limitan su desarrollo para así generar estrategias que maximicen el rendimiento de los cultivos.

El desarrollo de las plantas es influenciado por el agua, los nutrientes y la luz. Si una planta no recibe la cantidad necesaria de estos elementos, entonces su crecimiento puede verse limitado.[5] La luz es un factor imprescindible para llevar a cabo una serie de procesos fisiológicos en las plantas, siendo el más importante la *fotosíntesis*. La fotosíntesis es un proceso físico-químico por el cual las plantas, las algas y las bacterias fotosintéticas utilizan la energía de la luz solar para sintetizar compuestos orgánicos tales como los carbohidratos.[6] El proceso puede expresarse en forma resumida como



Para que el proceso fotosintético ocurra y se inicie la fase fotoquímica (conversión de la energía de la luz en energía química), lo primero que tienen que hacer los organismos es captar la luz.[7] La radiación que llega a la Tierra abarca todo el espectro electromagnético y aproximadamente el 40% de ella es lo que conocemos como luz visible. La luz visible comprende longitudes de onda que van de los 400 a los 700 nm y es usada por las plantas en el proceso de *fotosíntesis*. Este tipo de radiación también es conocida como Radiación Fotosintéticamente Activa o PAR (por sus siglas

en inglés: Photosynthetic Active Radiation).[8] Esta radiación es absorbida por diferentes pigmentos foliares: clorofilas a y b, xantofilas, carotenoides y antocianos.

Existen dos complejos fotoquímicos denominados fotosistema I (PSI) y fotosistema II (PSII) en los que tienen lugar las reacciones iniciales de almacenamiento de energía. Si ambos fotosistemas funcionan en serie se producen dos reacciones fotoquímicas en serie. El PSI absorbe luz del rojo lejano (longitudes de onda superiores a 680nm), y produce un reductor fuerte capaz de reducir NADP+ y un oxidante débil. El PSII absorbe luz roja (680nm), produce un oxidante muy fuerte capaz de oxidar al agua y un reductor más débil que el producido por el PSI.[7]

Otro de los factores que limitan la productividad de las tierras de manera más significativa son las plagas de insectos. La mayoría de los insectos tienen dos tipos de órganos fotorreceptores: ojos compuestos y ocelos. Los ojos compuestos se constan de un gran número de unidades sensibles a la luz denominados omatidios. Un omatidio contiene un paquete alargado de células fotorreceptoras, cada uno con sensibilidades espectrales específicas. Los omatidios se emban en una disposición hexagonal con el fin de cubrir un amplio campo visual con cierta resolución espacial y de percibir el movimiento de los objetos.[9] Las sensibilidades espectrales de los fotorreceptores determinan las longitudes de onda visibles para los insectos, que a menudo se expande en la región ultravioleta (UV).

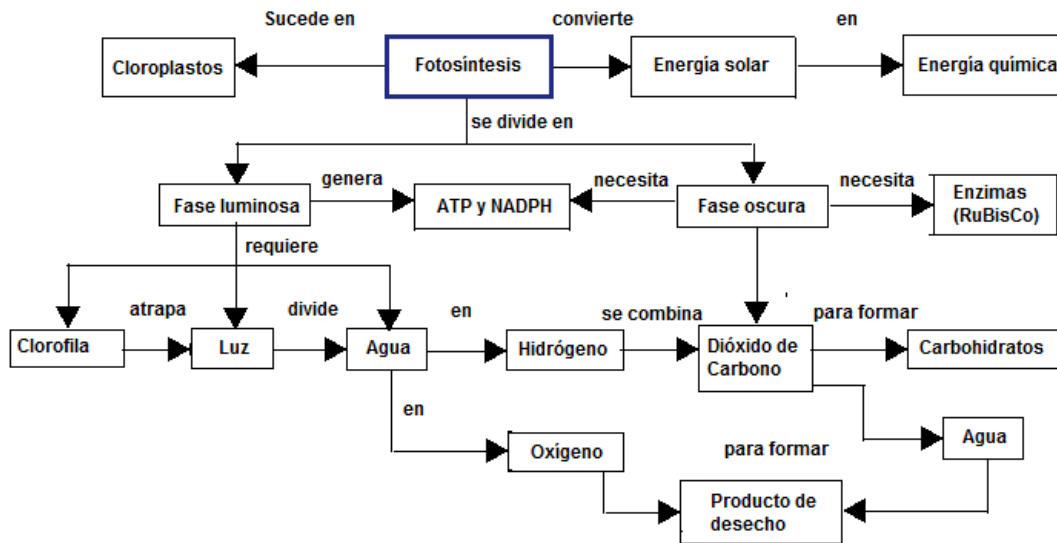


Figura 2. Esquema del proceso de fotosíntesis.

La luz afecta el comportamiento de los insectos.[10] Una de las respuestas más típicas a la luz es la fototaxia. Los insectos pueden presentar dos comportamientos fototáxicos: atracción (fototaxia positiva, se mueven hacia la fuente de luz) o repulsión (fototaxia negativa, se alejan de la luz). La fototaxia positiva se puede utilizar en trampas para plagas, pero se debe tener en cuenta que las longitudes de onda e intensidades eficaces varían entre especies. La fototaxia negativa se puede utilizar para prevenir que las plagas entren en una área de cultivo mediante la emisión de luz con longitudes de onda e intensidades que les repelen.[11]

3. PARTE EXPERIMENTAL

Para analizar cómo luz afecta en la incidencia de las plagas más comunes en la planta de jitomate se diseñó un experimento en el cual se formaron cuatro grupos de plantas. El primer grupo es un conjunto de plantas irradiado sólo con luz solar y es usado como grupo de control. Los otros tres grupos fueron iluminados con lámparas de 395, 470 y 630 nm en conjunto con luz solar.

Para implementar este experimento sembramos y cultivamos plantas de jitomate tipo saladette, para lo cual requerimos de semilleros, semilla de jitomate tipo saladette marca "Vita", tierra para cultivo marca "Vigoro", 3 lámparas LED de 15 mW con ancho espectral a la mitad del máximo de intensidad de 30 nm y con longitudes de onda de 395, 470 y 630 nm; y un higrómetro, ver Fig. 3.

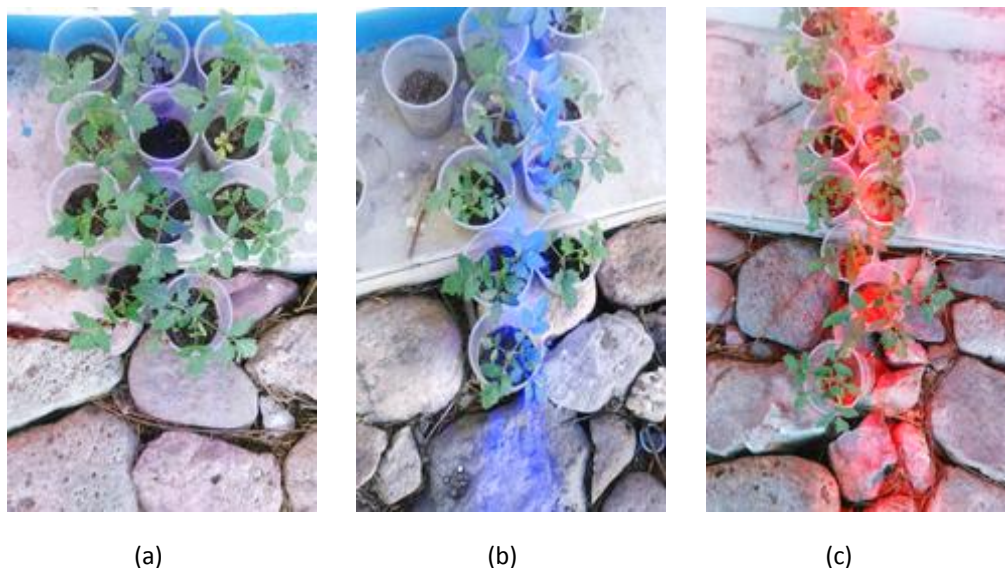


Figura 3. Grupos de plantas irradiados con luz solar y lámparas LED de 15 mW y longitud de onda central de 395 (parte a), 470 (parte b) y 630 nm (parte c).

Aplicación de tratamientos luminosos

- Sembramos 200 semillas de jitomate tipo saladette en 2 semilleros, con 2 semillas por cavidad del semillero.
- Durante el experimento medimos la temperatura y la humedad relativa utilizando un higrómetro. Las mediciones se realizaron los días lunes, miércoles y viernes de cada semana.
- Las semillas comenzaron a germinar 12 días después de sembrarlas. Luego de 30 días, las plantas fueron trasplantadas a contenedores individuales. Estas plantas fueron organizadas en 4 grupos de 20 plantas. Algunas de las semillas no lograron germinar y otras sobrevivieron durante un corto periodo.

- Implementamos el arreglo experimental de tal manera que cada grupo fuera irradiado con una de las tres lámparas además de la luz solar; y otro grupo fuera irradiado sólo con luz solar. La distancia entre las plantas y las lámparas fue de aproximadamente 0.7 m.
- Las plantas se mantuvieron bajo estas condiciones durante 8 semanas. Durante este periodo no se les agregó a las plantas ningún tipo de fertilizante o plaguicida.
- Aproximadamente en la semana 2 aparecieron algunas plagas en ciertos grupos de plantas.
- En la semana 6 apareció una nueva plaga en las plantas.

4. RESULTADOS

Después de que las plántulas fueron transplantadas les aplicamos los tratamientos luminosos por un periodo de 8 semanas. Para aplicar los tratamientos luminosos organizamos las plantas en cuatro grupos. A continuación describimos los efectos fototáxicos positivos y negativos que encontramos al utilizar lámparas LED para irradiar a las plantas de manera adicional a la luz solar.

Grupo de control: Este grupo está compuesto por plantas irradiadas únicamente con luz solar. Después de 5 semanas, 8 plantas fueron atacadas por minador de hoja (*Liriomyza trifolii*) y 2 por trips (*Frankliniella occidentalis*). El crecimiento de este grupo de plantas fue menor comparado con los otros tres grupos.

Grupo 1: Este grupo está conformado por las plantas irradiadas con la combinación de luz solar y una lámpara LED de 395 nm. Cabe mencionar que esta longitud de onda pertenece al espectro de luz UV el cual es utilizado a menudo para atraer a algunos insectos.[12] En este caso se observó que tres días después de iniciar el experimento, una de las plantas tenía un huevecillo de color amarillo y se le dio seguimiento. Una semana después se convirtió en una larva de gusano minador de hoja y comenzaron a presentarse daños en las hojas. Después de 6 semanas con el tratamiento 4 plantas se vieron afectadas por minador de hoja y 7 por trips (Fig. 4), además se presentó la plaga de la mosca blanca (*Bemisia tabaci*). Es decir, todas las plantas irradiadas con este tratamiento fueron atacadas por plagas. Este fue el grupo de plantas que presentó un mayor crecimiento con respecto a los otros grupos.

Grupo 2. Está compuesto por las plantas irradiadas con la combinación de luz solar y una lámpara LED de 470 nm. Al terminar la quinta semana con el tratamiento, 3 plantas presentaron lesiones por gusano minador de hoja y 4 por trips. Su crecimiento sólo superó al del grupo de control.

Grupo 3. Las plantas pertenecientes a este grupo fueron sometidas a la combinación de luz solar y una lámpara LED de 630 nm. Al igual que en el *grupo 1*, tres días después de haber iniciado el experimento observamos un huevecillo color amarillo que posteriormente se convirtió en una larva y 3 días después comenzamos a observar daños en las hojas por ser un insecto fitófago. Transcurridas 6 semanas, 6 plantas fueron atacadas por minador de hoja, 3 por trips y 2 por ambas plagas, es decir, todas las plantas del grupo fueron afectadas por las plagas. Además, se presentó la plaga de la mosca blanca (*Bemisia tabaci*). También observamos que éste fue el segundo grupo con mayor crecimiento.

Durante el experimento también se registró la temperatura y la humedad relativa del medio ambiente con la ayuda de un higrómetro, Fig. 5.

El 95% de las mediciones de temperatura estuvieron en el rango óptimo requerido para el desarrollo de la planta (12 - 30°C), mientras que el 92% de las mediciones sobre la humedad relativa quedaron por debajo del límite recomendado (60-70%), lo cual pudo repercutir en el

porcentaje de germinación de las semillas, en el desarrollo de las plantas y en su porcentaje de supervivencia.[13]

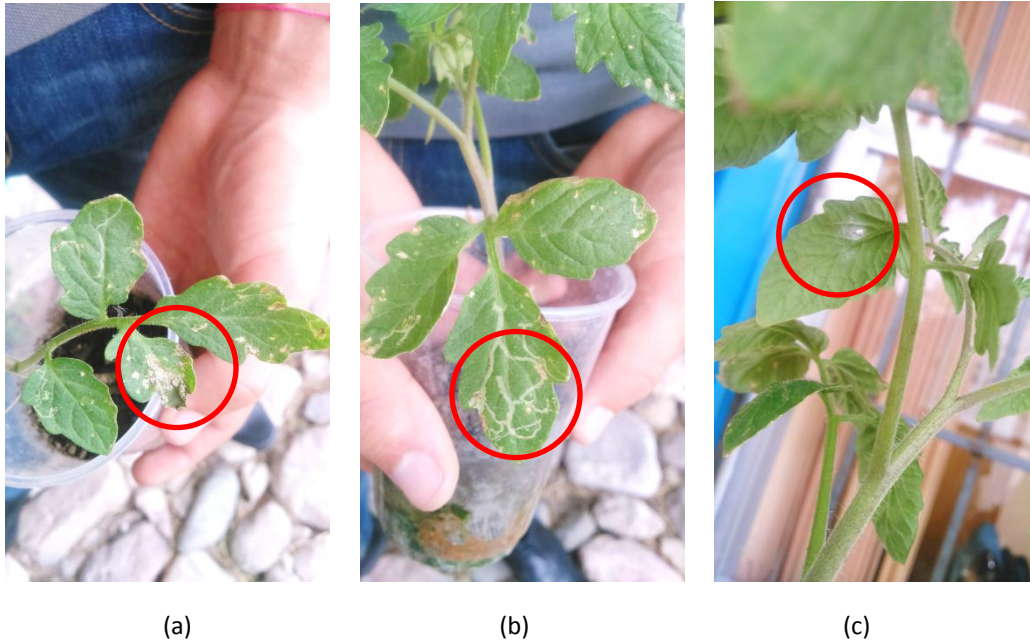
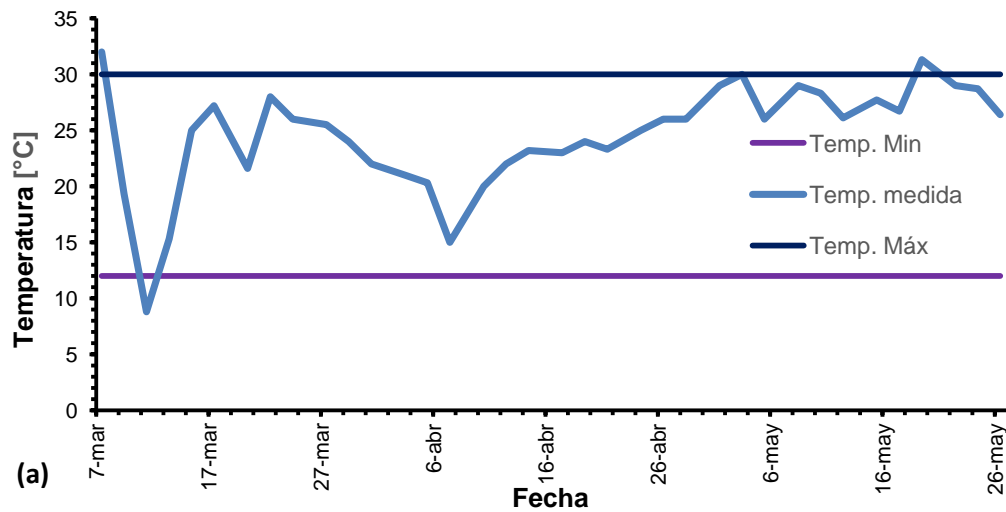


Figura 4. Plantas infectadas por trips (parte a), minador de hoja (parte b) y mosca blanca (parte c).



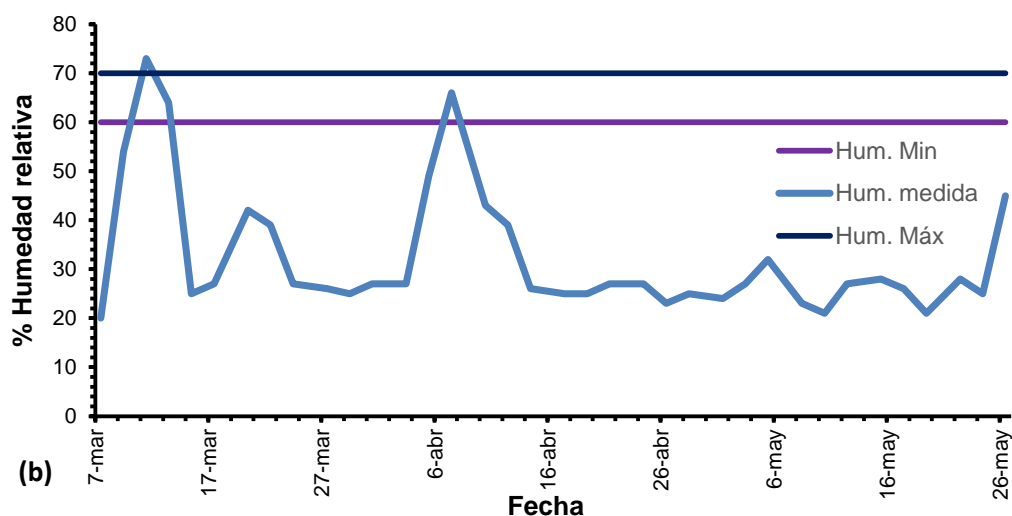


Figura 5. Registro de la temperatura (parte a) y de humedad relativa (parte b) del medio ambiente durante el periodo de crecimiento de las plantas que estudiamos.

5. DISCUSIÓN

De acuerdo a estos resultados, después de aplicar varios tipos de energía radiante a plantas de tomate logramos identificar que las lámparas con longitud de onda central de 395 y 630 nm son favorables para el crecimiento de las plantas pero también las hacen más susceptibles a los ataques de plagas debido a que atraen a algunos organismos patógenos. Esto puede deberse a que la luz UV representa un factor muy importante en la búsqueda de alimento, navegación y selección de pareja en animales invertebrados aéreos y terrestres. Respecto a la luz de 630 nm, algunos insectos son capaces de percibir la luz roja, por lo cual es posible que ocurra la fototaxia positiva.

También identificamos que las lámparas de 470 nm tienen un efecto plaguicida o fototaxia negativa en las plantas de jitomate, ya que las plantas de este grupo fueron menos afectadas que el grupo de control. Además posee ventajas en el crecimiento, debido a que dicha longitud de onda se encuentra en un pico de absorción de la clorofila B.

6. CONCLUSIONES

Con el experimento que diseñamos e implementamos pudimos identificar que la lámpara LED con longitud de onda central de 470 nm es la que produce un mayor efecto plaguicida o fototaxia negativa ya que el grupo de plantas irradiado este tipo de luz fue el menos afectado por las plagas. Más aún, el crecimiento de las plantas de este grupo fue superior al del grupo de control que sólo recibió luz solar. Por el contrario, observamos que el grupo irradiado con la lámpara de 395 nm y el grupo irradiado con la lámpara de 630 nm fueron más afectados por las plagas en comparación con el grupo irradiado con la lámpara de 470 nm. De hecho, el grupo irradiado con la lámpara de 630 nm fue más afectado por las plagas incluso que el grupo control. Por estas razones, concluimos que es posible aprovechar la fototaxia negativa de las lámparas con longitud de onda central de 470 nm para repeler las plagas y al mismo tiempo promover el crecimiento y desarrollo de las plantas ya que este tipo de radiación es absorbida eficientemente por las plantas debido a que se encuentra en un pico de absorción de la clorofila B. Por otra parte, podríamos aprovechar la fototaxia positiva de las lámparas con longitudes de onda centrales de 395 y 630 nm para diseñar y

fabricar trampas que lleven a los insectos lejos de las plantas. Así pues, este estudio nos indica que es factible el control de plagas en las plantas a través de la fototaxia positiva y negativa que producen las fuentes de iluminación de espectro angosto, ya sea irradiando directamente a las plantas o elaborando trampas para mantener a los insectos alejados de los cultivos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el apoyo de la Universidad de Guanajuato, la Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (DAIP), y el Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP).

BIBLIOGRAFÍA

1. F. Cisneros, "Generalidades sobre las plagas y sus efectos en la producción agrícola" en "Control de plagas agrícolas", Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina; 1995, pp. 1-10.
2. R. F. Smith, y R. Van Den Bosch, "Integrated Control" en "*Pest Control, Biological, Physical, and selected chemical Methods*". Editado por Wendel W. Kilgore y Richard L. Doutt. Academic Press; 1967, pp. 295-340.
3. L. Ruiz, "Agricultura general", DEA-MAG, 2004. [Consultado: Mayo 2016]. Disponible en: <https://bibliotecadeamag.wikispaces.com/file/view/AGRICULTURA+GENERAL+ING+OVIEDO.pdf>
4. SAGARPA, Retos y Oportunidades del sistema agroalimentario en México en los próximos 20 años, México, 2010. [Consultado: Mayo 2016]. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/pablo/retosyoportunidades.pdf>
5. L. Mexicano Santoyo, "*Cambios Morfológicos Producidos por Tratamientos Ópticos en las Plantas*," Tesis, Universidad de Guanajuato, 2016, p. 70.
6. E. Pérez, "*Fotosíntesis: Aspectos básicos, facultad de ciencias biológicas*", Universidad Complutense de Madrid, Reduca (biología), Vol. 2(3), 2009, pp. 1-47.
7. H. Reinoso, M. Torbalde, M. Grosso, APEB, Olimpiada Argentina de Biología, "*Desde la célula a la fotosíntesis en las plantas superiores*", Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Ciencias Exactas, Físico – Químicas y Naturales.
8. R. L. Carrasco, "*Efecto de la Radiación Ultravioleta-B en las plantas*", IDESIA (Chile), Vol. 27(3), 2009, pp. 5759-5796.
9. M. Land y D. Nilsson, "*Animal eyes*", New York: Oxford University Press, 2002.
10. M. Shimoda y K. Honda, "Insect reactions to light and its applications to pest management," in *Applied Entomology and Zoology*, Vol 48, 2013, pp. 413-421.
11. M. G. Kim, J. Y. Yang y H. S. Lee, "*Phototactic behavior: repellent effects of cigarette beetle, Lasioderma serricorne (Coleoptera: Anobiidae), to light-emitting diodes*", Appl. Biol. Chem. Vol 56, 2013, pp. 331–333.
12. M. Shockley, R. Lindner, "*Insect Vision: Ultraviolet, Color, and LED Light*", University of Georgia Department of Entomology, Georgia: 2011.
13. Investigación y capacitación agropecuaria, Secretaria de desarrollo agropecuario, Cultivo de jitomate, [Consultado: Mayo 2016], Disponible en: http://portal2.edomex.gob.mx/icamex/investigacion_publicaciones/horticola/jitomate/index.html

PRODUCCIÓN DE METANO EN RUMIANTES Y ALTERNATIVAS PARA DISMINUIR SUS EMISIONES

Sánchez Mendoza Berenice¹, Camargo Gurgua Miguel A.², Romano Muñoz José Luis¹, Buendía Rodríguez German¹.

¹INIFAP CENID-FyMA. ²Pilgrims México.

RESUMEN

Los gases de efecto invernadero son constituyentes de la atmósfera, capaces de absorber la radiación y emitirla posteriormente. El metano (CH₄) tiene un potencial contaminante de 23 a 30 veces superior al CO₂, en este sentido la producción intensiva de ganado representa una fuente importante de gases de efecto invernadero a la atmósfera, siendo la fermentación entérica una de las principales fuentes de metano, situando a los rumiantes en primer lugar de importancia. La emisión de CH₄ depende de factores intrínsecos del animal (peso, edad y especie), así como extrínsecos relacionados con el alimento (composición e ingestión). En este último caso, el elemento principal es la cantidad y calidad del alimento ingerido, siendo la digestibilidad de la ración uno de los factores más influyentes, por lo que generalmente se establece una correlación negativa entre la digestibilidad de las dietas y la emisión de metano. Por lo anterior el objetivo de este trabajo es describir algunos de los principales factores que pueden incidir en la producción de metano en rumiantes y analizar algunas alternativas alimenticias para estimar y disminuir su emisión. La fermentación de los hidratos de carbono resulta en la producción de hidrógeno que las bacterias metanogénicas utilizan para reducir el carbono del CO₂ a CH₄. En este sentido, la manipulación de la composición de la dieta puede reducir directamente la emisión de metano por los rumiantes, es decir, una dieta con alto contenido de concentrados tiende a reducir la población de protozoarios en el rumen, reduce el pH ruminal, altera la proporción de acetato: propionato y disminuye la cantidad de metano producido por unidad de alimento consumido.

1. INTRODUCCIÓN

El metano (CH₄) es un gas incoloro e inodoro producido en el rumen (entre 300 y 600 L, anuales González *et al.* 2006) y en menor grado en el intestino grueso (13%), FAO (2010). Este, se ha convertido en foco de la atención mundial debido al alarmante incremento de la concentración atmosférica, ya que, después del dióxido de carbono (CO₂), es el segundo gas de efecto invernadero más importante, debido a que es 23 veces más contaminante que el CO₂ (Forster *et al.*, 2007). El grupo microbiano responsable de la metanogénesis son las arqueobacterias, microorganismos del dominio *Archea* (Van Soest, 1994), la producción de CH₄ por estos microorganismos es parte de su metabolismo energético, al fermentar los carbohidratos y la mayoría utilizan CO₂ como su aceptor terminal de electrones en la respiración anaeróbica, convirtiéndolo a CH₄. El rumen es una cámara de fermentación anaeróbica y debe tener las condiciones adecuadas para el desarrollo de microorganismos (bacterias, protozoos y hongos) que aseguran la fermentación de los alimentos ingeridos mediante la secreción de enzimas específicas para cada sustrato. Los productos finales de la fermentación en el rumen incluyen los aprovechables como los ácidos grasos volátiles y proteína microbiana, así como los productos que son considerados desechos como el CO₂ y el metano, este último, constituye una pérdida de energía que afecta la productividad animal. La producción de metano depende de la calidad, de la dieta de tal manera que el alimentar con dietas altas en concentraciones de energía metabolizable

se considera un método eficaz para reducir las emisiones de metano entérico (Johnson y Johnson, 1995). Ya que estas emisiones representan entre 5.5-6.5% del total de energía potencial consumida en la dieta, sin embargo estos valores pueden variar entre 2-12% en condiciones de pastoreo, pero cuando la alimentación es con forrajes de baja calidad nutritiva, la producción de metano puede representar entre el 15 y 18% de la energía digestible, de igual forma se considera que la corrección de estas deficiencias podría reducir estos valores hasta un 7% (Carmona et al., 2005).

2. PRODUCCIÓN DE METANO Y ESTRATEGIAS PARA MITIGARLO

Debido a la importancia de las emisiones de metano se han propuesto alternativas para su disminución, involucrando modificaciones en la dieta (composición, conservación, procesamiento), alteraciones en la funcionalidad ruminal, manipulación de la microbiota y la selección animal (Cuadro1). Dentro de las modificaciones a la dieta y función ruminal existen puntos clave, que son; el consumo de alimento, la tasa de degradación de la materia orgánica, la eficiencia de crecimiento microbiano y el tipo de ácidos grasos producidos, todas las alternativas han funcionado y presentado resultados muy variables (Mao et al. 2010).

Como estrategias alimenticias se han propuesto el uso de metabolitos secundarios, como los taninos condensados, las saponinas, nitritos, nitratos y sulfatos (Mc Allister 1996; Santoso et al. 2004 y Waghorn et al. 2008). Por ejemplo, Patra y Yu, (2014) utilizaron saponinas (0.6 g/L), nitrato (5 mM) y sulfatos (5 mM), sobre la fermentación ruminal, y observaron que la combinación de nitrato con saponinas y/o sulfatos disminuyeron la producción de metano, (casi 46%) Sin afectar el consumo de alimento, y concluyeron que el uso de estos tres productos puede ser efectivo disminuyendo las emisiones de metano en rumiantes.

En este sentido también se han utilizado las grasas insaturadas, aceites de diferentes semillas u oleaginosas como: linaza, algodón, canola, girasol entre otras, (Itabashi et al. 2000). Beauchemin et al. (2009) observaron que la semilla de girasol y colza redujo la producción de CH₄ (g/d) en 10%, mientras que la de linaza un 18%, sin embargo con efectos negativos sobre el consumo de materia seca entre 18 y 10% respectivamente. Los ácidos grasos insaturados compiten con la metanogénesis por los equivalentes de reducción durante la biohidrogenación en el rumen además, disminuyen el número de protozoos (Czerkawski et al.1966). Así también, el uso ionóforos como la monensina, la cual afecta a las bacterias que producen H⁺ y CO₂, los cuales son requeridos para la metanogénesis (Chen y Wolin, 1979). Por otra parte el uso de enzimas fibrolíticas, compuestos halogenados homólogos del metano, como el hidrato de cloral, un complejo de Bromoclorometano y α ciclodextrina (Itabashi 2000) y el ácido 2-bromo-etano-sulfonato (BES) (Martín y Macy 1985; Delgado et al. 2006 y González et al. 2006). Los cuales incrementan significativamente la producción de propionato a expensas de la producción de acetato y butirato, disminuyendo la liberación de hidrógeno de ciertos compuestos como el formiato, de esta forma se reduce la producción de metano (Gil 2004). Sin embargo, los microorganismos del rumen se pueden adaptar a estos aditivos y son capaces de degradarlos después de alrededor de un mes de tratamiento (Carmona et al., 2005).

La molienda del forraje reduciría la producción de metano a nivel ruminal, al promover una mayor tasa de pasaje, limitando la fermentación de la fibra a nivel ruminal y por ende la disponibilidad de CO₂ e hidrógeno, para las bacterias metanogénicas (Johnson y Johnson 1995). Algunos componentes importantes de los forrajes lo constituyen las proteínas, azúcares solubles, lípidos, minerales y vitaminas. Los rumiantes tienen una alta capacidad de almacenamiento y mezclado, por lo cual el tamaño de partícula y la velocidad de pasaje del alimento a través del tracto digestivo permiten el desarrollo y estabilización de una densa masa microbiana. El resultado neto de la acción de los microorganismos, es la síntesis de nuevos compuestos que, en función del rol que cumplen en el metabolismo del animal huésped, se clasifican en glucogénicos (ácido propiónico), cetogénicos (ácido acético y butírico) y aminogénicos (proteína microbiana).

Los ácidos grasos volátiles producidos en el rumen no son una fuente directa para la metanogénesis, debido a que la conversión de CO₂ e hidrógeno es un proceso lento (Hobson y Stewart, 1997) por lo tanto el CH₄ en rumen se produce por la liberación de CO₂ e hidrógeno, que se generan conforme se producen los ácidos grasos volátiles durante la fermentación de los carbohidratos (Hungate, et al, 1970). Entonces el tipo y cantidad de carbohidrato así como su tasa de fermentación es uno de los factores dietéticos que modifica la producción de metano por su impacto en el pH y la población microbiana (Chandramoni *et al.*, 2000). Mientras que la fermentación de almidón genera cambios en pH ruminal, no aptos para el desarrollo de metanogénicas y mayor producción de ácido propiónico, debido al estímulo de bacterias amilolíticas, lo que conduce a una disminución en la generación de metano (Van Kessel y Russell, 1996).

Cuadro 1. Modificadores de la producción de CH₄ entérico en rumiantes.

Categoría	Efectividad	Potencial de mitigación
Inhibidores		
BCM y BES ¹	si	Alto
Cloroformo	si	Alto
Ciclodextrina	si	Bajo
3-nitroxipropanol	si	Medio
Receptores de electrones		
FMA ²	Inconsistente	Medio
Nitroetano	Inconsistente	Bajo
Nitrato	si	Alto
Ionóforos	Inconsistente	Bajo
Metabolitos secundarios		
Taninos	si	Bajo
Saponinas	Inconsistente	Bajo
Aceites Esenciales	Inconsistente	Bajo
Enzimas exógenas	no	Bajo
Defaunación	Inconsistente	Bajo
Manipulación de bacterias	Inconsistente	Bajo
Adición de lípidos	si	Medio
Concentrados	si	Medio - Bajo
Calidad de Forraje	si	Medio - Bajo
Procesados del alimento	Inconsistente	Bajo

¹BCM=Bromoclorometano; BES= 2-bromo-etano-sulfonato. (Adaptado de Hristov *et al.*, 2014).

²FMA=Ácido Málico y Ácido fumárico.

Por otra parte tenemos la especie y su edad, ya que el perfil microbiano del rumen difiere de un animal a otro en términos de composición y actividad metabólica (Blas *et al.*, 2003). Del mismo modo, el tamaño y la ubicación de la zona de fermentación afectan la tasa de pasaje, y los alimentos que son fermentados rápidamente favorecen la disminución de la producción de metano

en beneficio del propionato (Demeyer y Fievez, 2000). De Haas et al. (2011), indican que la producción endógena de metano tiene una base genética, con índices de heredabilidad de 0,35, para la producción solo de metano endógeno, con índice de correlación genética entre la producción de metano de la primera y la última lactación de 0,36.

3. ALTERNATIVAS PARA MEDIR EMISIONES DE CH₄

La búsqueda de métodos económicos, simples, de fácil adopción, eficientes, ha llevado al desarrollo de numerosas técnicas para estimar la cantidad de metano producido entre estas existen métodos *in vitro*, *in situ*, *in vivo*, la aplicación de modelos matemáticos o la interacción de todos. Las técnicas analíticas más destacadas para la determinación del CH₄ comprenden: calorimetría, espectroscopia infrarroja, cromatografía de gases, espectroscopia de masa, diodo laser, monitores automatizados. Las técnicas calorimétricas de respiración a partir de cámaras respiratorias han sido usadas con diferente efectividad (Johnson y Johnson, 1995). Estos equipos determinan el flujo total de aire en el sistema y la diferencia en la concentración de metano entre el aire inspirado y el expirado. Las cámaras respiratorias miden las emisiones de metano tanto proveniente de la fermentación ruminal como postruminal. Asimismo aportan información de la variabilidad de las emisiones durante el día por los animales y las variaciones entre animales. Sin embargo la determinación de las emisiones directas, implica una gran inversión, por otra parte están las máscaras faciales, diseñadas con el fin de reducir costos, sin embargo, no tienen la capacidad de medir las emisiones de metano de las fermentaciones postruminales y su uso no es aplicable en animales en pastoreo, por lo que se han desarrollado alternativas mediante marcadores indirectos, como N₂O y SF₆ (hexafloruro de azufre) como la técnica, esta se basa en la liberación de una cantidad conocida de gas marcador contenido en un tubo pre-calibrado y permeable que se coloca en el rumen es necesario conocer la tasa de liberación del gas marcador antes de su inserción en el rumen (Johnson *et al.*, 1994), aquí se le coloca al animal un capilar sobre el morro, a través del cual se colectan muestras de aire expirado que se almacenan en un tubo de vacío colocado en el cuello del animal y por cromatografía de gases se determina el CH₄ y el SF₆ o el N₂O. Existe una técnica de colecta directa del gas producido en rumen, mediante una fístula de 2 cm de diámetro, a través de la cual fluye el gas a un contenedor de nylon, tipo globo fijado al lomo, del animal. Se colecta el gas por periodos de 24 h y se determina la concentración de CH₄ en intervalos de 6 h.

Las técnicas *in vitro* son más económicas, y rápidas sin embargo son menos exactas, como la técnica de producción de gas o en el sistema de fermentación continua que simula las condiciones del rumen RUSITEC, los cuales han sido validados encontrando siempre una mayor correlación con la medición mediante la técnica de producción de gas (0.74 a 0.98) que con el RUSITEC (0.16 a 0.20) (Bhatta et al., 2007). De manera general estas técnicas resultan similares entre sí ya que utilizan como sustrato la muestra molida de interés, un medio de incubación tamponante y un inóculo que por lo general es líquido ruminal, lo cual en conjunto se pone a incubar en condiciones de anaerobiosis a temperatura controlada, realizando mediciones de los indicadores de interés con cierta periodicidad. Este tipo de métodos pretenden simular las condiciones de digestión *in vivo* y permiten la manipulación de diversidad de factores de variación de una manera controlada, lo cual facilita su uso en el estudio de la incidencia de componentes individuales sobre los parámetros de fermentación, pudiendo evaluar la interacción entre componentes de la ración.

Los estudios sobre el ecosistema ruminal han avanzado significativamente, (Van Soest, 1994), la utilización de modelos mecanísticos como herramienta de investigación se ha incrementado. En este sentido los modelos estequiométricos han sido propuestos para estimar la partición de los carbohidratos fermentables en el rumen hacia ácidos grasos volátiles (AGV's), CH₄ y calor de fermentación (Wolin 1960). Estos modelos podrían ser de utilidad para comparar las tasas de producción de CH₄ en rumiantes alimentados con raciones de baja calidad nutricional basadas en gramíneas tropicales y en dietas altas en granos (Kurihara *et al.* 1999). Aunque muchos modelos estadísticos tuvieron bastante éxito en la predicción de la producción de CH₄, algunos tienen datos

que son difíciles de medir y otros pueden tener dificultades en la estimación de la producción de metano fuera de los intervalos dentro de los que han sido desarrollados (Wilkerson *et al.*, 1995). Además requieren información de consumo de materia seca, composición química de la dieta y su degradabilidad, tasa de paso por el retículo-rumen y pH del fluido ruminal.

4. CONCLUSIONES

En este sentido, la manipulación de la composición de la dieta puede reducir directamente la emisión de metano por los rumiantes, disminuyendo la cantidad de metano producido por unidad de alimento consumido. Por lo tanto la importancia en la búsqueda de alternativas que disminuyan dichos gases, radica no solo en hacer más eficiente la utilización de la energía, sino también en disminuir sus impactos negativos en términos ambientales.

LITERATURA CITADA

1. Blas, C., Mateos, G.G. and Rebollar, P.G. 2003. Composición y valor nutritivo de alimentos para la formulación de piensos compuestos. Tablas FEDNA. Segunda Edición. Ed. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, España. 423 pp
2. Beauchemin, K. A., T. A. McAllister, and S. M. McGinn. 2009. Dietary mitigation of enteric methane from cattle. *CAB Rev.* 4:1–18.
3. Carmona CJ, Bolívar MD, Giraldo AL. El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. *Rev Col Cienc Pecu* 2005;18:1(49-63).
4. Chandramoni SB, Jadhao CM, Tiwari CM, Khan MY. Energy metabolism with Particular reference to methane production in Muzaffarnagari sheep fed rations in roughage to concentrate ratio. *Animal Feed Science and Technology*, 2000; 83: 287- 300.
5. Chen M., Wolin M.J., Effect of monensin and lasalocid-sodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 38 (1979) 72–77.
6. Czerkawski JW, Breckenridge G. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition*, 1977; 38: 371-384.
7. Demeyer, D.L. & Fievez, V. 2000. Ruminants et environnement: la méthanogénèse. *Ann. Zootech.* 49:95
8. Delgado C., Rosegrant, M., Steinfeld, H., Ehui, S. y Courbios, C. 1990. Livestock to 2020: the next food revolution, Food, Agriculture, and the Environment Discussion Paper 28. Washington D.C, IFPRI/ FAO/IIIG (Instituto Internacional de Investigación sobre Políticas Alimentarias /FAO/Instituto Internacional de Investigaciones ganaderas.
9. FAO. (2010). Greenhouse gas emissions from the dairy sector. A Life Cycle Assessment. Food and Agriculture Organization.
10. Forster, P., V. Ramaswamy, P. Artaxo, T. Berntsen, R. Betts, D. W. Fahey, J. Haywood, J. Lean, D. C. Lowe. G. Myhre, J. Nganga, R. Prinn, G. Raga, M. Schulz, and R. Van Dorland. 2007. Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing. In *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental*
11. Panel on Climate Change. S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K. B. Averyt, M. Tignor, and H. L. Miller, ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
12. González, N., Galindo, J., González, R., Sosa, Areadne; Moreira, O., Delgado, D., Martín, E., Sanabria, C., 2006. Utilización de la técnica de PCR en tiempo real y de la producción de gas in vitro para determinar el efecto del ácido bromoetano sulfónico en la metanogénesis y la población microbiana ruminal. *Revista Cubana de Ciencias Agrícolas*, Tomo 40 Número 2: 183-189.

13. Hobson, P., Stewart, C. (1997). *The Rumen Microbial Ecosystem*, Chapman and Hall, London, UK.
14. Hungate, R. E., Smith, W., Bauchop T., Yu, I., Rabinowitz, J. C. (1970). Formate as an intermediate in the bovine rumen fermentation. *Journal of Bacteriology*. 102 (2), 389–397.
15. Itabashi, H., Bayaru, E., Kanda, S., Nishida, T., Ando, S., Ishida, M., Itch, T., Isobe, Y. & Nagara, K., 2000. Effect of fumaric acid on methane production, rumen fermentation and digestibility in cattle. The III Joint Symposium of Japan and Korea on Rumen Metabolism and Physiology. Miyazaki, Japan. p. 11
17. Johnson KA, Huyler M, Westberg H, Brian L, Zimmerman P. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF6 tracer technique. *Environ Sci Technol* 1994; 28:359- 362.
18. Johnson KA, Johnson DE. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science* 73, 2483–2492.
19. Kurihara M, Magner T Mc, Crabb H .1999. Methane production and energy partition of cattle in the tropics. *British Journal of nutrition*, 81: 227-234.
20. Mao, H.L., Wang, J.K., Zhou, Y.Y., Liu, J.X., 2010. Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. *Livest. Sci.* 129, 56–62.
21. McAllister, T.A., Okine, E. K., Mathison, G.W., Cheng, K.J., 1996. Dietary environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* 76, 231–243.
22. Martin S.A., Macey J.M., Effects of monensin, pyromellitic diimide and 2-bromoethanesulfonic acid on rumen fermentation in vitro, *J. Anim. Sci.* 60 (1985) 544–550.
23. Patra AK, Yu Z. 2014. Combinations of nitrate, saponin, and sulfate additively reduce methane production by rumen cultures in vitro while not adversely affecting feed digestion, fermentation or microbial communities. *Bioresource Technology* 155 (2014) 129–135
24. Santoso, B., Mwenya, C. Sar, Y. Gamo, T. Kobayashi, R. Morikawa, K. Kimura, H. Mizukoshi, and J. Takahashi. 2004. Effects of supplementing galacto-oligosaccharides, *Yucca schidigera* or nisin on rumen methanogenesis, nitrogen and energy metabolism in sheep. *Livest. Prod. Sci.* 91:209–217.
25. Van Kessel J. A., Russell J. B. (1996). The effect of pH on ruminal methanogenesis. *FEMS Microbiology Ecology*. 20(4), 205–210.
26. Van Soest, P. J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. Cornell Univ. Press, Ithaca, NY.
27. Waghorn, G.C. 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production – progress and challenges. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147:116–139.
28. Wilkerson, V. A., D. P. Casper, and D. R. Mertens. 1995. The prediction of methane production of Holstein cows by several equations. *J. Dairy Sci.* 78:2402–2414.
29. Wolin, M. J. 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *J. Dairy Sci.* 43:1452–1459.

PRODUCCIÓN DE FLORES DE ALCATRAZ TRATADO CON LANTANO

Nadia Issaí Torres-Flores^a, Libia I. Trejo-Téllez^a, Gabriel Alcántar-González^a, Fernando C. Gómez-Merino^b, Prometeo Sánchez-García^a y Brenda I. Trejo-Téllez^c.

Colegio de Postgraduados ^aCampus Montecillo, ^bCampus Córdoba, ^cCampus San Luis Potosí.

RESUMEN

Se ha reportado que el La en algunas especies promueve la iniciación floral y el crecimiento reproductivo. En este estudio se evaluaron los efectos de la adición de La a la solución nutritiva en el número de flores de tres variedades de alcatraz (Gold Fever, Regal y Garnet Glow). Se probaron cuatro dosis de La (0, 10, 20 y 30 μM), suministrado a partir de dos fuentes [$\text{La}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y LaCl_3]; teniéndose ocho tratamientos por variedad. La unidad experimental fue una planta en una bolsa negra de polietileno, usando tezontle como sustrato. Al final del ciclo de producción se cuantificó el número de flores por planta y los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente. En la variedad Gold Fever, si bien no existieron diferencias estadísticas debidas a la concentración de La, se observó reducción en el número de flores en los tratamientos con La; entre fuentes existió diferencia estadística, siendo el LaCl_3 la fuente con mayor número de flores. En la variedad Regal los factores de estudio y su interacción no afectaron el número de flores. En la variedad Garnet Glow se observaron respuestas opuestas a las registradas en Gold Fever; es decir, a pesar de no existir diferencias estadísticas, el número de flores es mayor en los tratamientos con La cuando éste es suministrado como $\text{La}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Se concluye que las variedades de alcatraz muestran respuestas diferenciales a la fuente y concentración de La en lo que respecta al número de flores.

1. INTRODUCCIÓN

La floricultura es una actividad con importancia económica, en la cual los floricultores tienen la misión de cautivar a los consumidores de los diferentes estratos sociales (ASERCA, 2008). Dentro del amplio rango de especies de la horticultura ornamental, se encuentra el alcatraz también llamado calla (*Zantedeschia* spp.) (Pérez, 1998). Estados como Veracruz (zona central), México, Puebla (zona norte), Jalisco y Colima destacan a nivel nacional por la producción de alcatraz (Cruz y Cárdenas, 1997).

En nuestro país el cultivo de alcatraz (*Zantedeschia* spp.) de color diferente al blanco común, no está difundido a pesar de la gran aceptación que hay por lo consumidores finales (Cruz *et al.*, 2001), por lo que la producción de alcatraz de color es una opción para diversificar la agricultura en regiones de climas templados.

En el ámbito de la nutrición de cultivos, los elementos benéficos como Al, Ce, Co, I, La, Na, Se, Si, Ti y V han mostrado que pueden incrementar respuestas positivas en indicadores de crecimiento, rendimiento y calidad de las cosechas; para poder observar respuestas favorables, es necesario que las cantidades a suministrar sean concentraciones muy bajas, en las soluciones o bien directo al suelo (Gómez *et al.*, 2015).

En la literatura se han reportado efectos positivos, negativos o nulos en respuesta a la aplicación de La; respuestas que han sido atribuidas a las dosis, a las formas de aplicación y el tipo de cultivo

(Tribe *et al.*, 1990); lo que conlleva a la generación de nuevos resultados con cultivos no explorados como es el caso de alcatraz.

En el contexto anterior, este trabajo plantea como objetivo la evaluación del número de flores por planta en tres variedades de alcatraz (Gold Fever, Regal y Garnet Glow), durante su ciclo de producción para determinar si las dos fuentes y concentraciones de La aplicadas influyen en el parámetro evaluado.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para este experimento se plantaron los rizomas de tres variedades de alcatraz de color (Gold Fever, Regal y Garnet Glow); en un sustrato producto de una mezcla de tezontle de 5-8 mm + Agrolita® (70/30, v/v), en bolsas de polietileno negro de 30 x 30 cm, donde se plantó un rizoma por bolsa. Cada bolsa fue considerada como una unidad experimental. Previamente a la plantación se realizó una desinfección de los rizomas con una solución de Cupravit® + Promyl® a razón de 2 y 1 g L⁻¹ de agua, respectivamente durante 15 min para prevenir enfermedades fungosas, inmediatamente después se introdujeron los rizomas en una solución de 100 mg L⁻¹ de ácido giberélico por 15 min para promover la floración. Este experimento se condujo bajo condiciones de invernadero.

Durante el desarrollo del experimento se evaluaron ocho tratamientos, resultado de la combinación de las cuatro concentraciones de La (0, 10, 20 y 30 µM) y de las dos fuentes de La [La(NO₃)₂ 6H₂O y LaCl₃]. Las concentraciones de La evaluadas fueron suministradas en la solución nutritiva de Steiner al 50% (Steiner, 1984). El diseño experimental utilizado fue factorial con un arreglo 4 X 2 con cinco repeticiones por tratamiento. La aplicación de los tratamientos se inició 15 días después de la plantación (ddp), aplicando 200 mL por bolsa tres veces por semana. A partir de que inició la etapa de floración se contabilizaron el número de flores por planta cada semana y hasta el momento de la cosecha, para cuantificar el número de flores totales por planta. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias usando la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$ %) empleando el software Statistical Analysis System (SAS, 2002).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La variedad Gold Fever, no presentó diferencias estadísticas en la producción de flores entre tratamientos debidas a la concentración de La, empero se observó reducción en el número de flores en los tratamientos con La. Entre fuentes aplicadas, existió diferencia estadística significativa, siendo el LaCl₃ la fuente con mayor número de flores (**Figura 1**).

En la variedad Regal los factores de estudio y su interacción no afectaron el número de flores; pero es evidente en la **Figura 2**; que al incrementarse la concentración en ambas fuentes, se aumenta el número de flores. Hu *et al.* (2006), reportaron que el suministro de elementos de tierras raras en pequeñas cantidades, en particular el lantano (La), incrementa el crecimiento, la calidad y el rendimiento de diversos cultivos.

En la variedad Garnet Glow (**Figura 3**), no existieron diferencias significativas entre tratamientos; pero se observaron respuestas opuestas a las registradas en Gold Fever; es decir, a pesar de no existir diferencias estadísticas, el número de flores es mayor en los tratamientos con La cuando éste es suministrado como La(NO₃)₂ 6H₂O.

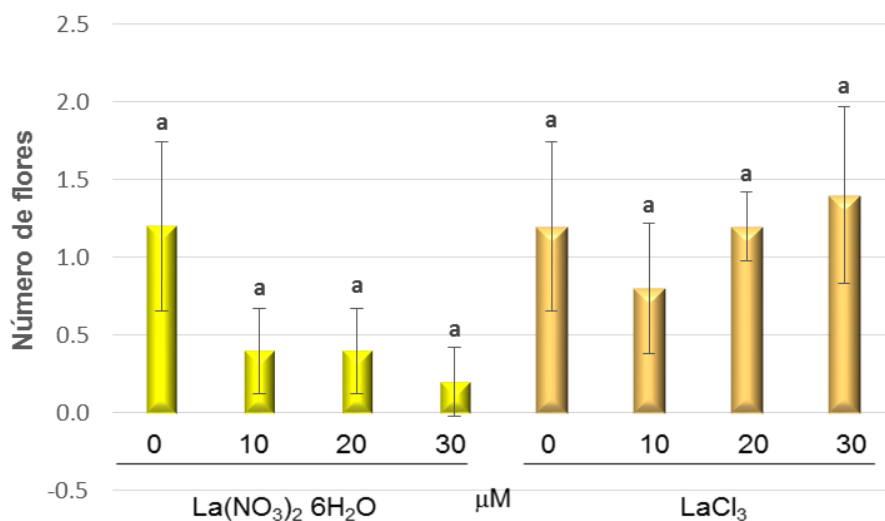


Figura 1. Número de flores en la variedad Gold Fever, en respuesta a la aplicación de cuatro dosis (0, 10, 20 y 30 μM) y de dos fuentes de La [$\text{La}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y LaCl_3]. Barras \pm DE con letras distintas en cada figura indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

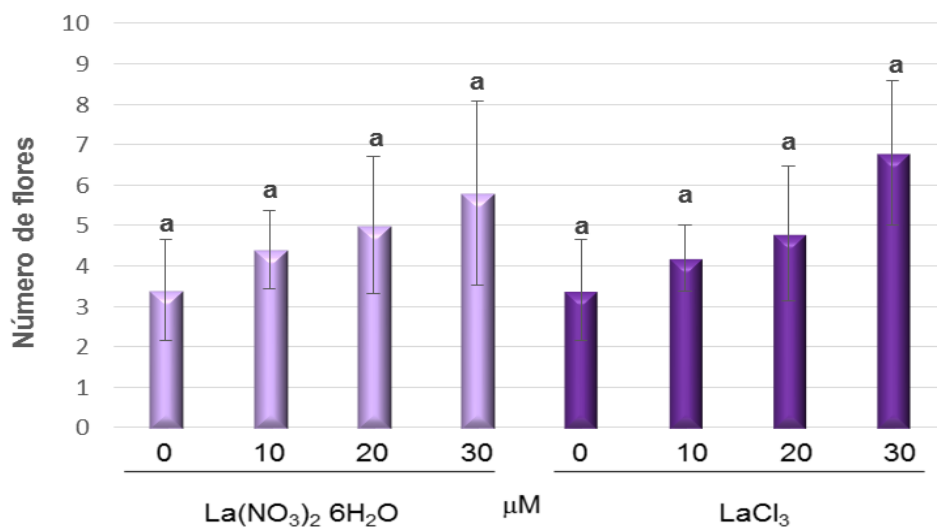


Figura 2. Número de flores en la variedad Regal, en respuesta a la aplicación de cuatro dosis (0, 10, 20 y 30 μM) y de dos fuentes de La [$\text{La}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y LaCl_3]. Barras \pm DE con letras distintas en cada figura indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

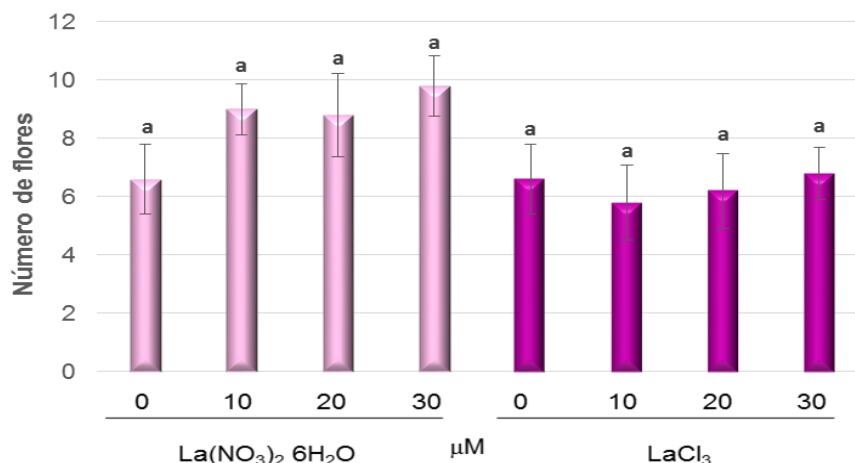


Figura 3. Número de flores en la variedad Garnet Glow, en respuesta a la aplicación de 4 dosis (0, 10, 20 y 30 μM) de dos fuentes de La [$\text{La}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y LaCl_3]. Barras \pm DE con letras distintas en cada figura indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

4. CONCLUSIÓN

Se concluye que las variedades de alcatraz evaluadas en esta investigación, muestran respuestas diferenciales a la fuente y concentración aplicada de La en lo que respecta al número de flores. En dos de ellas, dosis crecientes de La incrementan el número de flores, empero éste no es significativo.

BIBLIOGRAFÍA

- ASERCA. La Floricultura. Boletín ASERCA Regional Peninsular. 2008.
- E. Tribe. D., H. Robards. K., R. Reghenzani. J. and J. Ashe. C. Report to the Australian Academy of Technological Sciences and Engineering, Report, University of Queensland, Australia. 1990.
- F. C. Gómez. M., L. I. Trejo. T., C. Cuacua. T., M. A. Jácome. C. y H. E. Senties, H. Los elementos benéficos: potencial para innovar la producción agrícola. 2015. Agroentorno. Bo. 166. Año 18. Jul/Ago. pp. 19-20.
- J. G. Cruz C. y A. M. Cárdenas. El alcatraz (*Zantedeschia* spp.) un cultivo nuevo para el trópico de Veracruz, México. 1997. Proc. Interam. Soc. Trop. Hort. 41:84-87.
- J. G. Cruz C., L. P. A. Torres, and R. J. Mendoza. Shade, fertilizers and a natural bioregulator to improve *Zantedeschia* growth in a Mexican tropical upland area. Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico. 2001. 85(3-4): 135-142.
- Hu, X., X. R. Wang, and C. Wang. 2006. Bioaccumulation of lanthanum and its effects on growth of maize seedlings in red loamy soils. Pedosphere 16: 799-805.
- I. Pérez. C. Aplicación de ácido giberélico y thidiazuron en alcatraz (*Zantedeschia elliptiana*), para incrementar flores bajo invernadero. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Fitotecnia. Tesis de Licenciatura. Texcoco. México. 1998. 85 p.
- SAS. SAS High-Performance Forecasting 2.2: User's Guide, Volumes 1 and 2. Cary, NC: SAS Institute Inc. Ver. 9. 652p. SAS. 2002. SAS High-Performance Forecasting 2.2: User's Guide, Volumes 1 and 2. Cary, NC: SAS Institute Inc. 2002. Ver. 9. 652p.

ESTUDIO DEL EFECTO DE FÁRMACOS PRESENTES EN AGUA RESIDUAL SINTÉTICA SOBRE LA POBLACIÓN MICROBIANA DE UN LODO ACTIVADO POR UN PRE-TRATAMIENTO CON LA ENZIMA LACASA.

Ramírez Hernández Jessica Fabiola¹, Rodríguez Nava Celestino Odín¹

¹Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

RESUMEN

En los últimos años se ha cuantificado la presencia de fármacos en los efluentes de Plantas de tratamiento de aguas residuales, y se ha demostrado que ciertos fármacos no son removidos o eliminados de las aguas residuales por los tratamientos convencionales; lo que ha provocado que los fármacos lleguen al medio ambiente causando alteraciones en los organismos y producen un cambio en la estructura poblacional de los lodos activados, haciendo que el tratamiento por este método sea menos eficiente.

A causa de que los tratamientos convencionales no son tan eficientes para eliminar los desechos de los medicamentos, en este trabajo se propuso utilizar un pre-tratamiento enzimático, utilizando a la enzima lacasa por su alto poder oxidante, combinando este pre-tratamiento con un tratamiento de lodos activados para poder remover a fármacos como amoxicilina, bezafibrato, indometacina y sulfametoxazol; con el objetivo de disminuir la toxicidad de estos compuestos en los lodos activados después de los dos tratamientos.

Se adecuaron tres reactores cada uno con agua residual sintética y lodos activados, al reactor ARS (control) no se le adicionaron fármacos; al reactor ARS+F se le adicionaron fármacos sin un pre-tratamiento enzimático, al reactor ARS+E se le adicionaron fármacos con el pretratamiento enzimático (0.5 g/L de lacasa). A estos tres reactores se les evaluó la DQO (demanda química de oxígeno), los SSV (sólidos suspendidos volátiles), se realizó la cuantificación de los fármacos después del pre-tratamiento por electroforesis capilar y se compararon las estructuras poblacionales de los lodos activados con una huella metagenómica.

El reactor ARS+E presentó un porcentaje de remoción del 100% para todos los fármacos; el reactor ARS+F obtuvo un porcentaje del 43% para el sulfametoxazol, 100% bezafibrato y 0% indometacina. Al comparar la huella metagenómica de los lodos de cada reactor se obtuvo un 55% de similitud entre el reactor ARS y ARS+E y una similitud del 50% entre ARS y ARS+E. La estructura poblacional presentó modificaciones con el uso del pre-tratamiento enzimático, pero no incidió sobre la funcionalidad de los lodos activados de acuerdo con los resultados del porcentaje de remoción de materia orgánica, ya que el reactor ARS+E tiene una eficiencia de remoción del 85%, mientras que el reactor ARS+F tiene un porcentaje del 68%.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha cuantificado la presencia de fármacos en cuerpos de agua que pueden afectar la dinámica poblacional dentro de un ecosistema, también se ha detectado en afluentes y efluentes de las Plantas de tratamiento que descargan a aguas superficiales. (Santos *et al*, 2010).

Como se sabe los medicamentos están elaborados para la prevención y mitigación de las enfermedades, pero algunos de estos medicamentos están diseñados para combatir infecciones causadas por microorganismos como bacterias, parásitos y hongos. (B.A.Boxall; 2004). Pero esto no quiere decir que solo afectan a estas formas de vida; porque por otra parte, muchos de estos organismos que afectan a la salud humana y animal, tiene un papel crucial en el funcionamiento de los ecosistemas. Los investigadores han comenzado a examinar los efectos a largo plazo bajo la exposición de fármacos tal como lo estudió Boxall (2004) tabla 1.

Tabla 5 Efectos de los fármacos en diferentes organismos (B.A.Boxall, 2004)

Sustancia	Clase de medicamento	Efecto reportado
Tilosina	Antibiótico	Impacto sobre la estructura de las comunidades microbianas del suelo
Ibuprofeno	Antiinflamatorio	Estimula el crecimiento de cianobacterias e inhibe el crecimiento de plantas acuáticas.
Fenofibrato	Regulador de lípidos	Inhibe la actividad de hepatocitos de trucha
Diazepam	Ansiolítico	Inhibe la capacidad de regeneración de los tentáculos en los polipos
Estreptomicina	Antibiótico	En los microorganismos del suelo se aumenta la resistencia bacteriana.
Eritromicina	Antibiótico	Inhibe el crecimiento de cianobacterias y plantas acuáticas

Otro problema que representan los fármacos son en el tratamiento de aguas residuales, ya que los microorganismos juegan un papel importante en la eliminación de contaminantes orgánicos, y la eliminación de fármacos es menos eficiente, porque hay una influencia de los fármacos en la estructura poblacional de los lodos activados, como lo demuestra Barbara Kraigher *et al* (2008) donde evalúa la estructura poblacional de los lodos activados en el tratamiento de aguas residuales a pequeña escala con diferentes concentraciones (5µg/L - 50µg/L). Los resultados que se obtuvieron fueron una alta influencia de los fármacos (naproxeno, ketoprofeno e ibuprofeno) en la diversidad microbiana después de dos meses de exposición con la mayor concentración (50 µg/L); además de reducir la carga microbiana de betaprotobacteria en los reactores, entre los cuales se hallan *Thauera*, *Sphaerotilus*, *Ideonella* y spp relacionados con *Acidovorax dominada*. Las bacterias nitrito-oxidantes del genero *Nitrospira* sp, las cuales son organismos claves para la etapa de nitrificación en las plantas de aguas residuales, estas solo se hallaron en los reactores sin fármacos.

2. TEORÍA

En la actualidad no se tiene un control sobre los desechos de los medicamentos; y estudios realizados han demostrado que pueden generar daños en el ambiente, por lo que es necesario estudiar alternativas de tratamiento de aguas residuales que remuevan parcialmente o totalmente los fármacos para disminuir la toxicidad crónica en algunas especies acuáticas y sobre la estructura poblacional de los lodos activados. Esto ha impulsado la búsqueda de las nuevas tecnologías de oxidación basado en los sistemas biológicos tales como la oxidación enzimática. Estos sistemas presentan las siguientes ventajas frente a la oxidación química: las enzimas son catalizadores específicos, biodegradables, no generan metabolitos tóxicos y pueden degradar compuestos en baja concentración. (Rodríguez S. y Toca J.L., 2006)

Una de las alternativas para el tratamiento de compuestos de difícil degradación es el uso de enzimas como la enzima lacasa, es por ello que se propone utilizar un sistema de pre-tratamiento enzimático, y un sistema de lodos activados, para que los fármacos sean oxidados a especies menos tóxicas y puedan ser más fácilmente removidos por el tratamiento con lodos activados, evitando que la población microbiana se vea afectada por la toxicidad de los fármacos.

La lacasa es una glicoproteína monomérica, dimérica o trimérica con cuatro átomos de cobre, el cobre es el responsable de la oxidación del sustrato. Las lacasas hacen uso del oxígeno molecular para oxidar una variedad de compuestos aromáticos y no aromáticos a través de un mecanismo de oxidación con radicales. (Majeau J., *et al*, 2010)

Dentro de las ventajas que menciona Rodríguez O. acerca del uso de tratamientos por oxidación de la lacasa, se encuentran:

- Transformación del contaminante, sin generar residuos peligrosos que necesitan confinamiento.
- Mineralización completa (CO₂ Y H₂O)
- Útiles para compuestos refractarios que persisten en tratamientos biológicos.
- Tratar contaminantes que se encuentran en bajas concentraciones presentes en aguas residuales.
- No se forman subproductos de reacción.

Marco-Urrea *et al* en el año 2009, probaron la degradación de Ibuprofeno, ácido clofíbrico y carbamazepina utilizando hongos como *Trametes versicolor*, *Irpex lacteros*, *Ganoderma lucidium* y *Phanerochaete chrysosporium*; después de 7 días de incubación, el Ibuprofeno fue degradado por las cuatro cepas. *Trametes versicolor* fue el único hongo capaz de degradar el ácido clofíbrico con porcentajes de remoción cercanos al 97% con una concentración inicial de 5 mg/L. La carbamazepina fue degradada ligeramente por *T. versicolor* (56%), pero cuando se agregó en forma de pellet este hongo, la degradación de este compuesto fue cercana al 70%. Y en el año 2010 utilizaron a la enzima lacasa de la especie *Trametes versicolor* a una concentración de 10mg/L para la degradación de naproxeno, una concentración de 55 g/L y de ketoprofeno a una concentración de 40 g/L y se reportó que el 95% del naproxeno fue degradado después de 5 horas mientras que el ketoprofeno se degradó al 80% y se encontraron intermediarios en los espectros de HPLC.

Debido a la presencia de fármacos en las aguas residuales, se ha comprobado que la calidad del agua puede afectar a las comunidades bacterianas que se encuentran en los lodos activados como lo demuestra La Paraa, *et al* en el año 2001, realizando muestreos de los efluentes de reactores biológicos que contenían agua residual con desechos farmacéuticos y comparando los efluentes de aguas residuales sin desechos farmacéuticos. Mediante un análisis con PCR-DGGE se logró determinar la estabilidad de la estructura poblacional de los lodos activados; demostrando un cambio en la estructura poblacional a corto plazo en los reactores que contenían desechos farmacéuticos, sin embargo los valores de DQO no variaron demasiado, por lo que se concluye en el trabajo que las comunidades bacterianas de los lodos activados pueden responder a una perturbación cambiando su estructura pero adaptándose al medio de tal manera que la calidad de los efluentes en ambos casos sea la misma.

3. PARTE EXPERIMENTAL.

Se acondicionaron 3 reactores con una capacidad de 2 L cada uno. Se adicionó 205 ml de lodos activados a cada uno y se agregó 2L de agua residual sintética. Se alimentó a cada uno de los

reactores con 5 L agua residual sintética por día con una velocidad de flujo de 2.66 ml/min con una bomba peristáltica (Masterflex L/5) y un tiempo de retención hidráulica de 12 horas.

Los reactores se alimentaron solo con agua residual sintética hasta el día 48 posteriormente cada uno de los reactores fue alimentado de manera diferente; un reactor se alimentó con agua residual sintética (reactor control), otro con agua residual sintética con fármacos (reactor de prueba con fármacos) y uno con agua residual sintética, fármacos y biolite (enzima lacasa) a una concentración de 0.5g/L (reactor con pretratamiento enzimático); antes de ser alimentado el reactor, se preparó el agua residual sintética con fármacos y se adicionaba la enzima y se hizo reaccionar durante 1 hora y después del pretratamiento enzimático se alimentó al reactor.

Se tomaron muestras de 2.5 ml del efluente y afluente de cada reactor para el análisis de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) y de los Sólidos Suspending Volátiles (SSV) cada semana.

Al termino del experimento se tomaron muestras de 20 ml del efluente de cada reactor para realizar el análisis meta genómico de la estructura poblacional de los lodos activados.

4. RESULTADOS.

En la figura 8 se muestra el porcentaje de remoción obtenido después de la cuantificación de fármacos (amoxicilina, sulfametoxazol, indometacina y bezafibrato) en agua residual sintética antes y después del pre-tratamiento enzimático con biolite (0.4 y 0.5 g/L) y el tratamiento con lodos activados y sin el pre-tratamiento enzimático con lodos activados.

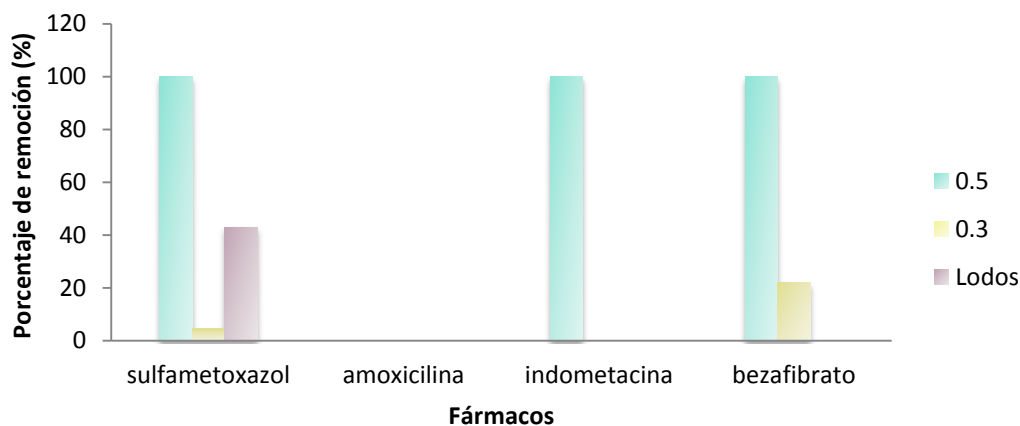


Figura 8 Porcentaje de remoción de fármacos

Figura 8 Porcentaje de remoción de los fármacos de amoxicilina, indometacina, sulfametoxazol y bezafibrato con los pre-tratamientos enzimáticos de 0.5 g/L de biolite (barras azules) y 0.3 g/L de biolite (barras verdes) y sin pre- tratamiento enzimático con lodos activados (barras rosas).

En la figura 8 se observa que el porcentaje de remoción con el tratamiento enzimático de 0.3 g/L de Biolite fue de 4.6% para sulfametoxazol, 0 % para la indometacina y 22.03% para el bezafibrato, mientras que para el tratamiento con biolite de 0.5 g/L fue del 100% para todos los fármacos excepto la amoxicilina ya que esta no fue detectada por el método de electroforesis capilar en

ninguna muestra; para el tratamiento con lodos activados el porcentaje de remoción fue de 43% para el sulfametoxazol, 100% bezafibrato y 0% para la indometacina.

Porcentaje de remoción.

El porcentaje de remoción nos permite evaluar la eficiencia de los reactores al mineralizar la materia orgánica.

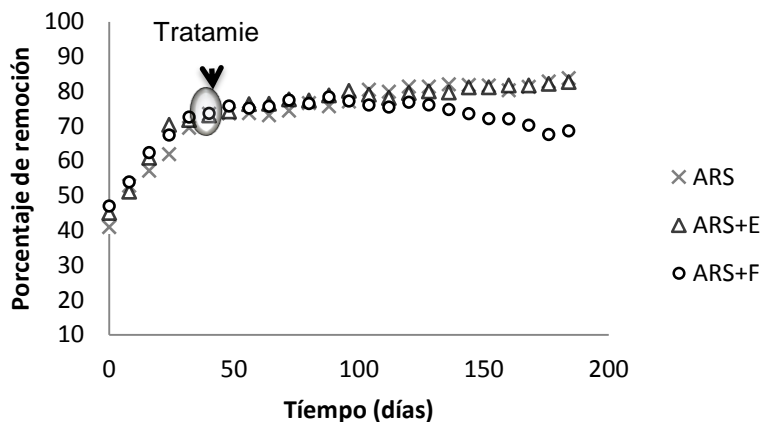


Figura 10 Porcentaje de Remoción

Figura 10 Porcentaje de remoción de la Demanda Química de Oxígeno de los diferentes reactores durante 184 días. Reactor con agua residual sintética (**ARS**), reactor con agua residual sintética con fármacos y con pre-tratamiento enzimático (**ARS+E**) y reactor con agua residual sintética con fármacos sin tratamiento enzimático (**ARS+F**).

En la figura 10 se observa que hasta el día 40 los reactores tienen la misma tendencia y se aproximan a un porcentaje de remoción del 75%; debido a que hasta el día 40 los reactores no han sido acondicionados con los diferentes tratamientos; al iniciar el tratamiento con enzima y adicionar los fármacos, se observa que el reactor ARS y el reactor ARS+E tienen la misma tendencia a aumentar su porcentaje de remoción llegando hasta un 85%. El reactor ARS+F se observa que a partir del día 120 el porcentaje de remoción disminuye a través del tiempo llegando hasta un 68%.

Sólidos suspendidos volátiles (SSV)

En la figura 7 se muestra la evaluación de los SSV, la cual se realizó tomando muestras de los lodos activados de cada reactor por semana, a partir del día 96 hasta el día 184.

Figura 11 Gráfica de la evaluación de sólidos suspendidos volátiles (SSV) en mg/L de los diferentes reactores en un periodo de 88 días. Muestra del efluente del reactor con agua residual sintética (**ARS**), muestra del efluente del reactor con agua residual sintética con fármacos sin tratamiento enzimático (**ARS+F**) y muestra del efluente del reactor con agua residual sintética con fármacos y pre-tratamiento enzimático (**ARS + E**).

En la figura 11 se observa que la muestra de ARS+E presenta un aumento en los SSV a través del tiempo al igual que la muestra de ARS, llegando a una cantidad máxima de 5720 mg/L comparada con la muestra de ARS que tiene un máximo de SSV de 5280 mg/L; mientras que la muestra de ARS+F presenta una disminución en la cantidad de SSV comparada con la muestra de ARS.

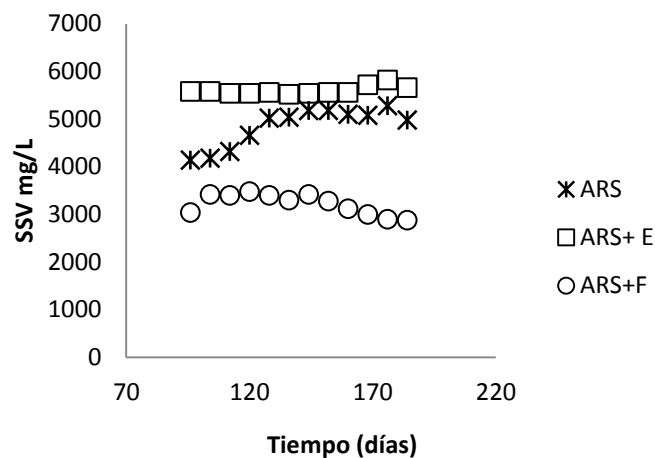


Figura 11 Sólidos Suspendedos Volátiles

5. CONCLUSIONES.

De acuerdo con todos los resultados se observa que hubo una similitud del 50% entre la población microbiana del reactor de ARS y ARS+E, y se esperaba que la similitud entre ambas poblaciones fuera cercana al 100%, sin embargo a pesar de que la población bacteriana se vio modificada, no se modificó el funcionamiento bioquímico de los microorganismos de acuerdo con los porcentajes de remoción de materia orgánica obtenidos, ya que se encontró que el reactor de ARS+E tuvo un porcentaje de remoción del 82.66% muy parecido al del reactor de ARS(83.77%) ,demostrando con esto que el pretratamiento con la enzima lacasa (0.5 g/L) fue efectivo al disminuir el efecto toxico de los fármacos al removerlos al 100% del agua residual sintética.

La concentración optima de Biolite (enzima lacasa) fue de 0.5 g/L con una velocidad especifica de 0.0222 mmoles/min gr de enzima.

El porcentaje de remoción con el tratamiento enzimático 0.3 g/L de Biolite fue de 4.6% para sulfametoxazol, 0% para la indometacina y 25.4% para el bezafibrato, mientras que para el tratamiento con enzima 0.5 g/L fue del 100% para todos los fármacos y para el tratamiento con lodos activados fue de 44% para el sulfametoxazol, 100% bezafibrato y 0% para la indometacina.

El porcentaje de similitud entre las poblaciones bacterianas de la muestra del reactor ARS y el reactor ARS+F ES del 55% y el porcentaje de similitud entre las poblaciones bacterianas de la muestra del reactor ARS y el reactor de ARS+E es del 50%

Los fármacos no afectaron la funcionalidad bioquímica de los lodos activados al obtener un porcentaje de remoción de materia orgánica del 82.66%; así mismo la cantidad de sólidos suspendidos volátiles no se vio afectada en este reactor.

Los fármacos afectaron la funcionalidad bioquímica de los lodos activados al obtener un porcentaje de remoción de materia orgánica del 68%; así mismo la cantidad de sólidos suspendidos volátiles se vio modificada (disminuyo) con respecto al reactor ARS.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kraigher B., Kosjek T., Heath E., Kompared B., Mandic-Muleca I. (2008). Influence of pharmaceutical residues on the structure of. *Water research*, pp. 4580-4582.
2. LaParaa T., Nakatsu C.H., Pantea L.M., Allemana J. (2001). Stability of the bacterial communities supported by a PCR-DGGE. *WATER RESEARCH*, 638-640.
3. B.A.Boxall, A. (2004). The environmental side effects. *EMBO reports*, pp. 1110-1112.
4. Carlos E. Rodríguez-Rodríguez, E. M.-U. (2009). Degradation of naproxen and carbamazepine in spiked sludge by slurry. *Bioresource technology*, pp. 2162-2164.
5. Majeau J., Brar S., Tyagi R. (2010). Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology*, pp. 2332-2339.
6. Marco-Urrea E., PérezTrujillo M., Blánquez P., Vicent T., Caminal G. (2010). Biodegradation of the analgesic naproxen by *Trametes versicolor* and identification. *Bioresource technology*, pp. 2159–2166.
7. Santos L, Araujo A., Fachini A., Pena A.Delerue-Matos C. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Hazardous Materials*, pp. 46-47.

EXTRACTOS Y ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* L. COMO INHIBIDOR DE MOVILIDAD EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

Perla Ivonne Gallegos Flores^{1,2}, Rómulo Bañuelos Valenzuela¹, Edgar Esparza Ibarra², Lucía Delgadillo Ruíz², Mónica Silva Vega^{1,2}, Carlos Meza Lopez¹

¹Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Zacatecas.

²Unidad Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Zacatecas.

RESUMEN

El aceite esencial y extractos (alcohólico, cocción e infusión) de orégano (*Origanum vulgare* L.) fueron usados para determinar la inhibición de movilidad en bacterias gram negativas flageladas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.*, *Clostridium spp.* y *Salmonella spp.*). Se ha demostrado que la planta de orégano posee propiedades analgésicas, antiespasmódicas, antioxidantes y antimicrobianas, siendo esta última de especial interés en medicina tradicional para el control de microorganismos. Los mayores componentes antibacterianos de esta planta son el carvacrol y el timol, estos principios activos dañan la membrana exterior de bacterias gram negativas aumentando la permeabilidad y provocando lisis celular. Se prepararon extractos de orégano acuoso (cocción e infusión), alcohólico y oleoso (aceite esencial). La concentración de principios activos se determinó por cromatografía de gases. La movilidad bacteriana fue determinada por el método en agar SIM y como control se utilizó estándar de carvacrol a diferentes concentraciones (0.05, 0.15 y 0.76 mg/mL). El aceite esencial de orégano, presentó inhibición de movilidad en cada una de las bacterias; esto atribuido a la alta concentración de carvacrol (165.20 mg/mL) y timol (24.74 mg/mL) presente en el aceite. La infusión con una concentración de carvacrol y timol de 0 y 8.75 mg/ml respectivamente, presentó la menor inhibición de motilidad bacteriana ya que únicamente disminuyó la movilidad en *Clostridium spp.* Se concluye que ambos principios activos reducen la movilidad bacteriana dependiendo de la concentración y del método de preparación del extracto de orégano.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas aromáticas, son consideradas de gran interés por sus propiedades organolépticas, químicas y medicinales. Estas plantas, se han utilizado como tratamiento para infecciones virales, parasitarias, fúngicas y bacterianas (González *et al.*, 2008). Un gran número de especies de plantas aromáticas pertenecen a la familia Lamiaceae; dentro de esta familia el orégano (*Origanum vulgare* ssp.), es una de las plantas ampliamente usada cuyos extractos y aceites esenciales son particularmente ricos en compuestos fenólicos, flavonoides y terpenoides (Armatu *et al.*, 2010).

El orégano, es una planta herbácea, perenne y aromática que crece en forma silvestre y se encuentra ampliamente distribuida en varias regiones del mundo. Los principales constituyentes químicos del orégano, son el carvacrol, timol, α -terpineno, limoneno y linalol; los cuales dependiendo del origen y tipo de planta será su concentración (Baser, 2002; Bakkali *et al.*, 2008).

Los extractos y aceites esenciales a partir de la planta de orégano, poseen propiedades analgésicas, antiespasmódicas, antioxidantes y antimicrobianas, siendo esta última de especial interés en medicina tradicional para el control de microorganismos, por lo que existen

investigaciones que han reportado el efecto de los extractos del orégano contra un gran número de cepas bacterianas (Sahin *et al.*, 2004; Choelo *et al.*, 2009; Tommasi *et al.*, 2009). Las acciones antimicrobianas del orégano se le atribuyen principalmente a los principios activos carvacrol y timol (Baátour *et al.*, 2011).

El carvacrol [2-metil-5-(1-metiletil)-fenol] y timol [(5-metil-2-(1-metiletil) fenol)] se encuentran principalmente en los extractos de orégano y tomillo. Estos principios activos han demostrado tener amplio espectro de actividad contra un gran número de bacterias gram positivas y gram negativas; se considera que el mecanismo de acción de estos compuestos químicos, es aumentar la fluidez y permeabilidad de la membrana citoplasmática bacteriana, lo cual da lugar a la pérdida del contenido celular y lisis celular, además se ha demostrado que el carvacrol en bacterias gram negativas evita el desarrollo de estructuras secundarias de movilidad como son flagelos y por lo tanto limita su capacidad de alcanzar los sitios óptimos de colonización en el huésped y así, su patogenicidad disminuye (Lambert *et al.*, 2001; Burt *et al.*, 2007; Madigan *et al.*, 2009).

2. PARTE EXPERIMENTAL

La planta de orégano, se recolectó en septiembre 2014 en el municipio de Valparaíso, Zacatecas, México, ubicado a 23° 10' de latitud norte y 104° 22' de longitud oeste, localizado a una altitud entre 700 y 3000 msnm, la temperatura promedio anual es de 12 a 24 °C y una precipitación anual de 500 a 1000 mm. La planta se deshidrató a 45 °C en un horno Thermo Scientific ® durante 24 h.

Preparación de los extractos

A partir de una mezcla de hojas, flores y tallos de la planta deshidratada y triturada, los extractos se prepararon en tres medios diferentes; acuoso, alcohólico y oleoso.

Extracto Acuoso

Para un medio acuoso se obtuvieron dos extracciones: cocción e infusión. La relación utilizada fue 25:200 (muestra molida:agua). Para el proceso determinado cocción, la planta se llevó a punto de ebullición durante 30 min, después se dejó reposar durante 10 min y se filtró a través de papel Whatman no. 4. En la preparación de infusión, el agua se llevó a ebullición durante 5 min., posteriormente se añadió la muestra de orégano y se dejó reposar durante 10 min y se filtró en papel Whatman no. 4 (Martins *et al.*, 2014; Teixeira *et al.*, 2013), todos los extractos fueron almacenados frascos ámbar.

Extracto Alcohólico

Se realizó utilizando una relación de 25 g de muestra molida por cada 200 mL de etanol:agua (80:20, v/v), la mezcla se colocó en frascos ámbar y se maceró durante un mes, se filtró a través de papel Whatman no. 4 y finalmente, el 70% del volumen total del solvente se vaporizó en un extractor tipo Soxhlet a 85°C (Pesewu *et al.*, 2008).

Extracto Oleoso

Se obtuvo a partir de la muestra seca por hidrodestilación durante 1 hr utilizando un sistema Clevenger modificado. Durante el proceso de ebullición, el material seco absorbe el agua y el aceite esencial difunde a través de las paredes celulares por medio de osmosis, luego es vaporizado y arrastrado por la corriente del evaporador (Teixeira *et al.*, 2013).

Determinación de principios activos en los extractos

Se determinó mediante cromatografía de gases (CG) en un equipo Agilent Technologies serie 6890N, empleando una columna polar DB_WAXetr con las siguientes características: largo 50 m,

ancho 320 μm , ancho de poro 1 μm . La composición química de cada extracto fue establecida por comparación de los tiempos de retención en minutos con respecto a una mezcla estándar.

Los estándares utilizados fueron grado reactivo marca Sigma Aldrich: carvacrol, timol, limoneno, linalool y terpineno con un porcentaje de pureza de 98, 99.5, 98, 97 y 85 % respectivamente.

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Los microorganismos bacterianos utilizados fueron bacterias gram negativas (flageladas): *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp*, *Clostridium spp* y *Salmonella spp*. Las cuales fueron identificadas por pruebas bioquímicas en paneles comerciales por el equipo Phoenix 100 Becton Dickinson and Company ® Sparks, Maryland 21152 USA y proporcionadas por la Universidad Autónoma de Zacatecas. Las condiciones de crecimiento para cada bacteria fue una temperatura de 37 °C en una incubadora Thermo ® durante un periodo de 24 h.

Preparación en tubo del medio SIM con extracto

Para la preparación del medio SIM BD Bioxon ®, se pesaron 30 g de agar por cada litro de agua destilada, el agar se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min y se dejó enfriar a una temperatura aproximada de 35 °C para adicionar el extracto correspondiente (0.5 mL del extracto por cada 4 mL de medio SIM) en tubos estériles de 10 mL.

Para cada bacteria se realizó una serie de tubos por triplicado como se describe a continuación:

1) sin extracto, 2) con alcohol al 80%, 3) carvacrol 0.05 mg/mL (C1), 4) carvacrol 0.15 mg/mL (C2), 5) carvacrol 0.75 mg/mL (C3), 6) infusión, 7) cocción, 8) extracto alcohólico, 9) extracto oleoso y 10) aceite de orégano comercial ®.

Pruebas de movilidad bacteriana

La prueba de movilidad se realizó mediante la técnica de picadura; la cual consiste en tomar con un asa bacteriológica una colonia aislada de bacterias y hacer una picadura en el medio SIM atravesando el agar hasta el fondo del tubo.

Una vez terminada la siembra por picadura, todas las muestras fueron incubadas a 37 °C por 24 h.

La movilidad bacteriana fue medida usando un método cualitativo; a) movilidad positiva (+): presencia de turbidez difusa o total en el medio. b) movilidad negativa (-): ausencia o presencia leve de crecimiento solo en el sitio de la picadura.

3. RESULTADOS

Determinación de principios activos en los extractos

La acción biológica de los extractos de orégano, dependen de la composición química y concentración de principios activos, el tipo de planta y su lugar de origen así como el método de preparación de los mismos (Vokou *et al.*, 1993). Estudios previos han reportado que los mayores componentes en los extractos de orégano son el carvacrol y su isómero timol, seguido de su precursor el α -terpinene (Aridogan *et al.*, 2002; Kokkini *et al.*, 2004; Burt *et al.*, 2004; Béjaoui *et al.*, 2013). En el cuadro 1, se puede apreciar que de acuerdo al método de extracción se obtuvieron diferentes compuestos y diferentes concentraciones, manifestando que la infusión fue el método en el que se extrajo menor cantidad de principios activos, sin embargo, la concentración de limoneno fue mayor en la infusión que en el resto de los otros extractos. El carvacrol, fue dominante en los extractos oleosos seguido del extracto alcohólico, sin embargo no existe presencia de este compuesto en los extractos acuosos, esto deja en claro una vez más que de acuerdo al medio de

extracción se obtendrán diferentes compuestos bioactivos así como diferentes concentraciones. Los principios activos con mayor concentración fueron el α -terpinene ($1.57 \text{ E}^4 \text{ mg/mL}$) y linalol ($1.57 \text{ E}^4 \text{ mg/mL}$) en los extractos alcohólico y aceite de orégano ® respectivamente.

Cuadro 1. Concentración y composición química de los extractos de orégano.

Extracto	α -Terpinene (mg/mL)	Limoneno (mg/mL)	Linalol (mg/mL)	Timol (mg/mL)	Carvacrol (mg/mL)
Cocción	71.746	0	1.828	4.893	0
Infusión	0	65.984	0	8.749	0
Alcohólico	1.57 E^4	0	10.545	26.713	3.235
Oleoso	0	14.494	8.788	24.741	165.201
Aceite de Orégano ®	0	32.068	1.47 E^4	116.986	282.674

Pruebas de movilidad bacteriana

La movilidad bacteriana *in vitro* de los extractos y aceites esenciales del orégano contra las bacterias se evaluó cualitativamente por la presencia o ausencia de turbidez en el tubo, los resultados del cuadro 2 mostraron que los extractos oleosos y alcohólico tienen amplia actividad antibacteriana frente a estos cuatro microorganismos, inhibiendo completamente el crecimiento bacteriano; con lo que respecta a los extractos acuosos, la infusión presentó menor efecto ya que únicamente inhibió la movilidad en *Clostridium Spp*. Las diferencias en la inhibición de movilidad bacteriana presentada en cada extracto, se atribuye a la presencia o ausencia de los diferentes principios activos obtenidos en cada extracto y a su concentración (cuadro 1), principalmente de los compuestos carvacrol y timol.

El preciso mecanismo de acción antibacteriana de los extractos y aceites esenciales de plantas y de sus compuestos bioactivos aún no han sido plenamente establecidos, sin embargo, se conoce que ocasionan cambios en la composición de los ácidos grasos de la membrana celular bacteriana; estos cambios han sido observados cuando las células son expuestas a concentraciones elevadas de los biocompuestos presentes en los aceites esenciales (Di Pascua *et al.*, 2006). El carvacrol y timol dañan la membrana exterior de las bacterias gram negativas e incrementan la permeabilidad de la membrana citoplasmática que causa pérdidas de ATP, fuga de iones y lisis celular (Helander *et al.*, 1998; Gill y Holley, 2006;).

Burt *et al.*, (2007) señalaron que bacterias de *E. coli* crecen en presencia de carvacrol a una concentración de 0.05 mg/mL sin síntesis de flagelos, provocando que el microorganismo crezca sin movilidad, es decir, cuando la célula bacteriana está sujeta a un estrés ocasionado por sustancias tóxicas y está en riesgo su viabilidad, la bacteria es capaz de suprimir funciones secundarias, como la formación del flagelo, y así conservar energía para otras funciones primordiales en la célula (Li *et al.*, 1993), sin embargo, a una concentración de 0.75 mg/mL de carvacrol la bacteria cesa completamente la formación de estructuras de movilidad y ocurre la muerte celular. Con respecto a los estándares de carvacrol presentados en este trabajo (cuadro 2), estos no mostraron inhibición de movilidad en concentraciones de 0.05 y 0.15 mg/mL como lo

señalaron Burt y colaboradores, sin embargo para una concentración alta (0.75 mg/mL), el efecto de inhibición para *E. coli* corresponde con la investigación de Burt.

Cuadro 2. Pruebas de movilidad bacteriana.

Extractos	Movilidad			
	<i>Escherichia. Coli.</i>	<i>Pseudomona Spp.</i>	<i>Clostridium Spp.</i>	<i>Salmonella Spp.</i>
Blanco	+	+	+	+
Blanco OH	+	+	+	+
C1= 0.05 mg/mL	+	+	+	+
C2= 0.15 mg/mL	+	+	+	+
C3= 0.75 mg/mL	-	+	-	+
Cocción	-	-	-	+
Infusión	+	+	-	+
E. Alcohólico	-	-	-	-
E. Oleoso	-	-	-	-
A. Orégano ®	-	-	-	-

Los extractos y aceites esenciales de orégano han demostrado tener una fuerte actividad antibacteriana (Béjaoui *et al.*, 2013; Teixeira *et al.*, 2013; Grondona *et al.*, 2014), considerando el efecto que tienen los compuestos del orégano sobre las bacterias, estos podrían ser utilizados para tratar infecciones bacterianas resistentes a los antibióticos; ya que para los microorganismos no es posible desarrollar fácilmente resistencia a los extractos y aceites esenciales de plantas, la razón se debe a que los extractos son mezclas complejas de compuestos químicos, muchos de los cuales poseen actividad antimicrobiana con diferentes mecanismos de acción, haciendo que sea imposible para los microorganismos establecer vías de resistencia (Mellor, 2000).

4. CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados sugieren que los principios activos presentes en los extractos y aceite esencial de orégano tienen potencial antibacteriano ya que evita la formación del flagelo y por lo tanto disminuye su mecanismo de patogenicidad y en ocasiones estos compuestos dependiendo de la concentración pueden generar muerte celular, por lo que estos biocompuestos podrían ser utilizados para la preservación de los alimentos y una fuente importante de compuestos naturales útiles para el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aridogan, b., Baydar, H., Kaya, S., Demirci, M., Ozbasar, D. y Mumcu, E. 2002. Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. Arch. Pharmacological Reserch, 26 (6): 860-864.
2. Armatu, A., Colceru-Mihul, S., Bubueanu, C., Draguici, E., Pirvu L. 2010. Evaluation of antioxidant and free scavenging potential of some Limiaceae species growing in Romania. Romanian Biotechnological Letters, 15 (3): 5274-5280.
3. Baátour, O., Kaddour, R., Mahmoudr, H., Tarchourr, I., Bettaieb, I., Nasri, N. 2011. Salt effects on *Origanum majorana* fatty acid and essential oil composition. Journal of Science of Food and Ariculture, 91 (14): 2613–2620
4. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. y Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils a review. Food Chemistry and Toxicology , 46: 446–475.
5. Baser, K. H. C. 2002. Oregano: The Genera *Origanum* and *Lippia*. p. 109-126 En: S. E. Kintzios. Editorial, The Turkish *Origanum* species. London, UK and New York, NY.
6. Béjaoui, A., Chaabane, H., Jemli, M., Boulila, A. y Boussaid, M. 2013. Essential oil composition and antibacterial activity of *Origanum vulgare* subsp. *Glandulosum* Desf. at Different phenological stages. Journal of Medicinal Food, 16 (12): 1115-1120.
7. Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. Journal Food and Microbiology, 94: 223-253.
8. Burt, S., Zee, R., Koets, A., de Graaff, A., van Knapen, F., Gaastra, W., Haagsman, H y Veldhuizen, E. 2007. Carvacrol Induces Heat Shock Protein 60 and Inhibits Synthesis of Flagellin in *Escherichia coli*O157:H7. Applied and Environmental Microbiology, 73 (14): 4484-4490.
9. Coelho da Costa, A., Cavalcanti dos Santos, B.E., Santos, F.L., Lima, E.O. 2009. Antibacterial activity of the essential oil of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) against bacterial multiresistant strains isolated from nosocomial patients. Journal Revista Brasileira de Farmacognosia, 19: 236–241.
10. Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G. y Mauriell, G. 2006. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde and eugenol in the growing media. Journal Agriculture, Food and Chemistry, 54: 2745-2749.
11. Gill, A. y Holley, R. 2006. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. Journal Food and Microbiology, 111: 170-174.
12. Grondona, E., Gatti, G., López, A., Sánchez, L., Rivero, V., Pessah, O., Zunino, M. y Ponce, A. 2014. Bio-efficacy of the Essential Oil of Oregano (*Origanum vulgare* Lamiaceae. Ssp. *Hirtum*). Plant Foods Hum Nutr, 69 (4):351-357
13. Gonzáles, M. R., Casares, M., Sánchez, C. P., Ramiro, J. M., Molero, J., Pieroni, A., Giusti, M. E., Censorii, E., de Pascuale, C., Della, A. 2008. Medicinal plants in the Mediterranean area: Synthesis of the results of the project Rubia. Journal of Ethnopharmacology, 116 (2): 341-357.
14. Helander, I., Alakomi, H., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E., Gorris, I. y Von Wright, A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. Journal Agriculture, Food and Chemirtry, 46: 3590-3595.
15. Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J. y Nychas, G.-J. E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal Applied Microbiology, 91: 453–462.
16. Li, C., Louise, W., Shi y Alder, J. 1993. Adverse conditions which cause lack of flagella in *Escherichia coli*. Journal Bacteriology, 175: 2229-2235.
17. Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P. y Clark, D. 2009. Estructura y función en bacterias y arqueas. P. 73-115. Ed. Pearson Educacion. Vol. 12. Madrid, España.

18. Martins, N., Barros, L., Santos, C., Henriques, M., Silva, S. y Ferreira, I. 2014. Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: Different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. *Food Chemistry*, 158: 73–80
19. Mellor, S. 2000. Herbs and spices promote health and growth. *Pig progress*, 16:27-30
20. Pesewua, G., Cutler, R. y Humbera, D. 2008. Antibacterial activity of plants used in traditional medicines of Ghana with particular reference to MRSA. *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 102–111.
21. Sahin, F., Gulluce, M., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Agar, G. 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* in the Eastern Anatolia Region of Turkey. *Food Control*, 15: 549–557.
22. Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Serrano, C., Matos y O., Neng, N. 2013. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 93 (11): 2707–2714.
23. Tommasi, L., Negro, C., Miceli, A., Mazzotta, F. 2009. Antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants grown in the Mediterranean area. *Journal of Essential Oil Research*, 21 (2): 185–189.
24. Vokou, D., Kokkini, S. y Bessiere, J. 1993. Geographic variation of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. *Biochemical Systematics and Ecology*, 21: 287–295.

EVALUACIÓN DE DOS TÉCNICAS DE PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *AGAVE SALMIANA* UTILIZANDO COMO EXPLANTE SEMILLA

Lorena Elizabeth Chávez Güitrón¹, Florencia del Carmen Salinas Pérez¹, Edgar Marín Bautista Romero¹, Alejandra Berenice Olvera Contreras¹ y Yesenia Sánchez Zepeda¹.

¹Universidad Tecnológica de Tecámac

RESUMEN

El objetivo fue evaluar la propagación *in vitro* de la semilla de *Agave salmiana* Otto utilizando la germinación tradicional y con escarificación. Se utilizaron semillas recolectadas en el Estado de Hidalgo. Para seleccionarlas se consideró tamaño, color, y estado fisiológico. El proceso de desinfección, lavado y enjuagado se realizó bajo condiciones de esterilidad. Se realizó un diseño completamente al azar, se sembraron en medio MS 5 semillas con 3 repeticiones. El grupo A, se cultivó por sembrado simple, el grupo B se cultivó por escarificación. Los cultivos se incubaron entre una temperatura de 21.8 °C y 24.8 °C, humedad relativa de 28 % y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad. Las variables evaluadas fueron: porcentaje de contaminación, porcentaje de germinación, días para la germinación y longitud del brote cotiledonario. Las variables días de germinación y longitud del brote cotiledonario se analizaron con una prueba de hipótesis. El porcentaje de contaminación en el grupo A fue de 5% y en B fue del 10%. El porcentaje de germinación fue de 86.66 ± 6.67 para el grupo B y 93.33 ± 6.67 para el A. En días para la germinación el grupo B germinó en 3.23 ± 0.45 días ($P < 0.05$) y A germinó en 9.57 ± 0.85 días. La longitud total de brotes cotiledonarios en el grupo B fue de 2.34 ± 0.31 cm ($P < 0.05$) y en el A fue de 1.38 ± 0.28 cm. Con el sembrado simple el porcentaje de contaminación fue menor. En el cultivo *in vitro* escarificado se obtuvo una germinación en menor tiempo y un mayor tamaño del brote cotiledonario.

1. INTRODUCCIÓN

El maguey (*Agave salmiana*) conocido con el nombre de maguey manso, maguey verde y maguey pulquero, es una de las especies con más tradición de uso en México. Perteneciente a la familia Agavaceae, se reconoce por sus hojas anchas, fuertes, suculentas, de color verde con largos ápices acuminados y sigmoideos, de tallo corto y macizo, con forma de roseta y tamaños que van desde 1.50 m a 3.40 m de altura y hasta 5 m de diámetro. Tiene flores carnosas de tépalos dimorfos, estrechos y doblados hacia el interior (Gentry, 1982).

Se le encuentra en terrenos planos y montañosos, desde suelos profundos a superficiales, este agave se distribuye principalmente en el Valle de México y en los estados de México, Hidalgo, Puebla y Tlaxcala. (Galván, 1994).

En México, los agaves han tenido y tienen una gran importancia económica y cultural para numerosos pueblos indígenas y mestizos, que los han aprovechado durante siglos como fuente de alimento, bebida, medicina, combustible, cobijo, ornato y producción de fibras.

Actualmente el cultivo masivo de agave tiene gran importancia para la industria alimentaria e industrial, esta va desde su valor ecológico y económico, hasta aspectos culturales.

Desafortunadamente, muchas especies de este grupo han sido descuidadas desde los puntos de vista de ausencia de mejoramiento, explotación racional, saqueo y falta de conservación.

En este sentido, la biotecnología vegetal puede aportar herramientas valiosas que permitan el mejor aprovechamiento de estas plantas y aseguren al mismo tiempo su conservación, como son las técnicas que permiten la propagación masiva *in vitro* de agave (Rosales *et al.*, 2008).

De acuerdo con Gentry (1982), el género agave se propaga por semillas, vástagos vegetativos y propágulos en la inflorescencia.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar dos técnicas de propagación *in vitro* de *Agave salmiana* utilizando como explante semilla.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Para el presente trabajo se utilizaron semillas recolectadas en el estado de Hidalgo (figura 1), de la variedad *Agave salmiana* Otto. Para seleccionar la semilla se consideró el tamaño, color, así como rasgos fisiológicos del estado de la semilla como son: sin necrosis, ni señales de deterioro, utilizando para ello la prueba de flotación (figura 2).

El proceso de desinfestación de la semilla se realizó manteniéndolas durante 24 horas en una solución de hipoclorito de sodio al 15% (Rosales *et al.*, 2008). Posteriormente fueron lavadas y enjuagadas dos veces en agua destilada estéril, en condiciones de esterilidad, finalmente para su secado se colocaron en papel filtro estéril. El medio de cultivo utilizado fue Murashige y Skoog (MDS) al 50% (1962). El pH del medio fue de 5.7.

El medio se esterilizó en un autoclave a 1.5 kg/cm^2 y una temperatura de 121.5°C durante 17 minutos. Se realizó un diseño completamente al azar. Se sembraron 5 semillas por frasco. Se realizaron 3 repeticiones por técnica de sembrado. La siembra de la semilla se realizó utilizando dos técnicas de sembrado, por sembrado simple y por escarificación de la semilla (figura 3).



Fig. 1. Semilla Agave

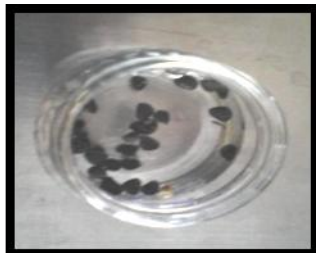


Fig. 2. Prueba de flotación



Fig. 3 Semilla escarificada

Para la siembra por escarificación se desprendió la testa de la semilla y se cortó en forma de embrión. Los frascos ya preparados fueron llevados a cámaras de incubación con una temperatura mínima de 21.8°C y máxima de 24.8°C , una humedad relativa de 28 % y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

Las variables evaluadas fueron porcentaje de contaminación, porcentaje de germinación, días para la germinación y longitud del cotiledón. Para las variables días para la germinación y tamaño de la plántula se realizó una prueba de hipótesis (t de student). (Daniel, 2003)

3. RESULTADOS

El porcentaje de contaminación de las semillas cultivadas *in vitro* con la técnica sembrado simple fue del 5% y de las semillas cultivadas por escarificación fue del 10% (Figura 4).

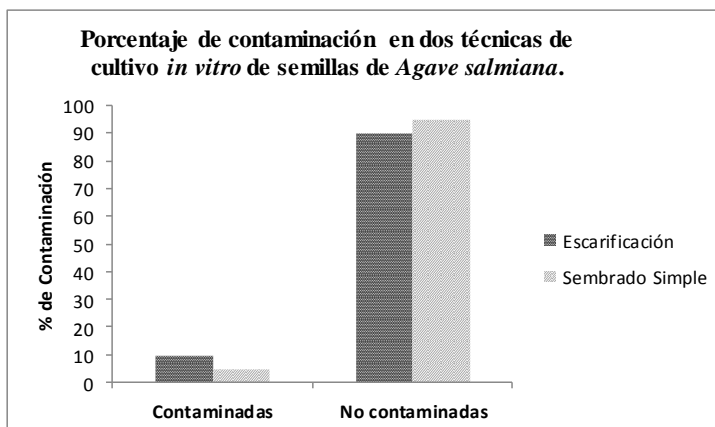


Fig. 4. Porcentaje de contaminación de cultivo *in vitro* por sembrado simple y escarificación de la semilla.

Los porcentajes de germinación del cultivo *in vitro* de semillas de *Agave salmiana* fueron de 86.66 ± 6.67 para el sembrado con escarificación y 93.33 ± 6.67 para el sembrado simple (Figura 5).

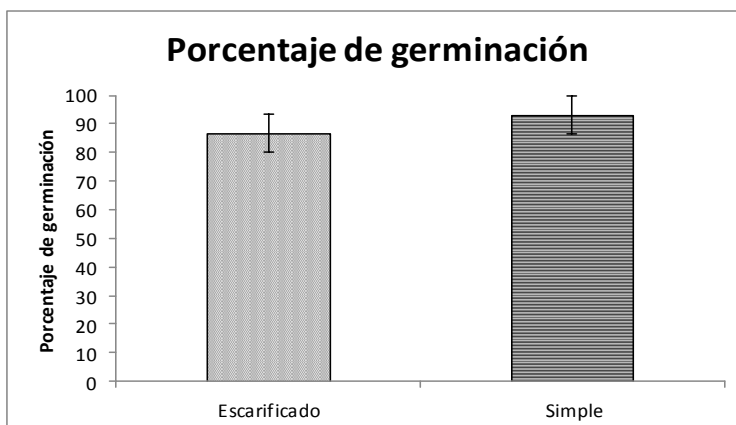


Fig. 5. Porcentaje de germinación de cultivo *in vitro* por sembrado simple y escarificación de la semilla.

El porcentaje de germinación fue mayor con la técnica de sembrado simple (Figura 4), que con el sembrado con previa escarificación esto probablemente fue causado por el manejo de la semilla durante la escarificación, ya que con este último método de sembrado el porcentaje de

contaminación fue mayor (Figura 3). Flores-Morales en su trabajo utilizó el sembrado simple en cultivo *in vitro* obteniendo un 98% de germinación.

Los porcentajes de germinación obtenidos con las dos técnicas de cultivo se consideran aceptables para la propagación de semillas de Agave. Rosales *et al.*, 2008, realizaron la propagación de diferentes especies de Agave utilizando como explantes tejidos meristemáticos y obtuvieron porcentajes variables de germinación desde el 60 al 100%. En este trabajo los porcentajes de germinación fueron del 86 al 93%.

El tiempo de brote (porcentaje de germinación) (Figura 5) con el método de cultivo por escarificación fue más rápido que con el cultivo por sembrado simple, esto probablemente se debió a que el medio de cultivo MDS se encontraba en contacto con el embrión lo que le proporcionó los nutrientes de forma directa.

En la Figura 6 se observa los días que tardó la semilla de *Agave salmiana* en germinar. La figura 7 muestra una semilla germinada en cultivo *in vitro*. El grupo sembrado con previa escarificación de la semilla germinó en 3.23 ± 0.45 días y el grupo con sembrado simple germinó en 9.57 ± 0.85 días. En esta variable existió diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$).

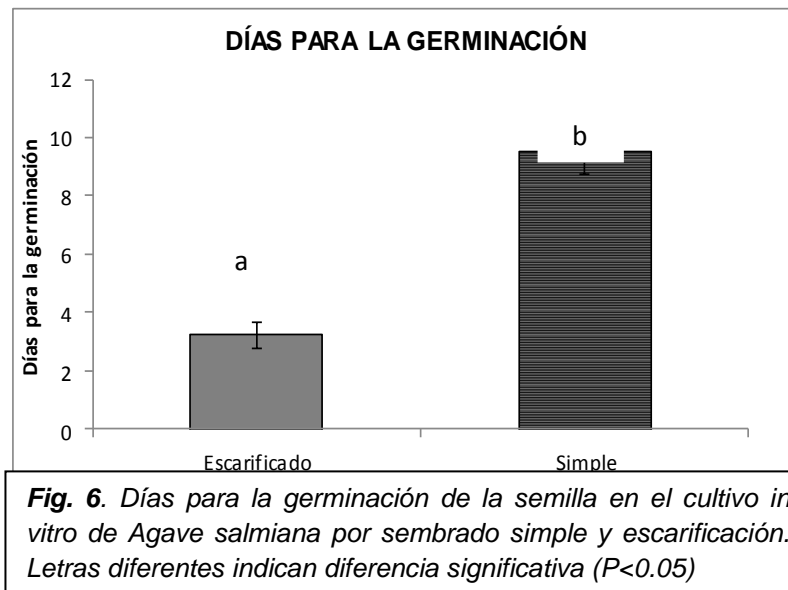
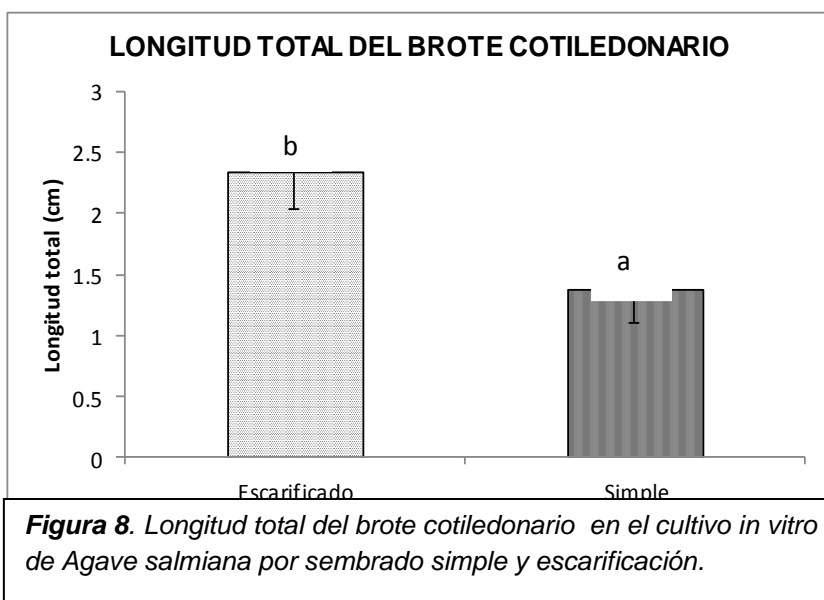


Fig. 7 Semilla de *Agave salmiana*, cultivo *in vitro*

En la figura 8 se muestran los resultados de la longitud total de brote cotiledonario, en el sembrado por escarificación fue de 2.34 ± 0.31 cm y en el método de sembrado simple la longitud total fue de 1.38 ± 0.28 cm. En esta variable también existió diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$).

Los resultados de este estudio apoyan lo señalado por Valenzuela 2003 y lo demostrado por Vázquez-Díaz 2011, en la relación a la propagación magueyes a partir de semilla. Por lo que la propagación *in vitro* de la semilla de *Agave salmiana* Otto por escarificación ofrece la ventaja de generar explantes de mayor longitud (Figura 8) lo que podría asegurar un desarrollo vegetativo en un menor tiempo.



4. CONCLUSIONES

La técnica de cultivo *in vitro* de semillas de *Agave salmiana* Otto escarificadas requirió un menor tiempo de emergencia.

La longitud total de brote cotiledonario obtenido del cultivo *in vitro* de *Agave salmiana* utilizando como explante semilla escarificada tuvo un mayor desarrollo.

Esta tecnología es apropiada para la micropropagación de plantas de *Agave salmiana*, en periodos cortos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Daniel, W. W. (2003). Bioestadística. Limusa.

2. Galván, R.V. 1994. Riquezas de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
3. Gentry, H. S. (1982). Agaves of Continental North America. Library of Congress Catalog in Publication Data.
4. Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3):473-497.
5. Morales, A. F., Hidalgo, E. C., Pérez, F. J. S., Aguilar, L. R., & Luna, J. R. Mecanismos de conservación y uso del Maguey Pulquero *Agave salmiana* en el altiplano mexicano. Disponible en: http://www.somas.org.mx/pdf/pdfs_libros/agriculturasostenible6/61/42.pdf Fecha de consulta: 26 Enero 2015.
6. Rosales, MS, Solís, ÁG, Méndez, NL, Balch, EP. (2008). Efecto de citocininas en la propagación in vitro de agaves mexicanos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31(4):317-322.
7. Valenzuela Zapata, A. G., & Zapata, A. G. V. (2003). El agave tequilero: cultivo e industria de México.
8. Vázquez Díaz, E., García Nava, J. R., Peña Valdivia, C. B., Tobías, R., Hugo, M., & Morales Ramos, V. (2011). Tamaño de la semilla, emergencia y desarrollo de la plántula de maguey (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck). *Revista fitotecnia mexicana*, 34(3):167-173.

PURIFICACIÓN DE GLICEROL DERIVADO DE LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL Y SU UTILIZACIÓN EN LA ELABORACIÓN DE UN PRODUCTO DE VALOR AGREGADO

Ingrid Astrid Martínez Ortega ¹, Eugenia Guadalupe Ortiz Lechuga ¹ y Katiushka Arévalo Niño ¹

¹Instituto de Biotecnología. Universidad Autónoma de Nuevo León.

RESUMEN

Actualmente, en todo el mundo se están buscando fuentes de energía “limpia” o de origen no fósil. Es así como hace algunos años surgió el uso de los biocombustibles, que son combustibles que provienen de fuentes no fósiles. Entre ellos, el biodiesel es uno de los más ampliamente investigados, y se puede obtener a partir de grasas y aceites vegetales y animales. Hoy en día la demanda de biodiesel va a la alza, de manera que se producen miles de litros de este combustible al año, sin embargo, en la reacción de producción de biodiesel, inevitablemente también se obtiene su residuo o subproducto: el glicerol. Como la demanda de glicerol no es tan alta, el glicerol residual se almacena y actualmente se considera como un problema de desecho. Es por esto que el objetivo de este trabajo es la utilización de glicerol residual proveniente de la fabricación de biodiesel para convertirlo en un producto de valor agregado. Ya que el glicerol residual conlleva muchas impurezas, primero se desarrolló un proceso de purificación por medio de precipitación por cambio de pH. Este proceso es reproducible, sencillo, costeable, y no requiere muchos materiales. Además provee un glicerol que alcanza una pureza mínima de 40%. También, se utilizó glicerol (tanto purificado como crudo) como aditivo para la formulación de un pegamento a base de almidón. Este aditivo provee al pegamento desarrolladas propiedades de resistencia a altas y bajas temperaturas, así como resistencia a la humedad y una larga vida de anaquel.

1. INTRODUCCIÓN

El dramático incremento en la demanda de combustibles para transporte y el incremento de las preocupaciones medioambientales, asociados a la disminución de las reservas de petróleo, han incrementado el énfasis en la energía renovable (Yang *et al.*, 2012). La importancia de la sustitución de los combustibles denominados fósiles o tradicionales, derivados del petróleo, por otros de origen vegetal, recae en el hecho de provenir de una fuente renovable, ser un instrumento de lucha contra el deterioro medioambiental, además de ser un factor de desarrollo de la agricultura e industrias derivadas (Stratta, 2000). El biodiesel constituye un tipo alternativo de combustible, que se deriva principalmente de la transesterificación de aceites vegetales y grasas animales. La forma convencional de producción de biodiesel involucra la transesterificación de triacilglicerol a alquil ésteres de ácidos grasos, en la presencia de un alcohol como metanol o etanol, y un catalizador básico como NaOH o KOH o un catalizador ácido, generando biodiesel y glicerol como el principal derivado (Chatzifragkou & Papanikolaou, 2012). Se ha estimado que por cada 100kg de biodiesel, se producen 10kg de glicerol crudo (Pagliaro *et al.*, 2007; Yazdani & González, 2007; Yang *et al.*, 2012). Aunque los biocombustibles como el biodiesel representan una alternativa segura, renovable, y segura para el medio ambiente a los combustibles fósiles, su viabilidad económica es un asunto de gran preocupación (Yazdani & González, 2007). Aunque se esperaba que la producción mundial de biodiesel alcanzara una gran capacidad, de hecho es menor que lo anticipado y ha incrementado lentamente. La principal razón es su costo de producción relativamente alto. Es así que la utilización del glicerol derivado de la síntesis de

biodiesel es una opción prometedora para bajar el costo de producción (Yang *et al.*, 2012). A medida que el mercado actual de oferta y demanda de glicerol no puede acomodar las cantidades en exceso de glicerol generado a partir de la producción de biodiesel, el flujo de glicerol ha creado un exceso de oferta en el mercado del mismo. Por estas razones, deben explorarse nuevos mercados o aplicaciones para el glicerol, como la conversión a productos de valor agregado (Tan *et al.*, 2013).

2. TEORÍA

Se han reportado diversos usos para el glicerol obtenido a partir de la producción de biodiesel, entre ellos, como alimento para rumiantes y no rumiantes, producción de 1,3-propanediol, ácido cítrico, hidrógeno, polihidroxicanoatos (PHA), entre otros (Yang *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2013).

Sin embargo, dependiendo del proceso y materia utilizados para la producción de biodiesel, el glicerol crudo derivado presenta impurezas en distintas proporciones, como cenizas, jabones, aceite que no reaccionó, sal y metanol, lo que inhibe el crecimiento microbiano y lo convierte en tóxico para el medio ambiente si se libera sin un tratamiento adecuado (Sarma *et al.*, 2012).

Diversos autores han reportado procesos de purificación de glicerol proveniente de la producción de biodiesel, utilizando diferentes tipos de materia prima, catalizadores y técnicas, obteniendo un rango de niveles de purificación. Entre ellos, Chunbao *et al.* (2014), obteniendo 96% de pureza o Posada *et al.* (2011), obteniendo 98% de pureza. Sin embargo, estos procedimientos son complejos e involucran la utilización de columnas de separación, carbón activado, o columnas de destilación.

Por medio del presente proyecto, se propone un proceso de purificación simple, reproducible, costeable, y que no requiere muchos materiales, para el tratamiento de glicerol proveniente de la producción de biodiesel.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Se utilizó un proceso de producción de biodiesel diseñado por Ortiz-Lechuga (2011), el cual permite dirigir la reacción de transesterificación hacia la obtención de glicerol.

Se aplicó este proceso a aceite de cocina usado y a aceite comercial virgen. Tras la reacción de transesterificación, se recuperó la fase de glicerol crudo.

A ambos tipos de glicerol se les aplicó el proceso de purificación de glicerol diseñado por el autor. De esta manera, se obtuvieron cuatro tipos de muestras de glicerol: dos crudos (uno proveniente de aceite virgen y uno de aceite residual) y dos purificados (uno proveniente de aceite virgen y uno de aceite residual). Según la materia prima y tratamiento utilizados, éstos se denominaron GRC (glicerol residual crudo), GRP (glicerol residual purificado), GVC (glicerol virgen crudo) y GVP (glicerol virgen purificado).

Para evaluar su composición, se realizaron pruebas de contenido glicerol por medio de FTIR, contenido de agua, cenizas, jabones, ácidos grasos libres, MONG (por evaluar) y viscosidad a los cuatro tipos de glicerol.

Asimismo, se utilizaron los cuatro tipos de glicerol obtenidos como aditivo para una formulación de pegamento a base de almidón, dirigido a su uso en etiquetas de papel sobre botellas de plástico, como un producto de valor agregado. A estas muestras se les realizaron pruebas de resistencia a temperatura: calor (de 25°C a 40°C) durante un mes, frío (4°C) y humedad, y vida de anaquel durante un año.

4. RESULTADOS

Producción de biodiesel: El proceso utilizado generó una relación de 1 a 1 en cuanto a contenido de glicerol y biodiesel, tanto en aceite residual como en virgen.

Proceso de purificación: Se tienen resultados preliminares en cuanto al contenido de glicerol de las muestras sometidas al proceso de purificación y a las muestras de glicerol crudo, cuyo contenido mínimo es (putativamente) de 40%. El contenido de las demás variables evaluadas se presenta en la tabla 1. Mediante este proceso, se obtuvieron volúmenes de glicerol purificado hasta del 59% del volumen inicial, tanto en glicerol proveniente de aceite residual como virgen (figura1).

PRUEBA	TIPO DE MUESTRA			
	GVP	GVC	GRP	GRC
AGUA	No	No	No	No
CENIZAS	4.07 %	4.65 %	4.95 %	5.1 %
JABONES	0.04 g	0.39 g	0.12 g	0.44 g
AGL	0.8	1.27	0.8	1.8
VISCOSIDAD	17.2 cP	15.0 cP	19.3 cP	17.6 cP
GLICEROL	EC	EC	EC	EC
MONG	EC	EC	EC	EC

Tabla 1. Composición de las muestras de glicerol evaluadas. Debido al tratamiento que se le dio a las muestras de glicerol, no se encontraron restos de agua en las mismas. AGL= ácidos grasos libres. EC= determinación en curso.

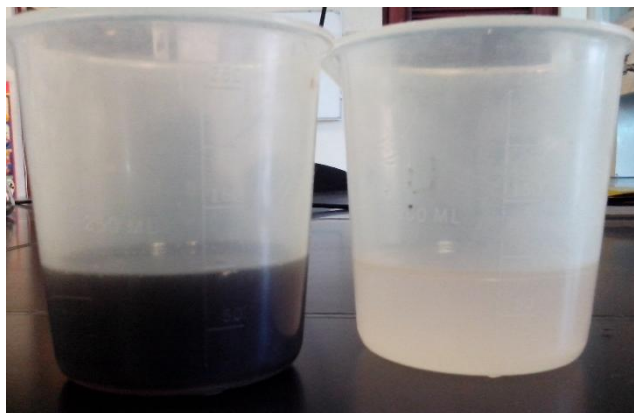


Figura 1. Glicerol recuperado del proceso de purificación de glicerol a partir de aceite residual (izquierda) y virgen (derecha).

Producción de pegamento: Se realizaron pruebas de calor durante un mes, utilizando diversas mezclas de pegamento conteniendo los 4 tipos de glicerol como aditivo. Los resultados de este ensayo se muestran en la tabla 2.

Aditivo	25°C	30°C	35°C	40°C
Control	100%	100%	100%	100%
GRC	100%	100%	0%	100%
GRP	100%	100%	100%	100%
GVC	100%	100%	33%	66%
GVP	100%	100%	100%	66%

Tabla 2. Resultados de las pruebas de calor a diferentes temperaturas utilizando los 4 tipos de glicerol como aditivo para pegamento, y control sin aditivo. 100% indica que todas las etiquetas del ensayo permanecieron estables. Este ensayo se mantuvo durante un mes.

De igual forma, se realizó una “prueba de agua helada”, utilizando etiquetas de papel pegadas con las diferentes mezclas de pegamento en frascos de vidrio, y sumergiéndolos en agua a 4°C durante una hora, seguido de un reposo de 24 horas, y de nuevo sumersión en agua helada durante una hora. En esa prueba, el 100% de las muestras permaneció estable durante los dos periodos de sumersión y el periodo de reposo. Asimismo, la composición del papel no se vio afectada. Cabe mencionar que al finalizar estas pruebas, ninguna muestra presentó exudados y la remoción de las etiquetas fue sencilla, dejando una ligera capa residual sobre el frasco, fácilmente removible con una toalla de papel.

En cuanto a las pruebas de vida de anaquel, todas las etiquetas a 25°C permanecieron estables durante un año. A 30°C todas las muestras permanecieron estables, a excepción de GVC. Las pruebas a 40°C también pueden considerarse satisfactorias, mientras que a 35°C los resultados fueron los más inestables. Esta información puede apreciarse en la tabla 3.

Aditivo	25°C	30°C	35°C	40°C
Control	100%	100%	100%	100%
GRC	100%	100%	0%	100%
GRP	100%	100%	66%	66%
GVC	100%	33%	0%	66%
GVP	100%	100%	100%	66%

Tabla 3. Resultados de las pruebas de vida de anaquel a diferentes temperaturas. Este ensayo se mantuvo durante un año.

5. CONCLUSIONES

Se desarrolló un proceso de purificación reproducible, costeable y sencillo, para el tratamiento de glicerol proveniente de la producción de biodiesel utilizando aceite virgen o residual como materia prima.

Se fabricó un pegamento como producto de valor agregado, eficaz y de producción costeable y sencilla. Este producto presento características de alta eficiencia a diferentes temperaturas, resistencia a la humedad y de fácil desprendimiento en las superficies probadas.

Se determino que el glicerol, en estado virgen o purificado, presenta propiedades similares en cuanto a su utilización como aditivo en este producto de valor agregado, lo que podría contribuir a la utilización del exceso de flujo de glicerol derivado de la industria del biodiesel.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chatzifragkou & S. Papanikolaou, "Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 95, 2012, pp. 13-27.
2. E. G. Ortiz-Lechuga, "Producción de biodiesel a partir de higuera (ricinus communis L.) y aceites vegetales comerciales puros y reutilizados en la región noreste de México", Tesis Profesional, Universidad Autónoma de Nuevo León, 2011.
3. F. Yang, M. A. Hanna & R. Sun, "Value-added uses for crude glycerol-a byproduct of biodiesel production", *Biotechnology for Biofuels*, Vol. 5, 13, 2012, pp. 1-10.
4. H. W. Tan, A. R. Abdul & M. K. Aroua, "Glycerol and its applications as raw material: A review", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 27, 2013, pp. 118-127.
5. J. Posada, J. Higuera & C. Cardona, "Optimization on the use of crude glycerol from the biodiesel production to obtain poly-3-hydroxybutyrate", *Linköping Electronic Conference Proceedings*, Vol. 57, 2011, pp. 237-334.
6. J. Stratta, "Biocombustibles: los aceites vegetales como constituyentes principales del biodiesel", *Investigación y Desarrollo – Departamento de Capacitación y Desarrollo de Mercado*, 2000, pp. 1-15.
7. M. Pagliaro, R. Ciriminna, H. Kimura, M. Rossi & C. Pina, "From glycerol to value-added products", *Angewandte Chemie International Edition*, Vol. 46, 24, 2007, pp. 4434-4440.
8. S. Sarma, S. Brar, E. Sydney, Y. Bihan, G. Buelna & C. Soccol, "Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review", *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 37, 8, 2012, pp. 6473-6490.
9. S. Yazdani & R. González, "Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry", *Current Opinion in biotechnology*, Vol. 18, 3, 2007, pp. 213-219.
10. X. Chunbao, M. R. Nanda, Z. Yuan, W. Qin & M. A. Poirier, "Purification of crude glycerol using acidification: effects of acid types and products characterization", *Austin Chemical Engineering*, Vol. 1, 1, 2014, pp. 1-7.

ESTUDIO COMPARATIVO DE VALORES DE CÉLULAS SOMÁTICAS DE LECHE DE BOVINO CON MASTITIS SUBCLÍNICA, ENTRE LA PRUEBA DE CALIFORNIA Y FOSSOMATIC

Martha Alicia Castañeda Vazquez¹, Erika Patricia Salas Castañeda¹, Hugo Castañeda Vazquez¹, Alejandro Quintero De la Torre¹. Carlos Bedolla Cedeño².

¹Laboratorio de Mastitis y Diagnóstico Molecular, CUCBA, Universidad de Guadalajara.

²Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

RESUMEN

La leche posee efecto antibacterial inhibiendo crecimiento bacteriano por contener factores de defensa como leucocitos e inmunoglobulinas sanguíneos que pasan a la glándula mamaria. Se designan como Células Somáticas las células de tejidos (células epiteliales) y células de defensa. En una glándula mamaria sana existen contenidos menores de 100,000 células somáticas/ml de leche, aumentando en respuesta a microorganismos hasta millones/ml de leche en la mastitis. El Conteo de Células Somáticas (CCS) es la medición utilizada para valorar el estado inflamatorio de la glándula mamaria, se puede realizar con la prueba de California (CMT) a nivel de campo o conteo óptico de fluorescencia con Fossomatic entre otros. El objetivo del estudio fue determinar equivalencias del CCS con el equipo Fossomatic-90 y la prueba de California. El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Mastitis de la UDG, realizándose el conteo de células somáticas con el equipo Fossomatic-90 en 80 muestras de leche de vacas de establos del Municipio de Ixtlahuacán de los Membrillos Jalisco, donde se realizaron las pruebas de California (CMT). En ambas pruebas se obtuvieron conteos celulares que difieren una de otra, dado que la prueba de California valora subjetivamente la cantidad a diferencia del Fossomatic donde se tiñen cada célula y eso favorece el recuento. Existen diversos métodos para CCS, diferentes en sencillez, costos y confiabilidad; se sugiere seleccionar el que se ajuste a las necesidades y posibilidades de cada explotación como prevención y diagnóstico de la mastitis.

1. INTRODUCCION

El Conteo de Células Somáticas (CCS) es la medición utilizada para indicar el estado de salud de la glándula mamaria, compuesto principalmente de glóbulos blancos de la sangre junto con un pequeño número de células epiteliales del tejido secretor. La leche tiene un efecto que inhibe el crecimiento de bacterias, las mata o las hace inofensivas. Su efecto antibacterial se debe a factores de defensas celulares y humorales. En los celulares intervienen los leucocitos polimorfonucleares (PMN), los linfocitos y los macrófagos (principal tipo de células en la leche).

La leche en condiciones normales contiene alrededor de 1, 000,000 células/ml. El término "células somáticas" indica una concentración de células en un mililitro de leche, entre ellos leucocitos (95%) y células epiteliales exfoliadas de la glándula mamaria (5%). Se estima que el 98% de las Células Somáticas que se encuentran en un momento dado en la leche, se generaron principalmente en respuesta a una invasión por microorganismos. Entre los factores de origen no inflamatorio que producen aumento del CCS, se encuentran el estado de la lactación, observándose un aumento al inicio y al final de la misma y el número de partos, aumentando el CCS con la edad productiva de los animales.

En condiciones normales las células somáticas en leche se encuentran en los siguientes porcentajes: macrófagos (60%), linfocitos (25%) y neutrófilos (15%).

En el caso de la mastitis aguda, los conteos pueden llegar hasta millones de células somáticas por mililitro de leche. Los leucocitos más numerosos durante el curso de una mastitis son los leucocitos polimorfonucleares (PMN). Éstos reconocen las bacterias marcadas con anticuerpos y las fagocitan. Pueden pasar de 12 a 24 horas después de la infección antes de que el contenido de PMN aumente claramente (Wolter *et al.*, 2004).

El CCS en leche está ampliamente aceptado como indicador del estado de salud de la glándula mamaria en lactación. Su uso está totalmente estandarizado en el ganado bovino, la importancia del conteo de células somáticas en la leche es que se puede conocer si la leche que se obtiene de la glándula mamaria es de buena calidad. La calidad sanitaria de la leche se asocia a la ausencia de mastitis y el principal parámetro para confirmar la presencia de esta patología es el CCS.

La calidad de la leche implica tres aspectos: la cantidad, sus componentes y los factores contaminantes (contaminación bacteriológica, conteo celular somático y presencia de residuos).

Efectuar conteos celulares somáticos es un procedimiento común, sobre todo en la industria láctea para medir la calidad de la leche. En el establo se utiliza como indicador de las infecciones. Puede ser realizada en la leche de cuartos individuales, vacas individuales, el hato completo o un grupo de hatos.

Las glándulas mamarias que nunca se han infectado normalmente tienen CCS de 20,000 a 50,000/ml de leche. En grandes poblaciones de vacas, 80% de los animales no infectados tendrán un CCS menor de 200,000/ml y 50% menor de 100,000/ml.

Cuando la leche de todas las vacas en el hato se mezcla, como en el tanque receptor un conteo de células somáticas mayor de 200,000 células/ml indica la presencia de mastitis subclínica. Los conteos de células somáticas por debajo de 400,000 células/ml son típicos de los hatos que poseen buenas prácticas de manejo. Conteos de células somáticas mayores de 500,000 células/ml indican que un tercio de las glándulas se encuentran infectadas y que la pérdida de leche debido a mastitis es mayor de 10% (García, 2004).

Existen varios métodos para realizar el conteo de células somáticas (CCS): físicos, químicos y biológicos, entre ellos difieren en sencillez, confiabilidad y costo; lo importante es seleccionar el que mejor se ajuste a las necesidades y posibilidades de cada explotación

Dentro de las pruebas biológicas se encuentran: la prueba de California para mastitis, prueba de Catalasa, prueba de Wisconsin, prueba de CAMP y el monitoreo de células somáticas, así como el diagnóstico bacteriológico por los métodos de aislamiento e identificación (Pérez *et al.*, 2005).

La Prueba de California para Mastitis (CMT) ha sido empleada durante décadas y sigue siendo la prueba más utilizada a nivel de campo para el diagnóstico de mastitis en el ganado bovino lechero (Morresey, 1999; Radostits *et al.*, 2002; Medina y Montaldo, 2003; Erskine, 2001; Bedolla y Castañeda, 2004).

Es una prueba sencilla que valora el recuento de células de la leche. No proporciona un resultado numérico, sino más bien una indicación de si el recuento es elevado o bajo, (Ávila, 1996; Ávila *et al.*, 2001; Barkema *et al.*, 1997).

La prueba consiste en el agregado de un detergente a la leche, el alquil-aril sulfonato de sodio, causando la liberación del ADN de los leucocitos presentes y este se convierte en combinación con agentes proteicos de la leche en una gelatina. A mayor presencia de células se libera una mayor concentración de ADN, por lo tanto mayor será la formación de la gelatina, traducándose la lectura

e interpretación del resultado como el grado más elevado de inflamación. Es decir, permite determinar la respuesta inflamatoria con base en la viscosidad del gel que se forma al mezclar el reactivo (púrpura de bromocresol) con la misma cantidad de leche en una paleta con cuatro pozos independientes permitiendo evaluar cada cuarto por separado (Smith 1990; Saran y Chaffer, 2000; Medina y Montaldo, 2003).

Los resultados se leen como Negativos, Traza (sospechoso), 1+, 2+ y 3+, según la cantidad de formación en la muestra (NMC, 1999, Wolter *et al.*, 2004).

Reacción	Cs por ml de leche
Negativo	0-200,000
Traza	150,000-500,000
Grado 1	400,000-1,500,000
Grado 2	3,000,000-5,000,000
Grado 3	Más de 5,000,000

Wolter et al., 2004.

Los métodos electrónicos tienen en la actualidad una aplicación universal, utilizándose aparatos de recuentos celulares como el Fossomatic (Foss Electric, Dinamarca) y el Counter Coulter (Coulter, Inglaterra) (Saran y Chaffer, 2000; Bedolla y Castañeda, 2004).

El método fluoro-opto-electrónico (Fossomatic) posee alta correlación con la microscopia óptica, por lo que proporciona una medida segura en el recuento de células somáticas. El Fossomatic basa su cálculo en la tinción fluorométrica del material nuclear celular, consiste en el filtrado de una solución de leche mezclada con detergente (Tritón X-100 EDTA) a través de una membrana con poros finos. Un procedimiento colorimétrico basado en la reacción con el ADN de las células es entonces utilizado para determinar el contenido de ADN que está relacionado directamente con el número de células presentes en la muestra inicial (Djabri *et al.*, 2002; Bedolla y Castañeda, 2004).

OBJETIVO

El objetivo del estudio fue determinar equivalencias del CCS con el equipo Fossomatic-90 y la prueba de California.

2. MATERIAL Y METODO

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Mastitis y Diagnóstico Molecular del CUCBA de la Universidad de Guadalajara, se recolectaron 80 muestras de leche obtenidas directamente de la glándula mamaria de las vacas de establos del Municipio de Ixtlahuacán de los Membrillos Jalisco, donde se realizaron las pruebas de California (CMT) en el sitio de ordeña, colocando en cada compartimiento de la paleta para la prueba de California (correspondiente a cada cuarto de la ubre) aproximadamente 10ml de leche y 10 ml del reactivo de California haciendo una mezcla con movimientos giratorios de la paleta y observando en el fondo algún cambio en la constitución de la leche, anotando los resultados en base a los parámetros anteriormente descritos (Wolter *et al.*, 2004) . El conteo de células somáticas con el equipo Fossomatic-90 se realizó en el laboratorio de Mastitis y Diagnóstico Molecular del CUCBA de la Universidad de Guadalajara, se colocaron 10ml de cada muestra de leche en el compartimiento correspondiente, la cual se tiñe con un colorante fluorescente para obtener una reacción solo con el ADN de las células somáticas que contiene. La muestra pasa frente a una luz especial y un detector registra cada célula somática y realiza el recuento. Entre cada muestra el aparato limpia su sistema de flujo para evitar el efecto de arrastre de una muestra a otra. Todas estas funciones son automáticas.

En base a los resultados obtenidos de ambas pruebas se realizó la comparación siguiendo los parámetros propuestos por la NMX-F-700-COFOCALEC-2004.

3. RESULTADOS

PRUEBA DE CALIFORNIA

Negativo	21
+ ligeramente positiva	44
++ Positiva	15
+++ muy positiva	8
Total positivos	67

INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA DE CALIFORNIA

Negativo -	Hasta 200,000 células/ml de leche	La mezcla permanece con líquido homogéneo, sin evidencia de hacerse densa. Indicación de ubre sana.
Trazas	150,000 a 500,000 células/ml de leche	Apariencia de líneas delgadas que se hacen visibles durante la rotación de la bandeja.
+ Grado I	400,000 a 1,5 millones de células/ml de leche	La mezcla se hace densa durante la rotación sin llegar a gelificarse. La mezcla es lenta en el seguimiento de los movimientos de la bandeja.
++ Grado II	3,000,000 a 5 millones de células/ml de leche	Ligera formación de gel. El gel sigue muy lentamente la rotación de la bandeja.
+++ Grado III	Mayor de 5 millones de células/ml de leche	El gel sólido formado se adhiere a la base de la bandeja. El gel sigue los movimientos muy lentamente, reuniéndose en el centro.

En los resultados promedios del Análisis Células Somáticas Fossomatic 90 se encontraron valores superiores en el rango de 95×10^3 e inferiores de 55×10^3 .

4. CONCLUSIÓN

En ambas pruebas se obtuvieron conteos celulares que difieren una de otra, dado que la prueba de California valora subjetivamente la cantidad a diferencia del Fossomatic donde se tiñen cada célula y eso favorece el recuento. Existen diversos métodos para CCS, diferentes en sencillez, costos y confiabilidad; se sugiere seleccionar el que se ajuste a las necesidades y posibilidades de cada explotación como prevención y diagnóstico de la mastitis.

BIBLIOGRAFIA

1. Ávila, T. S. 1984. Producción intensiva de Ganado lechero. Anatomía y fisiología de la glándula mamaria. Edit. Continental. México. pp. 139-157.
2. Barkema, H. W., Der Chans, J. V., Schukken, Y. H., De Gee, A. L. W., Lam, T. J. G. W., y Benedictus, G. 1997. Effect of freezing on somatic cell count of quarter milk samples as determined by a Fossomatic electronic cell counter. *J. Dairy Sci.* 80:422-426.
3. Bedolla, C. C. y Castañeda, V. H. 2004. Métodos de detección de mastitis bovina. Mimeo. FMVZ-UMSNH. México. pp. 37-42.
4. Blowey, R. y Edmondson, P. 1995. Control de la mastitis en granjas de vacuno de leche. Acribia. Zaragoza. 208 pp.
5. Bradley, A. y Green, M. 2005. Use and interpretation of somatic cell count data in dairy cows. *In practice.* 27: 310-315.
6. Brown, R. W., Morse, G. E., Newbould, S. H. F. y Slanetz, L. W. 1969. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Mastitis. National Mastitis Council, Washington, D.C.
7. Burton, J. L. y R. J. Erskine. 2003. Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 19 (1):1-45.
8. Wolter, W., Castañeda H., Kloppert, B y Zschock, M. 2004. Mastitis bovina. Prevención, diagnóstico y tratamiento. Editorial Universitaria. Universidad de Guadalajara. México. pp. 12-37.
9. Wolter, W., y Kloppert, B. 2004. Interpretación de los resultados del conteo celular y de la aplicación de la terapia. Avances en el Diagnóstico y Control de la Mastitis Bovina. Guadalajara, Jalisco, México. 5 pp.

“EFECTO DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA EN LA RACION TOTALMENTE MEZCLADA EN EL INCREMENTO DE LA GRASA DE LECHE EN VACAS DE LA COMARCA LAGUNERA”

Fatima del Rocío Escobedo Martínez¹, Rómulo Bañuelos Valenzuela², Carlos Meza Lopez², Daniel Rodríguez Tenorio¹, Romana Melba Rincon Delgado¹, Lucia Delgadillo Ruiz¹

¹Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UAZ. ²Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Zacatecas

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue determinar el efecto del tamaño de la partícula de la Ración Totalmente Mezclada (RTM) e incremento de grasa en la producción láctea en el establo lanchares de la comarca lagunera. Las muestras fueron obtenidas del carro mezclador, encomedero (inicio, mitad y final) en el mes de octubre. aproximadamente 1 Kg. se almacenaron en bolsas plásticas, la determinación del tamaño de partícula fue medida con un separador (Penn State®). Las determinaciones de humedad, materia seca, (M.S), Fibra Detergente Neutro (FDN), de acuerdo al manual de la OAC para análisis bromatológicos. La eficacia física se calculó. Aunque hubo variación entre las muestras, la distribución del tamaño de partícula en las cribas, 19-8.0, 8.0-1.18 mm y <1.18, se mantuvo en el ideal para RTM, Los resultados obtenidos fueron; humedad, 38.26% MS 61.74% FDN 35.76 % y de la eficacia física a dos cribas fue 0.48 % y a tres cribas 0.83 %; el promedio de grasa fue de 3.53 gr/ltr Los valores de FDN, tuvieron una gran variabilidad (40–56 %). para FDA (22-34%), se encontraron por arriba del mínimo requerido para vacas en producción. Aunque los valores fueron muy variables con respecto de tamaño de partícula y promedio geométrico, se puede generalizar que las raciones se encontraron dentro de los valores ideales reportados para un buen funcionamiento ruminal, manteniendo la producción y calidad de la leche. Se concluye que las partículas de tamaño 1.18 y 8 mm. Son las más adecuadas

1. INTRODUCCIÓN

Los efectos de una baja cantidad de fibra en las raciones de vacas lecheras, son reportados con la disminución del consumo de materia seca, producción de leche, además de algunos problemas de salud como laminitis, acidosis, cetosis y desplazamiento abomasal. (Beuchemin et al., 1996).

La industria alimenticia se ha interesado en evaluar la fibra efectiva en la ración que permita mantener altos niveles productivos y óptima salud del rumen. La evaluación del tamaño de partícula es una prueba para identificar la proporción de fibra de la ración, la cual es efectiva para estimular la rumia y la producción de saliva, de aquellos nutrientes los cuales son rápidamente o moderadamente digestibles. la distribución del tamaño de partícula y la uniformidad de la mezcla podría ser evaluada conjuntamente, ya que la meta es tener una ración uniformemente mezclada. (Grant et al., 2005).

2. TEORIA

El tamaño de partícula influye en la producción de grasa de leche en vacas estabuladas productoras de leche alimentadas con una RTM en la Comarca Lagunera.

El ganado bovino productor de leche se distingue por la capacidad de producir en abundancia éste líquido rico en grasas, vitaminas y lípidos, más de la que necesita un ternero, es éste excedente el que se utiliza como alimento humano. para que una vaca pueda producir leche es indispensable que haya estado gestante y tenga un becerro. la gestación de la vaca dura alrededor de 9 meses, al término de este periodo comienza la producción de leche para el recién nacido. el periodo de lactación o producción de leche es variable y depende del tipo de ganado (raza), su alimentación y su manejo, entre otros. las vacas en sistema especializado, se mantiene por cerca de 305 días; ciertas vacas pueden llegar a producir hasta 12,000 kg de leche en este periodo. esta es una cantidad considerable, cuando un ternero requiere tan sólo de 1,000 kg para su desarrollo. en algunos sistemas productivos del país, durante los 2 o 3 meses posteriores al parto, la vaca alcanza su mayor producción, siendo de 20 a 50 litros de leche por día dependiendo de la raza (financiera rural, 2009).

La producción nacional de leche al 1er trimestre de 2014, la producción de leche de bovino alcanzó 2 mil 595 millones litros (1.9% más que en el mismo período de 2013). Se estima que la producción será de 11 mil 141 millones de litros. Al mes de marzo de este año se produjeron 2 mil 595 millones 134 mil litros de leche, esto es, cerca de 29 millones por día (SIAP, 2014).

La ración totalmente mezclada, el fundamento técnico de la RTM es poder maximizar la producción, utilizando variados ingredientes, palatables o no, no segregados en el comedero como sucede cuando son suministrados individualmente, granos, subproductos de la industria, fibras que constituyan un alimento necesario y completo. Principalmente es absolutamente fisiológico, ya que no alimentamos un bovino productor de leche o productor de carne, alimentamos el más complejo órgano de digestión que se llama rumen. Si no conocemos exactamente cómo funciona el sistema digestivo bovino, con absolutos conocimientos actualizados de la fisiología de producción de carne o leche, nutrición, ingredientes y su fórmula física-química no podremos manejar las producciones al máximo. Utilizamos toda la Tecnología a nuestro alcance en la producción de silo de maíz, pasturas como: la elección del potrero analizando su rotación, análisis de suelo para suministrar las carencias y tasas extractivas de nutrientes, sembradora y su exacta regulación, la semilla, fumigaciones contra insectos, sistema de confección, largo y momento de corte, velocidad de confección, para lograr un alimento de alta calidad, compra de ingredientes para balancear y alimentar al ganado, programar una ración, Una mala mezcla de ingredientes de máxima calidad nutricional no solamente deriva en un mal rendimiento de producción o en lo que es peor en enfermedades metabólicas graves como acidosis, laminitis, abscesos hepáticos, torsión de abomaso o incluso la muerte (Malinarich y Álvarez, 2012).

El tamaño de la partícula se define como el tamaño de partícula óptimo en la alimentación del ganado, ha sido difícil porque el tamaño de partícula tiene dos efectos antagonistas en la función animal. Por un lado con un tamaño de partícula largo aumenta el contenido de FDN físicamente efectiva en la dieta con efectos positivos en la rumia y producción de sustancias búferes en el rumen y de este modo disminuye el riesgo de acidosis. Alimentando con el tamaño de partícula largo aumenta el contenido de eficacia física de la fibra detergente neutro en la dieta con efectos positivos en la rumia, búferes ruminales minimizando de este modo el riesgo de acidosis ruminal (Mertens, 1997; Tafaj *et al.*, 2007). El otro efecto sucede cuando se aumenta el tamaño de partícula ya que se modifican los niveles de paso de la ingesta y disminuye la degradación de la fibra debido a la disminución del ataque bacteriano, por lo tanto hay menor ingesta del alimento y de nutrientes (Storm y Kristensen, 2010). El análisis de la distribución del tamaño de partícula para el mantenimiento en el comedero y formulación de dietas que mantienen las funciones del rumen, maximizan la producción y calidad de la leche (Arzola-Álvarez *et al.*, 2010). El efecto del tamaño de partícula del forraje sobre el contenido de grasa en la leche es cuantitativamente importante, hay una disminución de 13%, cuando la dieta se suministra molida, cuando la alfalfa es molida a 0.5 cm y a 1 cm respectivamente, antes de ensilarse (Grant *et al.*, 2005); una disminución del 11% (3.6% a 3.2%) cuando el heno se pica a 6.4 cm y 2.6% respectivamente (Woodford *et al.*, 1988) y una disminución del 16% (3.8% a 3.2%) cuando se muele por un tamiz de 7.6 cm a 0.6 cm (Grant *et al.*,

2005). En vacas lecheras, la sustitución de un 30% de alfalfa ensilada pre henificada por alfalfa molida no alteró el contenido en grasa de la leche, pero si hubo una reducción en un 16% cuando la sustitución fue del 70% (Woodford y Murphy, 1988). Aumentando linealmente el tamaño de partícula y el tiempo en la alimentación del consumo de materia seca pero no la alimentación y el ajuste del tiempo para fibra detergente neutra, indican que el tiempo de alimentación dio un resultado más alto. El aumento del porcentaje de la grasa en la leche con el incremento del tamaño de partícula del heno de alfalfa y el correspondiente incremento de la relación grasa: proteína de la ración sugieren un ambiente favorable en el rumen incrementado el tamaño de partícula, aunque aumentando el tamaño de partícula del heno de alfalfa ha demostrado que incrementa la concentración de grasa en la leche (Grant *et al.*, 2005).

Efecto del tamaño de la partícula sobre los parámetros ruminales, La rumia es el proceso por el cual los contenidos del rumen son completamente mezclados y adónde las partículas más grandes y menos digeridas son re-dirigidas hacia arriba, regurgitadas, masticadas y tragadas nuevamente. Este proceso se repite una y otra vez hasta que las partículas alcanzan un tamaño lo suficientemente pequeño y un área de superficie relativamente grande que permite a las bacterias y protozoarios del rumen digerirlas más eficientemente. Los carbohidratos estructurales (la "fibra" del forraje) suministran el estímulo físico para el inicio de la rumia. La masticación estimula la producción de saliva rica en bicarbonato. La saliva es esencial para neutralizar la acidez que resulta de los ácidos grasos volátiles producidos de forma continua por los microbios del rumen. Cuando el tamaño de partícula de la dieta es demasiado pequeño, la capacidad de rumiar se altera, lo que disminuye la capacidad de neutralizar la acidez y la motilidad del rumen (García, Kalscheur, 2006).

Una dieta con un tamaño de partícula pequeño ocasiona una alteración importante de los parámetros ruminales en comparación con una dieta de tamaño de partícula grande. De acuerdo con los resultados de Klusmeyer *et al.* 1990), el pH del contenido ruminal se reduce significativamente ($P < 0.01$) desde 6.02 hasta 5.59 en una dieta con tamaño de partícula pequeño. Este descenso se explica por una velocidad mayor de ingestión, un tiempo menor de masticación (con la consiguiente reducción de la producción de saliva), y por una velocidad mayor de fermentación que se traduce en una concentración mayor de AGV (Krause *et al.*, 2002). En vacas lecheras, la sustitución de un 30% de alfalfa ensilada pre henificada por alfalfa molida no alteró el contenido en grasa de la leche, pero si hubo una reducción en un 16% cuando la sustitución fue del 70% (Woodford y Murphy, 1988).

Efecto del tamaño de la partícula sobre la producción de grasa, Los productos de la fermentación ruminal son principalmente AGV'S que sirven como una fuente importante de energía para el animal, los productos de la fermentación tienen un efecto directo sobre los parámetros fisiológicos del animal, sobre la cantidad y composición de la leche. (Jami, *et al.*, 2014). Donde se considera ineficiente la producción lechera a nivel mundial se prevé un aumento de la demanda por múltiples funciones socioeconómicas (Herrero *et al.*, 2013), y para proveer del producto a la creciente población mundial. (FAO 2009), esto depende al aumento de la eficiencia nutricional que se usa en las dietas de vacas productoras de leche. Alterando la proporción a ingerir de energía bruta disponible para la producción de leche puede alcanzarse reduciendo la energía midiéndose en: heces, orina, ganancia de peso y calor. Así que cuantificando la variabilidad de cada paso de la energía y la utilización del nitrógeno puede servir como una guía en el futuro para medir el esfuerzo de eficiencia en la conversión de alimento y su ingestión de nitrógeno (Yang *et al.*, 2007;). Así la parte de eficacia de la conversión alimenticia fue causada por una dilución del mantenimiento de la energía y nitrógeno a pesar de las pérdidas de la eficacia digestiva, y el consumo de materia seca. La emisión diaria de metano a pesar de la diferencia del consumo de materia seca puede ser el resultado de una metanogénesis por unidad de FDN digerida (Arndt, *et al.*, 2015). La actividad de rumia es estimulada por la ingesta de la fibra detergente neutro físicamente efectiva definida por el tamaño de partícula mayor a 1.18mm (Yang *et al.*, (2001).

La fibra detergente neutro (FDN) constituye la pared celular de las plantas y está compuesta principalmente por hemicelulosa, celulosa y lignina. El contenido de FDN de un forraje se relaciona inversamente con su consumo por los animales ya que al estar formada por material lentamente digerible y material indigestible genera el efecto de llenado ruminal (Beauchemin, 1996).

El concepto de efectividad física de la (efFDN) contiene información del tamaño de partícula de la dieta y de la cantidad de FDN de la dieta, o sea que combina características químicas y físicas. Estas dos variables afectan la actividad de masticación y rumia y la estratificación de las partículas en el rumen, y por lo tanto el pH ruminal. Este término es utilizado para la formulación de dietas tal que provean fibra de adecuado tamaño de partícula para reducir el riesgo de acidosis. La eficacia física de la fibra detergente neutro, está definida específicamente como la fracción de la fibra que estimula la rumia y contribuye a las partículas largas flotantes en el rumen (Mertens, 1997).

3. PARTE EXPERIMENTAL

Se determinaron de las muestras de la ración totalmente mezclada el porcentaje de Humedad, Materia Seca, Digestibilidad, Fibra Detergente Neutra, eficacia física de la Fibra Detergente Neutra y el porcentaje de grasa de leche en el laboratorio.

Obtención de muestras de la ración totalmente mezclada, al inicio, intermedio y final del carro mezclador posterior al llenado de comederos, cribar las muestras con el método de Pennsylvania fig.1 (criba 19mm, 8, 1.18 y la bandeja de recolección de polvillo. Para la determinación del tamaño de partícula se tomaron muestras de la RTM de 3100 vacas en producción, con un promedio de leche de 33 litros por vaca, raza Holstein, primíparas y múltiparas.



Fig 1 Muestra la RTM cribada con las cribas de Pennsylvania

Cuando se obtuvo la materia seca de la RTM en la estufa de secado, las diferentes muestras fueron desecadas y molidas de manera individual y se depositaron en bolsas de papel de papel filtro y pesadas fig 2. Posteriormente se introdujeron en un biodigestor para determinar fibra detergente neutro Fig 3.

Método de determinación de grasa en leche

El método Gerber consiste en separar la grasa dentro de un recipiente medidor, llamado Método de determinación de grasa en leche en un tanto por ciento en masa



Fig 2. Báscula y muestra



Fig 3. Biodigestor

4. RESULTADOS

Los resultados de la ración totalmente mezclada se indican en la fig. 4, la línea azul indica la bandeja de recolección de polvillo y muestra un aumento en la cantidad de gramos recolectados, se incrementó de 14 a 18 gr. La criba que cuenta con poros de 1.18 mm de tamaño se indica con la línea de color gris y al inicio del periodo de recolección una inicia con 43 gramos, y disminuye gradualmente hasta llegar a 41 gramos aproximadamente. La línea de color naranja muestra una disminución de 36 a 34 gramos, esta línea indica la criba que tiene poros de 8 mm de tamaño. Las anteriores dos cribas corresponden a la porción intermedia del método de cribado y se mantienen constantes y estables respecto a la recolección de alimento. El tamaño de los poros de la criba superior es de 19 mm, se indica con la línea amarilla y muestra la disminución más notable respecto a la retención de alimento, disminuye de 15 a 5 gramos durante el periodo

En la Fig 4 Se demuestran los resultados del cribado de la RTM, los tamaños de poros que se mantuvieron más constantes en la retención de material fueron los de 1.18 y 8 mm.

Los resultados de la eFDN que se aprecian en la Fig 5 y el dato que se obtiene más constante es el de dos cribas siendo estas las cribas de 8 y 1.18 mm.

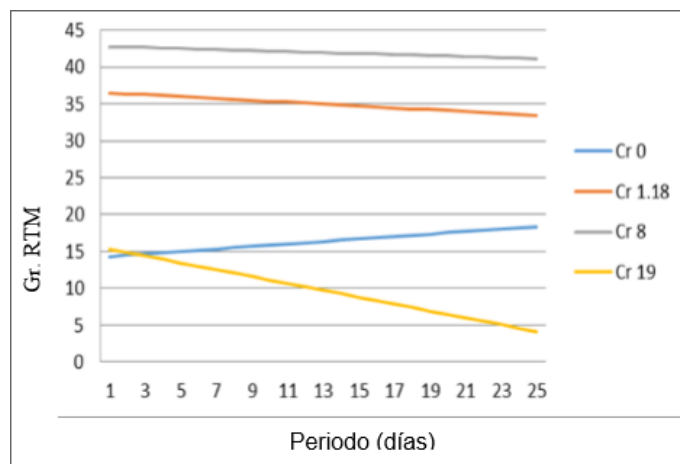


Fig.4 Cribado de la ración totalmente mezclada

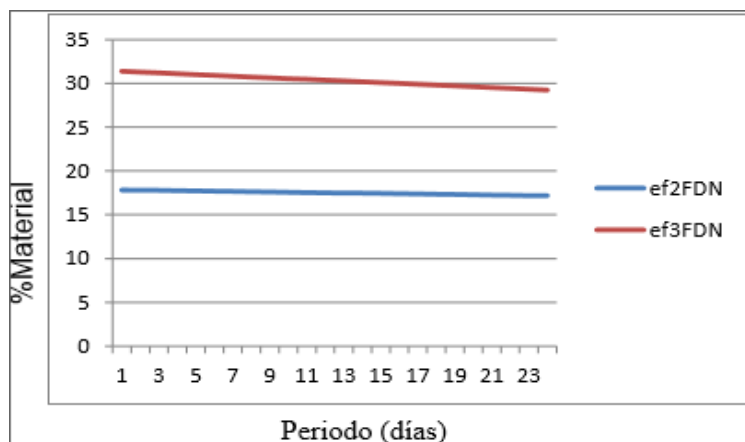


Fig 5. Eficacia de la FDN a 2 y 3 cribas

Se indica el aumento de grasa en leche del mes de octubre en el cuadro 1 el cual se cuantifica en gramos por y los kilogramos equivalentes a cada día.

El tamaño de partícula incrementa la producción de grasa en vacas estabuladas productoras de leche estabuladas productoras de leche alimentadas con una RTM en la Comarca Lagunera.

Cuadro 1. Porcentaje y kg. de grasa en la leche contabilizados durante el mes de octubre

Día	grasa Gr/ltr	Kg. grasa	Día	Kg. grasa	Grasa/Kg.
1	3.54	362142	17	3.47	354981
2	3.54	362142	18	3.48	356004
3	3.57	365211	19	3.65	373395
4	3.64	365211	20	3.49	357027
5	3.57	365211	21	3.54	362142
6	3.61	369303	22	3.5	358050
7	3.52	360096	23	3.5	358050
8	3.49	357027	24	3.56	364188
9	3.51	359073	25	3.3	337590
10	3.54	362142	26	3.46	353958
11	3.47	354981	27	3.45	352935
12	3.5	358050	28	3.64	372372
13	3.58	366234	29	3.51	359073
14	3.55	363165	30	3.51	359073
15	3.52	360096	31	3.46	353958
16	3.62	370326			

5. CONCLUSIONES

Al ofrecer dietas con diferente tamaño de partícula, hubo una mayor eficiencia respecto a las partículas retenidas en las cribas 8 y 1.18. Y hay un mejor consumo de las partículas de los tamaños mencionados, la materia seca no fue constante y esto se atribuye a la localización y variación climática, cuando existió un mayor tamaño de partícula, hay un contenido menor de la materia seca y hubo un aumento de grasa en la producción de leche, por lo tanto estos factores pueden ser considerados para la formulación de raciones alimenticias en vacas lecheras.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arndt, C., Powell, J. M., Aguerre, M. J., Crump, P. M., y Wattiaux, M. A. "Feed conversion efficiency in dairy cows: Repeatability, variation in digestion and metabolism of energy and nitrogen, and ruminal methanogens". *Journal of dairy Science*, 98(6), 2015 3938-3950.
2. Arzola-Álvarez, C., Bocanegra-Viezca, J. A., Murphy, M. R., Salinas-Chavira, J., Corral-Luna, A., Romanos, A., y Rodríguez-Muela, C. "Particle size distribution and chemical composition of total mixed rations for dairy cattle: Water addition and feed sampling effects". *Journal of dairy science*, 93(9), 2010 4180-4188.
3. Asociación Oficial del Control de la Alimentación disponible en: www.aafco.org.
4. Garcia, A., y Kalscheur, K. Tamaño de partícula y fibra efectiva en la dieta de las vacas lecheras. *Dairy Science*. College of Agriculture y Biological Sciences. South Dakota State University 2006
5. Grant, R. J., Cotanch, K. W., y Chazy, N. Y., Physically effective fiber for dairy cows: current perspectives. In *Proc. Cornell Nutr. Conf. for Feed Manufacturers*. October 2005 (pp. 18-20).
6. Jami, E., White, B. A., y Mizrahi, I. Potential role of the bovine rumen microbiome in modulating milk composition and feed efficiency 2014
7. Klusmeyer, T. H., McCarthy, R. D., Clark, J. H., y Nelson, D. R. (). Effects of source and amount of protein on ruminal fermentation and passage of nutrients to the small intestine of lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 73(12), 1990 3526-3537.
8. Krause, K. M., Combs, D. K., & Beauchemin, K. A. Effects of forage particle size and grain fermentability in midlactation cows. II. Ruminal pH and chewing activity. *Journal of Dairy Science*, 85(8), 2002 1947-1957.
9. Malinarich, H. y Alvarez G. Ración Totalmente mezclada. Egormix.com 2011
10. Mertens, D. R. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. *Journal of dairy science*, 80(7), 1997 1463-1481
11. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura disponible en: 2012 www.fao.org
12. Woodford, S. T., y Murphy, M. R. Effect of forage physical form on chewing activity, dry matter intake, and rumen function of dairy cows in early lactation. *Journal of dairy science*, 71(3), 1988 674-686.
13. Yang, W. Z., Beauchemin, K. A., y Rode, L. M. Effects of grain processing, forage to concentrate ratio, and forage particle size on rumen pH and digestion by dairy cows. *Journal of dairy science*, 84(10), 2001 2203-2216.
14. Yang, W. Z., y Beauchemin, K. A. Altering physically effective fiber intake through forage proportion and particle length: Chewing and ruminal pH. *Journal of dairy science*, 90(6), 2007 2826-2838
15. A. G. Evans, "Perspectiva on the development of high-toughness ceramics", *J. Am. Ceram. Soc.*, Vol. 73, 2, 1990, pp. 187-206.
16. T. Kreis, "Speckle Metrology," in *Holographic Interferometry* (Akademie Verlag Inc., New York, NY, 1996), Chapter 4, pp. 125-149.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA ESTUDIOS MOLECULARES DEL FACTOR DE TRANSFERENCIA DE CABALLO

Olvera M. S., Soto D. F. J., Cerón M. G. I., Escamilla O. B., y Alarcón B., J.

Universidad Tecnológica de Tecámac.

RESUMEN

Los Factores de Transferencia (FT) son cadenas cortas de aminoácidos, sintetizados por los linfocitos T, encargados de coordinar la respuesta inmune, los cuales tienen acción entre especies. En trabajos previos se implementó su obtención a partir del fraccionamiento de la sangre de caballo. Posteriormente se evaluaron dos procesos de membrana para su concentración y por último el FT obtenido fue probado su efecto inmunomodulador en alergias en cobayo. En el presente trabajo se implementó la técnica de purificación de FT por medio de una membrana de ultrafiltración de celulosa regenerada (UF-CR), con peso de corte molecular de 5 *kDa* (Pellicon XL), para concentrar y purificar los oligopéptidos para su posterior análisis molecular. La permeabilidad promedio de la membrana fue de $16.04 L(hm^2bar)^{-1}$, referencia de su adecuada funcionalidad. La regresión lineal mostró una R^2 de 0.99, lo que indicó que el proceso es repetible y confiable. Antes de desalinizar la muestra de FT (0.15 L), mostró una conductividad eléctrica de $4460 \mu scm^{-1}$ y el paquete celular obtenido después del proceso fue de $70 \mu scm^{-1}$, lo que indicó una disminución de compuestos iónicos (interferencias). Se determinó el Carbono Orgánico Total (CO) y Nitrógeno Total (NT) en el paquete celular. Los resultados obtenidos antes y después de la desalinización del FT fueron $CO= 573.2 \frac{mg}{L}$ y $NT= 231.19 \frac{mg}{L}$, $CO= 160.7 \frac{mg}{L}$ y $NT= 9.975 \frac{mg}{L}$, observando una reducción de los compuestos orgánicos. Se comprueba que al pasar la muestra de FT por la UF-CR de 5 *kDa*, decrecieron los compuestos orgánicos y se concentró el FT. Por tanto fue posible preparar la muestra de FT para su análisis molecular.

1. INTRODUCCIÓN

A fines de la década de 1940, el Dr. H. Sherwood Lawrence descubrió que la competencia inmunológica de un donador podría ser transferida a un receptor inexperimentado usando extractos de bajo peso molecular obtenidos de las células blancas; a estos extractos de moléculas pequeñas, los llamo "factores de transferencia" (FT); moléculas mensajeras que educan y alertan sobre un peligro potencial a las células sin experiencia, además de ser universalmente efectivas, a pesar de las diferencias entre las especies de donador y receptor (Hennen, 2009).

Los FT son cadenas cortas de aminoácidos y quizás pequeños fragmentos de ácido ribonucleico (ARN). Se cree que los factores de transferencia son sintetizados dentro de las células T encargadas de coordinar la acción por el sistema inmune. Una vez liberado por las células T cooperadoras, los factores de transferencia influyen en la actividad del sistema inmune de varias maneras (White, 2009).

En la actualidad, los preparados de FT pueden incluir productos completos o parciales obtenidos por tecnologías de microfiltración (Rozzo, 1992). Ésta tecnología se basa en el uso de membranas, cuya función es actuar como una barrera selectiva. Debe permitir el paso de ciertos componentes y

retener otros. Los procesos de separación por membranas más usados son: microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración, ósmosis inversa, electrodiálisis, etc. Cubriendo un amplio rango de tamaño de partículas (López, 2009). En el presente trabajo se implementó la técnica de purificación del FT a partir sangre de caballo, haciendo uso de una membrana de ultrafiltración de celulosa regenerada, con peso de corte molecular de 5 *kDa*.

2. TEORÍA

El FT, presente en el Extracto Dializable Leucocitario (EDL), se puede obtener a partir de tejidos como leucocitos del suero de la sangre, ganglios linfáticos, bazo, calostro, leche; en condiciones *in vitro* mediante el cultivo de células de la línea linfoblástide, etc. La obtención del FT puede hacerse específica o inespecífica hacia cualquier antígeno. Se han elaborado FT específicos a PPD (derivados de proteína purificadas de tuberculina), varidasa, candida, herpes, virus de inmunodeficiencia del simio (VIS), herpes virus, (Franco, 2004).

El FT está formado por un conjunto de moléculas pequeñas que pasan por poros que excluyen moléculas mayores de 10,000 a 12,000 *Da*. El FT carece de efectos secundarios, no es tóxico al organismo y puede ser administrado tanto por vía oral como parenteral. En 1983, Lawrence, encontró que si se hacía pasar el EDL por una membrana que exclusivamente deje pasar moléculas menores de 3500 *Da* las moléculas que se retienen son específicas de antígeno, mientras que las moléculas que atraviesan el filtro tienen propiedades de incrementar en forma no específica la respuesta inmunológica. Las moléculas específicas han sido caracterizadas por varios investigadores entre otros como péptidos hidrofílicos altamente polares, con potente actividad biológica. Estos péptidos son los responsables de transferir inmunidad celular contra los gérmenes intracelulares. Los FT son más pequeños que los anticuerpos y no transfieren respuestas mediadas por anticuerpos y a su vez no inducen la producción de inmunoglobulinas. A la fecha no se ha logrado la caracterización de un FT esencialmente puro. Se han fraccionado extractos de leucocitos humanos mediante cromatografía de intercambio iónico, empleando dietilaminoetil celulosa (DEAE) o filtración en gel; encontrando nucleósidos en el FT. En 1983 Lawrence, empleando cromatografía por filtración en gel en extractos de leucocitos de humanos sensibilizados propuso que el FT es: soluble en agua, dializable, con un peso molecular menor de 10,000 *Da* y es resistente a la digestión por deoxirribonucleasa, ribonucleasa y tripsina; que posee un pico cromatográfico con una absorbancia mayor de 260 *nm* a 280 *nm*. Se ha demostrado que las moléculas que tienen actividad de FT son relativamente pequeñas, menores de 6000 *Da*, hidrofílicas y polares en forma nativa. Además la actividad de este compuesto permanece si se calienta a 56 °C pero no a 75°C por 30 minutos y a una breve exposición de etanol al 95%. Los resultados de estudios de sensibilidad enzimática y depleción de la actividad han producido resultados compatibles con un modelo de nucleoproteína o nucleopéptido para la estructura de los FT (Franco, 2004). En la actualidad se han utilizado procesos de membrana para su purificación y concentración.

Una membrana es una lámina que permite el paso selectivo de sustancias a través de ella. El flujo de estas sustancias puede venir determinada por diferentes "fuerzas impulsoras", principalmente: la presión, concentración y potencial eléctrico. La selectividad permitirá enriquecer o empobrecer una corriente o carga en una o varias sustancias. El sustrato se introduce en un módulo donde existe una membrana. De este módulo emergen dos corrientes: el concentrado, que contendrá las sustancias que no han logrado pasar a través de la membrana y el permeado que contendrá las sustancias que sí pueden pasar a través de la membrana. La selectividad de una membrana frente a una sustancia puede venir dada por dos factores distintos dependiendo de cómo describamos la membrana: * Tamaño: La membrana consta de poros, las sustancias más grandes que el tamaño de estos poros no podrán pasar a través de ella. * Afinidad química: Si una sustancia se incorpora fácilmente a la membrana podrá atravesarla, en caso contrario no.

El flujo de una sustancia a través de una membrana se lleva a cabo porque existe una "fuerza impulsora", es decir, algo que mantiene al sistema apartado del equilibrio. El flujo intenta compensar este desequilibrio y en último término es misión del diseñador mantener este desequilibrio para mantener el flujo. Ello no obstante tiene unos límites marcados por la 3ª ley de Onsager que de forma simplificada podría enunciarse como: "Cuanta más densidad de flujo exista a través de una membrana peor es la eficiencia energética del proceso" (Quero, 2007).

Las membranas, en función de su naturaleza, se pueden dividir en: membranas naturales o biológicas y membranas sintéticas. La estructura de una membrana determina su mecanismo de separación y por lo tanto la aplicación. Dentro de las membranas sintéticas (sólidas) se pueden distinguir dos tipos de membranas: simétricas y asimétricas. El grosor de las membranas simétricas (porosas o no porosas) está entre 10 y 200 μm ; la resistencia a la transferencia de materia está determinada por el grosor total de la membrana. Un descenso en el grosor de la membrana provoca un aumento en la velocidad de permeación, el rango de separación varía según el tipo de membrana. El desarrollo de membranas asimétricas consiste en una capa superior muy densa con un grosor de 0,1 a 0,5 μm soportada en una subcapa porosa con un grosor de 50 a 150 μm del mismo material. Las membranas de microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración, ósmosis inversa, electrodiálisis y la separación de gases están siendo implementadas industrialmente y se consideran tecnológicamente probadas. Sin embargo, la mayoría de procesos y aplicaciones están en fase de desarrollo. Las aplicaciones se pueden clasificar en dos grupos: separación líquida y separación de gases. Esta clasificación se basa en las diferencias de las propiedades de transporte (Figura 1) (Guastalli, 2006).







Membranas simétricas		Membranas asimétricas	
	Porosa Poros cilíndricos (MF, UF)		Porosa, con una lámina superior porosa (UF, MF)
	Porosa (MF, D)		Porosa, con una lámina superior no porosa (OI, SG)
	Película homogénea no porosa (SG, PV)		Compuesta, con una lámina superior no porosa (preparación en 2 pasos) (OI, PV, SG)

Figura 5: Clasificación de las membranas según su estructura. (Guastalli, 2006).

La ultrafiltración tangencial (UF) es un mecanismo de concentración, purificación y separación de partículas finas, microorganismos y gotas de emulsión, a través de membranas semipermeables. En otras palabras, es la separación de sustancias en una solución por medio de su filtración, donde la separación se realiza a partir de la presión que ejerce la solución sobre el filtro tangencial. La membrana actúa como barrera selectiva, logrando separar partículas que se encuentran en el rango entre 5 y 100 nm , equivalente a pesos moleculares entre 0,5 y 500 kDa , aproximadamente. El solvente y los solutos de bajo peso molecular (tales como azúcares, sales, aminoácidos, etc.) pasaran a través de la membrana, quedando retenidas las moléculas de mayor tamaño y peso. Por esto, la principal aplicación de la UF es la concentración, fraccionamiento y purificación de

macrosolutos en solución acuosa, tales como proteínas y carbohidratos. En ausencia de fenómenos de incrustación superficial el flujo de permeado (JP) se rige por la ley de Darcy, por ende es directamente proporcional a la diferencia de presión aplicada e inversamente proporcional a la viscosidad de la fase líquida. Los polímeros más empleados en la confección de membranas de ultrafiltración son la polisulfona y la polietersulfona. Estos polímeros presentan una notable estabilidad térmica, resistencia a condiciones extremas de pH (entre 1 y 13), buena resistencia a agentes oxidantes y capacidad de ser configurada en diferentes geometrías. El transporte de materia en membranas de ultrafiltración corresponde a flujo viscoso a través de un medio poroso. La viscosidad (μ), de la fase líquida afecta directamente en la productividad de la membrana de UF. Hay que remarcar que este comportamiento es similar en el proceso de Microfiltración (MF). Es importante destacar que tales procesos operan como filtración tangencial (Romero, 2010).

3. PARTE EXPERIMENTAL

Se preparó el anticoagulante ácido - citrato – dextrosa (ACD) en base a la NOM-139-SSA1-1995, la cual se esterilizó en autoclave (121°C/15 psi/15 min). Los contenedores de sangre se esterizaron por 15 min por radiación UV en cámara de seguridad biológica (Labconco, Clase II, Tipo A2) y se vertió un volumen de ACD correspondiente a la sexta parte del contenedor y se almacenaron a 2.1°C hasta su uso. La sangre fresca de caballo fue colectada por punción de la carótida, homogeneizada con el ACD y transportada en baño de hielo hasta su uso.

A la muestra de sangre de caballo se le determinó la presencia de anticuerpos contra *Brucella* por el método de Rosa de Bengala. A las muestras negativas a *Brucella* se dejó reposar la sangre por 72 h. para la separación y obtención del paquete leucocitario el cual se sometió a un choque térmico 37°C y 0°C con intervalos de 10 min. El lisado se recuperó y se centrifugó a 10900 G/30 min./5°C y se refrigeró hasta su procesamiento.

El equipo de ultrafiltración se montó y se determinaron sus parámetros de operación con agua destilada. Se calculó el flujo alimentado (Q_f) como la suma del flujo permeado y retenido ($Q_p + Q_r$). Q_p se determinó como el tiempo para recuperar un volumen de permeado de 5 mL. Con estos valores se calculó el Gradiente de Presión Transmembranal (ΔPTM) y el Flux de permeado L/hm^2 . Se repitió el proceso variando presiones para encontrar un flujo constante en el flujo alimentado Q_f . La permeabilidad (L_p) se calculó a partir de la pendiente de la curva al graficar ΔPTM Vs. Flux (Figura 2). El flujo se determinó mediante la fórmula:

$$1.- Q = V/t$$

Donde: Q : Flujo (L/h), V: Volumen (L) y t: tiempo (h)

El flujo alimentado Q_f se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$2. Q_f = Q_p + Q_r$$

Donde: Q_f : Flujo alimentado (L/h), Q_p : Flujo permeado (L/h) y Q_r : Flujo retenido (L/h)

El Flux de permeado (L/hm^2) se obtuvo a partir del flujo de la muestra permeada y se realizó su conversión.

Posteriormente se realizó la desalinización de la muestra de FT de caballo por ultrafiltración utilizando una membrana de celulosa regenerada (Pellicon XL cassette) de 5 kDa. Empleando un volumen de 0.15 L a una presión de alimentación (P_f) de 30 psi y una presión de retenido (P_r) de 15 psi, recirculando el Q_r , hasta reducir su volumen a 0.015 L. Se recuperaron las fracciones del Q_p cada 0.02 L, registrando el tiempo y la conductividad eléctrica (Conductronic, Mod. CL 35). Tras una **primera** secuencia de diafiltración al volumen retenido de 0.015 L se registraron las lecturas de conductividad. Posteriormente se adicionaron 0.1 L de agua destilada a la muestra retenida y se diafiltró hasta un volumen final de 0.015 L (**segunda** secuencia de diafiltración) midiendo la

conductividad al final de la diafiltración. Se efectuaron las secuencias necesarias de diafiltración hasta alcanzar la conductividad de 0 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Se determinó el Carbono Orgánico Total (COT) y Nitrógeno Total (NT) en un equipo TOC (Shimadzu, Mod. TOC-VCSN) al FT antes y después del proceso de desalinización por el proceso de ultrafiltración (o diafiltración).

El contenido de nitrógeno protéico se determinó por curva patrón con seroalbúmina humana (25 mg/mL) y se leyeron las muestras a 500 nm (Perkin Elmer, Mod. Lambda 35)

4. RESULTADOS

En la Tabla 1. se muestran los parámetros de operación del equipo de ultrafiltración con agua desionizada

Tabla 1. Parámetros de operación del equipo de ultrafiltración con agua desionizada.

P_f (<i>psi</i>)	P_r (<i>psi</i>)	V_b (<i>RPM</i>)	Volumen retenido (Lh^{-1})
30	0	2.4	0.00083
25	0	1.9	0.00083
20	5	1.5	0.00068

Las condiciones seleccionadas de operación fueron $P_f = 20$ psi, $P_r = 5$ psi y un $V_r = 0.00068$ L/h.

En la Tabla 2. se muestran los datos de Flujo alimentado y Flujo permeado para la determinación de la permeabilidad de la membrana (pendiente de la curva, Figura 2)

Tabla 2. Parámetros de operación del sistema de ultrafiltración

Flujo alimentado					Flujo Permeado
V_b (<i>RPM</i>)	P_f (<i>psi</i>)	P_r (<i>psi</i>)	ΔPTM (<i>bar</i>)	Q_f (Lh^{-1})	$Flux$ ($L(hm^2)^{-1}$)
0.2	10	7	0.59	0.87	9.55
0.7	15	12	0.93	0.85	14.81
1	18	16	1.17	0.86	18.87
1	20	17	1.28	0.86	19.80
1.8	25	23	1.65	0.87	27.65
1.9	28	25	1.83	0.86	28.70

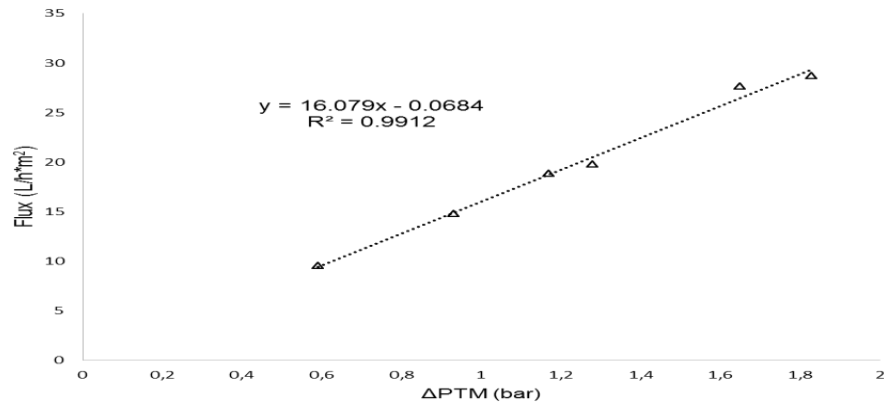


Figura 2. Permeabilidad de la membrana

De esta manera la permeabilidad promedio fue de 16.04 L/hm²bar. Para la desalinización de la muestra de FT por el sistema de ultrafiltración se obtuvieron los siguientes resultados

Las condiciones de operación óptimas fueron $V = 0.05$ L, $P_f = 40$ psi, $P_r = 0$ psi, $t = 0.17$ h. con una conductividad eléctrica final = 70 μ S/cm, obteniendo en el V_r detritus celulares y en el V_p el FT desalinizado.

Tabla 3. Desalinizado del FT

Muestra	Vb (RPM)	Pf (psi)	Pr (psi)	Conductividad (μ scm ⁻¹)
FT inicial (0.15 L)	-	-	-	4460
Permeado 1	4.1	30	15	4110
Permeado 2	4.1	30	15	4300
Permeado 3	4.1	30	15	4770
Permeado 4	4.1	30	15	4790
Permeado 5	4.1	30	15	4700
Permeado 6	4.1	30	15	4820
0.015 L Muestra	-	-	-	4690
Muestra + 0.1 L H ₂ O	-	-	-	710
Permeado 7	4.1	30	15	2390
Permeado 8	4.1	30	15	1080
Permeado 9	4.1	30	15	1110
Permeado 10	4.1	30	15	1120
Permeado 11	4.1	30	15	1130
15ml Solución	-	-	-	1270
Muestra + 0.1 L H ₂ O	-	-	-	180
Permeado 12	4.1	30	15	570
Permeado 13	4.1	30	15	300
Permeado 14	4.1	30	15	270
Permeado 15	4.1	30	15	260
Permeado 16	4.1	30	15	260
16ml Solución	-	-	-	380
Muestra + 0.05 L H ₂ O	-	-	-	100
Permeado 17	4.1	30	15	90
Permeado 18	4.1	30	15	0
0.017 L muestra	-	-	-	140

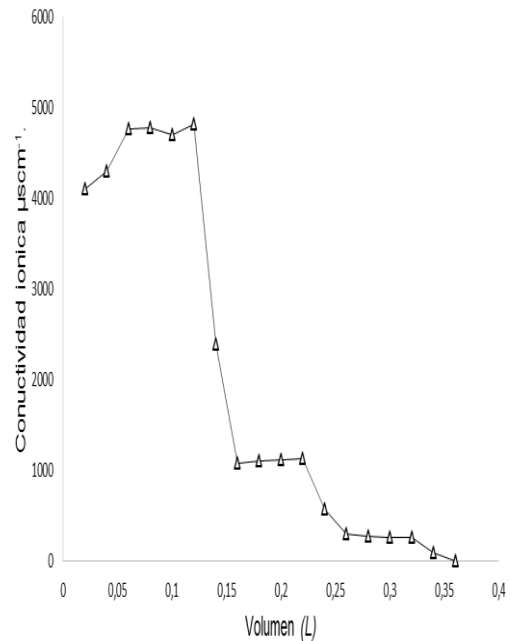


Figura 3. Conductividad eléctrica durante el proceso de desalinización del FT.

Los resultados de Carbono Orgánico Total (COT) y Nitrógeno Total (NT) del FT se determinaron por duplicado en el equipo TOC (Shimadzu, Mod. TOC-VCSN) antes (i) y después (f) del proceso de diafiltración, Los resultados fueron CO_i = 580 µg/L, NT_i = 210 µg/L y CO_f = 160 µg/L, NT_f = 15 µg/L con lo que se observa una reducción significativa de los compuestos orgánicos como *debritis* celulares después de la diafiltración y por tanto la concentración del EDL con actividad de FT.

La concentración de proteínas en el FT concentrado y desalinizado fue de 687 mg/mL, que comparado con los resultados obtenidos por el TOC no son concordantes muy probablemente a residuos del anticoagulante (Citrato de sodio y EDTA) utilizado en la preservación de la sangre de caballo. Sin embargo, hubo una concentración significativa del FT ya que las presentaciones comerciales tienen en promedio una concentración proteica de 250 mg/mL.

5. CONCLUSIONES

A partir de las condiciones óptimas de operación del equipo de ultrafiltración ($V = 0.05$ L, $P_f = 40$ psi, $P_r = 0$ psi, $t = 0.17$ h) se llevó a cabo la desalinización del FT el cual tuvo una concentración proteica final de 687 mg/mL, 274% mayor a las registradas en FT comerciales.

Los resultados de COT y NT del concentrado desalinizado del FT no fueron concordantes con la concentración de proteínas, probablemente a interferencias por los anticoagulantes residuales usados durante la obtención de la fracción leucocitaria de la sangre de caballo. Sin embargo, fueron de gran ayuda como parámetros de seguimiento durante la eliminación de los restos celulares presentes en el FT antes de su diafiltración y así obtener mejores resultados para la caracterización molecular del FT purificado.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Carbajal, A. (2013). *Cromatografía de afinidad*. México. Universidad Autónoma de México. pp 2.
2. Franco, M. (2004). *Efecto del extracto dializable de leucocitos bovino (edlb) en el shock endotóxico inducido por lipopolisacáridos*. Universidad Autónoma de Nuevo León. pp. 42-43.
3. Franco, M., Mendoza, E., Miranda, D., Zapata, P., Castillo, L., Isaza, C., Tamez, R., & Rodríguez, C. (2006). *In vitro effects of bovine dialyzable leukocyte extract (bDLE) in cancer cells*. NCBI.
4. Guastalli, A. (2006). *Estudio sobre la Aplicación de la Tecnología de Membranas para la Recuperación del Ácido Fosfórico de las Aguas de Lavado en el Proceso de Anodizado del Aluminio*. Universidad de Barcelona. Barcelona.
5. Ibañez, J., Mainero, R., & Doria, M. (2009). *Experimentos de química en microescala para nivel medio superior*. México: Universidad Iberoamericana.
6. Labome: The world of laboratories. (2012). *Protein Quantitation*. Estados Unidos. NCBI.
7. López, S. (2009). *Aplicación de la filtración tangencial en procesos de purificación*. Grifols Engineering, S.A. Barcelona, España. 2 pp.
8. Hennen, W. (2009). *Factor de Transferencia Mejorado*. Colombia: Millions Sold.
9. Pérez, M. (2014). *Determinación simultánea de carbono orgánico total, carbono inorgánico y metales pesados en aguas*. Universidad de Alicante.
10. Pizza, G., Amadori, M., Ablashi, D., De Vinci, C., & Viza, D. (2006). *Cell mediated immunity to meet the avian influenza A (H5N1) challenge*. ELSEVIER. Vol 67, pp 1.
11. Quero, H. (2007). *Membranas (Ultrafiltración)*. Universidad Politécnica de Catalunya (UPC). Barcelona.

12. Romero, J. (2010). *Control Avanzado en Procesos Industriales de Microfiltración y Ultrafiltración tangencial*. Universidad Politécnica de Valencia.
13. Rozzo SJ, Kirkpatrick CH. (1992) Purification of transfer factors. *Mol Immunol*.1992; 29:167–82.
14. Shimadzu Corporation. (2008). En *Analytical & measuring instruments*. Kyoto, Japan.
15. Viñals, L. (2007). ¿Qué son y para que se usan los hemoderivados? *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias (RCCV)*, 1, 527.
16. Voet, D., & Voet, J. (2006). *Bioquímica*. Montevideo, Uruguay: panamericana.
17. White, A. (2009). *Research on Transfer Factors in Disease Treatment and Prevention*. *EXPLORE*, 18(5) pp 19

CARACTERIZACIÓN DE LAS UNIDADES DE PRODUCCIÓN PECUARIA EN LA MICROCUENCA LA JOYA, QUERÉTARO

Elsa Angélica Contreras Contreras¹, Diana Elisa Bustos Contreras¹ Sergio Gómez Rosales¹ y José Antonio Espinosa García¹

¹ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias

RESUMEN

La sociedad, hablando particularmente de la rural, es heterogénea entre sus regiones y en sus localidades mismas, varían las oportunidades de desarrollo así como el modo de aprovechamiento de sus recursos económicos, sociales y naturales; por lo que es importante estudiar y analizar los procesos que se dan en cada una de las unidades de producción. El objetivo de este trabajo fue realizar una caracterización para entender el modo de producción pecuario y las variables que influyen en el manejo del ganado.

La investigación tuvo un enfoque cuanti-cualitativo, se realizaron entrevistas semi-estructuradas, talleres participativos, recorridos de campo y encuestas. En la microcuenca La Joya el sistema agropecuario se fundamenta en tres aspectos que son: tenencia de la tierra, agricultura y ganadería y la fuerza de trabajo está constituida por la familia. De acuerdo a las variables antes mencionadas se identificaron tres tipos de unidades de producción con características distintas que determinan el manejo del ganado. Se encontró que las mujeres se encargan de la "ganadería de traspatio". Tres cuartas partes (30) de las mujeres encuestadas dijeron tener animales de traspatio, principalmente cabras y ovinos (720), gallinas, pollos y guajalotes (120), conejos (90).

Se puede concluir que en la microcuenca La Joya la ganadería ha dejado de ser, si es que en algún momento lo fue, un ámbito de dominio enteramente masculino y reconocerlo contribuirá a que las mujeres sean consideradas como grupo meta de políticas públicas y puedan tener más opciones para desarrollarse como actoras de la economía local

1. INTRODUCCIÓN

La población es un agente fundamental del desarrollo sustentable y es indudablemente un factor importante de los cambios ambientales; sin embargo para una mejor descripción, no debe tomarse como un todo homogéneo, sino que requiere formar parte de los análisis considerando distintas variables. Como bien señala Rico (1997), el problema poblacional no involucra solamente números absolutos de gente, ni aún tasas de incremento o densidad poblacional, sino también de manera importante, factores sociales, políticos e institucionales.

La descripción de los aspectos relacionados con la población se realizó bajo el enfoque de género tomando en cuenta los roles sociales de hombres y mujeres así como la división genérica del trabajo y la edad. Según los datos obtenidos en el cuestionario y en el trabajo de campo, se encontró que además del género hay otras variables como la edad y la tenencia de la tierra, que determinan el manejo del ganado.

2. METODOLOGÍA

La investigación tuvo un enfoque cuanti-cualitativo. El enfoque mixto es un proceso que recolecta, analiza y vincula datos cuantitativos y cualitativos en un mismo estudio, en una serie de actividades diseñadas para responder a determinadas preguntas de investigación.

Ofrece varias ventajas: se logra una perspectiva más precisa del fenómeno; ayuda a clarificar el planteamiento del problema, así como las formas más apropiadas para estudiar y teorizar determinado fenómeno. De igual manera resulta importante integrar a los estudios sobre ganadería otras variables como el género, la edad, tenencia de la tierra, indicadores que determinan el manejo del ganado. Las herramientas metodológicas empleadas fueron: cuatro talleres participativos, se aplicaron ocho entrevistas semiestructuradas a informantes clave, así como un cuestionario en 54 viviendas, se llevó a cabo una campaña de vacunación que permitió realizar un censo del ganado y obtener información sobre aspectos productivos y reproductivos y registrar las prácticas de pastoreo.

3. RESULTADOS

Según los datos obtenidos en el cuestionario y en el trabajo de campo, se encontró que además del género hay otras variables como la edad y la tenencia de la tierra, que determinan el manejo del ganado. En la microcuenca La Joya el sistema agropecuario se fundamenta en tres aspectos que son: tenencia de la tierra, agricultura y ganadería y la fuerza de trabajo está constituida por la familia. De acuerdo a las variables antes mencionadas se identificaron tres tipos de Unidades de Producción (UP) con características distintas que determinan el manejo del ganado.

Las UP fueron clasificadas en función de su ciclo de vida, determinado por la edad de pareja. Los matrimonios jóvenes (entre 24 y 39 años: UP I) están al comienzo de su ciclo de vida los conformados por matrimonios intermedios (entre 40 y 59 años: UP II) están en expansión; mientras que aquellos donde hay adultos mayores de sesenta años, ya sea en pareja o solos, están en una etapa de contracción, es decir, tienen menos integrantes que el resto (UP III) (tabla 1).

Tabla 1. Tipología de Unidades de Producción (UP).

	UP I	UP II	UP III	TOTAL
El Charape	6	8	5	19
La Joya	10	13	12	35
Total	16	21	17	54

Fuente: Elaboración propia

Unidad de producción (UP) I

Respecto al sistema de producción en la UP I se encontró que la participación de las mujeres en el manejo del ganado es muy importante. Uno de los factores que determina el tamaño del hato es la mano de obra familiar, el contar con pastores que puedan apoyar en el pastoreo del ganado es primordial, al no contar con ella el tamaño se reduce, en este grupo solo cuatro cuentan con ganado bovino, pero si tienen ganado caprino y ovino, sin embargo el número de cabezas es pequeño en promedio diez. Las mujeres se encargan del cuidado y manejo del ganado, salen a pastorear cerca de la casa y lo hacen por las tardes cuando han terminado las actividades domésticas. Cuentan también con animales de traspatio como son pollos y gallinas, en 12 grupos tienen conejos, sin embargo la cría de estos últimos les implica más trabajo y más gasto y

realmente no le ven futuro pues no tienen donde comercializar. Para este grupo el contar con ganado es una forma de ahorro, pues lo venden en casos de urgencia (enfermedad, reparación y compra del algún bien para el hogar) o para alguna celebración (fiesta familiar o fiesta del pueblo).

Unidad de producción (UP) II

En esta UP si tienen ganado bovino (100 %), y la participación de los hijos en el cuidado de las cabras y ovinos es muy importante, son ellos los que se encargan del pastoreo, la ligera preferencia de criar ovinos a caprinos está relacionada con los pastores y su edad, ya que los niños cuidan ovinos o hatos mixtos con pocas cabras, y los jóvenes cuidan principalmente hatos formados por caprinos. El tamaño del hato en promedio de bovinos es de 10 cabezas y el de cabras y ovinos de 30. Es en esta UP se hizo evidente la estrecha relación que existe entre la agricultura, la ganadería y la tenencia de la tierra.

En las parcelas se lleva a cabo la actividad agrícola cultivando bajo el sistema milpa, mezclando granos de maíz-frijol, calabaza-chícharo, la cosecha se destina principalmente al autoconsumo y también se obtiene el rastrojo de la siembra y se recogen las diversas herbáceas que crecen entre el surcado, para en conjunto ser utilizados como alimento para el ganado en los meses de diciembre a febrero cuando el pasto de las áreas comunes se ve mermado por el pastoreo. En este grupo se encontró una estrecha relación entre la presencia de ganado bovino y la cosecha de esquilmos en la parcela y entre la tenencia de la tierra ya que todos son ejidatarios y poseen potreros además de la parcela. Las familias que no poseen parcela y/o potrero no cuentan con ganado bovino pues este espacio lo destinan principalmente para mantener el ganado ahí en los meses de diciembre y hasta que inician las lluvias; los potreros que están integrados a la parcela, se utilizan desde que termina la cosecha en octubre y hasta enero.

Respecto al manejo y actividades de cada uno de los miembros se encontraron diferencias, a las mujeres se les asocia con el manejo del ganado menor o como en algunos textos se menciona con la “ganadería de traspatio”, que incluye a las cabras, ovinos, cerdos, pollos, gallinas, guajolotes y conejos, su manejo y la reproducción de este sistema depende de ellas, la importancia de la crianza de este ganado está asociada a la estabilidad socioeconómica de las unidades de producción, y también con la seguridad alimentaria, pues además de vender el ganado, los subproductos como el huevo y carne se consumen en la familia. Los hombres por el contrario se encargan del cuidado del ganado bovino y su reproducción está asociada a la comercialización principalmente. Y por último los niños son los encargados de pastorear el ganado ovino y caprino, ellos junto con las mujeres se encargan de limpiar el corral de los mismos. De acuerdo con Vázquez (2014) se han registrado diferencias en las estrategias cuando al frente de las unidades de producción hay mujeres o cuando las decisiones se toman de forma compartida. Las mujeres están más centradas en la satisfacción de necesidades básicas y por tanto, son especialmente sensibles a la estabilidad de las unidades de producción.

c) Unidades de Producción (UP) III

Esta UP está integrada por adultos mayores el rango de edad es de 60 a 74 años. De las 54 UP 19 se encuentran en este grupo, lo que nos habla del envejecimiento del campo, situación presente en todo el país. México se encuentra inmerso en un proceso de envejecimiento de su población, el cual se presenta de manera más acentuada en las zonas rurales, que son las que exhiben mayor grado de empobrecimiento y de carencias. En este contexto, las mujeres son mayoría, ya que tienen una mayor esperanza de vida (Zapata *et al.*, 2008). Este sector es el más vulnerable, debido a que la única fuente de ingresos segura y por lo tanto la más importante es el subsidio, el total de los grupos reciben apoyo del programa 65 y más del gobierno federal. Según Zapata *et al.* (2008), los beneficiarios de este programa presentan un fuerte rezago educativo, cuentan con escasas opciones de ingreso y aquellas que podrían representar una alternativa, les son negadas en forma explícita o por la realidad de su deterioro físico

Al respecto del sistema de producción se encontró que solo el 60% tienen ganado bovino, ya que las familias que no poseen potrero y/o parcela, o bien, que son ejidatarios de edad avanzada y no siembran, no tienen. Cuentan con ganado ovino y caprino pero al igual que en la UPI, el hato en promedio es de 10 a 15, debido a que muchas veces quien lo pastorea son los hijos ya que lo juntan con su ganado. Las mujeres se dedican al cuidado de los animales de traspatio como son las gallinas y los pollos, su reproducción es para autoconsumo principalmente y solo 10 de las 19 UP, venden el huevo ahí mismo en la comunidad. En este grupo para los hombres tener ganado bovino es una forma de poder, pues históricamente el hecho de ser ganaderos les brinda status, este factor está relacionado principalmente con la edad.

4. CONCLUSIONES

De acuerdo al trabajo de campo realizado se puede concluir que el sistema de producción agropecuario, es una actividad que tiene una continuidad histórica, que brinda arraigo y seguridad, es parte integrante de la dinámica socioeconómica y ambiental de la microcuenca, lo mismo en la UP I, II y III. Se encontró que las mujeres se encargan de la “ganadería de traspatio”. Tres cuartas partes (30) de las mujeres encuestadas dijeron tener animales de traspatio, principalmente cabras y ovinos (720), gallinas, pollos y guajalotes (120), conejos (90).

Las unidades de producción pecuarias están constituidas por 51 familias que representan el 83.6% de la población de las comunidades analizadas dentro de la microcuenca. Considerando que a la vez estas familias poseen tierras de cultivo, y que el manejo de la milpa se combina con la producción pecuaria, esto da lugar a que dentro de la estructura del ingreso familiar; la ganadería sea la principal participación en los ingresos obtenidos localmente, por lo que adquiere relevancia social y económica, aunado al manejo de los recursos de la microcuenca.

BIBLIOGRAFÍA

1. M.N. Rico, Las mujeres en los procesos asociados al agua en América Latina. Estado de situación, propuestas de investigación y políticas. Ponencia presentada en el Octavo simposio sobre los aportes de las mujeres en el ámbito de los recursos hídricos. Estocolmo, Suecia, del 8 al 12 de agosto de 1998.
2. S.J. Taylor, y R. Bogdan, “Ir hacia la gente”. Introducción a los métodos cualitativos de investigación, 1992, Buenos Aires: Paidós.
3. E. Zapara, B. Suarez, L.E. Garza, Con el sol a cuestas. Balance de la vejez en el México rural. México: GIMTRAP, 2008, INDESOL.

IMPORTANCIA DEL MANEJO REPRODUCTIVO DE GANADO BOVINO LECHERO PARA LA DETECCIÓN DE FACTORES DE RIESGO EN UN ESTABLO

Padilla Ramírez Francisco Javier¹, Hugo Castañeda Vazquez¹, Martha Alicia Castañeda Vazquez¹, Erika Patricia Salas Castañeda¹, Oscar Carbajal Mariscal¹.

¹Laboratorio de Mastitis Y Diagnóstico Molecular, CUCBA, Universidad de Guadalajara

RESUMEN

La problemática en los sistemas de producción de leche de bovino es diversa, se muestra baja productividad asociada principalmente al tiempo prolongado en que los animales se encuentran improductivos (crianza y periodos secos largos) y una baja producción de los animales que están en ordeña. El objetivo del presente estudio, fue evaluar el comportamiento reproductivo y productivo de ganado bovino lechero para determinar los posibles factores de riesgo y establecer un programa estratégico de manejo tendiente a la toma de decisiones oportuna. El estudio se realizó en el Campo Experimental Cofradía. Se utilizaron 64 tarjetas de control individual que incluyeron vacas y vaquillas de primer parto. Las variables de respuesta fueron: edad al primer parto, días al primer estro post-parto, días al primer servicio post-parto, días abiertos, tasa de concepción general y producción de leche por lactancia. Se realizó un análisis de varianza con el paquete SAS en su rutina GLM. De los resultados obtenidos se observa que los principales factores de riesgo asociados al comportamiento reproductivo fueron: Inadecuado programa de alimentación y monitoreo durante la lactancia tardía, secado y postparto, mala eficiencia en detección de estros, alta incidencia de problemas en periparto y puerperio, atención inadecuada a animales con problemas e inadecuado programa de control para enfermedades reproductivas. Se concluye que en cualquier sistema de producción animal la función reproductiva y su eficiencia, así como la crianza de reemplazos dependen de la interacción entre factores ambientales, infecciosos, individuales y de manejo. Es necesario evaluar y diagnosticar factores de riesgo para establecer medidas de corrección oportunas.

1. INTRODUCCION

Los sistemas de producción de leche de bovino son diversos y complejos. La producción de leche es generalmente baja a pesar del elevado uso de insumos y de la aplicación de tecnología, lo que indica una problemática en la que se combina el inadecuado uso de recursos y la presencia en el sistema de algunos elementos que impiden la expresión del potencial productivo. Como resultado de esta situación se muestra una baja productividad asociada principalmente al tiempo prolongado en que los animales se encuentran improductivos (crianza y periodos secos largos) y a una baja producción de los animales que están en ordeña.

Otros de los aspectos determinantes son los problemas reproductivos, que inducen una alta tasa de desecho de los animales. Los más frecuentes son el prolongado anestro posparto (Cuevas *et al.*, 2007) y la infertilidad (Camacho, 1994). Lo anterior puede verse reflejado en el alto porcentaje de vacas adultas sin producir detectado en algunos hatos en alrededor del 42 % (Cuevas *et al.*, 2007), en los que se ha observado que las vacas pueden presentar hasta 160 días abiertos (Luna *et al.*, 1999).

Las condiciones de subnutrición que frecuentemente se presentan en los sistemas semitecnificados, particularmente durante el periodo de transición secado-lactancia y el postparto temprano, son probablemente la causa de esta condición de ineficiencia reproductiva (Flores *et al.*, 2007).

Otro problema, es la insuficiente producción de crías de reemplazo, determinada por una excesiva pérdida durante la crianza, aproximadamente un 30% entre el nacimiento y los primeros 100 días de edad (Medina y Montaldo, 2002) y una baja tasa de crecimiento que alarga el periodo entre el nacimiento y el primer parto. En un estudio realizado en la región de los altos de Jalisco se encontró que 67 % de las vaquillas recibían su primer servicio con más de 15 meses de edad y 87 % tenían su primer parto después de los 24 meses (Flores *et al.*, 2007). La ineficiencia reproductiva y de crianza de reemplazos también es probablemente determinada por la alta prevalencia de enfermedades virales y bacterianas que afectan la fertilidad de los vientres y la sobrevivencia de las becerras.

Existen evidencias que han demostrado que los principales problemas que afectan la productividad están relacionados con aspectos de salud animal, eficiencia reproductiva y eficiencia en la crianza de hembras para reemplazo. En cualquier sistema de producción animal la función reproductiva y su eficiencia, así como la crianza de reemplazos en el caso de los sistemas de producción de leche bovina, dependen de la interacción entre factores ambientales, infecciosos, individuales y de manejo. Lo anterior determina la necesidad de identificar y valorar la importancia de factores de riesgo asociados a las condiciones de falla con el fin de establecer un programa de toma de decisiones oportuna para aplicar las estrategias necesarias para limitar el o los problemas.

OBJETIVO

El objetivo del presente estudio fue evaluar el comportamiento reproductivo y productivo en un establo para determinar los posibles factores de riesgo con el fin de establecer un programa estratégico de manejo tendiente a la toma de decisiones oportuna.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el establo lechero del Campo Experimental Cofradía del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la U de G. ubicado en el municipio de Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco. El manejo de los bovinos en el establo se realizó con base a su etapa fisiológica; crianza de becerras, fase de desarrollo, vaquillas de reemplazo, vaquillas gestantes, vacas en producción y vacas secas. Se llevaron a cabo registros y prácticas zootécnicas, sistema de alimentación, programas reproductivos, registros de producción e inseminación artificial.

Las variables de respuesta fueron: edad al primer parto, días al primer estro post parto, días al primer servicio post parto, días abiertos, tasa de concepción general y producción de leche por lactancia.

Para el análisis estadístico, se diseñó una hoja de entrada para los datos y se capturó en el programa Excel. Se realizó un análisis de varianza con el paquete SAS en su rutina GLM.

Crianza de becerras; a partir del tercer día de edad la becerro se trasladó a la sala de crianza, previa aplicación de vitaminas A, D y E intramusculares y se alojó en una corraleta individual donde permaneció hasta el destete a los 60 días de edad. Las prácticas zootécnicas que se realizaron en la jaula fueron: el descornado con pasta comercial previo corte de pelo del área que rodea al cuerno y la aplicación de grasa o vaselina alrededor del área recortada. Corte de tetas suplementarias con tijeras previa desinfección de la zona y el instrumental. El sistema de alimentación se suministró a 4 litros de leche por animal hasta los 45 días de edad. Se ofreció concentrado iniciador con un contenido de 20% de proteína para su consumo a libertad a partir del

octavo día de edad. Del día 46 de edad, la leche que se les proporcionó se disminuyó a 2 litros diarios hasta llegar a los 60 días al destete. Con la finalidad de disminuir el estrés producido por el destete, los animales permanecieron en la jaula aproximadamente dos semanas después de realizado este.

Fase de desarrollo; esta fase comprende de los dos a los seis meses de edad. La alimentación que se les proporcionó es ensilaje de maíz a libertad más 2 kg de concentrado por animal por día el cual contiene 17% de proteína. Se vacunaron y desparasitaron interna y externamente. La desparasitación interna se llevó a cabo por primera vez a los tres meses de edad, posteriormente cada 6 meses previo muestreo de heces para observar el grado de infestación. Las vacunaciones rutinarias que se realizaron fueron contra el Ántrax y bacterina doble (Septicemia hemorrágica y edema maligno).

Vaquillas de reemplazo; comprende desde los 6 meses de edad hasta que las vaquillas alcanzan el peso de 340 kg que es cuando reciben el primer servicio. Las vaquillas permanecieron en corrales en grupos de 5 a 8 animales, con edades y pesos similares; se alimentaron con ensilaje de maíz y un concentrado que contenía 16% de proteína en cantidades variables según requerimientos. El primer servicio por inseminación artificial se dio cuando los animales alcanzaron un peso corporal de 340 kg. El diagnóstico de gestación se realizó entre los 45 y 60 días postservicio. Una vez confirmado el diagnóstico como gestante se separaron al corral de vaquillas gestantes hasta tener 7 meses de gestación.

Vaquillas gestantes; dos meses antes del parto estas se alojaron en un corral cercano a las vacas en producción con la finalidad de que se fueran acostumbrando a la rutina de alimentación de las vacas.

Vacas en producción; en esta fase se tienen a las vacas a partir del cuarto día después del parto hasta los siete meses de gestación o cuando su producción es inferior a 6 litros por día. Los lotes se dividieron en frescas, altas, medianas y bajas productoras. La alimentación consistió principalmente en ensilaje de maíz junto con un concentrado que se ofreció con base a su estatus de producción de bajas, medias o altas productoras. Se ofreció en todos los corrales sales minerales a libertad. La ordeña se realizó dos veces al día en forma mecanizada, efectuando una serie de pasos encaminados a disminuir hasta donde fuera posible los problemas de mastitis como: lavado de la ubre, despunte, evitar sobre ordeño, desinfección de pezoneras, sellado del pezón, lavado y desinfección del equipo.

Se realizó mensualmente la prueba de California para la detección de vacas con mastitis subclínica y se llevaron registros diarios de producción por vaca.

Vacas secas; el secado de las vacas se realizó mediante ordeños alternos espaciados para propiciar que la ubre dejara de producir leche, y en el último ordeño se acompañó con la aplicación intramamaria de antibióticos especiales para el secado en cada cuarto. Durante las primeras semanas de secado solo se ofreció forraje de buena calidad y se inició a dar cantidades crecientes de concentrado de buena calidad a partir la sexta semana preparto.

Programa reproductivo; la detección de celos se realizó dos veces al día (por la mañana y por la tarde) por espacio de una hora cada vez.

La inseminación artificial se realizó en forma convencional 12 horas después de haberse detectado el inicio del celo.

El diagnóstico de la preñez se realizó por vía transrectal 45 a 60 días postservicio. Una semana posterior al parto se realizó una revisión para determinar la involución uterina. Entre los 45 y 50 días postparto si la vaca no presentó celo se indujo artificialmente con los protocolos convencionales usando GnRH y prostaglandinas según el caso. Se utilizó la información

documentada en las tarjetas de control individual (n=64) donde se incluyeron vacas y vaquillas de primer parto. Las variables de respuesta fueron: Edad al primer parto, días al primer estro post parto, días al primer servicio post parto, días abiertos, tasa de concepción general y producción de leche por lactancia.

Para el análisis estadístico, se diseñó una hoja de entrada para los datos y se capturó en el programa Excel. Se realizó un análisis de varianza con el paquete SAS en su rutina GLM.

3. RESULTADOS

La primera respuesta de carácter reproductivo en las vaquillas lecheras es la edad al primer parto. En este estudio fue de 26.18+0.379 meses de edad. Posteriormente la característica reproductiva son los días que transcurren entre el parto y la presentación del primer estro, y en este caso fue de 24.41+2.49 días. El periodo del primer servicio posparto fue de 94.07+3.54 días. Por su parte unas de las características reproductivas que muestran la eficiencia reproductiva son los días abiertos que es el periodo entre la fecha de parto y la fecha en la que queda gestante, y en este estudio fue de 133.64+4.70 días. Por su parte el periodo interparto que es el periodo de días entre un parto y otro fue de 436.08+5.62 días. El número de servicios por concepción en promedio que se encontraron en este estudio fue de 2.25+0.103.

En cuanto a la longevidad observada en estos animales expresada en número de partos que mostraron fue de 2.66+0.163 partos. Por otra parte la tasa de gestación total observada en estos animales fue de 52.43+2.86%. En relación al comportamiento productivo expresado en la producción de leche por lactancia las vacas produjeron un total promedio de 6977+172 kg.

4. DISCUSIÓN

Se ha demostrado que la rentabilidad de una explotación lechera depende en gran medida del comportamiento reproductivo de los vientres (Britt, 1985; Plaizier *et al.*, 1997; Meadows *et al.*, 2005). De los principales rubros que son determinados por este comportamiento son: La producción diaria de leche, número de reemplazos disponibles y la tasa de desecho voluntario e involuntario (Britt, 1985). La cantidad de leche producida por vaca en el establo se ve afectada negativamente al disminuir la eficiencia reproductiva, como son: mayor número de días abiertos, menor eficiencia en la detección del celo y mayor intervalo entre partos.

Con base a los resultados de la edad al primer parto, el valor encontrado en este trabajo se encuentra por arriba de los valores encontrados o mencionados por otros autores para esta misma raza en condiciones de clima templado y bajo sistemas de manejo intensivo donde mencionan edades de 23 y 24 meses (Flores *et al.*, 2007). Se ha demostrado la importancia que representa una edad adecuada al primer parto: de los principales son cuando se presenta a una edad muy temprana (antes de los 24 meses de edad) se afecta la madurez reproductiva. Cuando se presenta a mayor edad se afecta a través del costo que representa mantener más días al animal hasta que llega a su primera manifestación reproductiva importante, también para este caso el que lleguen a una edad tardía se manifiestan fallas en el manejo, como no contar con un plan de desarrollo corporal planeado para que lleguen a la edad y peso adecuado para ser servidas (15 meses de edad y 350 kg de peso corporal). En este caso el factor de riesgo detectado es una falla en el crecimiento de las vaquillas que se puede resolver determinado al menos cada dos meses un peso objetivo y los requerimientos necesarios para que lleguen al peso deseado.

Los cambios durante el periodo posparto relacionados con cambios fisiológicos en tanto al tracto reproductivo y de la relación del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas determinan en gran parte el comportamiento reproductivo. Durante el posparto las vacas lecheras sufren un cambio importante en el balance energético que precede la aparición de los ciclos ováricos normales. Este balance energético negativo está provocado fundamentalmente por pérdida de energía que implica la lactancia y que excede la incorporada a través de los alimentos. Dicho balance negativo se asocia

en la dinámica folicular, con el conocido resultado de la falta de celo y ovulación. El restablecimiento de la secreción pulsátil de LH luego del parto provoca el reinicio de la dinámica folicular normal. El comienzo temprano de los ciclos estrales es determinante de una concepción temprana. El momento de la primera ovulación determina y limita el número de ciclos estrales que pueden ocurrir antes de la primera inseminación, y cuanto mayor sea el número de celos antes de los 60 días postparto, mayor será la posibilidad de concepción al primer servicio (2,60 y 1,75 servicios por concepción para vacas de 0 y 4 celos respectivamente antes de los 60 días postparto). En relación al periodo que transcurre entre el parto y la presentación del primer celo fue de $24.41+2.49$ días. Este valor coincide con la mayoría de autores que han publicado sobre esta variable que varía entre 18 y 25 días, sin embargo, en establos lecheros una de las prácticas más comunes es aplicar un periodo de espera que consiste en dejar pasar algunos calores con el objeto de permitir a la vaca que tenga su periodo de puerperio completo que ocurre alrededor de 30 días postparto.

Por otro lado, está bien documentado el hecho de que con el objetivo de contar con los días necesarios para el secado se recomienda dejar por lo menos un periodo de espera voluntario de al menos 65 días. La importancia de observar la actividad ovárica postparto así como el transcurso del puerperio sano radica como se mencionó por otros autores que los problemas reproductivos más frecuentes son el prolongado anestro postparto, la infertilidad y vacas repetidoras (Cuevas *et al.*, 2007). Posterior al periodo de espera voluntario uno de los retos es preñar lo más pronto posible a la hembra. En este estudio el periodo del primer servicio postparto fue de $94.07+3.54$ días, que es ligeramente menor que datos de otros autores que observaron en explotaciones lecheras tecnificadas una alta variabilidad en el periodo de anestro postparto, que va desde el 4 hasta el 58% de las vacas quienes permanecen en estado de anestro entre los 40 y 97 días (Stevenson, 2001).

Por otro lado, en vacas Holstein en pastoreo mostraron periodos de anovulación hasta los 96 días postparto. Para este caso los factores de riesgo se considera que son: un inadecuado programa de alimentación y su monitoreo durante la lactancia tardía, secado y postparto, deficiencias en la detección de estros, alta incidencia de problemas en periparto, puerperio y/o atención inadecuada a animales con problemas e inadecuado programa de control para enfermedades reproductivas. Se recomienda en estos casos atender el periodo del periparto especialmente. El día abierto en vacas está determinado por el puerperio fisiológico que son los días necesarios para que aparezca un primer celo después del parto, que es un promedio de no menos de 45 y un máximo de 60 días. Este período llamado período de espera voluntario, no puede ser modificado sustancialmente ya que responde a variables fisiológicas. Los otros componentes de los días abiertos están determinados por las fallas en la detección de celos y fallas en la concepción, lo cual implica, en ambos casos adicionar 21 días del nuevo ciclo estral a los días abiertos.

Por todo lo anteriormente expuesto, la justificación principal de la implementación de un programa de manejo reproductivo en establos lecheros radica en la optimización de la detección de celos y la mejora en las tasas de concepción. Otro indicador de la eficiencia reproductiva es la tasa de preñez que resulta del producto entre la tasa de detección de celos vacas preñadas sobre el número de vacas inseminadas. Lo que significa que la eficiencia en la detección de celos va a afectar directamente las tasas efectivas de preñez del hato. En este trabajo el promedio de días abiertos fue de $133.64+4.70$ días, lo que concuerda con la mayoría de datos que se mencionan para esta característica. Existen evidencias documentadas que la principal causa de desecho temprano en vacas Holstein en el altiplano es la infertilidad, ya que se observó que el promedio fue de dos lactancias en su vida productiva (Milián *et al.*, 1989), lo que representaría que no se pague la fase de crianza y desarrollo, que a su vez repercute en tener al menos un 30% menos de producción de leche. En el presente trabajo se observó un promedio de $2.66+0.163$ partos en la vida productiva del animal.

5. CONCLUSION

Desde el punto de vista reproductivo la visión de cualquier especialista es atender básicamente tres rubros: El primero es el inicio de la actividad sexual (Pubertad), para incorporar lo más pronto posible a la vaquilla a ser vientre, el segundo es la atención especial a las vaquillas de primer parto; y el tercero es el reinicio de la actividad ovárica y puerperio posparto. Para lograr el éxito de obtener una eficiencia reproductiva adecuada es necesario hacer un análisis del comportamiento reproductivo y productivo para detectar los factores de riesgo y tomar las decisiones oportunas de manejo para su corrección.

BIBLIOGRAFÍA

1. Britt J. H. 1985. Enhanced reproduction and its economic implications. *J. Dairy Sci.* 68:1585–1592.
2. Cuevas V.R., Espinosa G.J.A., Moctezuma L.G., Jolalpa Barrera J.L., Romero S.F., Vélez I.A., Flores M.B.A., Vázquez G.R. 2007. La cadena Agroalimentaria de la leche de vaca en el Estado de Hidalgo: Diagnostico y prospección al año 2020. pp 54-59 INIFAP.
3. Flores H.E., J.J. Olmos, H. Ramírez, V.O. Fuentes, O. Reynoso y H. Moreno. 2007. ET-59 Caracterización del sistema de producción de leche de la cuenca hidrográfica El Jihuite, Jalisco, México. Memorias del II Congreso Internacional de Producción Animal Tropical. 26 al 29 de noviembre. La Habana, Cuba.
4. Medina CM., Montaldo VH. Algunos parámetros productivos y reproductivos en los Reemplazos Holstein en el Altiplano Central de México. XIX Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, 24 – 28 de Octubre del 2004. Buenos Aires, Argentina. Asociación Panamericana de Ciencias Veterinarias AC. 2004. 96.
5. Meadows C., P. J. Rajala-Schultz, and G. S. Frazer. 2005. A spreadsheet-based model demonstrating the nonuniform economic effects of varying reproductive performance in Ohio dairy herds. *J. Dairy Sci.* 88:1244–1254.
6. Milián S.F., N.E. Holins y R.D. Smith. 1989. Análisis descriptivo de un estudio epidemiológico de las razones de desecho en ganado lechero. *Tec. Pec. En Méx.*, 27 (1):14-23.
7. Plaizier J. C., G. J. King, J. C. Dekkers, and K. Lissemore. 1997. Estimation of economic values of indices for reproductive performance in dairy herds using computer simulation. *J. Dairy Sci.* 80:2775–2783.
8. Stevenson SJ. 2001. Reproductive management of dairy cows in high milk-producing herds. *J. Dairy Sci.* 84(E. Suppl.):E128-E143.

MOLECULAS BIOLÓGICAMENTE ACTIVAS COMO BIOCIDAS DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS

Erika Elizabeth Morales-Irigoyen¹, Marina Olivia Franco-Hernández¹, Jorge Luis Flores-Moreno².

¹Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (IPN-UPIBI).

²Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco.

RESUMEN

Las enfermedades post-cosecha causadas por bacterias como *Pectobacterium carotovorum* y *Erwinia amylovora*, producen importantes pérdidas de las cosechas. Para contrarrestar estas enfermedades, se utilizan agroquímicos aplicados en dosis excesivas que provocan daños a la salud y al medio ambiente además inducen resistencia bacteriana. Una alternativa consiste en utilizar biomateriales como tratamiento post-cosecha. Sin embargo, el estudio del efecto biocida de estos sólidos, es limitado. Para esto, se propone la síntesis de materiales híbridos, asociando un hidróxido doble laminar (HDL) con una molécula biológicamente activa (MBA). El primer paso para la síntesis es conocer el efecto de la MBA sobre el agente causal de la enfermedad. Por lo anterior, el objetivo de este estudio consistió en evaluar moléculas de Cefalexina, Cefalexina monohidratada, Neomicina, Ampicilina, Cloxacilina y Amoxicilina Tri-hidrato, contra *Pectobacterium carotovorum* y *Erwinia amylovora*. La actividad antibacteriana se evaluó *in vitro* difusión en disco. Los resultados mostraron que la cefalexina, cefalexina monohidratada, Neomicina, Ampicilina y Amoxicilina Tri-hidratada tuvieron actividad antibacteriana, por lo tanto son susceptibles a ser intercaladas, a diferencia de la cloxacilina sódica que no mostró efecto bactericida.

1.- INTRODUCCIÓN

Se estima que las pérdidas de los alimentos producidos en los países desarrollados y en vías de desarrollo, pueden alcanzar desde el 15 hasta un 50% [1]. Una de las causas de estas pérdidas, se debe a las enfermedades post-cosecha provocadas por la contaminación por microorganismos. Particularmente, las bacterias fitopatógenas *Pectobacterium carotovorum* y *Erwinia amylovora*, inducen enfermedades conocidas como pudrición blanda y fuego bacteriano, respectivamente. Estas enfermedades atacan a la papa, manzanas y peras, entre otros, causando pérdidas millonarias alrededor del mundo. Para el control de estas enfermedades, se aplican dosis excesivas e inadecuadas de agroquímicos peligrosos como fungicidas, insecticidas y bactericidas agrícolas a partir de mezclas de antibióticos como tetraciclina, estreptomina y gentamicina con sulfato de cobre [2], que causan daños a la salud y el medio ambiente además de inducir el desarrollo de cepas cada vez más resistentes. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevos productos amigables con la salud y el medio ambiente que ayuden a combatir las enfermedades producidas por bacterias fitopatógenas. Para esto, se propone la síntesis de biomateriales o materiales híbridos, asociando un hidróxido doble laminar (HDL) con una molécula biológicamente activa (MBA), particularmente antibióticos. Sin embargo, el primer paso para la síntesis de estos materiales es conocer el efecto de los antibióticos sobre el agente causal de la enfermedad.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio consistió en evaluar las siguientes moléculas biológicamente activas: Cefalexina, Cefalexina monohidratada, Neomicina, Ampicilina, Cloxacilina y

Amoxicilina Tri-hidrato, contra los fitopatógenos *Pectobacterium carotovorum* y *Erwinia amylovora*, para así conocer las posibilidades de estas moléculas para ser intercaladas en matrices laminares.

2. METODOLOGÍA

Material Biológico

Se utilizaron dos cepas de bacterias fitopatógenas *Pectobacterium carotovorum* y *Erwinia amylovora*, ambas proporcionadas por la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI).

Molécula Biológicamente Activa (MBA)

Se utilizaron 6 MBA:

- Cefalexina
- Cefalexina monohidratada
- Neomicina
- Ampicilina
- Cloxacilina
- Amoxicilina trihidratada

Todas las MBA fueron proporcionadas por el Laboratorio de Química de Materiales de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco.

Análisis *in vitro* de sensibilidad bacteriana

La prueba *in vitro* para determinar el efecto de las moléculas biológicamente activas contra *Pectobacterium carotovorum* y *Erwinia amylovora*, se realizó mediante la técnica de sensibilidad bacteriana [3], que se observa gráficamente en la Figura .

Se utilizaron sensidiscos de 6 mm que fueron impregnados con una solución (p/v) de la MBA en forma sódica en agua destilada a una concentración de 0.025 mg/μL.

Para realizar los tapetes bacterianos se utilizaron suspensiones bacterianas de *Pectobacterium carotovorum* y *Erwinia amylovora* a una concentración de 1.5×10^8 UFC, según escala nefelométrica. La suspensión se aplicó con hisopo estéril sobre agar Müller Hinton contenido en cajas de Petri de 10 cm de diámetro.

Los sensidiscos secos, previamente impregnados con la solución de MBA, se colocaron sobre los tapetes bacterianos. Las cajas se incubaron a 28 ± 2 °C, durante 24 h. Se midieron los halos de inhibición después de 24 h y se reportaron en mm.

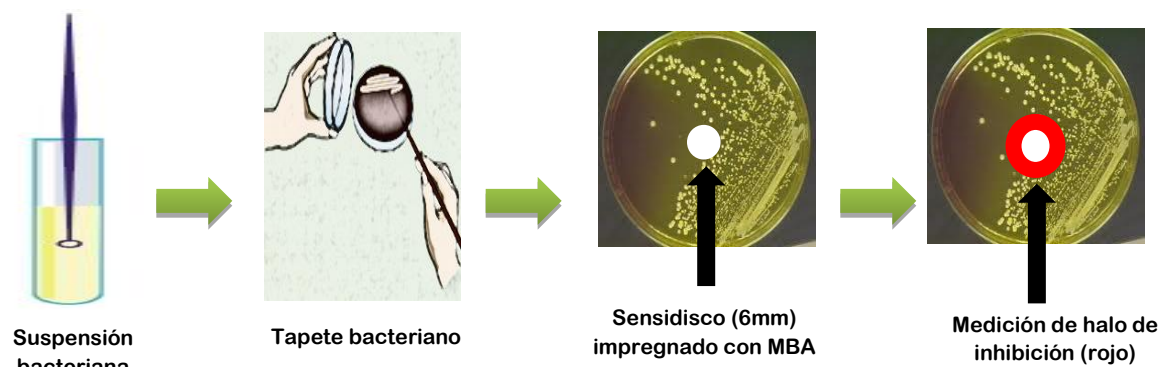


Figura 1.- Técnica de sensibilidad bacteriana

Análisis de datos

Los datos obtenidos en la prueba de sensibilidad bacteriana fueron examinados mediante análisis de Varianza (ANDEVA) de una vía y prueba de Duncan ($p \leq 0.05$) utilizando el paquete estadístico SAS[®] versión 9.0 [4].

3. RESULTADOS

Como se observa en la Tabla 1, en la prueba de sensibilidad bacteriana, las MBA analizadas tuvieron efecto sobre ambas bacterias *Pectobacterium carotovorum* y *Erwinia amylovora*, con excepción de la cloxacilina, que no generó halo o zona de inhibición (ZI).

Las MBA generaron halos de inhibición de tamaño considerable, por lo que podemos clasificar ambas bacterias como susceptibles [5]. Se puede observar una tendencia de mayor inhibición contra *Erwinia amylovora*.

En el caso de *Pectobacterium carotovorum*, la ampicilina y la amoxicilina Trihidrato generaron halos significativamente mayores que el resto de los tratamientos y en el caso de *Erwinia amylovora*, se observó el mismo comportamiento con estas mismas moléculas.

Tabla 1. Halos de inhibición (mm) de MBA contra *Pectobacterium carotovorum* y *Erwinia amylovora*.

MBA	Halos de inhibición (mm)	
	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	<i>Erwinia amylovora</i>
▪ Ampicilina	38.75±0.5 ^a	45.25±0.95 ^a
▪ Amoxicilina Tri-hidrato	38.25±0.5 ^a	43 ^b
▪ Cefalexina	27.25±0.5 ^c	31.5±0.5 ^c
▪ Cefalexina monohidratada	30 ^b	29.5±0.5 ^d
▪ Neomicina	23.75±0.5 ^d	26.25±0.5 ^e
▪ Cloxacilina	0 ^e	0 ^f

*Media ± desviación estándar, n=4. ^{a, b, c} Halos (mm) con la misma letra en la misma columna, por bacteria, no son significativamente diferentes (Duncan, $p \leq 0.05$, n = 4).

Para determinar la susceptibilidad de una molécula para ser intercalada dentro de un hidróxido doble laminar (HDL) o de alguna otra matriz ya sea inorgánica o no, se debe conocer la capacidad biocida de la misma, el tamaño de la molécula, la solubilidad, la carga parcial, entre otras propiedades. Sin embargo, la principal propiedad es la capacidad de inhibir al microorganismo blanco, así como la capacidad de mantener esta acción aún después de que la molécula biológicamente activa haya sido sometida al proceso de intercalación, en el que las variables más importantes como la temperatura o tiempo de intercambio pueden desnaturalizar y por ende afectar la acción biológica de estas moléculas.

Así, de las 6 MBA analizadas en este estudio, se puede concluir que la cefalexina, la cefalexina monohidratada, la neomicina, la ampicilina y la amoxicilina trihidratada son moléculas idóneas para ser hospedadas en matrices inorgánicas y fungir como componentes en la síntesis de materiales híbridos que pueden ser utilizados específicamente como agentes de control de enfermedades post-cosecha tales como pudrición blanda, pie negro, manchas y tizones entre otras, inducidas específicamente las bacterias fitopatógenas *Pectobacterium carotovorum* y *Erwinia amylovora*.

En la **Figura 6a**, se muestra la ZI generada por la ampicilina y en la **Figura 2b**, se han remarcado la ZI, el sensidisco y la zona de no inhibición o tapete bacteriano no eliminado. Cabe señalar que en la ampicilina generó las zonas de mayor inhibición contra ambas bacterias, pero contra *Erwinia amylovora* esta molécula generó el mayor diámetro ZI de 45.25 ± 0.95 mm, comparado con el resto de los tratamientos.

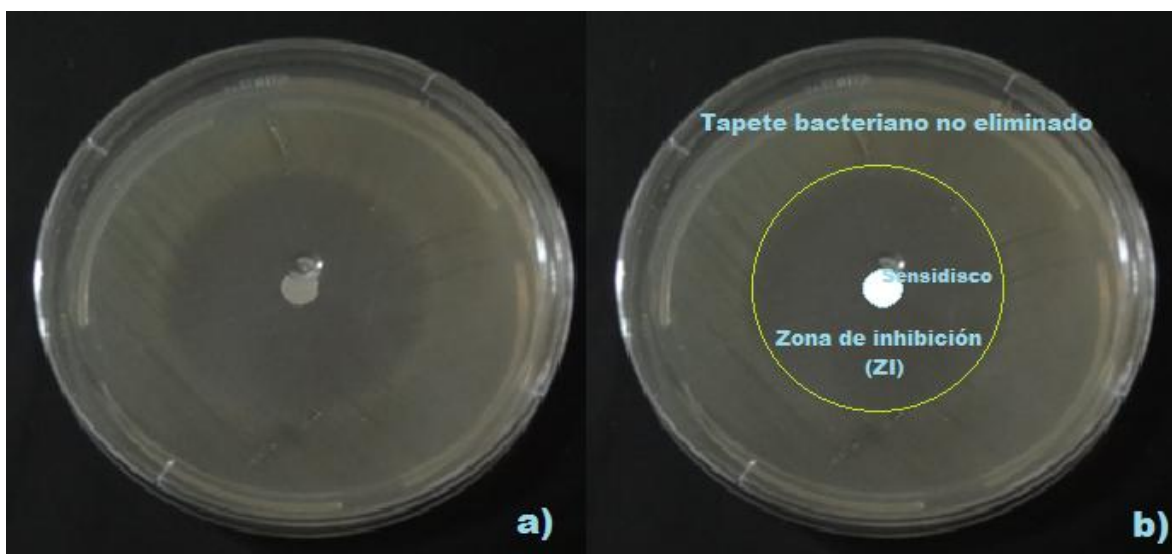


Figura 6.- a) Zona de inhibición y b) Zona de Inhibición (ZI) producida por ampicilina contra *Erwinia amylovora*.

4. CONCLUSIONES

De las 6 moléculas biológicamente activas analizadas, la Ampicilina, Amoxicilina trihidratada, cefalexina, cefalexina monohidratada y neomicina mostraron acción biocida contra *Pectobacterium carotovorum* y *Erwinia amylovora*, por lo que se puede concluir que son moléculas susceptibles al proceso de intercalación.

La ampicilina generó halos significativamente mayores comparados con los obtenidos en el resto de los tratamientos, esto en ambas bacterias.

La Cloxacilina no mostró acción biocida en contra de los fitopatógenos *Pectobacterium carotovorum* y *Erwinia amylovora*.

Es necesario profundizar estudios acerca de la toxicidad de las biomoléculas analizadas, para minimizar el posible impacto a la salud y al medio ambiente. Así como evaluar la posibilidad de resistencia bacteriana.

BIBLIOGRAFÍA

1. C.L. Wilson L. P. P., "Potential for Biological Control of Postharvest plant diseases," *Plant Dis.*, vol. 69, no. 5, pp. 375–378, 1985.
2. SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, "Guía de Plaguicidas autorizados para uso agrícola". *Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.*, 2007.
3. A. W. Bauer, W. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck, "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 45, no. 4, pp. 493–496., 1966.
4. SAS Institute Inc., Cary, NC, "Software Version 9.00 (TS M0)," 2009.
5. W. W. C. Konneman E. W., Allen S. D., Janda W. M., Schreckenberger P. C., *Diagnóstico Microbiológico*, . 5ª edición. Argentina, 2004.

OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN DEL CRISTAL VIOLETA CON UNA CEPA DE *Citrobacter freundii*

Mata Camarena Nadia Carolina¹, Sosa Santillán Gerardo de Jesús^{1*}, Sánchez Valdés Diana Guadalupe¹, Garza García Yolanda¹

¹Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Venustiano Carranza s/n, Col. República Ote., Saltillo, Coahuila, 25280, MÉXICO.

RESUMEN

La presencia de colorantes en las aguas residuales representa un grave problema ambiental, ya que este tipo de compuestos no puede eliminarse con los métodos de tratamiento convencionales. La mayoría de los sistemas de tratamiento basados en métodos químicos o físicos son costosos y requieren de gran cantidad de energía y reactivos, la biotecnología ofrece una alternativa de tratamiento. Una de las ventajas de este tipo de tecnologías es que, además de la decoloración, se puede alcanzar la completa mineralización del colorante. Basándose en resultados preliminares obtenidos previamente, en este trabajo se realizó un estudio para optimizar el proceso de biodegradación del colorante cristal violeta por medio de una cepa de *Citrobacter freundii*, Se realizaron cinéticas de biodegradación a diferentes valores de pH, temperaturas y concentración. A fin de optimizar el proceso se utilizó un diseño de Taguchi. Los resultados muestran eficiencias de hasta un 85% en el porcentaje de remoción del colorante; esta remoción, correlacionada con el incremento en la biomasa celular, indica la capacidad de esta cepa para utilizar al cristal violeta como fuente de carbono, contribuyendo así a su eliminación.

1. INTRODUCCIÓN

Como una consecuencia de la industrialización, el mundo enfrenta graves problemas de contaminación de aire, suelos y agua. La industria textil es una de las mayores empresas productoras, pero utiliza grandes volúmenes de agua en los procesos de teñido, generando grandes cantidades de agua residual con una alta carga de colorantes. Algunos colorantes son carcinógenos y mutagénicos, deterioran estéticamente los cuerpos de agua e impactan en la flora y la fauna marina [1]. Debido a su composición química, los colorantes empleados en la industria textil están diseñados de tal forma que puedan resistir la degradación por diversos factores externos y mantener integro su color bajo exposiciones a la luz solar, la acción de productos químicos, condiciones variables de temperatura e incluso a la degradación microbiana [2,3].

En nuestro país la Norma Oficial Mexicana NOM-CCA-014-ECOL/1993, tiene establecidos los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales provenientes de la industria textil a cuerpos receptores de agua, por lo tanto las empresas dedicadas al teñido de prendas deben de cumplir con los requerimientos que marca dicha norma. Este hecho ha forzado el interés por generar tecnologías para el tratamiento de aguas usadas en los procesos de la industria textil que logren alcanzar un nivel de degradación y mineralización suficiente como para reutilizar las aguas tratadas y reducir el consumo hídrico [4].

Se ha demostrado que los métodos biológicos son eficientes y factibles para el tratamiento de estos efluentes, pues mediante la degradación microbiana o enzimática se puede lograr la completa mineralización de los efluentes y por lo tanto el agua puede ser reutilizada [5]. Los

microorganismos usados en los procesos de remediación de efluentes textiles pueden aislarse de algún ambiente contaminado, como un efluente de la industria textil, por adaptación de cepas con el potencial de degradar colorantes o bien, aplicando técnicas de ingeniería genética para obtener microorganismos mejorados [5]. Una de las ventajas de trabajar con cultivos de un solo tipo de microorganismo, es que las condiciones y los parámetros determinados son más reproducibles y la interpretación es más sencilla al trabajar con un sistema simple [6]. Por ello para estudiar la microbiología y cinética de degradación puede ser más conveniente utilizar microorganismos aislados [7], que al ser identificados se puede conocer mejor su mecanismo de degradación y el proceso de decoloración puede ser optimizado.

En un trabajo previo, se demostró que *Citrobacter freundii* es capaz de degradar al cristal violeta en forma eficiente [8], por lo que en este trabajo se pretende lograr una optimización del proceso.

2. PARTE EXPERIMENTAL.

CEPA BACTERIANA.

Se utilizó una cepa de *Citrobacter freundii* perteneciente a la colección del Departamento de Biotecnología. Se mantuvo mediante resiembras periódicas y su pureza fue confirmada en cada resiembra observándolo a través del microscopio.

COLORANTE UTILIZADO.

Como modelo de estudio se utilizó solución acuosa de cristal violeta marca JalmeK.

PRECULTIVO

El inóculo de la cepa se obtuvo realizando un precultivo bajo condiciones aerobias en un medio de cultivo de referencia, el cual estaba compuesto de caldo nutritivo (0.8%), peptona de caseína (0.3%), extracto de levadura (0.2%), incubado a 35 °C, por un tiempo de 12 horas. Transcurrido el tiempo mencionado se utilizaron 10 mL de la suspensión bacteriana para inocular cada una de las unidades experimentales para un volumen final de 50 mL, por lo que se trabajó con una relación 1:4 de suspensión bacteriana y medio mineral.

MEDIO MINERAL

El medio mineral que se utilizó para realizar las cinéticas estaba compuesto de cloruro de sodio (0.5%), nitrato de sodio (0.3%), cloruro de potasio (0.5%), glucosa (1%), fosfato ácido de potasio (0.2%) y sulfato de magnesio (0.001%). Este medio fue utilizado anteriormente por Sánchez Valdés [8] con excelentes resultados para el crecimiento de *C. freundii* con actividad biodegradativa.

CINÉTICAS DE BIODEGRADACIÓN

Las células fueron crecidas aeróbicamente en un medio mineral, adicionado con una concentración definida del colorante, por un período de 4 horas, monitoreando la misma a partir del tiempo cero a intervalos de una hora.

Las cinéticas se realizaron en matraces de 250 mL conteniendo, con un volumen ocupado de 50 mL constituido por de 40 mL del medio mineral inoculado con 10 mL de suspensión de *C. freundii* proveniente del precultivo (excepto en el caso del estudio de la concentración de colorante), e incubados inicialmente a 30°C con una agitación de 250 rpm en una incubadora Lab-line Orbit.

Esta investigación consistió en optimizar la biodegradación del colorante con la cepa realizando un diseño de experimento con un arreglo Taguchi que partía en la realización de cuatro reactores

como se muestra en la Tabla 1. Se tomaron en cuenta tres factores que fueron la temperatura, pH y concentración del colorante, se realizaron 3 repeticiones de cada reactor.

Tabla 1. Diseño experimental utilizado

Reactor	Temperatura (°C)	pH	Concentración de colorante (ppm)
1	35	7	2.5
2	35	8	5.0
3	40	7	5.0
4	40	8	2.5

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE DECOLORACIÓN

La actividad de decoloración se expresó en términos del porcentaje de decoloración. Cada alícuota tomada de cada reactor fue centrifugada a 5,000 rpm por 10 minutos en una microcentrifuga Biofugue pico marca Heraeus.

El sobrenadante fue utilizado para determinar la decoloración del cristal violeta monitoreando la disminución en absorbancia al máximo valor de longitud de onda de dicho colorante (590 nm) en un espectrofotómetro UV-visible marca Varian. La actividad de decoloración fue calculada como sigue:

$$Decolorización(\%) = \frac{(absorbancia\ inicial) - (absorbancia\ observada)}{(absorbancia\ inicial)} \times 100$$

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA CELULAR

El paquete celular obtenido tras la centrifugación de cada muestra según lo especificado en el punto anterior fue lavado un par de veces con agua destilada y utilizado para la determinación de proteína por el método de Peterson modificado, esto con el fin de demostrar que existe crecimiento microbiano asociado al proceso de decoloración

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las Figuras 1 a 4 (Reactores 1 a 4) muestran los resultados obtenidos para el reactor funcionando bajo las diferentes condiciones probadas en este trabajo.

Los gráficos en azul muestran el comportamiento del proceso de decoloración con respecto al tiempo; puede observarse que para todos los casos se presenta una evidente disminución del color, aunque las pendientes de las gráficas muestran que la velocidad de degradación no es acelerada. Los porcentajes de decoloración alcanzados fueron de 39.5%, 39.21%, 32.16% y 32.33% para los reactores 1, 2, 3 y 4, respectivamente (Figuras 1 a 4). Es de señalar que las

cinéticas de degradación se monitorearon por un lapso de 4 horas, tiempo en el cual ninguno de los tratamientos parece haber alcanzado un estado estacionario, sino que más bien parece continuarse la tendencia de disminución en la decoloración, lo cual es más evidente para el Reactor 4. Esto sugiere que un mayor tiempo de proceso podría llevar a un mayor porcentaje de decoloración.

Los gráficos en rojo muestran el crecimiento celular expresado como proteína celular total; este parámetro fue considerado con el fin de correlacionar el proceso de degradación la cinética de crecimiento del microorganismo y poder con ello tener evidencia de que efectivamente la desaparición del color está asociada a un proceso de toma del cristal violeta como fuente de carbono por parte de *C. freundii*. En todos los tratamientos es evidente la estrecha relación entre la tasa de decoloración y la tasa de crecimiento. Es de notar que, tal como se mencionó para el caso del proceso de decoloración, las cuatro horas de cinética no permiten alcanzar una fase estacionaria en el crecimiento del microorganismo, por lo que es de esperar que a mayor tiempo de proceso se alcance una tasa mayor de crecimiento celular, impactando esto de forma positiva en el proceso de biodegradación del cristal violeta.

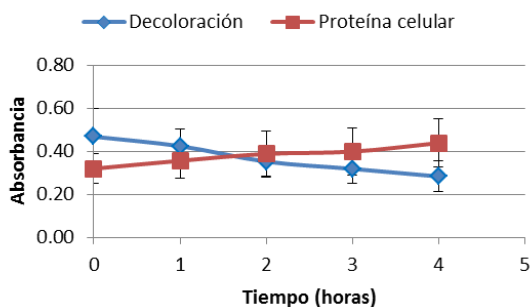


Figura 1. 35⁰ C, pH 7.0, concentración de cristal violeta 250 ppm

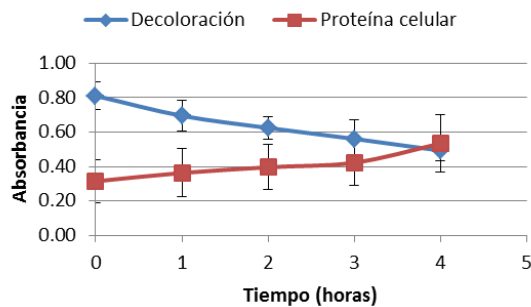


Figura 2. 35⁰ C, pH 8.0, concentración de cristal violeta 500 ppm

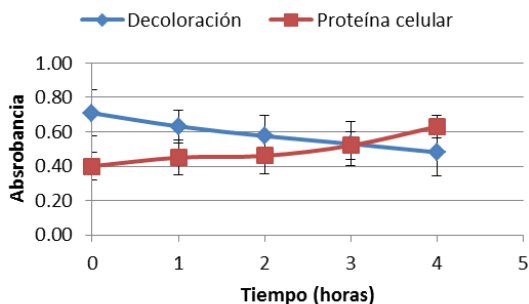


Figura 3. 40⁰ C, pH 7.0, concentración de cristal violeta 500 ppm

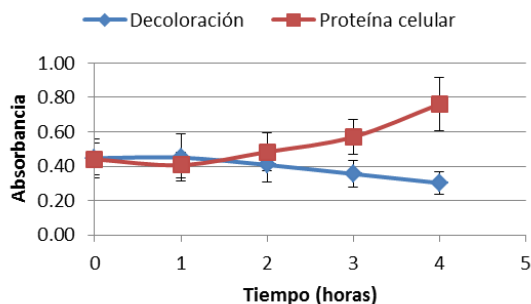


Figura 4. 40⁰ C, pH 8.0, concentración de cristal violeta 250 ppm

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que efectivamente el proceso de decoloración del colorante está asociado al crecimiento del microorganismo, por lo que se trata de un proceso de biodegradación, ya que el incremento de la concentración de proteínas es proporcional a la decoloración, es decir, *C. freundii* utilizó como fuente de carbono al cristal violeta.

4. CONCLUSIONES.

El vertido de colorantes provenientes de la industria textil representa un grave problema ambiental y las alternativas que existen para remediarlo no llegan a ser tan específicas y requieren recursos muy costosos para la industria. Es por eso que los procesos biológicos representan una alternativa aceptable como tratamiento de los residuos generados por las industrias que emplean colorantes para la fabricación de sus productos y las ventajas de esta alternativa es que su costo es bajo y ambientalmente amigable.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, se establece que las mejores condiciones para la decoloración del cristal violeta por actividad biodegradativa de *Citrobacter freundii* se da bajo las siguientes condiciones: el nivel de pH de 7.0, temperatura de 35 °C, y concentración de colorante de 250 ppm. Bajo estas condiciones fue posible alcanzar un porcentaje de decoloración de hasta 39.5 %. No obstante, este porcentaje es bajo, por lo que debe trabajarse explorando otras variables, como el tiempo duración del proceso, con el fin de realmente optimizar y alcanzar niveles de por lo menos 80% de degradación que sean equiparables con otras metodologías ya reportadas en la literatura.

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Autónoma de Coahuila, que a través del Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas, proporcionó lo necesario para la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Muñoz Rábago Edwin de Jesús, Vicente Rodríguez Ortiz. 2008. Cinética de la decoloración de colorantes en una muestra modelo en presencia de un catalizador. Tesina Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Químicas. Veracruz, México.
2. Pedraza Chan María S, Geissler Dahleim Gunther, Cedillo Ramírez Ma. Lilia y Muñoz Gracia Andrés. 2006. Biodegradación de colorantes azo bajo condiciones reductoras por bacterias gram-negativas mesofílicas aisladas de diversos ambientes. Memorias del V Congreso Internacional y XI Nacional de Ciencias Ambientales. Morelos, México.
3. Pey Clemetente, Jaime. 2008. Aplicación de procesos de oxidación avanzada (Fotocatálisis solar) para tratamiento y reutilización de efluentes textiles. Tesis. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 198 p.
4. Li F., Wichmann K., Otterpolhl R. (2009). Review of the technological approaches for grey water treatment and reuses. *Science of Total Environment*, 407, 3439-3449.
5. Kandelbauer A. y Guebitz G.M. Bioremediation for the decolorization of textile dyes - a review. En *Environmental Chemistry* (Editores: Lichtfouse E, Dudd S, Robert D) Springer Berlin Heidelberg, 269-288. 2005
6. Pearce C.I., Lloyd J.R. y Guthrie J.T., 2003. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dye Pigment*, 58, 179–196.
7. González Gutiérrez Linda Victoria. 2006. Estudio de la degradación de un colorante azo rojo reactivo en un biorreactor anaerobio de flujo ascendente. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química. Instituto Tecnológico de Celaya. Celaya Guanajuato.
8. Sánchez-Valdés, D.G. 2014. Estudio Preliminar Sobre la Biodegradación de Cristal Violeta por una Cepa de *Citrobacter freundii*. Tesis Nivel Licenciatura. Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, México. 54 p.

9. Dundass N., N. K. Leos, M. Mitui, P. Revell y B. B. Rogers. 2008. Comparison of automated nucleic acid extraction methods with manual extraction. *Journal of Molecular Diagnostics* 10: 311-316.
10. Espinosa Asuar Laura. 2007. Capítulo 17 Guía práctica sobre la técnica de PCR. Pag517-540. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología Universidad Nacional Autónoma de México Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. ISBN 978-968-817-839-3

ELABORACIÓN DE UN LICOR BAJO EN CALORÍAS A PARTIR DE UN EDULCORANTE NATURAL

Viena Maria Cuevas Mancilla¹, Minerva Rosas Morales², Ada Maria Ríos Cortés², Mariana Miranda Arambula², Fernando López Valdez³ y Gabriel Ríos Cortés⁴

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla¹. Instituto Tecnológico de Orizaba². Universidad Interserrana del estado de Puebla Ahuacatlán³. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional⁴.

RESUMEN

Los licores han sido elaborados desde tiempos atrás ya que para su elaboración pueden realizar por maceración o por diferentes frutas y semillas. Debido a este tipos de licores que contienen calorías se ha optado por la elaboración de un licor bajo en calorías aplicando stevia. Debido a la gran cantidad de personas con sobrepeso y al no existir en el mercado este tipo de bebidas bajas en calorías se realizara un licor que en el cual se le pueda añadir un edulcorante natural bajo en calorías para que pueda ser consumible por todo el público en general y que tenga una menor costo a comparación de los que están hechos con azúcar, y que estos contienen una mayor cantidad de calorías a comparación de la propuesta a realizar y que pueda tener una mejor demanda y poder introducirlo al mercado, ya sea nacional e internacional y que se dé a conocer por sus características sensoriales y que sea un producto de calidad.

1. INTRODUCCIÓN

Los productos dulces han sido consumidos por el hombre desde la antigüedad, siendo el azúcar el mayormente consumido a nivel mundial. No obstante; debido al abuso de este se han provocado diversos padecimientos como el síndrome metabólico, diabetes tipo 2, obesidad, etc. Por todo esto se han optado por nuevos edulcorantes, uno de ellos es la Stevia. Esta planta originaria de Paraguay es 300 veces más dulce que el azúcar y debido a sus características moleculares no se asimila en el organismo. Su introducción a México y otros países es reciente por lo que no se han desarrollado productos como edulcorante principal, si no por lo regular se ha combinado con edulcorantes calóricos o no calóricos lo que hace menguar sus propiedades. Otro de los inconvenientes y su difícil aceptación en el mercado ha sido el sabor amargo que deja en el paladar esto debido a la alta concentración de ciertos glucósidos diterpénicos que en los procesos de extracción se mantienen. Debido a esto, en el presente trabajo se desarrolló un jarabe a base de Stevia con el que se logró erradicar el sabor amargo y se mantuvo el poder edulcorante característico. Con este se formuló un licor con la intención de generar una nueva bebida con bajo índice calórico que pueda comercializarse en el mercado regional de Zacatlán, Puebla, una de las ciudades reconocidas a nivel nacional por su elaboración de vinos y licores.

2. PARTE EXPERIEMETAL

Selección y acondicionamiento de la materia prima

El material obtenido fueron hojas variedad morita II, la cuales se secaron por exposición al sol dentro de un domo de plástico. Se seleccionaron hojas sanas, verdes, libres de manchas. Una vez

seleccionadas, se pulverizaron en un mortero, el polvo se tamizó y almacenó a temperatura ambiente en bolsas de sellado hermético.

Proceso de extracción de edulcorante a base de stevia

Se colocó en un recipiente de acero inoxidable 100 g de hojas secas de *Stevia rebaudiana bertonii* molida y tamizada de 1mm de tamaño de partícula aproximadamente, 5 gr de Carbonato de Calcio y 700 ml de agua potable cuya densidad a 25°C es de 1.0 g/cm³ por esa razón se utiliza la masa del agua de 700g a 25°C, se procedió a mezclar y se dejó reposar durante 24 horas y se sometió a calentamiento la mezcla a una temperatura de 70°C durante media hora. Se dejó enfriar y se colocó la mezcla en un tamiz (colador) para la primera clarificación, la fase líquida es pasada por un filtro. Se agregan 10g Hidróxido de consiguiendo un precipitado en donde se encuentran los compuestos orgánicos, bases orgánicas, sales inorgánicas, fenol, sustancias derivadas de la fotosíntesis, proteínas, aminoácidos, entre otros. Se adicionó ácido cítrico en pequeñas cantidades para conseguir un pH aproximado en un rango de 7.0, posteriormente se dejó por 48 horas la fase líquida para sedimentar los compuestos orgánicos, la fase sólida obtenida en la filtración se puede llevar al horno y se deja secar para ser utilizada como abono orgánico.

La fase concentrada se llevó a la centrífuga por 20 minutos a una velocidad de 4,500 RPM para aumentar el rendimiento del extracto, pasados los 20 minutos se recogieron los livianos se mezcla con la primera fase liviana y se toma una muestra para llevarla al refractómetro para medir los grados °Brix que debe de encontrarse un extracto entre 6-8 °Brix, en seguida se midió el pH que debe encontrarse entre los 6.5-7.5. La densidad, y aspectos organolépticos como el olor, sabor, color. Al culminar la preparación del jarabe se midieron los °Brix y se encontraban en los 7.6.

PROCESO DE ELABORACIÓN DE LICOR

La preparación del licor se realizó de acuerdo a la formulación empleada para obtener el licor tradicional. En una parrilla de agitación se colocó un vaso de precipitados añadiendo 100 ml de agua purificada, en la cual se pesó 0.3 gr de C.M.C, haciendo una mezcla para poder eliminar los grumos, al observarse que ya no existían los grumos se añadieron 12 ml del jarabe obtenido a base de Stevia con agitación para tener un mejor mezclado y poder tener un mejor dulzor, después se prosiguió con el saborizante que ya contenía el color y aroma, se añadió el alcohol al 18% de acuerdo a la norma, de ahí se envaso y se midió la vida de anaquel del producto, ya que esta fórmula fue la que mejor características tenía. Ya en este proceso de elaboración se realizó lo mismo para los diferentes sabores que fueron elaborados con las mismas concentraciones tanto de espesantes, colorantes, cantidad de edulcorante, y alcohol. Para la preparación del licor se utilizó la fórmula anterior solo que para esta se realizó con azúcar no con el edulcorante natural para esto se utilizó un recipiente con 150 ml de agua y se le agregó 0.3 gr de C.M.C. con una agitación constante para poder disolver todos los grumos que se hacen a la hora de añadirla con el agua después se le agregaron 12 gr de azúcar así mismo con agitación y de ahí se le agregó el saborizante que ya contiene color y olor, se prosigue con la mezcla ya obteniendo la mezcla se le añade el alcohol al 18% de acuerdo a la norma de ahí se envaso en botellas de vidrio y observar su vida de anaquel.

EVALUACIÓN SENSORIAL DE LOS LICORES.

Pruebas discriminativas

Con el fin de dar una mejor caracterización más completa se evaluaron sensorialmente.

Las pruebas se realizaron a una población de 20 personas de diferentes tipos de sexo y de edad diferente (18-49 años) empleando un formato por cada prueba que se realizó, a cada persona se le hizo una prueba de los tres diferentes licores obtenidos y se llenó un formato por cada prueba.

Esto con el fin de obtener información sobre el color, olor, sabor, textura y contenido de alcohol y así poder determinar la formulación más acertada en un siguiente planteamiento.

Para cada característica que se va a evaluar se determinó cada del producto:

Olor: característico y que no haya una mezcla de olores desagradables.

Color: el color debe ser característico del producto ya se de los diferentes licores que se da a cada persona para su evaluación.

Sabor: debe ser característico de cada fruta o saborizante utilizado.

Viscosidad: observar si tiene cuerpo característico del producto.

Contenido de alcohol: se midió si su grado de alcohol es aceptable para el consumidor.

De acuerdo a estos puntos a evaluar se realizara un análisis para determinar si nuestro producto es aceptable o no por los consumidores.

3. RESULTADOS

Selección y acondicionamiento de la materia prima

El método de secado a sol empleado en este trabajo para las hojas de *S. rebaudiana* mediante el uso de un domo tuvo un buen desempeño ya que se alcanzó una deshidratación del 97% y tuvo un tiempo de secado de 2 días preservando el sabor característico de *Stevia*.

Proceso de extracción de edulcorante a base de *stevia*

Se logró obtener el extracto con las características deseadas los aditivos empleados para la extracción tuvieron un gran aporte porque ayudaron en la eliminación del de sabor amargo, aportando a ello la determinación de solubilidad del líquido en agua manteniendo sus características organolépticas de iniciación y permanecer con los grados ° Brix iniciales.

Mediante la metodología empleada por Méndez F & Sarabia R. en la cual ellas describen la mejora para la obtención de jarabe a partir de *Stevia rebaudiana* B. se afirma la eficiencia del proceso para la extracción.

Proceso de elaboración de licor

En la elaboración se observó que el jarabe no pierde sus características en cuanto al dulzor y se puede realizar la mezcla con varios saborizantes y colorantes para hacer distintas muestras de diferentes sabores.

Evaluación sensorial de los licores.

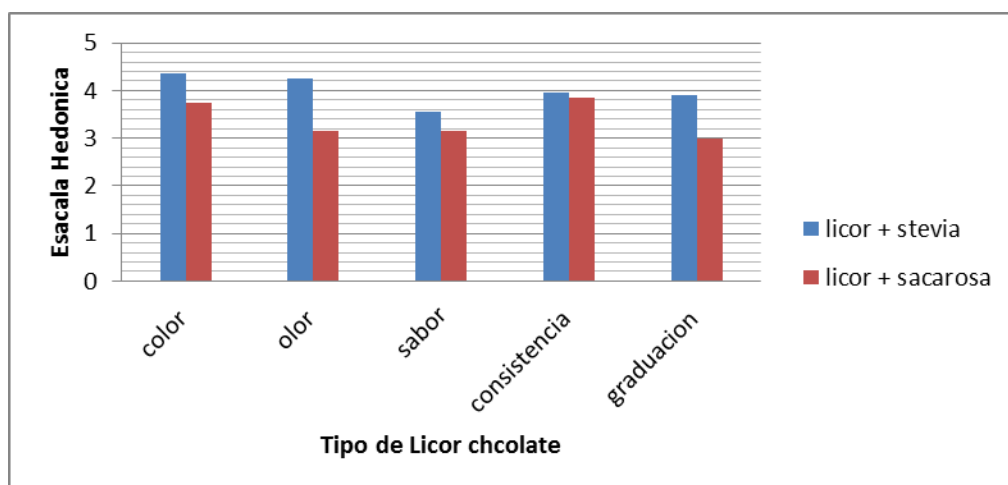
Para el proceso de la molienda, de la planta se obtuvo principalmente las hojas para poder realizarla primero se obtuvo un buen secado y de ahí comenzar con el proceso de pulverización que se tiene del tamaño de una articula para así utilizarlo para la elaboración de jarabe pasándolo por un tamiz un polvo muy fino y así poder hacerle la aplicación.

Mediante la metodología empleada por Méndez F & Sarabia R. en la cual ellas describen la mejora para la obtención de jarabe a partir de *Stevia rebaudiana* B. se afirma la eficiencia del proceso para la extracción, los aditivos empleados para la extracción tuvieron un gran aporte porque ayudaron en la eliminación del de sabor amargo, aportando a ello la determinación de solubilidad del líquido en agua manteniendo sus características organolépticas de iniciación y permanecer con los grados

° Brix iniciales. La elaboración del licor cuando me comenzó a realizar la mezcla se observó que el jarabe no pierde sus características en cuanto al dulzor y se puede realizar la mezcla con varios saborizantes y colorantes para hacer distintas muestras de diferentes sabores.

De las formulaciones empleadas se realizó una prueba hedónica; para el licor de chocolate, café y uva en donde las características importantes como color, olor, sabor, textura y contenido de alcohol fueron las principales evaluadas hacia el producto final.

Los resultados obtenidos indican que el licor con mejores características sensoriales fue el de chocolate el cual resultó más aceptable a diferencia a de los licores de café y de uva como se puede apreciar en la figura 1.



En la tabla Anova descompone la varianza de los datos en dos componentes: en un componente de cada grupo. El color es la que indica su aceptabilidad o su rechazo por el consumidor, para estos casos el color juega un papel muy importante para que haya variantes y se tenga una significancia mínima.

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	8	4	2	3.95833333	0.0051443	2.46749362
Dentro de los grupos	48	95	0.50526316			
Total	56	99				

De acuerdo a la hipótesis aceptada

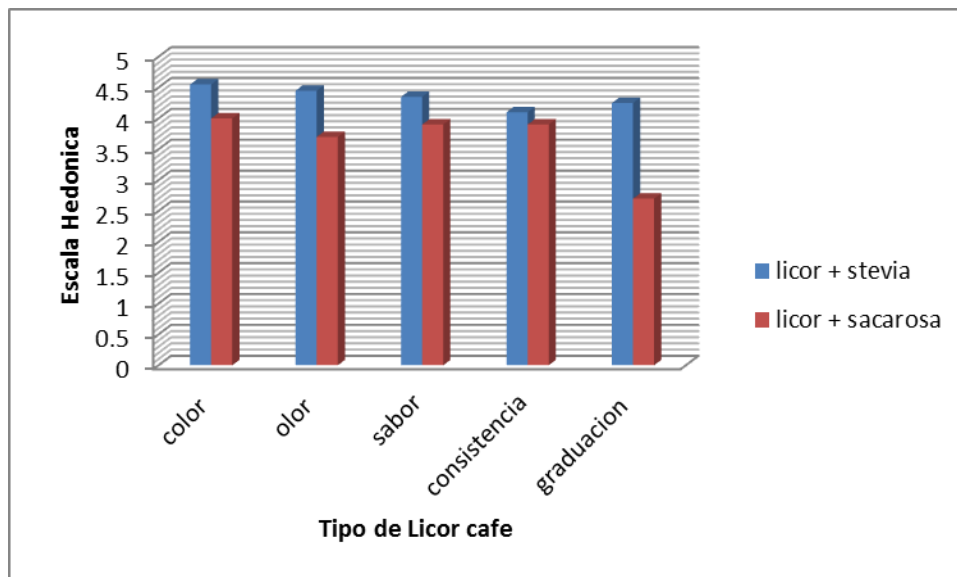
Hc: El licor de chocolate tiene una mejor aceptabilidad por el consumidor

Ho: El licor de chocolate no tiene una mejor aceptabilidad por el consumidor

El licor de chocolate endulzado con *Stevia* tiene una mayor aceptación el que esta endulzado con sacarosa.

De acuerdo a la gráfica y el anova realizado la hipótesis es alternativa ya que el consumidor prefiere el licor endulzado con *Stevia* que el que es endulzado con sacarosa como se muestra en la gráfica de la figura 1 y ANOVA de figura 2.

De los resultados que se evaluaron en café uno como el que mejor fue aceptado por sus características como: color, olor, sabor, contenido de alcohol. Ya que la textura no tiene valores muy bajos de acuerdo con los demás y estas fueron evaluadas por el catador dichos resultados se muestran en la siguiente gráfica.



Efecto del tipo de endulzante sobre la aceptabilidad de un licor de café.

En la tabla Anova se descomponen la varianza en dos componentes y estos uno de cada grupo. En este se puede observar que el color tiene una mayor aceptabilidad que los demás o su rechazo para estos casos el café juega con un papel muy importante para que haya una menor significancia entre ellos.

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2.44	4	0.61	1.525	0.20111771	2.46749362
Dentro de los grupos	38	95	0.4			
Total	40.44	99				

Hipótesis aceptada

Hc: El licor de café tiene una mayor aceptabilidad con el consumidor.

Ho: El licor de café no tiene una aceptabilidad por el consumidor.

El licor de café endulzado con *Stevia* tiene mayor aceptabilidad por el consumidor con respecto al que esta endulzado con sacarosa.

De acuerdo a la gráfica y el anova realizado dice que el licor aceptado es el que esta endulzado con *Stevia* analizando la F calculada con respecto a la F de tablas.

De los resultados que se obtuvieron la uva dos fue la que mejor tiene características a comparación de la uva uno ya que o tiene las mismas características que fueron evaluadas por el catador ya que fueron evaluados por su color olor, sabor, textura. Dichos resultados se muestran en las grafica siguiente.

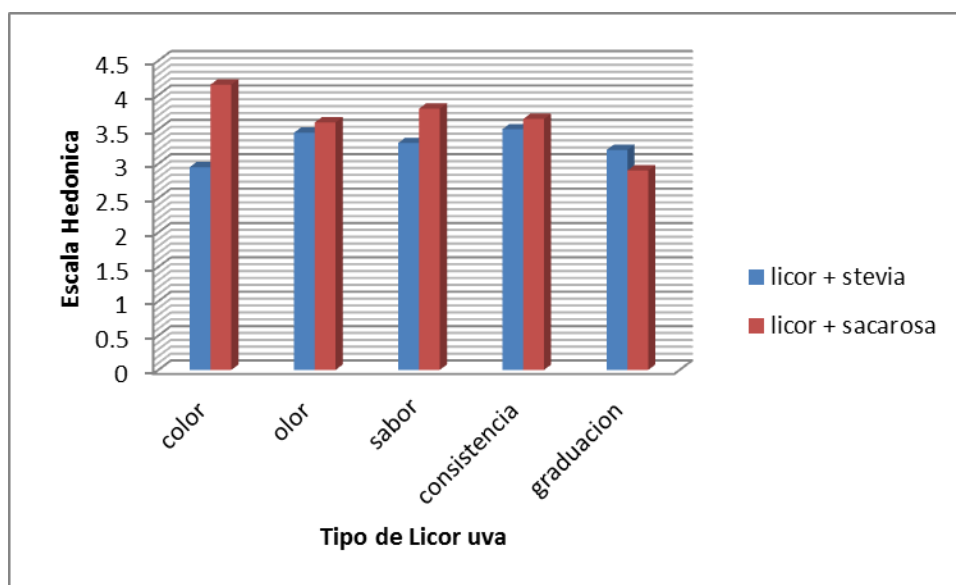


Figura comparación de los dos licores de acuerdo a su prueba hedónica

En la tabla Anova se descompone la varianza en dos componentes y estos uno en cada grupo. En este caso se puede observar que el color tiene una mayor aceptabilidad que los demás, en este caso la uva dos juega un papel muy importante para que haya una menor significancia.

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	16.66	4	4.165	3.44364665	0.01129414	2.46749362
Dentro de los grupos	114.9	95	1.20947368			
Total	131.56	99				

Hipótesis aceptada

Hc: El licor de café endulzado con sacarosa tiene una mejor aceptación.

Ho: El licor de café endulzado con sacarosa no tiene una aceptación.

El licor de café endulzado con sacarosa tiene una mejor aceptación con respecto al que esta endulzado con *Stevia*

De acuerdo a los resultados obtenidos se dice que tiene mayor aceptabilidad el chocolate uno y café uno por sus mejores características de acuerdo a la prueba hedónica realizada ya que fue una formula con mayor aceptación por sus características, para la pruebas realizadas ya que catadores no profesionales aceptaron por sus características organolépticas, y el licor de chocolate se obtuvieron resultados similares a los del café su aceptabilidad fue la formulación número uno a comparación de los dos que se realizaron y el licor de uva tiene una mejor aceptabilidad el dos ya que este no fue aceptado por el color principalmente.

AGRADECEMOS AL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

BIBLIOGRAFÍA

1. Macek, M. 2010. La destilación.
2. Blanco, I. Estudio del tratamiento térmico de las virutas de robles en la elaboración de extractos para la producción de rones. Tesis en opción al grado académico de Master en Ingeniería Alimentaria. La Habana: CUJAE, 2004.
3. Aleixandre, J. Licores. En: Vinos y bebidas alcohólicas. Dpto. de tecnología de alimento. Univ. Politécnica de Valencia, España. Servicios de publicaciones, 1999.
4. Pérez, J.; Delgado, R. Bebidas alcohólicas destiladas y añejadas. [CD-ROM] LaHabana: Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia. 2007.
5. Iglesias, P. 2006. Historia del aguardiente.

6. Álvarez-García, R., J. Torres-Valencia, L. Román, J. Hernández, C. Cerda-García-Rojas y P. Joseph-Nathan. 2005. Absolute configuration of the α -methylbutyryl residue in longipinene derivatives from *Stevia pilosa*. *Phytochem.* 66, 639-642.
7. Badui D. S (1997). *Química de los alimentos*. Tercera edición, quinta reimpresión. Logman de México Editores, S.A de C.V Alhambra Mexicana México, D.F. págs. 45-117
8. Gabriela Noriega, licenciada en nutrición y ciencias de los alimentos, certificada por el Colegio Mexicano de Nutriólogos • Nutrióloga Georgina del Ángel Cabrera, presidenta de la Sociedad de Nutriología, A. C. • Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-1994, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus en la atención primaria para quedar como Norma Oficial Mexicana NOM-015- SSA2-1994, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes • Diario Oficial de la Federación del 15 de diciembre de 1999 • www.clia.org.mx
9. Cáceda, Q. C. y Rodríguez, E. Y. 2003. Producción de licor a partir de sacarosa suplementado con cascara de naranja (*Citrus aurantium*) Maca (*Lepidium mellen Walp.*) mediante el proceso fermentativo utilizando *Saccaromyces cerevisiae* L. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, Perú. 22 p.
10. López, S. 2004. Curso de cocina y alimentación. Bebidas. Licores y cocteles. <http://www.mailxmail.com/curso-licores-cocteles/historia-licores> (Fecha de consulta marzo de 2010).
11. Vargas, C. A. 2001. Elaboración de licor del fruto de pitayo (*Stenocereus queretaroensis*) y su análisis sensorial descriptivo. Tesis licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. México. 62 p
12. Hearn, L.K. y P.P. Subedi. 2008. Determining levels of steviol glycosides in the leaves of *Stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy. *J. Food Comp. Anal.* 22(2), 165-168.
13. Álvarez-García, R., J. Torres-Valencia, L. Román, J. Hernández, C. Cerda-García-Rojas y P. Joseph-Nathan. 2005. Absolute configuration of the α -methylbutyryl residue in longipinene derivatives from *Stevia pilosa*. *Phytochem.* 66, 639-642.
14. Hsieh, M., P. Chan, Y. Sue, J. Liu, T. Liang, T. Huang, B. Tomlinson, M. Chow, P. Kao e Y. Chen. 2003. Efficacy and tolerability of oral stevioside in patients with mild essential hypertension: a two-year, randomized, placebo-controlled study. *Clinical Therapeutics* 25(11), 2797-2808.
15. Geuns, J.M. 2003. Stevioside. *Phytochem.* 64, 913-921
16. Liu, J., L. Jin-wei y T. Jian. 2010. Ultrasonically assisted extraction of total carbohydrates from *Stevia rebaudiana* Bertoni and identification of extracts. *Food Bioprod. Process.* 88(2-3), 215-221.
17. Tadhani, M., V. Patel y S. Rema. 2007. In vitro antioxidant activity- In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *J. Food Compos. Anal.* 20, 323-329.
18. I. Kimura 2009. Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. Pag.41-54.
19. López, S. 2004. Curso de cocina y alimentación. Bebidas. Licores y cocteles. <http://www.mailxmail.com/curso-licores-cocteles/historia-licores> (Fecha de consulta marzo de 2010).
20. Vargas, C. A. 2001. Elaboración de licor del fruto de pitayo (*Stenocereus queretaroensis*) y su análisis sensorial descriptivo. Tesis licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial.

PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS AGREGADOS RETICULADOS DE LA LIPASA TERMOALCALÓFILA RECOMBINANTE DE *Geobacillus thermoleovorans* CCR11

G.L. Badillo Zeferino¹, T.A. Semeria Maitret², R.M. Oliart Ros¹, A. Ramírez Higuera¹, J.G. Domínguez Chávez², M.G. Sánchez Otero²

¹Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos, Instituto Tecnológico de Veracruz. ²Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana

RESUMEN

La lipasa termoalcalófila recombinante LipMatCCR11 fue inmovilizada por medio de la formación de agregados reticulados (CLEA's). Las mejores condiciones para la producción de los LipMatCCR11-CLEA's fueron las siguientes: 40 % p/v de sulfato de amonio, 40 mM de agente reticulador, pH 9, temperatura de reacción 20°C y tiempo de reacción 7.5 h. Los agregados reticulados presentaron una mayor termoestabilidad y mejor estabilidad durante el almacenamiento comparados con la enzima soluble, además de presentar una buena reusabilidad al conservar el 40% de su actividad inicial después de 9 ciclos de reúso.

1. INTRODUCCIÓN

Las lipasas, son enzimas que catalizan reacciones que poseen importantes aplicaciones industriales, su gran versatilidad y en ocasiones alta especificidad, han hecho que estas biomoléculas posean en la actualidad un alto interés investigativo (1). Sin embargo, el costo actual de las enzimas hace inviable económicamente un proceso de catálisis homogénea, debido a que el catalizador no es fácilmente recuperable. Por tal razón, la inmovilización de enzimas es un factor clave en la expansión de las aplicaciones de estos catalizadores naturales; gracias a ella es posible lograr tanto una fácil separación y purificación de los productos de una reacción así como también la recuperación y reúso de los catalizadores en ella empleados (2).

Tradicionalmente los métodos de inmovilización más usados consisten en la unión de la enzima de interés a un material sólido que le sirve de soporte, lo cual a pesar de proveerle resistencia mecánica conlleva una dilución de la actividad enzimática (3); en este sentido la producción de agregados enzimáticos reticulados, mejor conocidos como CLEA's (Cross-linked Enzyme Aggregates) ha demostrado ser una técnica de inmovilización que permite obtener biocatalizadores sólidos con una alta carga enzimática (4).

Este método de inmovilización consiste en la reticulación covalente de una enzima precipitada. En la primera etapa del proceso las proteínas son precipitadas por medio de agentes tales como sales inorgánicas, polímeros y solventes orgánicos. Posterior a ello y a modo de fijar esta configuración de manera permanente se forman las uniones intermoleculares por medio del uso de reactivos bifuncionales (5). Por tanto, la misma enzima es el soporte de inmovilización. Una ventaja adicional del paso inicial de precipitación consiste en que al ser esta una forma de purificación permite inmovilizar la proteína de interés directamente de lisados celulares o caldos de fermentación (6).

Para la síntesis de CLEA's se prefiere el uso de las sales inorgánicas y polímeros como agentes precipitantes, debido a que estos promueven la formación de agregados donde la estructura tridimensional de las proteínas no se ve afectada (5). Como reactivos bifuncionales se pueden

emplear dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos y diaminas. A pesar de ello, el agente reticulante más empleado es el glutaraldehído. Este reactivo reacciona con las lisinas situadas en la superficie de la enzima dando lugar a una primera base Schiff, el grupo aldehído libre puede establecer otro enlace covalente con otra molécula de enzima (Figura 2). El resultado del reticulado es un entramado de enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura (7).

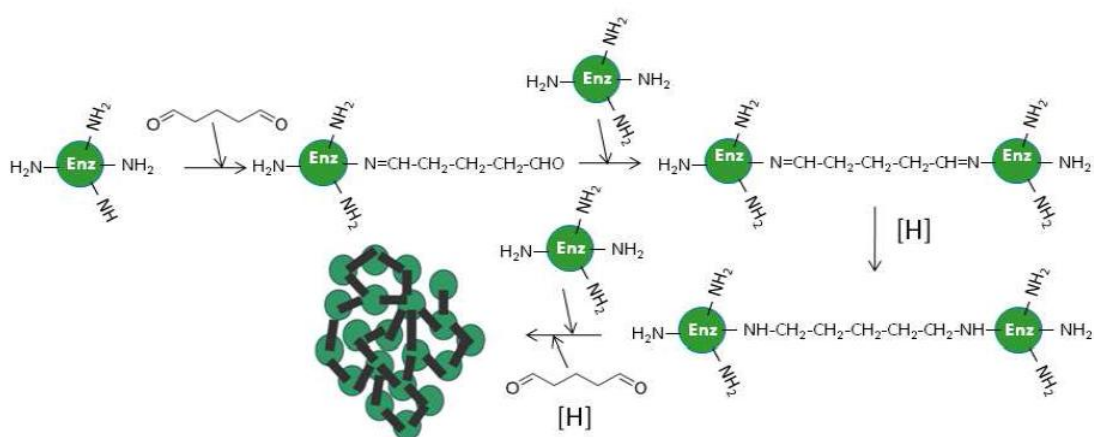


Figura 2. Reticulado de enzimas con glutaraldehído (8)

Sin embargo, aunque las bases teóricas detrás de la síntesis de los CLEA's carecen de complejidad aparente, a la fecha este proceso y la naturaleza de las interacciones entre las variables involucradas en su desarrollo no han sido elucidadas por completo (9). La elección del tipo de agente precipitante y el agente reticulador para la síntesis de estos agregados es de vital importancia, otros factores relativos a las condiciones de reacción (tiempo de precipitación, pH, temperatura, agitación, tiempo de reacción, fuente proteica, uso de aditivos) también pueden ser modificados para obtener un producto con las características deseadas (5) por ello el estudio de las condiciones de reticulación resulta un proceso obligatorio para cada enzima que se desee someter a este proceso.

Geobacillus thermoleovorans CCR11, es un bacteria termófila que fue aislada en la fuente hidrotermal de "El Carrizal" en el estado de Veracruz, este microorganismo produce una lipasa termoalcalófila extracelular y tolerante a solventes polares (10). El gen de esta lipasa fue recuperado por PCR y clonado en *Escherichia coli* BL21 lo cual produjo una lipasa recombinante de un peso molecular de 43kDa (LipMatCCR11) (11); esta lipasa ha probado ser un nuevo y prometedor biocatalizador (1) y debido a ello su producción en el microorganismo recombinante fue optimizada por medio del uso de una metodología de superficie de respuesta (12). El objetivo del presente trabajo fue establecer las mejores condiciones para la producción de los agregados reticulados de LipMatCCR11 usando sulfato de amonio como agente precipitante y glutaraldehído como agente reticulador y posterior caracterizar los productos de inmovilización obtenidos.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Los reactivos, disolventes y medios de cultivo fueron de grado reactivo, empleados sin ninguna purificación adicional. Para la producción de la lipasa se utilizó la cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformada con el plásmido *pET-3b-LipMatCCR11*.

Producción y recuperación de la lipasa LipMatCCR11

A medio LB fresco se le agregó ampicilina (100 µg/ml) y posterior a ello fue inoculado al 2.5 % (v/v) con un cultivo iniciador de 12 horas de la cepa recombinante *E. coli pET-3b-LipMatCCR11*; se cultivó en agitación (120 rpm) a 37 °C hasta que se alcanzó la fase exponencial ($D.O_{600} = 0.6$). Posterior a ello se indujo la expresión de la lipasa LipMatCCR11 con IPTG (isopropil-β-D tiogalactopiranosido) en una concentración final de 0.6 mM. El proceso de inducción fue de 18 horas a 16 °C con una agitación de 200 rpm (12). Al final de la etapa de inducción, las células se colectaron por centrifugación (13000xg, 15 min, 4 °C) y se lisaron por medio de sonicación (60 Hz, 15 s); el lisado obtenido se centrifugó (14000xg, 15min, 4°C).

Determinación de actividad enzimática y concentración de proteína

La actividad hidrolítica de la enzima soluble y los inmovilizados fue determinada por medio de un método espectrofotométrico usando como sustrato *p*-nitrofenil laurato (*p*-NPL) (13). El contenido de proteína se evaluó usando albumina sérica bovina como estándar (14).

Síntesis de los LipMatCCR11-CLEA's

El lisado de *E. coli pET-3b-LipMatCCR11* se diluyó con buffer al pH deseado para ajustar la concentración deseada de proteína, a esta solución se le añadió la cantidad necesaria de Tritón-X100 para asegurar una concentración final del 0.15 % en la mezcla de reacción; de igual forma, se agregó la cantidad de sulfato de amonio necesaria para alcanzar el porcentaje de saturación final deseado. Inmediatamente después, el proceso de reticulación se inició con la adición de un volumen determinado de una solución acuosa de glutaraldehído al 25 %. La reacción se dejó continuar en condiciones isotérmicas y una vez transcurrido el tiempo de reacción ésta se detuvo por medio de la adición de un volumen de amortiguador tal que la concentración de saturación de sulfato de amonio no fuera superior al 15 % en la mezcla de reacción. Los LipMatCCR11-CLEA's fueron lavados 3 veces, recuperados por centrifugación y secados al vacío. Previo a su uso los LipMatCCR11-CLEA's fueron almacenados a una temperatura de -4 °C.

Determinación de las condiciones de inmovilización

Para estudiar la producción de los LipMatCCR11-CLEA's se seleccionaron seis variables para ser evaluadas cada una en 5 niveles (Tabla 1).

Tabla 1. Factores estudiados en la producción de LipMatCCR11-CLEA's

Factor	Min	Max
Proteína (mg/mL)	1	10
(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	20	60
pH	6.5	9
Glutaraldehído (mM)	40	300
Temperatura °C	4	25
Tiempo (horas)	2	24

Sin embargo, debido al alto número de variables y niveles y a modo de estudiar el área experimental seleccionada con un número mínimo de experimentos, las corridas experimentales fueron establecidas de acuerdo a un diseño uniforme (15). Para generar las combinaciones de los

niveles de los factores seleccionados para cada tratamiento se utilizó la tabla para un diseño de la forma $U_{10}(5^6)$ (Tabla 2).

Los parámetros de las ecuaciones de respuesta y los correspondientes análisis de varianza fueron evaluados usando software de diseño y Matlab Statistics Toolbox 7.3

Caracterización de los LipMatCCR11-CLEA's

El pH y la temperatura de actividad óptimas fueron determinados por medio de la medida de la actividad hidrolítica de la enzima soluble e inmovilizada en un rango de pH de 4-10 y en un rango de temperatura de 30-100 °C. Con respecto a la estabilidad se evaluaron termoestabilidad (después de 1 hora de incubación), estabilidad frente al reuso y estabilidad durante el almacenamiento (por un periodo de 30 días).

Estudio de la liberación de la enzima de los agregados

Las pruebas de estabilidad de los LipMatCCR11-CLEA's se llevaron a cabo de la siguiente manera: 20 miligramos de LipMatCCR11-CLEA's fueron resuspendidos en 200µL de amortiguador de carga (2 % o 10 % de SDS y 5 % de β-mercaptoetanol) esta mezcla se calentó a 95 °C por 5 minutos. Los sobrenadantes fueron analizados por electroforesis SDS-PAGE, ésta fue llevada a cabo en una celda Mini-Protean tetra (Bio-Rad). La actividad lipolítica fue determinada en los geles SDS-PAGE usando metilumbeliferil-butilato (MUF) como sustrato y observada bajo luz UV. Finalmente, para identificar las bandas que presentaron actividad lipolítica, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie para la detección de la proteína.

Tabla 2. Diseño experimental para la selección de las condiciones de producción de los LipMatCCR11-CLEA's

Tratamiento	Variables						Respuesta
	Proteína (mg/ml)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (% sat)	pH	Glutaraldehído (mM)	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	U/g
1	7.75	50	9	235	14.5	24	95
2	5.5	30	7.125	40	9.25	24	4965
3	10	50	7.75	105	4	2	2755
4	1	60	7.75	105	25	18.5	95
5	10	20	8.375	170	19.75	18.5	710
6	3.25	20	6.5	170	14.5	2	165
7	5.5	60	6.5	235	9.25	13	60
8	3.25	40	9	40	19.75	7.5	7755
9	1	30	8.375	300	4	13	75
10	7.75	40	7.125	300	25	7.5	30

Análisis microestructural

Las imágenes para el análisis de la microestructura de los LipMatCCR11-CLEA's fueron obtenidas con un microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-7600F. La preparación de la muestra consistió en el secado de los CLEA's los cuales se observaron sin el uso de ningún recubrimiento adicional.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de las condiciones de inmovilización

Después de realizar el análisis estadístico de los datos, se propusieron dos posibles modelos para explicar la interacción de los diferentes factores estudiados para la producción de los LipMatCCR11-CLEA's. Al realizar un análisis de varianza a ambos modelos, éstos demostraron una excelente reproducción del comportamiento experimental al tener coeficientes de determinación superiores a 0.95, lo que indica que no más del 5% de la varianza total de los datos no podía ser explicada por la regresión. Sin embargo, al realizar la validación experimental para ambos modelos no fue posible lograr un aumento de la variable de respuesta superior al máximo obtenido durante el desarrollo experimental del diseño. Por lo que se decidió continuar con el proceso de caracterización usando la combinación de las variables estudiadas correspondiente al tratamiento 8 (Tabla 2).

Caracterización de los LipMatCCR11-CLEA's

El efecto de la temperatura y el pH en la actividad hidrolítica de la enzima soluble y los LipMatCCR11-CLEA's se muestran en la Figura 3 (Izquierda). La temperatura de actividad óptima fue determinada en 40°C tanto para la enzima soluble como para los CLEA's. La disminución de la actividad relativa y su aumento en temperaturas superiores al óptimo para los CLEA's en comparación con su contraparte soluble es un fenómeno común a este tipo de inmovilización (6, 9) pueden ser explicados por la disminución de la flexibilidad conformacional asociada a la formación de enlaces covalentes lo cual a su vez ocasiona un aumento en los requerimientos energéticos de la enzima para alcanzar una conformación favorable para la catálisis. Los resultados de la evaluación de la termoestabilidad (derecha) indicaron que los LipMatCCR11-CLEA's fueron mucho más estables en el rango de temperatura de 30-60°C. La enzima soluble perdió más del 70 % de su actividad después de una hora de incubación a 30°C y solo conservó el 1% de su actividad a 60°C mientras que los LipMatCCR11-CLEA's conservaron más de un 30% de su actividad residual en iguales condiciones. Similares aumentos en la termoestabilidad han sido reportados para la lipasa de *Rhizopus oryzae* cuyos CLEA's conservaban el 50% de su actividad posterior a una incubación a 60°C en contraste con su forma libre que perdió por completo su actividad después de ser incubada 15 minutos a la misma temperatura (9).

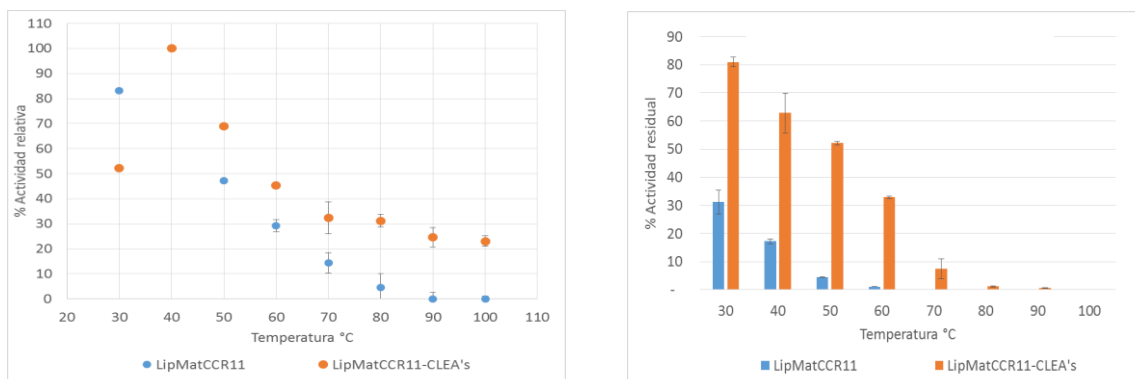


Figura 3. Perfil de actividad lipolítica de los LipMatCCR11-CLEA's y LipMatCCR11 a diferentes temperaturas (izquierda) v termoestabilidad (derecha)

El pH de actividad óptimo de los LipMatCCR11-CLEA's fue de 8 lo cual difiere del pH óptimo de actividad de la enzima soluble (Figura 4). Existen multiples ejemplos en la literatura de variaciones similares en el valor óptimo de pH entre enzimas solubles e inmovilizadas por este metodo (6,16, 17), esta variación puede ser resultado del cambio en los estados de ionización de los residuos acidos y basicos en el microambiente alrededor del sitio activo causado por nuevas interacciones formadas entre los residuos basicos de la enzima y el glutaraldehido durante la reticulación (7).

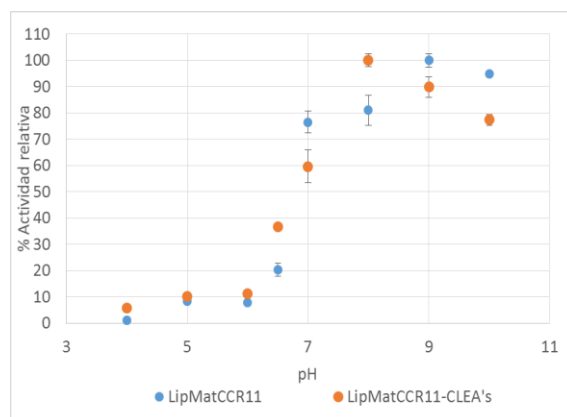


Figura 4. Perfil de actividad lipolítica de los LipMatCCR11-CLEA's y LipMatCCR11 a diferentes pH's

Para evaluar el efecto de la inmovilización en la estabilidad durante el almacenamiento, ambas lipasas soluble e inmovilizada fueron almacenadas a dos temperaturas diferentes 4 °C y 25 °C (Figura 5). Después de 30 días, enzima libre almacenada a 4 °C retuvo 35 % de su actividad mientras que la almacenada a 25 °C únicamente retuvo el 20 % de actividad residual; en cambio la enzima inmovilizada conservo el 100 % de su actividad, resultado similar al reportado por Aytar y colaboradores (6) donde de al igual que en el presente estudio, la inmovilización aumentó la vida útil de la proteína soluble independientemente de la temperatura de almacenamiento.

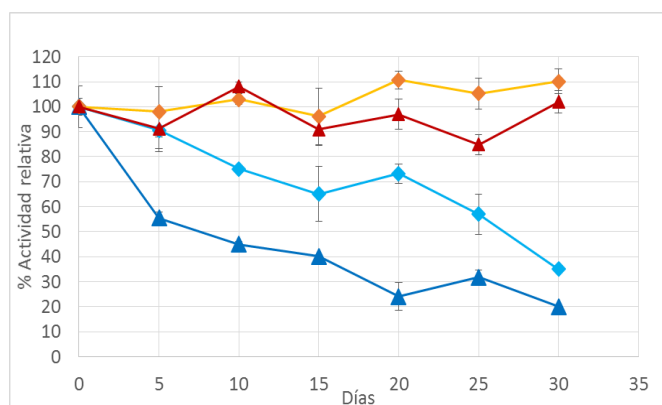


Figura 5. Estabilidad durante el almacenamiento de LipMatCCR11 a 4°C (—◆—), LipMatCCR11 a 25°C (—▲—), LipMatCCR11-CLEA's a 4°C (—◆—), y LipMatCCR11-CLEA's a 25°C (—▲—)

La estabilidad de biocatalizadores es de gran importancia para cualquier aplicación industrial (5). Durante las pruebas de estabilidad frente al reuso los LipMatCCR11-CLEA's retuvieron mas del 40% de su actividad durante 9 ciclos. Valores de reusabilidad similares has sido reportados para CLEA's de distintas lipasas siendo 5 el número de ciclos minimos de reuso reportados para este tipo de catalizadores (9, 18).

Estudio de la liberación de la enzima de los agregados

En la Figura 6 puede apreciarse que el tratamiento termico en presencia de SDS al 10% provoco la liberacion al sobrenadante de la enzima LipMatCCR11 (Carril 4); este comportamiento puede atribuirse a una formacion ineficiente de los los enlaces covalentes entre moleculas de proteina donde en lugar de favorecerse la uniones intermoleculares, las condiciones reaccion seleccionadas resultaron más favorables para la formación de uniones intramoleculares (7); lo cual impide que la red de entrecruzamiento posea la fuerza y la estabilidad para resistir este tipo de condiciones desnaturizantes (19, 20).

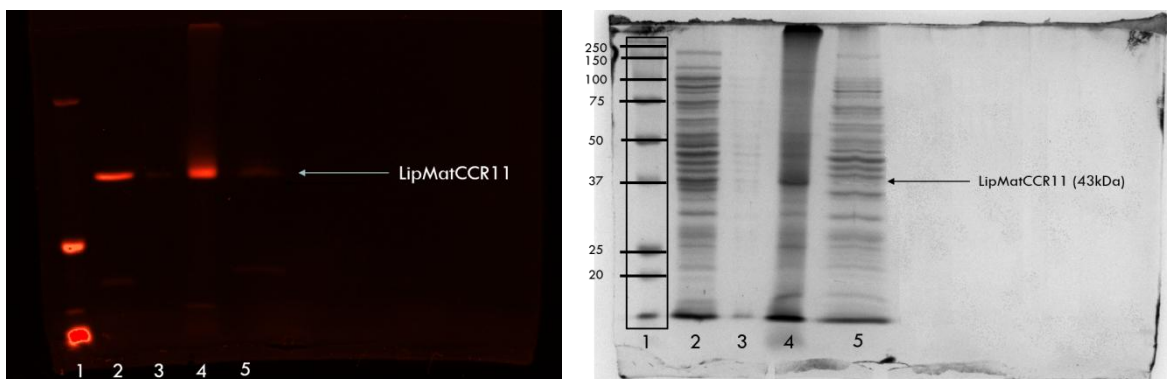


Figura 6. SDS-PAGE correspondiente al análisis de la liberación de la enzima de los CLEA's. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40% (precipitado) Carril 3: LipMatCCR11-CLEA's (SDS 3%). Carril 4: LipMatCCR11-CLEA's (SDS 10%). Carril 5: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40% (sobrenadante)

Análisis microestructural

En la Figura 7 se muestra la imagen de la LipMatCCR11 liofilizada y los LipMatCCR11-CLEA's observados por microscopia electrónica de barrido. En la imagen de la izquierda puede apreciarse que la enzima liofilizada se encuentra agrupada en grandes estructuras laminares de forma irregular, en cambio la microestructura de los CLEA's (derecha) se encuentra formada por agregados individuales de aproximadamente 0.25 μm de diámetro que se encuentran prácticamente indiferenciados unos de otros al formar clústers ramificados de tamaños que van de los 10 a los 100 μm . Donde considerando que una molécula de LipMatCCR11 tiene un volumen teórico de 52nm^3 (21) cada agregado individual puede contener hasta 7.5×10^5 moléculas de enzima.

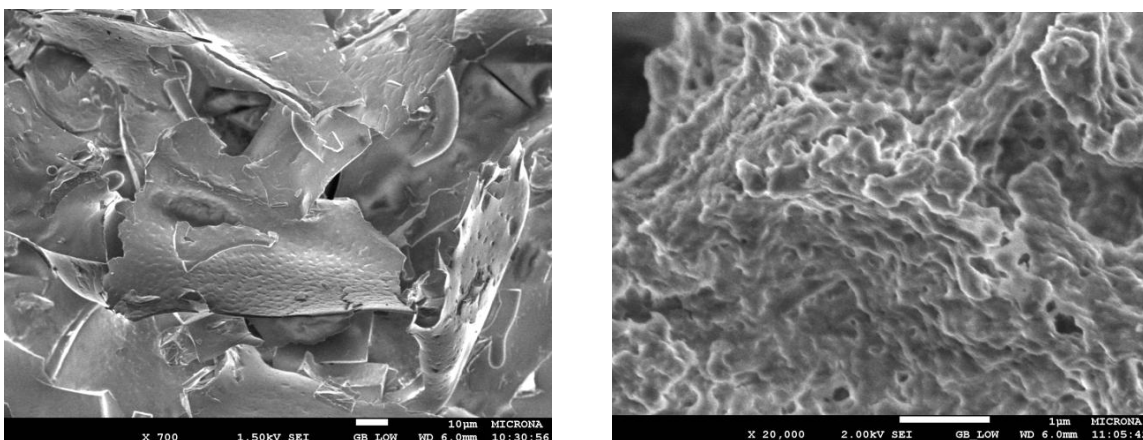


Figura 7. LipMatCCR11 liofilizada magnificación 700x (Izquierda) y LipMatCCR11-CLEA's magnificación 20,000x (Derecha)

4. CONCLUSIONES

Debido a la compleja naturaleza de las interacciones entre los factores involucrados en la síntesis de los agregados enzimáticos reticulados de LipMatCCR11, la cantidad de datos proporcionados por el diseño experimental planteado resultó insuficiente para maximizar la variable de respuesta. La implementación de una estrategia de inmovilización libre de soporte basada en uniones covalentes sobre la proteína recombinante LipMatCCR11, mejoró la estabilidad de la proteína respecto a su contraparte soluble, sin embargo como quedó evidenciado por las pruebas de desnaturalización, las condiciones de reacción seleccionadas en el presente trabajo para la síntesis de los LipMatCCR11-CLEA's resultaron no ser las adecuadas para promover la formación de uniones intermoleculares, las cuales son necesarias para generar un producto final de gran estabilidad. Es por ello que futuros estudios que relacionen la capacidad catalítica y la estabilidad de los productos de inmovilización con los cambios estructurales que ocurren a la proteína durante este proceso, son necesarios para elucidar una aproximación racional que además de mejorar la estabilidad de la enzima se generen inmovilizados robustos y de gran capacidad catalítica.

BIBLIOGRAFÍA

1. M. G. Sánchez-Otero, *et al.*, "Enzymatic reactions and synthesis of n-butyl caproate: esterification, transesterification and aminolysis using a recombinant lipase from *Geobacillus thermoleovorans* CCR11." *Environmental technology* Vol. 31, 10, 2010, pp. 1101-1106.
2. C. Mateo, *et al.*, "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques." *Enzyme and microbial technology*, Vol. 40, 6, 2007, pp. 1451-1463.
3. L. Cao, L. Van Langen, and R. A. Sheldon. "Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free?." *Current opinion in Biotechnology* Vol. 14, 4, 2003, pp. 387-394.
4. R. Schoevaart, *et al.*, "Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs)." *Biotechnology and Bioengineering* Vol. 87, 6, 2004, pp. 754-762.
5. S. Talekar, *et al.*, "Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs)." *RSC Advances* Vol. 3, 31, 2013, pp. 12485-12511.
6. B.S. Aytar, and B. Ufuk, "Preparation of cross-linked tyrosinase aggregates." *Process Biochemistry* Vol. 43, 2, 2008, pp. 125-131.

7. I. Migneault, *et al.*, "Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking." *Biotechniques* Vol. 37, 5, 2004, pp. 790-806.
8. Y. Alvaro-Ureña, Nueva nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Desulfotalea psychrophila*, Tesis de Doctorado, Universidad Complutense de Madrid - Facultad de Ciencias Biológicas, 2012.
9. F. Kartal, and A. Kilinc, "Crosslinked aggregates of *Rhizopus oryzae* lipase as industrial biocatalysts: Preparation, optimization, characterization, and application for enantioselective resolution reactions." *Biotechnology progress* Vol. 28, 4, 2012, pp. 937-945.
10. L. D. Castro-Ochoa, *et al.*, "Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11." *Enzyme and Microbial Technology* 37.6 (2005): 648-654.
11. R. Quintana-Castro, *et al.*, "Gene cloning, expression, and characterization of the *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 thermoalkaliphilic lipase." *Molecular biotechnology* Vol. 42, 1, 2009, pp. 75-83.
12. G. L. Badillo-Zeferino, *et al.*, "Improved expression and immobilization of *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 thermostable recombinant lipase." *Biotechnology and applied biochemistry*, 2015.
13. N. Nawani, R. Rajvinder and J. Kaur, "Immobilization and stability studies of a lipase from thermophilic *Bacillus* sp: The effect of process parameters on immobilization of enzyme." *Electronic Journal of Biotechnology* Vol. 9, 5, 2006, pp. 0-0.
14. M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical biochemistry* Vol. 72, 1-2, 1976, pp. 248-254.
15. K. Fang, *et al.* "Uniform design: theory and application." *Technometrics*, Vol. 42, 3, 2000, pp. 237-248.
16. D. Hormigo, *et al.*, "Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of recombinant poly-3-hydroxybutyrate depolymerase from *Streptomyces exfoliatus*." *Bioresource technology* Vol. 115, 2012, pp. 177-182.
17. S. S. Mahmod, *et al.*, "Optimizing the preparation conditions and characterization of a stable and recyclable cross-linked enzyme aggregate (CLEA)-protease." *Bioresources and Bioprocessing* Vol. 3, 1, 2016, pp. 1-11.
18. P. Gupta, *et al.*, "Characterization of cross-linked immobilized lipase from thermophilic mould *Thermomyces lanuginosa* using glutaraldehyde." *Bioresource Technology* Vol. 100, 18, 2009, pp. 4074-4076.
19. J. Cruz, *et al.*, "Optimized preparation of CALB-CLEAs by response surface methodology: the necessity to employ a feeder to have an effective crosslinking." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol.80, 2012, pp. 7-14.
20. F. López-Gallego, *et al.* "Co-aggregation of enzymes and polyethyleneimine: a simple method to prepare stable and immobilized derivatives of glutaryl acylase." *Biomacromolecules* Vol. 6, 4, 2005, pp. 1839-1842.
21. H.P. Erickson. "Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy." *Biological procedures online* Vol. 11, 1, 2009, pp. 32.

FLAVONOIDES EN HOJAS DE 11 ECOTIPOS DE *Ricinus communis* (HIGUERILLA) PROVENIENTES DE LOS MUNICIPIOS DE SILAO DE LA VICTORIA Y ROMITA DE LICEAGA, GTO.

María C. García Caudillo¹, Jesús G. Rostro Rojas¹, Juan C. Baltazar Vera¹, Dellanira Méndez Valencia¹, María Maldonado Santoyo², Gladys Morales López¹.

¹Universidad Politécnica del Bicentenario, Silao, Gto. ²Centro de Investigación Aplicada en Tecnologías Competitivas A.C., León, Gto.

RESUMEN

Entre los productos naturales, los flavonoides son altamente estudiados debido a que tienen actividad farmacológica, por lo que pudieran ser usados para tratar el cáncer, el estrés oxidante, bacterias patógenas, inflamaciones y disfunciones cardiovasculares [1]. El objetivo de este trabajo fue identificar cualitativamente flavonoides en hojas de 11 ecotipos de *Ricinus communis* (Higuerrilla) previamente identificados. El muestreo de hojas de *R. communis* se llevó a cabo en los municipios de Silao y Romita, Gto., considerando los lugares de mayor densidad de plantas de higuerrilla así como que las hojas estuvieran sanas. Las hojas se secaron a temperatura ambiente durante una semana, se molieron en mortero y se pusieron a macerar con 2mL de etanol absoluto. La identificación cualitativa de los flavonoides se realizó mediante reacciones específicas de Wilstatter. Los resultados mostraron reacciones positivas para flavonas (dos muestras), flavanonas (tres muestras), agliconas (tres muestras) y flavonoles (siete muestras), por los resultados promisorios obtenidos concluimos que *R. communis* puede ser una potencial fuente de flavonoides.

1. INTRODUCCIÓN

El término flavonoides denota un grupo muy amplio de compuestos polifenólicos caracterizados por una estructura benzo-γ-pirano, los cuales están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y se encuentran de forma universal en las plantas [2].

Aunque diversos estudios indican que algunos flavonoides poseen acciones prooxidantes, éstas se producen sólo a dosis altas, constatándose en la mayor parte de las investigaciones la existencia de efectos antiinflamatorios, antivirales o antialérgicos, y su papel protector frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y diversas patologías. Los flavonoides se encuentran en frutas, verduras, semillas y flores, así como en cerveza, vino, té verde, té negro y soja, los cuales son consumidos en la dieta humana en forma habitual. También pueden incorporarse en forma de suplementos nutricionales, junto con ciertas vitaminas y minerales [3]. Los flavonoides en las plantas están presentes tanto en estado libre como formando glucósidos, estos últimos son los que contribuyen a darle color a las flores, frutos y hojas.

La higuerrilla (*Ricinus communis*) es una planta común que crece en condiciones silvestres y con un alto grado de rusticidad. En México a esta especie se le localiza desde zonas costeras hasta tierra adentro de Veracruz, Colima, Michoacán, en estados del centro del país y otras regiones como Chiapas, Tabasco y Campeche. En Guanajuato se le localiza en todo el Bajío hasta los 2 300 msnm ya que, por ser susceptible a bajas temperaturas, a más altura no se desarrollan [4].

La higuera (*Ricinus communis*) es una especie con varios usos; por ejemplo, los tallos pueden ser utilizados para la fabricación de papel, aunque, las semillas son lo más importante económicamente debido a que se usan en la obtención de biodiesel [5]. Las hojas poseen diversas actividades biológicas, como hepatoprotector [6], insecticida [7], propiedades anticonceptivas [8]; y se han reportado actividades antioxidantes de los extractos de hojas y raíces [9]. Es una planta herbácea de porte arbustivo, ligeramente leñosa, con tallos y ramas huecas por dentro, con hojas de color verde claro a azul grisáceo, en ocasiones rojiza. El fruto de la planta de higuera es una cápsula trilobular que contiene una semilla por lóbulo (tricoco), de 1.5 a 2.5 cm de largo, exteriormente está recubierto por espinas o púas no punzantes, cortas y gruesas (equinado); tiene tendencia a la dehiscencia. La semilla es oval, de tamaño variable entre 5 y 20 mm según la variedad [10].

La higuera, es pues, una especie promisoría por su alta diversidad genética y diversas propiedades. Por lo que el objetivo de este trabajo fue identificar cualitativamente flavonoides en hojas de 11 ecotipos de *R. communis*.

2. PARTE EXPERIMENTAL.

Muestreo de Higuera

Los muestreos se llevaron a cabo en los municipios de Silao de la Victoria y Romita de Liceaga, Gto., zona catalogada con buen potencial para el desarrollo de la higuera (*Ricinus communis* L.) [4]. Previamente se identificaron 11 ecotipos en los municipios mencionados, las colectas se realizaron en áreas donde se encontró mayor población de higueras y solo se colectaron hojas sanas.

Identificación de Flavonoides

Las hojas se secaron a temperatura ambiente durante una semana, se molieron en mortero y se pusieron a macerar con 10mL de etanol absoluto y se decantaron. La identificación cualitativa de los flavonoides se realizó mediante análisis fitoquímico por medio de reacciones de reconocimiento de flavonoides: Prueba de la Cianidina o Shinoda, que es conocida también como reacción de Willstätter [11], a partir del siguiente procedimiento:

1. 2mL de extracto etanólico de cada muestra de hoja de higuera, se puso en un tubo de ensayo, se agregaron 0.5 mL de HCl concentrado y dos trocitos de Mg a cada tubo, se dejaron reaccionar por 10 minutos. Si se obtiene un color naranja a rojo, hay flavonas, si la coloración es de rojo a carmesí, hay flavonoles y si es de carmesí a magenta, indica la presencia de flavanonas. Si se obtienen colores verde o azul se toman solo como evidencia de reacción positiva para agliconas o glicósidos respectivamente.
2. 2ml de extracto etanólico más HCl concentrado y trocitos de Zn se pusieron en tubos de ensayo para la identificación de flavonoles, ésta reacción da una coloración intensa.
3. Para la identificación de leucoantocianidinas, 2 mL de extractos etanólicos se pusieron en tubos de ensayo y se les agregó 0.5 mL de HCl concentrado y se calentaron a baño de vapor por 5 minutos. La aparición de un color púrpura es la prueba positiva para leucoantocianidinas. Cabe señalar que cada muestra se hizo por triplicado.

3. RESULTADOS

Muestreo de Higuera

Las características de las hojas de los 11 ecotipos se muestran en la Tabla 1, pues tienen variación en el color de la hoja, tamaño y tallo, así mismo en la Figura 1 se muestran siete hojas representativas que muestran las diferencias físicas de las hojas de las higueras.

Tabla 1. Clasificación de las hojas de higuera.

Muestra	Color de hoja
1	Morada chica con tallo ceroso
2	Morada grande con tallo ceroso
3	Morada chica sin tallo ceroso
4	Morada grande sin tallo ceroso
5	Morada-verde con tallo ceroso
6	Verde grande con tallo ceroso
7	Verde grande sin tallo ceroso
8	Rosa- verde chica con tallo ceroso
9	Rosa- verde grande con tallo ceroso
10	Rosa chica sin tallo ceroso
11	Rosa grande sin tallo ceroso



Figura 1. Características físicas de las hojas y tallos de higuera.

Identificación de Flavonoides

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos a las reacciones de Willstätter, en donde se puede observar que dos muestras dieron positivas para flavonas, tres para flavanonas, tres para agliconas y siete para flavonoles; y ninguna muestra dio positivo para leucoantocianidinas.

Tabla 2. Resultado de las reacciones de Willstätter.

Prueba	HCl + Mg			HCl + Zn		HCl + calor	
Coloración	Naranja a rojo	Rojo a carmesí	Carmesí a magenta	Verde	Azul	Color intenso	Púrpura
Muestra	Flavona	Flavonoles	Flavanona	Aglicona	Glicósido	Flavonoles	Leucoantocianidinas.
1							
2	√						
3							
4			√			√	
5				√		√	
6				√		√	
7				√		√	
8							
9	√					√	
10			√			√	
11			√			√	

Como se puede observar los flavonoles se identificaron con la prueba de HCl + Zn.

4. CONCLUSIONES

Se logró la identificación cualitativa de flavonas, flavanonas, agliconas y flavonoles; en hojas de 11 ecotipos silvestres de higerillas, recolectadas en los municipios de Silao y Romita, Gto., para las leucoantocianidinas ninguna muestra dio positivo, sin embargo los resultados son alentadores para cuatro de las siete pruebas realizadas por lo que puede considerarse a la higerilla como fuente potencial de flavonoides.

BIBLIOGRAFÍA

1. N. Koirala, N. Huy Thuan, G. P. Ghimire, D. V. Thang, J.K. Sohng. "Methylation of flavonoids: Chemical structures, bioactivities, progress and perspectives for biotechnological production". *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 86, May 2016, pp 103-116, ISSN 0141-0229.
2. O. Cartaya e I. Reynaldo, "Flavonoides: características químicas y aplicaciones." *Cultivos Tropicales*, 2001, vol. 22, no. 2, p. 5-14.
3. S. Martínez-Flórez, J. González-Gallego, J. M. Culebras y M. J. Tuñón, "Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes", *Nutr. Hosp.*, 2002, XVII (6), 271-278.

4. V. Fernández-Carpio, E. Andrio-Enríquez, M. Mendoza-Elos, "Aprovechamiento de la Higuierilla (*Ricinus communis*) para uso bioenergético", La Biodiversidad en Guanajuato, Estudio de caso, Vol I, 2012, ISBN: 978-607-7607-79-3, pp, 235.
5. R.A. Niembro, "Árboles y Arbustos de México". Editorial Herrero S.A. 1990.
6. P.K.S Visen, B Shukla, G.K. Patnaik, S.C Tripathi, D.K Kulshreshtha, R.C Srimal, "Hepatoprotective activity of *Ricinus communis* leaves". International Journal of Pharmacognosy., 30, 241–250, 1992.
7. S.M. Upasani, h.M Kotkar, P.S Mendki, & V.L Maheshwari, "Partial characterization and insecticidal properties of *Ricinus communis* L. foliage flavonoids". Pest Management Science, 59, 1349–1354, 2003.
8. F.K Okwuasaba, S.C Das, C.O Isichei, M.M Ekwenchi, O. Onoruvwe, A.O Olayinka, "The anticonceptive and the effect on uterus of ether extract, 18312-J of *Ricinus communis*". Phytotherapy Research, 10, 97–100, 1997.
9. W. Ghnimi, A. Dicko, M.L Khouja, O.H Ferchichi, "Larvicidal activity, phytochemical composition, and antioxidant properties of different parts of five populations of *Ricinus communis* L., Industrial Crops and Products", Volume 56, May 2014, Pages 43-51
10. G.G Pabón, "Estudio de las características botánicas y etnobotánicas de higuierilla (*Ricinus communis* L.)". Cultivos energéticos alternativos. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 2010, Pp. 9-23.
11. J. S. Martínez-Arbeláez, J. I. Sierra-Acevedo, R. C. Arrubla- Jaramillo, P. N. Martínez-Yepes, "Secondary metabolites in the yellow guayacán and in the pink guayacán". Scientia et Technica Año XVII, No 47, Abril de 2011. Universidad Tecnológica de Pereira. ISSN 0122-1701.

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE SEMILLAS FORRAJERAS.

Callejas Hernández Judith¹, Prieto Méndez Judith², Aquino Torres Eleazar², Prieto García Francisco³, García Álvarez Eduardo¹.

1Ingeniería en Agrotecnología, Universidad Politécnica de Francisco I. Madero, 2Instituto de Ciencias, Agropecuarias, 3 Área Académica de Química Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

RESUMEN

En el trabajo se evaluó la calidad de semillas forrajeras, que fueron suministradas por el Instituto de Ciencias Agropecuarias, ubicado en Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México. Las variedades corresponden a: cebada esmeralda (*Hordeum vulgare*), triticale centenario (*Triticum aestivum*) y avena negra (*Avena strigosa*). Dichas variedades fueron evaluadas en cuanto al porcentaje de germinación natural, emergencia en campo (siembra directa), germinación forzada (H_2SO_4 y H_2O_2), pruebas colorimétricas (índigo y tetrazolio), humedad, peso, pureza y sanidad. Solo por mencionar algunas, se encuentra la relación entre la germinación natural y la siembra directa donde, entre las variedades que obtuvieron un mayor porcentaje de germinación (por encima del 70%) la cebada esmeralda y el triticale centenario. En cuanto a la prueba de germinación forzada, no es muy recomendable, ya que el porcentaje de germinación es muy bajo en la mayoría de las variedades cercanas o iguales a cero, pero de igual forma no es recomendable la escarificación, ya que el porcentaje es muy similar al obtenido en germinación natural. Para las pruebas colorimétricas las cuales representan la viabilidad y vigor de las semillas los resultados arrojaron un buen porcentaje de embriones viables tanto para cebada esmeralda como para triticale centenario, por encima del 80%, contrario a estas se encontró a la avena negra con un porcentaje muy bajo, menor al 50% de embriones viables. La evaluación de la calidad de las semillas es muy importante, ya que permite decidir si cierta variedad es útil para el establecimiento de un cultivo o si se ajusta a las características deseadas por el productor y/o la industria.

1. INTRODUCCIÓN

La calidad de semillas puede ser vista como un padrón de excelencia, es decir, un conjunto de características en ciertos atributos que van a determinar el desempeño de la semilla en la siembra o en el almacén.

El porcentaje de germinación no es suficiente para expresar la calidad de la semilla debido a que este concepto también implica calidad genética, así como otros aspectos de calidad fisiológica además de la germinación. La pérdida de la habilidad para germinar es precedida por una larga fila de procesos deteriorantes dentro de la semilla que debilitan su desempeño.

Por lo tanto el objetivo de las pruebas de calidad no es solamente medir el porcentaje de germinación a través de una prueba de laboratorio estándar, sino también medir el alcance de los procesos deteriorantes antes de la pérdida máxima de habilidad para germinar. La intención es tener la capacidad de detectar las diferencias de desempeño entre las semillas con habilidad de germinación.

Hay cuatro parámetros básicos para las características de calidad de semillas: Calidad física de la semilla; Calidad fisiológica, la cual se refiere a aspectos del desempeño de la semilla; Calidad genética, la cual se relaciona a las características genéticas específicas de la variedad de semilla. Sanidad de las semillas, la cual se refiere a la presencia o ausencia de enfermedades o plagas dentro del lote de semillas.

La producción actual de semillas forrajeras es insuficiente para cubrir la demanda nacional, en México es una actividad marginal de la ganadería y se efectúa con técnicas deficientes y ancestrales, que dan como resultado rendimientos bajos y calidad mala de la semilla producida. De ahí que la producción de semillas de especies forrajeras puede ser una actividad significativa dentro de la economía del sector agropecuario, ya que usualmente genera recursos económicos y oportunidades de empleo, por la gran cantidad de mano de obra que ocupa (hasta 60 jornales por hectárea) y por qué es parte fundamental para el establecimiento y mejoramiento de las áreas de pastoreo y de la ganadería en general. Se estableció que una limitante para mejorar la producción forrajera es la baja disponibilidad de semilla en los mercados nacionales, lo que ocasiona que, anualmente, se importen más de 40,000 toneladas de semilla de pastos y forrajes de países como Brasil, Australia y Estados Unidos para abastecer la demanda nacional.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Se estudiaron tres lotes de semillas de Triticale centenario, avena negra y cebada esmeralda, proporcionadas por el ICAP, UAEH Tulancingo, Hidalgo. Todas las pruebas se realizaron por triplicado para cada lote.

Prueba de germinación natural: Se colocaron 100 semillas de cada lote en estudio, en algodón previamente humedecido (90%) con agua destilada dentro de cajas Petri tapadas a temperatura ambiente. Se realizaron las evaluaciones a las 96 horas del germinado. Se consideró como germinadas sólo plántulas normales, libres de manchas necróticas o con síntomas de necrosis muy incipientes. Este criterio fue más estricto que el establecido por ISTA (1999), según el cual se consideran normales plántulas con necrosis en hasta 50% de sus cotiledones.

Prueba colorimétrica con Tetrazolio: Se preparó la solución de tetrazolio (cloruro de 2,3,5 trifenil tetrazolio) al 1%. Para esta determinación se contaron al azar tres repeticiones de 100 granos sanos y se cortaron longitudinalmente, se colocaron 50 medios granos en tubos de ensayo con la solución, posteriormente se colocaron en baño maría a 45°C con el fin de acelerar la reacción de aparición del color: rojo rosa a rojo intenso. El tiempo de reacción bajo estas condiciones fue de 8 a 15 minutos como máximo. Cuando el tiempo de reacción terminó, se separaron los granos y se lavaron inmediatamente con agua limpia. Si el embrión presenta una coloración rojo intensa en las estructuras de crecimiento es indicativo de que el embrión está vivo y presenta una gran viabilidad; la falta de coloración y/o colores rosa pálidos, indican la muerte del embrión o poca viabilidad, respectivamente. Para cuantificar el porcentaje de germinación, se determinaron los granos viables (por conteo) y la cifra resulta de la multiplicación por dos y porcentaje de viabilidad para la germinación (Prieto *et al*, 2011).

Prueba colorimétrica con Índigo Carmín: para este método se utilizó de igual manera un método de tinción en tubos de ensayo. Para esta determinación las semillas se cortaron longitudinalmente procurando no dañar el embrión, posteriormente se colocaron en los tubos de ensayo, conteniendo el reactivo; la prueba del índigo carmín es igualmente una reacción indicadora. El índigo carmín se preparó añadiendo 0,15 g de índigo carmín en 100 ml de agua. Se sumergieron las semillas 18 horas en agua destilada para reblandecer el endospermo y posteriormente se sumergieron en la solución durante 3 horas a temperatura ambiente. Se lavaron y se clasificaron en viables (blancos o con pocas manchas azules nunca localizadas en la radícula), de vitalidad limitada (embriones con dudas), y no viables (zona de la radícula totalmente teñida y embrión teñido) (Prieto *et al*, 2011).

Prueba de humedad: para cada lote de semillas, las determinaciones de humedad se hicieron por triplicado empleando 5 g de semilla en cada muestra, antes del secado las semillas se pesaron en una balanza analítica (0.0001 g). Las muestras se secaron en una estufa durante aproximadamente 8 – 12 horas a 65 °C, después de enfriadas, las muestras se pesaron otra vez y se determinó la pérdida registrada por el secado. El contenido de humedad total (w) se calculó por diferencia de peso.

Prueba de vigor: Para la prueba de la conductividad eléctrica (CE) fueron utilizadas tres repeticiones de semillas secas por muestra representativa de cada lote (muestras utilizadas en la prueba de humedad). Las semillas previamente se pesaron y posteriormente fueron colocadas para embeber en 75 mL de agua desionizada por un periodo de 24 horas, a 25 °C. Después de colocar las semillas en los frascos se registró el valor de la conductividad eléctrica en el tiempo 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 horas, los valores de la conductividad eléctrica fueron medidos empleándose un conductímetro de la marca “ThermoScientific”. El valor de cada lectura de conductividad eléctrica fue dividido por el respectivo peso de la muestra y los resultados fueron expresados en $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ de semilla.

Siembra directa en suelo: Para esta prueba se utilizaron tres repeticiones de 100 semillas de cada muestra representativa de cada lote, las cuales fueron sembradas en macetas rellenas con suelo y con riegos constantes, se evaluó el número de plántulas germinadas así como la velocidad y uniformidad de dicha germinación, mediante las reglas establecidas (ISTA), a los 15 días se evaluó nuevamente la germinación como el porcentaje de plántulas normales (crecimiento constante y uniforme), además se evaluó el de plantas anormales (cotiledones fusionados, plantas subdesarrolladas, cotiledones no expandidos, cotiledones corrugados, cotiledones severamente curvados hacia abajo).

Sanidad, Incidencia de patógenos en semillas: para determinar la patología en semillas se utilizó agar papa dextrosa al 2% con alternancia de luz, según recomiendan las reglas de análisis de semillas (ISTA, 2003). Se analizaron un total de 300 semillas por material. A las 24, 48 y 72 horas se midió la presencia/ausencia de hongos (Gallo *et al*, 2007).

El análisis de pureza se llevó a cabo tomando 3 muestras representativas de cada lote 100 g de semilla, separando los componentes físicos. Restando del peso total de cada muestra la suma de los pesos obtenidos de forma separada para los tres componentes: semillas de malas hierbas, semilla de otros cultivos y materia inerte, se obtuvo el peso de semilla pura. Los valores obtenidos se expresaron en porcentaje con relación al total de la muestra.

Para cada muestra, la determinación del peso de 1000 semillas se hizo por triplicado empleando muestras 100 semillas tomadas de la muestra representativa de cada lote, cada una, tomada de la porción de semilla pura de cada muestra. El peso promedio de las muestras se multiplico por 10 para obtener el peso de 1000 semillas. Todos los datos fueron ajustados a la humedad obtenida en la previa prueba de humedad.

El análisis estadístico para cada tratamiento y sus respectivas réplicas fueron evaluados mediante un análisis de varianza en el programa estadístico SAS 9.0 y se realizaron pruebas de comparación de medias de Tukey. Para minimizar el error en cada prueba se llevó a cabo por triplicado, lo que indica que las determinaciones guardan un grado de confiabilidad aceptable.

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Para las diferentes pruebas de germinación los resultados capturados fueron los mostrados a continuación: en cuanto a la siembra natural y la siembra directa los resultados son muy similares. En el gráfico 1 se muestran los resultados de la comparación de medias por Tukey, para la germinación natural y en campo; resultados con letras diferentes indican que hay diferencia entre los resultados. En cuanto al porcentaje de germinación natural el triticale centenario presentó

mayor % de germinación, 88; esta variedad se encuentra por encima del 80%, mientras que cebada esmeralda presentó 78%. En siembra directa triticale centenario (82%), cebada esmeralda (80%) se puede observar que en la siembra natural estas variedades no cumplirían los valores establecidos para semillas certificadas. Cuando un lote está por debajo del 70% de germinación, seguramente se comportará presentando una baja emergencia en campo y se deteriorará rápidamente en el almacenamiento en condiciones desfavorables (Salinas *et al.*, 2001). En la germinación natural por debajo del 70% se encuentra la avena negra con un 46% y en siembra directa se tiene 42%. Se puede observar que esta última coincide en ambas pruebas, corroborando lo dicho por los autores. Para el caso de la avena esto puede atribuirse al bajo vigor de semillas, ya que el porcentaje de semillas teñidas fue menor al 60% por ambos métodos (indigo y tetrazolio). De acuerdo a la clasificación de Franca-Neto y colaboradores (1998), las semillas estudiadas de cebada esmeralda y triticale centenario son semillas consideradas con un vigor muy alto, ya que presentan porcentajes superiores al 85%, mientras que la avena negra presenta vigor bajo, el cual está entre el rango de 59 - 50%.

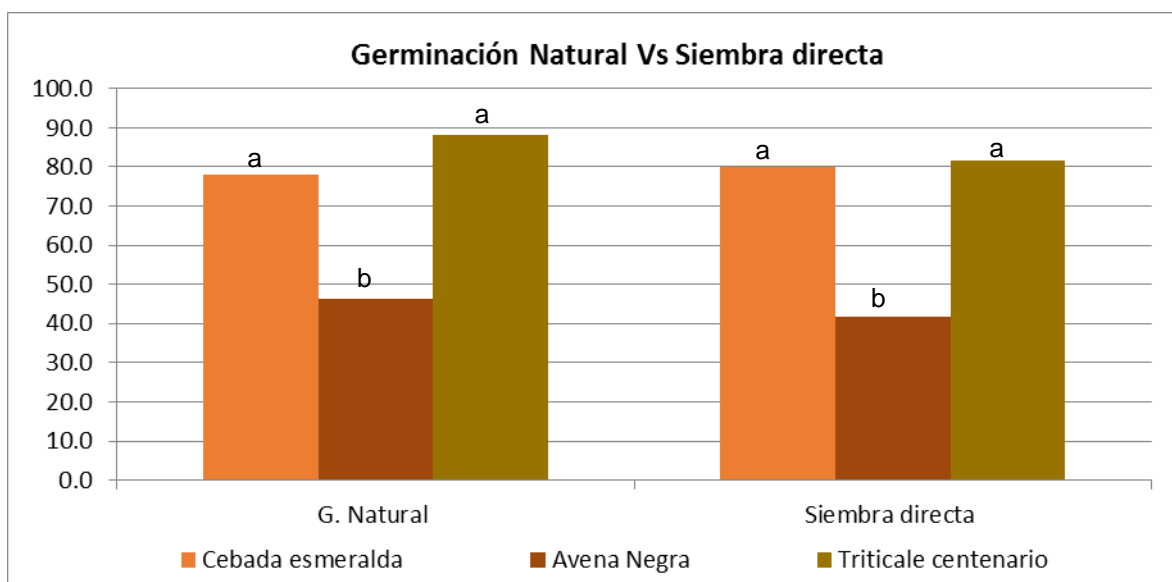


Gráfico 1. Porcentaje de germinación natural y directa en semillas¹. ¹Medias de igual letra no difieren significativamente al 5% de probabilidad, prueba de Tukey.

El análisis estadístico revela que la cebada esmeralda y el triticale centenario estadísticamente son iguales y no muestran diferencia significativa, pero ambos son diferentes a la avena. Como se había mencionado anteriormente, semillas con alto vigor presentarán porcentajes de emergencia en campo superior al 70%. En el gráfico 2, se observa tanto para germinación natural como para siembra directa en las especies estudiadas.

Lo dicho anteriormente también se ratificó con la prueba de conductividad eléctrica (CE). A lo largo de la prueba de CE la avena mantuvo valores por debajo de $40 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$, ratificando con ello los bajos porcentajes de germinación. No así para la cebada que tuvo un buen comportamiento desde el inicio hasta el final de la prueba con valores aceptables, corroborando con ello un 78% de germinación. La prueba de CE está relacionada con el vigor de las semillas. Para su clasificación en diferentes niveles se pueden establecer rangos, que van desde 45 hasta $85 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ las cuales pueden ser consideradas como semillas de alto vigor, para las especies estudiadas el

triticale centenario está dentro de este intervalo. La germinación en campo está por encima del 80%, lo que resulta ideal para el establecimiento en campo, corroborando que ella presenta alta calidad, es decir, son viables y de alto vigor. El análisis estadístico para la CE corrobora lo dicho anteriormente y se muestra en el gráfico 3 que existen diferencias significativas entre estas especies en estudio.

Cuando se presentan valores de CE por encima de 85 y hasta 100 $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ las semillas serán clasificadas con vigor medio, tal es el caso de la cebada esmeralda aunque presenta un porcentaje considerable de germinación (80%), el análisis estadístico muestra que hay diferencia con respecto a triticale. Los valores de CE han sido establecidos a partir de referencias para la soja (Fachini *et al.*, 2004). En el caso de la avena presenta una CE de 35.6 $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$, por lo que no es posible clasificarla como de alto, medio o bajo vigor, esto pudiera atribuirse a que las semillas presenten un daño en el embrión. Esto se contrasta con la prueba de tetrazolio, donde el 50% de las semillas resultaron con daño, es decir, son semillas no viables. Las pruebas estadísticas muestran que es significativamente diferente al resto. En las pruebas se observó a las semillas no teñidas con formazan indicando la muerte del embrión. Esto impacta directamente en la tasa de germinación para la avena con 41.7% y sólo el 31.3% resultó como plántulas normales y el resto como plántulas anormales.

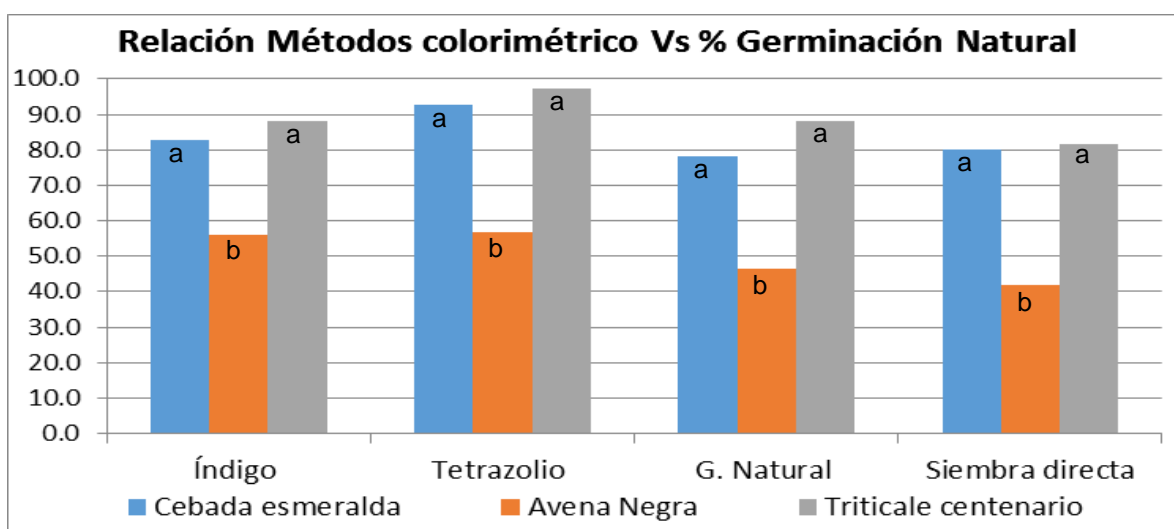


Grafico 2. Relación del índice de viabilidad (determinación con índigo y tetrazolio) contra la germinación (natural y en siembra directa)¹. ¹Medias de igual letra no difieren significativamente al 5% de probabilidad, prueba de Tukey.

Para la prueba de peso las semillas mostraron un peso por encima de la media, dentro de los intervalos establecidos: cebada esmeralda con 50.36 g (30-60 g), avena negra con 47.37 g (20-50 g) y triticale centenario con un 50.51 g (40-60 g). También existe una relación con el vigor de las semillas, ya que a menor peso menor material necesario (nutrientes) para la germinación.

La humedad es un parámetro muy importante, sobre todo cuando los granos y/o semillas son destinados para almacenamiento. Los resultados representan el porcentaje de humedad de las semillas, el cual está por debajo del límite establecido para la cosecha de granos (14%), incluso por debajo del 10%, tal es el caso de cebada esmeralda con 9.7%, avena negra con 9.5% y triticale centenario con 7.6%. este parámetro no afecta, incluso cuando se pretende almacenar las semillas por varios años, alcanzando longevidades muy elevadas. En el caso de los cereales como el

triticale centenario, cebada esmeralda y avena negra pueden mantenerse viables hasta por diez años con un contenido de humedad del 10% y una temperatura media de 20 °C (Pérez *et Villamil*, 1999). El contenido de humedad también es un factor limitante para evitar la infestación por hongos patógenos así como la temperatura de almacenamiento, la cual debe de estar por debajo de los 20°C.

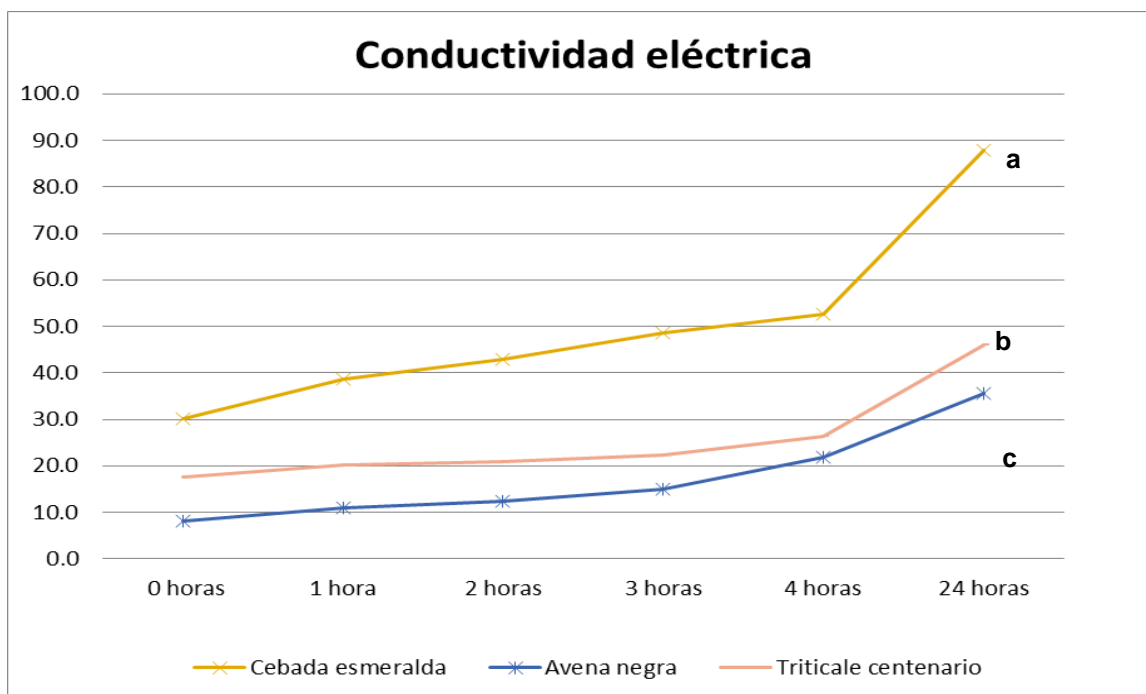


Grafico 3. Prueba de conductividad eléctrica en un periodo de 24 horas¹. ¹Medias de igual letra no difieren significativamente al 5% de probabilidad, prueba de Tukey.

Los resultados arrojados para la prueba de sanidad muestran el porcentaje de infección en semillas, las variedades que mostraron mayor incidencia principalmente con hongos, por encima del 20% fueron: el triticale centenario con un 27.7% y la cebada esmeralda con 23% de incidencia y la avena negra con un 7.0% de semillas infectadas. La parte sanitaria debe controlarse sobre todo cuando se pretende almacenar las semillas o incluso dentro del establecimiento como cultivo. Dado que los resultados permitieron identificar el tipo de hongo, el cual corresponde a *Fusarium oxysporum*, dicho hongo, podría producir daños considerables en el cultivo si no se le brinda un tratamiento adecuado, causando la pudrición de la raíz en las plántulas germinadas. En el caso de triticale centenario y cebada esmeralda, presentaron características favorables en cuanto al porcentaje de germinación natural y emergencia en campo, CE, semillas viables con alto vigor. Esto permite utilizar estas semillas para el establecimiento del cultivo, siempre y cuando las semillas sean tratadas con algún fungicida antes de la siembra.

Se evaluó también la pureza de las semillas, contemplando como impurezas los restos de materia orgánica, presencia de insectos y semillas de otros cultivos o malezas, semillas quebradas e infestadas. Los resultados son favorables para las variedades, ya que se registró un porcentaje muy bajo respecto a las impurezas contenidas (solo materia orgánica), Para el caso de la avena negra el porcentaje de impurezas fue de un 14%, un porcentaje muy elevado con respecto al resto, del cual el 5.6% resultaron semillas de maleza las cuales fueron identificadas como semillas de malva (*Malva Sylvestris L.*), por lo que se recomienda una selección de la semilla, antes de la

siembra en campo. En el caso de la cebada esmeralda y el triticale centenario que mostraron un porcentaje bajo de impurezas (sólo materia orgánica) 4.5 y 1.3% respectivamente, no se recomienda el almacenamiento; porque se encontró gorgojo o picudo del trigo (*Sitophilus oryzae* L.), para ambos casos. Este coleóptero puede causar daños considerables durante el almacenamiento si no es controlado a tiempo, ya que su tasa de reproducción es muy elevada y su apetito es voraz. Para el caso de las dos variedades antes mencionadas se recomienda un control previo al almacenamiento con insecticidas.

4. CONCLUSIONES

Porcentajes de germinación natural y en campo por encima del 80% indican una buena calidad en la semilla para su establecimiento en campo. Las semillas que satisfacen este criterio son cebada esmeralda y triticale centenario. Es posible recomendarle al agricultor incrementar la densidad de siembra para alcanzar 100% de germinación. Sobre todo si se pretende utilizar la avena negra como semilla para producción de forrajes.

Semillas por encima del 80% de germinación tanto en campo como en natural son clasificadas como semillas de alto vigor de acuerdo a la CE, las cuales presentan valores entre 45-85 $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Semillas con CE por arriba de 85 $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ son de vigor medio y presentan germinación menor al 80% (pastos y cebada esmeralda). Semillas por debajo de los 45 $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ se clasifican como de bajo vigor (avena negra) con germinación menor al 50%.

La calidad de las semillas estudiadas está determinada por tres factores de gran importancia, como el estado del embrión (que indica la viabilidad y vigor de la semilla), la humedad y la sanidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fachini Colete, J. C., Daiton Vieira, R., Sandro Dutra, A. "Electrical conductivity and soybean seedling emergence". Sci. Agric., 2004. pp. 386-391.
2. Franca Neto, J. D., Krzyzanowsk, F. C., Pereira da Costa, N. "El test de tetrazolio en semillas de soja". Embrapa - CNPSO, 72. 1998
3. Gallo, C., Craviotto, R., Arango, M. "Incidencia de patógenos fúngicos en semillas de alcaucil. Análisis de semillas" 2007, pp. 76-79.
4. Pérez García, F., Pita Villamil, J. M. "Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas" Madrid, España. 1999
5. Prieto Méndez, J., Prieto García, F., Hernández Cervantes, N., Domínguez Soto, J., Román Gutiérrez, A. "Métodos comparativos del poder germinativo en *Hordeum distichon* L. calidad maltera". Tulancingo de bravo, Hidalgo, México. 26 de Abril de 2011
6. Salinas, A. R., Yoldjian, A. M., Craviotto, R. M., Bisaro, V. "Pruebas de vigor y calidad fisiológica de semillas de soja". Brasil. Febrero de 200.

ELABORACIÓN DE UNA MERMELEDA DE ARÁNDANO Y CHÍA ADICIONADA CON INULINA Y EVALUACIÓN DE SU COMPORTAMIENTO GLICÉMICO

Antonio de Jesús Ortiz Hernández¹, Rosa María García Martínez¹, José Octavio Rodiles López¹

¹Facultad de Químico Farmacobiología, UMSNH. Tzintzuntzan No. 173 Col. Mariano Matamoros C.P. 58240 Morelia, Mich.

RESUMEN

Los alimentos funcionales son productos elaborados por la adición de nutraceuticos y otros ingredientes como prebióticos y probióticos, o por la eliminación de algún agente dañino como la sacarosa, sodio, grasas, etc. que ayudan a evitar enfermedades crónico degenerativas tal como la diabetes, hipertensión y enfermedades cardiovasculares. Las mermeladas son productos pastosos obtenidos por la cocción y la concentración de una o más frutas, preparada con edulcorantes, sustancias gelificantes y acidificantes naturales, hasta obtener una consistencia característica, cuyos ingredientes mayoritarios son fruta y azúcares que son los que permiten asegurar su conservación. El arándano tiene una gran cantidad de propiedades que hacen que sea considerado un alimento funcional, de bajo valor calórico, rico en vitamina C y de fuerte capacidad antioxidante. La chía proporciona energía y aumenta la fuerza y resistencia y fuente de proteína de origen vegetal. Regula la concentración de glucosa en sangre y mejora el tránsito intestinal. En esta investigación, se elaboró una mermelada funcional a base de chía y arándano que aporta salud, dadas sus propiedades nutrimentales y fisiológicas antes descritas y que además puede ser consumida por personas con síndrome metabólico sin que afecte a los niveles de glucosa en sangre y que por otra parte, disminuya la concentración plasmática de colesterol y triglicéridos, reduciendo la incidencia de enfermedades crónico degenerativas. Mediante pruebas sensoriales se realizó el grado de aceptación por parte de los panelistas, teniendo una mermelada control y las tres formulaciones, de 5, 10 y 15 %. Se evaluaron aspectos de color, olor, sabor y textura de cada mermelada. La formulación al 5% fue la de mayor grado de aceptación y a ésta se determinó el análisis proximal y su tabla de valor nutrimental mientras que el IG a 30 min fue de 99 mg/dl.

1. INTRODUCCIÓN

Las mermeladas son productos cuyos ingredientes mayoritarios son la fruta y los azúcares, puede contener una o varias frutas, las cuales son el ingrediente que le da identidad propia formando parte de la denominación comercial del producto. Debido a su valor nutritivo y a sus características organolépticas, son un producto muy consumido durante los desayunos, meriendas y postres. Se obtienen por la cocción de la fruta con el azúcar hasta obtener un producto de consistencia semifluida o espesa (Chacón, 2006).

Las mermeladas suelen tener más del 50% de azúcar, la cual es responsable de que el contenido calórico de esos alimentos suba mucho respecto a la fruta fresca (en torno a las 250 kcal/100 g). Retienen unas de las propiedades de la fruta como algunas vitaminas, excepto la vitamina C que se pierde por calor, aunque suele agregarse como antioxidante al propio proceso industrial, también contiene todos los minerales y la fibra. Su mayor inconveniente reside en su alto contenido de azúcares de absorción rápida, por lo que su consumo debe ser moderado para todos y en especial para diabéticos (Campillo, 1997). La respuesta comercial a estos inconvenientes es la elaboración de mermeladas especiales. En ellas hay que diferenciar las que son bajas en calorías

y que han sido elaboradas con un edulcorantes artificiales y otras, en las que no se adiciona azúcar. El valor nutritivo y calórico de cada mermelada depende del tipo de fruta usada, así como del edulcorante usado y la concentración utilizada. Los ingredientes básicos de las mermeladas son invariablemente azúcar, fruta, pectina y en algunos casos ácidos frutales. Aunque cada mermelada es ligeramente diferente, siempre deberá partir de la mejor fruta fresca. Cada ingrediente cumple con una función específica, además una proporción adecuada de estos productos crea el gel característico de las mermeladas, conserva su sabor, así como la vida de anaquel. La cantidad de azúcar indicada es de 60^oBrix, cuando la cantidad es menor existe riesgo de fermentación durante el almacenamiento y propiciar el desarrollo de hongos, si es superior a 68^oBrix, el azúcar podría cristalizarse (Chacón, 2006).

La fruta es otra de las materias primas básicas, las cuales deben estar sanas y en un estado óptimo de madurez y pueden ser usadas en pieza completa, en trozos o trituradas.

Los alimentos funcionales son productos elaborados por la adición de nutracéuticos y otros ingredientes como prebióticos y probióticos, o por la eliminación de algún agente dañino como la sacarosa, sodio, grasas, etc. que ayudan a evitar enfermedades crónico degenerativas tal como la diabetes, hipertensión y enfermedades cardiovasculares. El arándano tiene una gran cantidad de propiedades que hacen que sea considerado un alimento funcional, de bajo valor calórico, rico en vitamina C y de fuerte capacidad antioxidante. La chía proporciona energía y aumenta la fuerza y resistencia y fuente de proteína de origen vegetal. Regula la concentración de glucosa en sangre y mejora el tránsito intestinal.

En esta investigación, se elaboró una mermelada funcional a base de chía y arándano que aporta salud, dadas sus propiedades nutrimentales y fisiológicas antes descritas y que además puede ser consumida por personas con síndrome metabólico sin que afecte a los niveles de glucosa en sangre y que por otra parte, disminuya la concentración plasmática de colesterol y triglicéridos, reduciendo la incidencia de enfermedades crónico degenerativas.

2. TEORÍA

Los arándanos se suelen clasificar en 2 tipos: el arándano rojo, también conocido como arándano agrio ó cranberry, siendo la especie principal *Vaccinium macrocarpon*, el otro tipo de arándano que es el que nos interesa, es el arándano negro, también conocido como arándano azul o blueberry, siendo *Vaccinium corymbosum* la principal especie. Estas frutas son de bajo valor calórico por su escaso contenido de carbohidratos aportando 57 Kcal por cada 100 g, destacándose el contenido de fibra dietética, ricos en vitaminas y minerales. Son especialmente ricas en vitamina C que tiene acción antioxidante, al igual que los antocianinas y carotenoides.

La salvia hispánica, es una planta que pertenece a la familia de la lamiaceae (familia de las aromáticas) planta de la cual se obtiene la semilla de chía. Es originaria de Centroamérica y México. El uso de la semilla y sus subproductos se remonta a la época de los Mayas y los Aztecas. En la actualidad, la semilla de chía se ha convertido en fuente de gran interés gracias a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, en especial el ácido alfa linolénico (omega 6), la fibra, la proteína, los antioxidantes y un bajo índice glucémico. Debido a la composición que presenta la semilla de chía, ha sido posible que tanto la semilla como los subproductos derivados de ella (aceite, harina, etc.) puedan ser incorporados a diferentes matrices alimentarias como panificación, bebidas, cereales, mezclas secas, para dar un valor agregado, o consumirla directamente como alimento funcional (Jaramillo, 2013).

La inulina es un polisacárido de reserva energética de las plantas, está compuesta por una cadena de moléculas de fructuosa y terminando cada extremo con una glucosa, se encuentra presente en diversas fuentes vegetales. Debido a que la inulina es un carbohidrato no digerible, actúa como fibra prebiótica que tiene un efecto beneficioso en el tracto digestivo, puesto que sirve como

alimento a los microorganismos que habita en el intestino. Además de tener propiedades clásicas de las fibras alimentarias para regular el tránsito intestinal, contribuye a una mejor absorción del calcio, a la estimulación de las defensas naturales de la flora intestinal (efecto bifidus) y a reducir el colesterol y los niveles de azúcar en sangre.

El índice glucémico o IG por sus abreviaturas es simplemente un indicador de la velocidad con que un azúcar es absorbido en el intestino e incorporado a la sangre. Su valor está en relación inversa a la rapidez de absorción, cuanto más rápido se absorbe más alto es el índice. Su importancia se debe al ya conocido incremento de insulina que tiene lugar con la llegada masiva de glucosa a la sangre, y la consecuente conversión de esta glucosa en grasa. El calculo del IG se basa en el calculo del area bajo la curva que describe la respuesta glucemica en las dos horas siguientes a la ingesta de hidratos de carbono (normalmente 50) contenidos en un alimento comparandolo con un alimento de referencia. Un mayor indice glucémico de un alimento indica quee este producira un mayor ingremento en la glucemia, por lo tanto, del area bajo la curva que describe en la dos horas posteriores a su ingesta y éste se compara con un alimento de referencia o control. Un IG bajo garantiza la quema de grasa superflua, se estabiliza el nivel de glucosa en sangre disminuyendo el riesgo de diabetes, normalizándose así también los niveles de grasa en sangre, lo cual hace disminuir las probabilidades de sufrir un infarto o un colapso.

Hoy en día se busca el consumo de alimentos funcionales, los cuales aportan beneficios directos a la salud, además de su valor nutritivo. En ésta investigación, se propuso elaborar un alimento de tipo funcional y con bajo índice glicémico IG, una mermelada de arándano fortificada con chía sin la adición de azúcar. El arándano es un fruto con altas concentraciones de compuestos antioxidantes y la chía, una semilla que regula la concentración de azúcar sanguínea, así como la inulina que es un prebiótico importante y que al mismo tiempo le confiere un grado de dulzor al producto final, aportando salud y brindando seguridad en el consumo ya que no afecta los niveles de glucosa en sangre.

3. PARTE EXPERIMENTAL

El arándano se compró en el Mercado de Abastos de la ciudad de Morelia, Mich. Posteriormente ya en el laboratorio, se procedió a su limpieza y sanitización. Se elaboró una mermelada control así como mermeladas al 5% de chía, al 10% y al 15%, considerando como base el 40% de fruta presente para cada formulación. Cabe indicar que la mermelada control no lleva la adición de inulina, no así para las demás formulaciones en las cuales se encuentra alrededor del 40%.

A cada una de las formulaciones se les realizó el análisis de grado de aceptación mediante pruebas sensoriales a panelistas inexpertos en base a un método analítico discriminativo mediante prueba de ordenamiento, esto con la finalidad de elegir la formulación de mermelada a trabajar. Se evaluaron los aspectos de color, olor, sabor y textura de cada mermelada y se realizó con 25 panelistas.

Sobre la formulación elegida, se realizó una evaluación fisicoquímica en donde se evaluaron los parámetros de pH, grados Brix y el análisis proximal completo basándose en las normas técnicas de referencia del AOAC.

La evaluación de tipo biológica se hizo en pacientes voluntarios, midiendo los niveles de glucosa postprandial a los tiempos 0, 30, 60 y 120 minutos, para ello se utilizó un glucómetro One Touch Ultra®.

4. RESULTADOS

FORMULACIÓN

Se elaboró una mermelada de arándano, y adicionada con diferentes concentraciones de semilla de chía, 5, 10, y 15%. Se usó una concentración de fruta del 40% de arándano, y 40% de inulina, que sustituye al azúcar. El producto terminado fue endulzado usando estevia.

ANÁLISIS SENSORIAL

El análisis sensorial se realizó con 25 panelistas inexpertos en base al método analítico discriminativo evaluando color, olor, sabor y textura. Este método tiene como objeto establecer si entre dos o más muestras existe o no diferencia en alguna característica evaluada, o bien, teniéndolas en cuenta todas de manera conjunta, y representando así una herramienta analítica disponible y de gran utilidad para el análisis sensorial (Ibáñez y Barcina, 2001). Cada panelista ordenó en base a su gusto, la formulación que más gusto a la que menos agradó, evaluando por separado cada uno de los parámetros. En el Gráfico 1, se observan los resultados de la evaluación de los parámetros medidos en las distintas formulaciones, pudiéndose apreciar mayor grado de aceptación por la formulación control, seguida de la formulación con 5 % de chía, sobresaliendo sólo el parámetro de olor en ésta formulación a diferencia de las demás. Para consideraciones de trabajo en éste tema de investigación se optó por trabajar en la segunda formulación de más grado de aceptación, es decir, la mermelada mayormente aceptada después de la mermelada control o base.

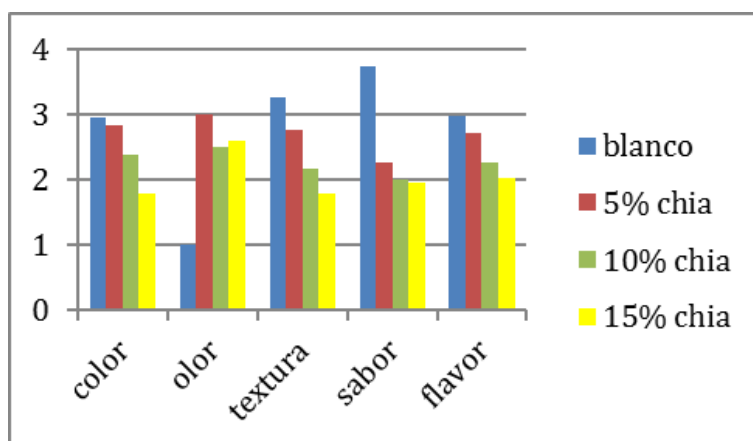


Gráfico 1. Análisis sensorial a las distintas formulaciones de mermeladas.

ANÁLISIS PROXIMAL

A la mermelada control y a la formulación al 5% de chía se les realizó el análisis proximal. Los resultados se muestran en la Tabla 1. El dato de carbohidratos se obtuvo por diferencia. Se puede observar un incremento en los valores de fibra, y éstos porque se le adicionó inulina a la mermelada funcional.

ENSAYO BIOLÓGICO

Se realizaron pruebas con seres humanos para evaluar su índice glucémico, IG, después de consumir la mermelada normal y la mermelada funcional. La mermelada normal lleva fruta y azúcar, y la mermelada funcional lleva arándano, chía, e inulina. Los resultados se compararon con el IG de la glucosa. En primera instancia se les dio a los panelistas una dosis de glucosa en agua, posteriormente se les dio la mermelada normal, y posteriormente la mermelada funcional.

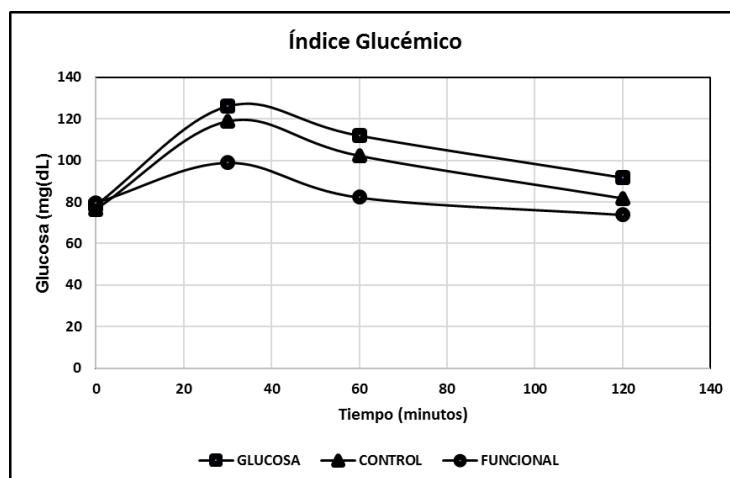
Tabla 1. Análisis proximal muestras control y formulación 5%

ANÁLISIS PROXIMAL DE MERMELADA BLANCO Y MERMELADA AL 5% DE CHÍA		
PARÁMETRO	BLANCO	5% CHÍA
Humedad	17.1450%	18.7250%
Cenizas	0.0013%	0.0034%
Lípidos	0.0395%	0.0859%
Proteínas	0.0625%	0.7770%
Fibra dietética	4.9012%	26.4012%
Carbohidratos por diferencia	77.8505%	54.0075%

Se utilizaron 10 personas voluntarias con un índice de masa corporal normal (18-25) y con un ayuno de 8 horas. Se obtuvieron las curvas correspondientes, y se obtuvo el área bajo la curva. Los resultados se presentan en la Tabla 2. La mermelada normal hecha con arándano y azúcar mostró un área bajo la curva ligeramente inferior a la glucosa, disminuyendo un 7.8%. Mientras que la mermelada funcional, elaborada con arándano, chía, e inulina, mostró un área bajo la curva mucho menor, y con una disminución del 21%

Tabla 2. Área Bajo la Curva, Índice Glucémico

PRODUCTO	ÁREA IG
Glucosa	12,754
Mermelada Normal	11,761
Mermelada Funcional	10,087



5. CONCLUSIONES

La mermelada que desarrollamos funcionó como un alimento funcional. Esta estuvo elaborada con 40% de arándano, 5% de chía, 40% de inulina, y endulzada con estevia. Esta mermelada permitió bajar en 21% el índice glicémico en seres humanos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chacon, A. S., 2006. Control de calidad en el proceso de elaboracion.. En: *Procesamiento de frutas: Procesos húmedos y procesos secos*.. El Salvador: s.n., p. 8
2. Chacon, A. S., 2006. Procesamiento de mermeladas: método de conservación de frutas por alta concentración de azúcar.. En: *Procesamiento de frutas: procesos húmedos y procesos secos*.. El Salvador: s.n, p. 12 y 13
3. Campillo A. J., 1997. Fruta fresca y en conserva. En: *Alimentación: ciencia, tradición y salud*. Madrid, España: ARÁN, p. 179.
4. Ibáñez M. F. & Barcina A. Y., 2001. *Análisis sensorial de alimentos. Métodos y aplicaciones*. Barcelona, Espaa: Springer-Verlag Ibérica.
5. Jaramillo G., Y., 2013. *La chia (salvia hispanica L.) una fuente de nutrientes para el desarrollo de alimentos saludables.Tesis de licenciatura*. Caldas-Antioquia, Colombia: Corporación Universitaria Lasallista.

APLICACIÓN DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR EN LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES FÚNGICAS

Pablo Flores Cervantes, Christian J. Gallegos Núñez, Gerardo Vázquez Marrufo, Virginia A. Robinson Fuentes

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

RESUMEN

La identificación de las diferentes especies de los hongos se realiza a través de diversos métodos. En este trabajo se propone usar la electroforesis capilar (EC) porque es útil para analizar conidias de diversas especies fúngicas; en trabajos previos se han obtenido señales características para *Trichoderma spp.* por lo que se quiere establecer si tales señales electroforéticas son específicas para este género o también se presentan en otras especies/géneros para que dicha técnica pueda servir como una alternativa para la identificación de células fúngicas. En este estudio se usaron diferentes géneros y especies de hongos (*Fusarium*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Pochonia* y *Umbelopsis*) todos silvestres. Se sembraron en 4 diferentes medios: PDA, MDA, Sabouraud y Vogel; se incubaron a 28 °C, se realizaron curvas de crecimiento y se registró el tiempo de conidiación. Después, se procesaron las conidias, suspendiéndolas en agua estéril y se llevó a cabo el análisis de los sobrenadantes por EC usando un capilar de sílice fundida de 100 µm de d.i., 50 cm L_t. Se usó PBS 10mM a pH 6.8 como buffer, a -17 KV. Se obtuvieron señales electroforéticas que son características de género.

1. INTRODUCCION

Los hongos son pequeños organismos productores de esporas, generalmente microscópicos, eucarióticos, ramificados y a menudo son filamentosos que carecen de clorofila y que tienen paredes celulares que contienen quitina, celulosa o ambos componentes. Se conocen cerca de 100.000 especies de las cuales la mayoría son estrictamente saprofitas y viven sobre la materia orgánica muerta, a la que descomponen. Alrededor de 50 especies de hongos producen enfermedades en el hombre y casi el mismo número las ocasiona en los animales. Sin embargo, alrededor de 8.000 son fitopatógenos. Por lo que el estudio de la fitopatología requiere un amplio conocimiento de micología [Agris, 2005].

Los hongos que causan enfermedades en las plantas se denominan "fitopatógenos" (phyton: planta; pathos: enfermedad). Estos microorganismos constituyen un grupo de mucha importancia en la agricultura debido a su gran número y enorme capacidad de reproducción. Estos hongos ocasionan grandes pérdidas económicas, ya que los costos de producción aumentan al tener que establecer medidas para su control. A nivel mundial los hongos fitopatógenos constituyen el grupo más importante desde el punto de vista económico en cuanto a su frecuencia de aparición y daño que pueden causar [Arauz, 1998]. Es por eso que se requiere de una identificación precisa, eficaz y económica, ya a sabiendas de la especie fúngica que se trata se podrá iniciar con un tratamiento oportuno contra el patógeno de la planta.

La electroforesis capilar (EC) es una técnica de separación que se basa en la movilidad o velocidad de migración de partículas cargadas debido a la acción de un campo eléctrico. En esta

técnica se emplean capilares de sílice de 20 a 200 μm de diámetro para realizar separaciones de alta eficiencia de moléculas grandes y pequeñas. Las propiedades de separación y el consiguiente electroferograma tienen características que se asemejan a los geles de agarosa y poliacrilamida y la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Con esta técnica es posible separar cationes, aniones, proteínas, macromoléculas, ADN y sustancias no cargadas en forma simultánea, haciendo de la EC una de las herramientas más importantes y fundamentales en biología moléculas y la medicina de diagnóstico [Castagnino, 2000 y Cázares, 2009].

La EC es una poderosa herramienta analítica que produce separaciones rápidas y altamente eficientes con un mínimo de preparación y consumo de muestra; y aunque es predominantemente usada para el análisis de moléculas, recientemente ha posibilitado la separación, identificación y cuantificación de microorganismos [Armstrong, 2000 y Armstrong, 2001]. Además usando EC se pueden investigar las propiedades de las células microbianas con el fin de obtener información de la manera en que se comportan e interactúan con el medio ambiente. Las propiedades superficiales proporcionan información sobre la composición celular, sus puntos isoeléctricos, velocidad con la que captan nutrientes y fármacos antimicrobianos del medio [Desai, 2003 y Armstrong, 2001]. Usando dicha técnica podemos llevar a cabo un análisis de los hongos fitopatógenos y así obtener una identificación precisa y rápida para llevar a cabo un tratamiento que sea oportuno. Recientemente, se han estado haciendo estudios en los que se analizan conidias de *Trichoderma spp* mediante electroforesis capilar (Cázares, 2009; Avila, 2011; Salazar Alcántar, 2015 y Salazar González, 2015). Se ha observado la presencia de una señal que se piensa puede ser usada para caracterizar especies fúngicas, por lo que el análisis de este tipo de señales mediante EC se abordan en este trabajo.

OBJETIVO

Evaluar la factibilidad de usar a la Electroforesis Capilar como una técnica alternativa para la identificación de especies fúngicas.

2. MATERIALES Y METODOS

Materiales

Se utilizaron 4 diferentes medios de cultivo, PDA y MDA ambos de BD DIFCO®, el agar Sabouraud de BD DIFCO® y medio mínimo Vogel, que se utilizaron para la siembra de 13 cepas de 5 géneros distintos (*Fusarium*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Pochonia* y *Umbelopsis*) proporcionados por el Laboratorio de Conservación de Hongos del CMEB-FMVZ, UMSNH. Se utilizó un equipo de electroforesis capilar P/ACE™ MDQ Capillary Electrophoresis System Beckman Coulter® para llevar a cabo los corrimientos electroforéticos.

Medios de cultivo: Agar Papa Dextrosa (PDA Difco), Agar Sabouraud (BD BIOXON®), Agar Extracto de Malta (MDA, Difco) y Medio Mínimo Vogel.

Siembra de las cepas: Se colocó un bocado de 3 mm de diámetro en el centro de cada caja Petri. Las 13 cepas se sembraron en los cuatro medios de cultivo, todo esto se realizó en campana de flujo laminar y las cajas se mantuvieron en incubadora a 28°C. Se registró el tiempo en que tardan en aparecer las conidias.

Preparación de la muestra: Las conidias se recolectaron adicionando 1.5 mL de agua destilada estéril a la caja Petri, ladeándola para desprender las conidias. La suspensión de conidias se recolecto con pipeta Pasteur y se colocó en micro tubo, se agitó en Vortex y se centrifugó a 13300 rpm por 10 min. Se retiró el sobrenadante y se lavaron las conidias dos veces más con agua destilada esteril. Finalmente, las conidias se dejaron suspendidas en agua estéril por 24 h y se tomaron 400 μL del sobrenadante que se mezclaron con 200 μL de buffer de corrimiento, para su

posterior análisis por electroforesis capilar. Esta operación se repitió para el mismo día, a las 24 y 48 h.

Análisis por EC: Se usando un equipo de electroforesis capilar Beckman Coulter (P/ACE MDQ); el buffer de corrimiento consiste en PBS 10 mM a pH 6.3 y 6.8. La inyección es hidrodinámica a 20 psi por 5 seg, el voltaje es a -17 KV, la temperature se mantiene a 25°C. Se usa un capilar de sílice fundido de 50 cm Lt y 40 cm Ld con 100 μm d.i. La detección se realizó a 201 nm en DAD.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

Crecimiento y conidiación

Penicillium: creció y conidió más rápido en PDA y MDA.

Umbelopsis: creció y conidió más rápido en medio mínimo Vogel.

Pochonia: creció y conidió más rápido en PDA y Vogel.

Fusarium: creció y conidió más rápido en PDA y Vogel.

Pestalotiopsis: creció y conidió más rápido en PDA y MDA.

De los resultados en cuanto a crecimiento y conidiación podemos resaltar que de los 4 medios estudiados en los que se presenó mayor velocidad de crecimiento y conidiación fueron el MDA y el PDA, seguido del medio mínimo vogel tomándolo como una tercera opción.

Electroferogramas

En la Figura 1 se aprecian las señales obtenidas después del análisis por EC para el sobrenadante resultante de la suspensión de las conidias en agua. En todos los casos se está obteniendo una señal con un tiempo de migración entre 1.2 y 2.5 min, de formas variadas. Esto significa que el compuesto que se está analizando puede ser el mismo o tener características similares. Hay que resaltar que cada cepa produce la señal en un medio particular, mas no en todos y la forma es diferente.

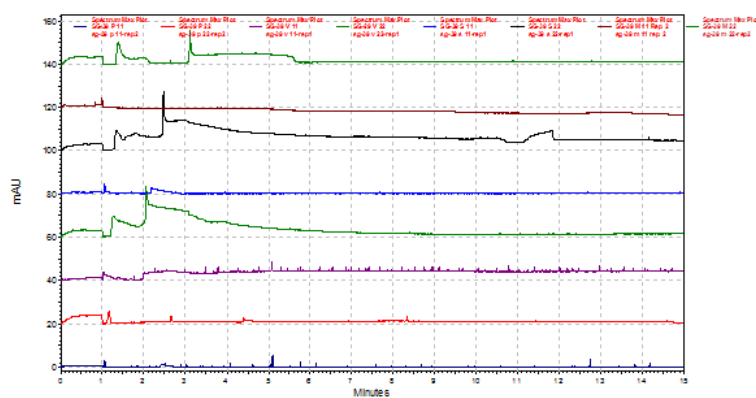


Figura 1. Electroferogramas que muestran las señales producidas por una suspensión de *Penicillium lilacionoechinulatum* a las 24 y 48 h de suspensión. Condiciones explicadas en el texto.

Después de revisar analizar las cepas, se encontró que las mejores condiciones en las que se puede encontrar una señal que se puede considerar característica es Buffer de fosfatos 10 mM pH 6.3, realizando el análisis después de que las conidias han permanecido en suspensión 48 h.

Hay que resaltar que este tipo de análisis no se han realizado de la manera estudiada en este trabajo. La EC se ha utilizado en el análisis de especies fúngicas, principalmente de levaduras y hay poca información sobre el análisis de hongos filamentosos, en las que se analizan sus conidias/esporas, mas no los productos que pudieran estar liberando en el medio.

4. CONCLUSIONES

Las señales obtenidas muestran que, bajo las condiciones de crecimiento y análisis de las diferentes cepas, la EC puede usarse como una técnica auxiliar en la identificación de especies fúngicas; sin embargo, se requiere realizar más trabajo para obtener mejores señales y hacerlas más específicas de género y/o especie fúngica.

BIBLIOGRAFIA

1. Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. 5^{ta} edición. Elsevier Academic Press. USA
2. Arauz Cavallini LP. 1998. Fitopatología un enfoque agroecológico, primera edición. Editorial de la universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
3. Armstrong DW, Schneiderheinze MJ, Kullman JP, He L. 2001. Rapid CE microbial assays for consumer products that contain active bacteria. FEMS Microbiology letters 194: 33-37.
4. Armstrong DW, He L. 2001. Determination of Cell Viability in Single or Mixed Samples Using Capillary Electrophoresis Laser-Induced Fluorescence Microfluidic Systems. Anal Chem 73: 4551-4557.
5. Desai MJ, Armstrong DW 2003. Separation, Identification and Characterization of Microorganisms by Capillary Electrophoresis. Microbiology and molecular biology revivs 67 (1): 38- 51
6. Castagnino JM. Electroforesis capilar. 2000. Bioquímica. 25 (1):13-32
7. Cázares García SV. 2009. Movilidad Electroforética de Células Fúngicas. Tesis de maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. México.

EFFECTO DE UN RECUBRIMIENTO DINÁMICO DEL CAPILAR SOBRE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA DE CONIDIAS DE *Trichoderma Spp.*

Christian J. Gallegos Nuñez¹, Ricardo Salazar González¹, Virginia A. Robinson Fuentes¹

¹ Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

RESUMEN

Los hongos filamentosos y sus conidias se encuentran en todo tipo de ambientes. La exposición a sus antígenos se asocia con efectos adversos para la salud: reacciones alérgicas e infecciones nosocomiales con alta tasa de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos; además pueden producir micotoxinas que contaminan alimentos. Debido a esto y a la sensibilidad variable a los agentes antifúngicos, la detección temprana y la correcta identificación de estos microorganismos es importante (Horká et al. 2009). La electroforesis capilar es una técnica de separación que se basa en la velocidad de migración de los analitos al ser sometidos a la acción de un campo eléctrico. Dicha velocidad depende de dos factores: La relación masa/carga de las especies y el flujo electroosmótico. Un recubrimiento dinámico de la pared interna del capilar disminuye la adsorción de los microorganismos al mismo y, dependiendo de su naturaleza, puede invertir o detener el FEO modificando la movilidad electroforética de los analitos (Petr and Maier 2012). Se ensayó el efecto de utilizar un recubrimiento de la pared interna del capilar, polímero (PEO) y un surfactante catiónico, sobre la movilidad electroforética de conidias de *Trichoderma spp.*, logrando agrupar las células bajo las condiciones probadas, arrojando señales estrechas y definidas que permite la posibilidad de desarrollar un método mediante EC para la identificación y cuantificación de especies fúngicas de diversos orígenes.

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos filamentosos y sus conidias se encuentran en todo tipo de ambientes, tanto al aire libre como en interiores. La exposición a sus antígenos se asocia con una amplia gama de efectos adversos para la salud, desde la génesis de reacciones alérgicas hasta infecciones nosocomiales con una alta tasa de mortalidad, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. Además, los hongos filamentosos microscópicos son capaces de producir micotoxinas que contaminan alimentos y representan un grave riesgo para los seres humanos, principalmente debido a su efecto carcinogénico. Debido a esto y a la sensibilidad variable a los agentes antifúngicos de estos patógenos, la detección temprana y la correcta identificación de los mismos es importante (Horká et al. 2009).

El método estándar para su identificación y clasificación sigue basándose en la morfología (cuerpo fructífero, forma de las esporas, color, medidas, disposición de hifas, etc.), ya que los hongos filamentosos tienen morfologías más distintivas que, por ejemplo, las bacterias unicelulares y levaduras. Sin embargo, implican el crecimiento del agente contaminante en un medio de cultivo, y por lo tanto involucran largos tiempos de análisis. Otros enfoques, como la hibridación, amplificación, y el inmunoensayo, requieren tiempos de análisis considerablemente más cortos, pero son técnicas muy complejas de llevar a cabo, requiriendo además, de contar con personal altamente capacitado. En los últimos años, técnicas instrumentales sofisticadas para el análisis y caracterización de microorganismos se han convertido en las más comunes. En particular, los métodos basados en electroforesis capilar (EC) lucen muy prometedores al ser bien conocidos por

sus análisis rápidos, de alto rendimiento y menor consumo de la muestra (Horká et al. 2009; Bao 2008).

En contraste con las bacterias, las paredes celulares de los hongos y las esporas se componen principalmente de diferentes polisacáridos (80-90%), incluyendo la quitina que mantiene la rigidez y la estabilidad estructural de las células, y β - α -glucanos, aunque también están presentes péptidos, proteínas, lípidos, polifosfatos y los iones inorgánicos. Dichos elementos le confieren ciertas propiedades fisicoquímicas a cada tipo de especie, y ante determinadas condiciones, una carga eléctrica diferente. Debido a lo anterior, la electroforesis capilar surge como una técnica de separación que puede aprovechar las propiedades de la pared celular para la distinción, caracterización, identificación y cuantificación de diferentes especies de hongos, debido a sus ventajas y propiedades tales como, alta eficiencia, selectividad y rapidez de los tiempos de análisis (Horká et al. 2009; Horká et al. 2012; Girod and Armstrong 2002). Sin embargo, en el análisis de conidias hidrófobas de hongos filamentosos por EC, se pueden esperar algunas dificultades tales como, la agregación entre las mismas y con los aditivos en la solución buffer, su adsorción en la pared del capilar y la sensibilidad de la detección. El estudiar las características de las conidias nos permite entender cómo es que se agrupan entre ellas y se adhieren a diferentes superficies, aprovechando dichas propiedades para lograr un análisis sensible (Horká et al. 2009).

La electroforesis capilar (EC) es una técnica analítica que permite la separación y cuantificación de una amplia gama de analitos que se basa en la migración diferencial de las partículas cargadas, es decir, el movimiento o desplazamiento que estas presentan al ser sometidas a la acción de un campo eléctrico (Castagnino 1999; Chopin 2002; Valverde 2002; Simonet et al. 2008; Magaña et al. 2009; Sósol et al. 2012). La superficie de la pared interna de los capilares usados en esta técnica contiene grupos silanol cargados negativamente que usualmente pueden causar adsorción de diversas partículas biológicas. Dado que la superficie de los microorganismos es bastante heterogénea está claro que la adsorción puede ocurrir. En la actualidad, dos de las maneras conocidas para prevenir el efecto de adsorción en el análisis de microorganismos por EC son el uso del agente de recubrimiento dinámico óxido de polietileno (PEO) y el uso de un recubrimiento catiónico que invierte el Flujo Electroosnótico (EOF) (Petr et al. 2009).

El PEO ha sido utilizado en EC como recubrimiento con el propósito de modificar el EOF. Estudios anteriores han demostrado que una solución diluida de polímero es necesaria para lograr el agrupamiento de la muestra y separaciones de alta eficiencia de microorganismos en EC. La adición de polímero en el proceso de separación influye de tres maneras: Disminuye el EOF, hace que los microorganismos, bajo un campo eléctrico aplicado, se agrupen de una manera eficiente, y provoca que el tiempo de migración de los mismos se incremente a un grado mayor (Girod and Armstrong 2002).

El segundo enfoque usa el recubrimiento dinámico del capilar basado en surfactantes catiónicos en el que se invierte el EOF y se busca la preconcentración “on-line” de los microorganismos. En general, se sabe que las moléculas de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) recubren la superficie de sílice mediante interacciones electrostáticas resultando en la superficie del capilar cargada negativamente, lo que permite invertir el EOF. Bajo estas condiciones, aparentemente las células se moverán como aniones desde el cátodo al ánodo usando polaridad inversa e invirtiendo el EOF. Además, al usar CTAB se observa una alta tendencia a que las conidias formen agregados debido a que las moléculas del CTAB afectan la doble capa eléctrica que se encuentra alrededor de células negativas (Petr et al. 2009).

OBJETIVO

Determinar la influencia de agentes que forman un recubrimiento dinámico en la movilidad electroforética de conidias de *Trichoderma spp.*

2. PARTE EXPERIMENTAL

Buffers: MOPS, HEPES, y Tricina, con valores de pH alrededor de su pKa en su máxima capacidad de amortiguamiento 10mM. Recubrimiento dinámico de la pared interna del capilar: Surfactante catiónico (CTAB) y óxido de polietileno (PEO). Medio de cultivo: Agar mínimo Vogel. Instrumentación: Equipo BECKMAN COULTER P/ACETM MDQ Capillary Electrophoresis System Beckman Coulter®, capilar de sílice fundida, d.i de 100µm, 50 cm de Lt y 40 cm de Ld, detector de arreglo de diodos con una λ de 201 y temperatura controlada de 25°C. Material Biológico: Cepa de referencia *Trichoderma atroviride* IMI-206040 proveniente del Cepario Michoacano Universitario perteneciente al Laboratorio de Conservación y Biotecnología de Microorganismos del CMEB. El volumen de inyección de muestra con el que se trabajó fue de 95nL, inyectando en promedio una concentración de 12.8×10^3 conidias/ µL.

Se realizó el cultivo de la cepa de *Trichoderma* en el agar Vogel incubándolo a 28°C y provocando un daño mecánico a las 72 h para estimular la conidiación. A las 120 h se llevó a cabo la obtención de las conidias agregando 10 mL de agua destilada estéril y frotando la superficie del micelio con una espátula con la finalidad de desprender las conidias. La solución obtenida se colocó en micro tubos estériles de 1.5 mL, se adicionó 1 mL de H₂O destilada estéril a cada tubo y se agitaron en un Vortex (ICA MS1 Minishaker®) durante 5 min para dispersar las células y evitar agregados. Se llevaron a cabo 3 lavados a las conidias con el fin de obtener conidias libres de micelio y medio de cultivo. Las conidias se resuspenden en el buffer de corrimiento con una dilución 1:10 bajo condiciones estériles; posteriormente se sonicaron (Branson 1510) durante 10 minutos para eliminar las burbujas presentes en la suspensión y finalmente se colocaron 400 µL de la muestra en viales especiales para llevar a cabo el análisis electroforético.

3. RESULTADOS

En el presente estudio se verificó el efecto de utilizar un capilar sin y con un recubrimiento dinámico de la pared interna del mismo. En la fig 1a. Se puede observar que al no utilizar ningún tipo de recubrimiento, las conidias se agrupan en un solo pico, pero las señales que se obtienen no se encuentran completamente definidas. Por otro lado, la fig 2. muestra que al utilizar PEO en el sistema las conidias se agrupan eficientemente y las señales presentan un incremento considerable en la definición, producto de una ionización más uniforme de la pared celular.

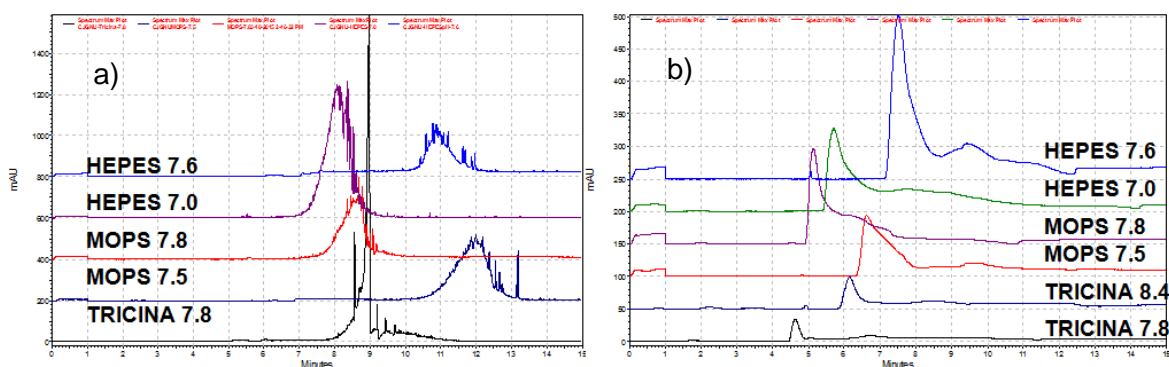


Figura 1. Comparación de las señales de *Trichoderma atroviride* IMI-206040 utilizando diversos BGE, sin y con la utilización de PEO. **a)** Sin recubrimiento del capilar con PEO 0.125%, polaridad normal. **b)** Con recubrimiento del capilar con PEO 0.125%, polaridad inversa.

Aunado a lo anterior, el haber realizado los ensayos con PEO permitió confirmar que, en efecto, las conidias presentan una carga neta negativa, puesto que si se adiciona el polímero al sistema, el EOF disminuye, y estas solo migran de acuerdo a la movilidad electroforética. Es decir que bajo esta premisa, si se trabaja en polaridad normal, en la que los analitos se desplazan desde el polo positivo al negativo, solo migraran aquellos con carga positiva; y si por otro lado, se utiliza polaridad inversa, en la que las especies migran desde el polo negativo hacia el positivo, solo serán detectadas aquellas que presenten carga neta negativa. Las pruebas que se realizaron utilizando PEO en polaridad normal no arrojaron señal alguna, indicando que la carga de las conidias no les permitió ser detectadas bajo estas condiciones, sin embargo al utilizar polaridad inversa se obtuvieron señales más definidas y estrechas que al utilizar solo buffer.

Con lo que respecta al uso del surfactante catiónico CTAB, este sistema se enfoca en invertir el EOF, el cual recubre los grupos silanol de la pared del capilar, generando que su superficie quede cargada positivamente y la doble capa eléctrica se forme a partir de los aniones de la solución circundante, y no de los cationes, como es normal cuando no se adicionan surfactantes al sistema. Esto provoca que el EOF se lleve a cabo desde el polo negativo al positivo utilizando polaridad inversa. Además de lo anterior, el efecto de adicionar CTAB a la muestra en una concentración por encima de su concentración micelar crítica, provoca la formación de micelas, que mediante la interacción diferencial de éstas con las conidias modifica la carga neta de las células fúngicas y su agrupación en agregados conidia-surfactante. El resultado neto es la inversión del EOF y la formación de micelas que agrupan las conidias con base en su afinidad con las mismas.

Las conidias se distribuyen entre la fase micelar y la fase acuosa del buffer de corrimiento en diferente extensión. Mientras la interacción de las células con la micela sea mayor, mayor será su tiempo de migración, puesto que la micela migra solo como consecuencia del EOF; en cambio, cuando no están en contacto con la micela, son transportadas por el EOF y la relación masa/carga.

Es decir, una micelia individual migra debido al EOF, una conidia como consecuencia del EOF y de la movilidad electroforética, y los agregados de surfactantes con conidias en función de la carga prioritaria.

Ésta condición propició una señal que agrupo las conidias casi en su totalidad, estrecha, definida y simétrica. Sin embargo, la línea base presenta ruido, lo que podría explicarse por una distribución no uniforme de las conidias entre la fase micelar y la acuosa, que resultó en que algunas de ellas se agruparan y migraran con las micelas, y otras individualmente como consecuencia del EOF y la relación masa/carga (figura 2).

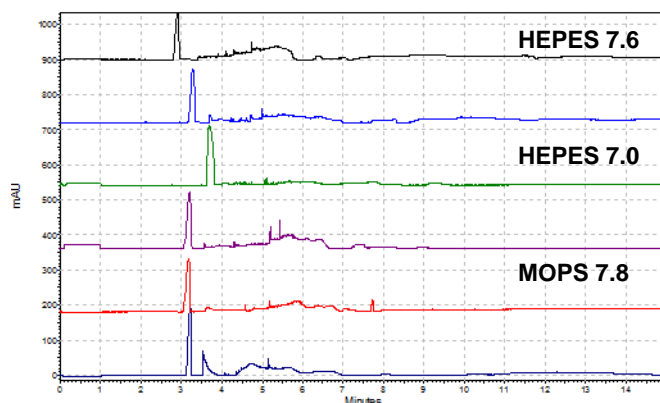


Figura 2. Señales electroforéticas de conidias de *Trichoderma atroviride* IMI-206040 utilizando diversos buffers de corrimiento, CTAB 15mM como recubrimiento (adicionado en el BGE), CTAB 15mM adicionado en muestra, y polaridad inversa.

4. CONCLUSIONES

El uso tanto del PEO como del CTAB como agentes de recubrimiento de la pared interna del capilar, arroja señales más estrechas y definidas que cuando no se utilizan en el sistema, lo que contribuye al desarrollo de una metodología para la identificación y cuantificación de células fúngicas por electroforesis capilar.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bao Y, Lantz AW, Crank JA, Huang J, Armstrong DW. The use of cationic surfactants and ionic liquids in the detection of microbial contamination by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2008; 29: 2587-2592.
2. Castagnino JM. Electroforesis capilar. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 199; 33(3):297-329.
3. Chopin M. Principios básicos de electroforesis capilar: técnica analítica de separación de analitos. *Tecnología en salud*. 2012; 1(2):86-89
4. Girod M and Armstrong DW. Monitoring the migration behavior of living microorganisms in capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection with a charged-coupled device imaging system. *Electrophoresis*. 2002; 23:2048-2056.
5. Horká M, Růžička F, Kubesová A, Holá V and Štais K. Capillary Electrophoresis of *Conidia* form Cultivated Microscopic Filamentous Fungi. *Analytical Chemistry*. 2009; 81 (10) 3997-4004.
6. Horká M, Kubesová A, Šaplachta J, Zapletová E, Horký J, and Šlais K. Capillary and gel electromigration techniques and MALDI-TOF MS- Suitable tools for identification of filamentous fungi. *Analytica Chimica Acta*. 2012; 716: 155-162.
7. Magaña JJ, Arenas ML, Gómez R. La electroforesis capilar como una nueva estrategia en la medicina y el diagnóstico clínico. *Revista Médica Chile*. 2009; 137: 946-956.
8. Simonet BM, Ríos A, Valcárcel M. Capillary Electrophoresis Separation of Microorganisms. From: *Methods in Molecular Biology*. Capillary Electrophoresis. Edited by: P. Schmitt-Kopplin Humana Press Inc. Totowa, NJ. 2008. 384: 569-590.
9. Sósol RE, Marín VM, Rosales E y Lapizco BH. 2012. Análisis de células en dispositivos microfluídicos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2012; 2(2): 227-248.
10. Petr J, Ryparová O, Ranc V, Hinnerová P, Znaleziuna J, Kowalska M, Knob R, Maier V, Frébort I, Lemr K, and Ševčík. Assessment of CE for the identification of microorganisms. *Electrophoresis*. 2009, 30, 444-449.
11. Petr J, Maier V. Analysis of microorganisms by capillary electrophoresis. *Trends in Analytical Chemistry*. 2012; 31:9-22.
12. Valverde I. Desarrollo de nuevas metodologías analíticas mediante electroforesis capilar. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. 2002.

BIOSÍNTESIS DE NANOMATERIALES ANTIMICROBIANOS DE AGCL-AG MEDIANTE EXTRACTO ACUOSO DE ZARZAMORA

R. Ángeles Sierra¹, J.J. Manríquez-Torres², M.A. Flores-González¹, M.A. Hernández-Pérez³, P.N. Olivera-Venegas¹, M. Villanueva-Ibáñez¹

¹Universidad Politécnica de Pachuca, Laboratorio de Nanotecnología y Bioelectromagnetismo Aplicado. ²Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. ³Instituto Politécnico Nacional, Depto. de Ingeniería en Metalurgia y Materiales-ESIQIE.

RESUMEN

Las nanopartículas (NPs) de AgCl y Ag-AgCl poseen potenciales aplicaciones en optoelectrónica, catálisis, así como desinfectantes. Una opción cada vez más estudiada para su obtención es el uso de extractos de plantas como medio reductor dando lugar a un proceso ecoamigable. En este proyecto se propone el uso del fruto de zarzamora dado su contenido de antioxidantes que pueden fungir como agentes reductores, así como su contenido de cloro que facilitará la formación de las NPs de interés. El objetivo principal del proyecto es la obtención mediante este extracto, de nanopartículas de AgCl-Ag con propiedades antimicrobianas. Se evaluaron dos formas de secado del extracto, liofilización y secado al aire. Se llevaron a cabo biosíntesis con ambos extractos variando el volumen adicionado de los mismos y monitoreando la evolución de la formación de las NPs mediante UV-vis. Mediante técnicas complementarias se caracterizaron las NPs para posteriormente evaluar su actividad antimicrobiana. Los resultados indicaron las bandas de absorción UV-vis características de AgCl-Ag obtenidas mediante ambos extractos. Se obtuvieron agregados de partículas de AgCl-Ag con una moda superior a 100 nm; sin embargo, estas partículas presentaron inhibición en bacterias modelo gram positivo y gram negativo. Finalmente, se observa que el extracto liofilizado no cambió su capacidad reductora al ser sometido al método de conservación, lo que favorece el uso del extracto en cualquier momento sin riesgo a ser contaminado. El contenido de antioxidantes en el extracto, así como de cloro, favoreció la formación de estas NPs.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la nanociencia y la nanotecnología se hacen presentes en la vida cotidiana debido a que los materiales que son usados a diario por el ser humano, tales como accesorios, autos, ropa y aparatos médicos, son beneficiados por el uso de productos derivados de estas tecnologías, como las nanopartículas metálicas [1]. La mayoría de estos nanomateriales se obtienen por métodos químicos que como es sabido, presentan ciertos inconvenientes entre los que destacan el recubrimiento de residuos de compuestos químicos en la superficie de las nanopartículas que limita sus aplicaciones en dominios como la medicina.

Por tal razón se están desarrollando nuevos métodos de obtención como los métodos biológicos, que prometen ser ecoamigables dando productos biocompatibles; así mismo, permiten aprovechar recursos naturales como algunos residuos agroindustriales o plantas que ya no serán utilizadas por el ser humano al llegar al final de su vida útil en anaquel [2]. Recientemente, la síntesis de nanopartículas de AgCl y AgCl-Ag ha llamado la atención dado que pueden ser empleadas en

optoelectrónica, catálisis, electrónica, así como desinfectantes, por lo que se consideran potencialmente aplicables como antimicrobianos. La síntesis de nanopartículas de Ag y AgCl se basa en métodos físicos, químicos y biológicos.

Actualmente, las AgNPs son obtenidas por cualquiera de estos tres métodos, destacando los biológicos en los que es posible usar microorganismos o plantas. De esta forma, en este proyecto se plantea una ruta biotecnológica mediante el uso del extracto de plantas como agentes reductores de los iones del metal de interés. Se propone el uso del fruto de zarzamora ya que al ser muy delicado no suele ser comercializado cuando se ha maltratado durante su transporte o manipulación por lo que se pretende dar un valor agregado a este fruto al obtener productos de interés tecnológico como las nanopartículas de AgCl y AgCl-Ag, aunado a lo anterior, el extracto de zarzamora puede ser adecuado para la formación de estas NPs dado que en su composición presenta alto contenido en cloro. Una vez que se han determinado las mejores condiciones de obtención de las nanopartículas éstas serán evaluadas por técnicas complementarias de análisis que proporcionen información sobre sus características estructurales y morfológicas. Finalmente, se realizarán ensayos biológicos mediante pruebas por difusión en disco para observar su actividad antibacteriana.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Obtención de extracto. El fruto de zarzamora fue adquirido en la central de abastos de la localidad, el extracto se obtuvo mediante la trituration del fruto en mortero de ágata con agua y cuidando de no dañar las semillas del fruto y se lleva a un volumen final de 20 mL. Este extracto se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos para retirar exceso de materia orgánica y posteriormente se filtró al vacío con membranas de 0.45 μm y 0.2 μm . De acuerdo a las necesidades experimentales, el extracto pudo ser usado directamente, secado bajo flujo de aire a temperatura ambiente o se sometió a un proceso de liofilizado.

Biosíntesis de AgCl-AgNPs. Se determinó el volumen de extracto necesario para la obtención de las partículas. La variación del volumen se realizó en un intervalo de 3 a 7 mL de extracto acuoso de zarzamora adicionando a una solución de AgNO_3 cuya concentración final fue 1mM. Se monitorearon los experimentos durante 4 horas mediante la adquisición de espectros UV-vis que mostraron la absorción característica de las nanopartículas de AgCl-Ag.

Al término de 4h se determinó el tamaño de NPs por medio de granulometría láser. Los viales que contienen las AgCl-AgNPs se protegen de la luz al ser fotosensibles y se conservan en refrigeración para posteriores análisis. De igual forma se realizaron experimentos con el extracto liofilizado. Las características de interés de estudio en las nanopartículas obtenidas son principalmente el tamaño, la morfología, estructura y composición, de tal modo que se emplean técnicas analíticas complementarias como granulometría láser, espectroscopia de absorción UV-vis, Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) - EDS y Difracción de Rayos X (DRX).

Ensayos para determinar actividad antibacteriana. Los ensayos de actividad antibacteriana se desarrollaron conforme al método de difusión por disco (o método Kirby-Bauer). El microorganismo a investigar se inocula en una o varias placas de agar y sobre su superficie se disponen los discos de papel filtro embebidos con las muestras a analizar. Se incuban las placas durante 16-24 horas y se estudia el crecimiento en ellas mediante valoración del diámetro de la zona de inhibición que se forma alrededor de cada disco. En la figura 1 se muestra la técnica realizada.

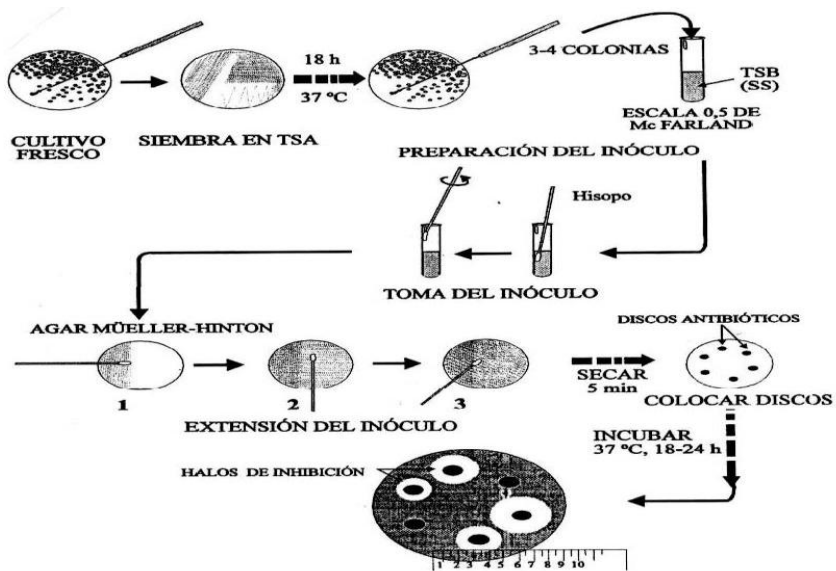


Figura 1. Desarrollo de antibiogramas (Forbes, 2009)

3. RESULTADOS

Dado su contenido en cloro, en el presente proyecto se exploró el uso del extracto acuoso del fruto zarzamora para la formación de nanopartículas de AgCl y AgCl-Ag. En primera instancia se obtuvo el extracto por medio de trituración con agua a temperatura ambiente (~25°C). La trituración por mortero ayudó a no dañar las semillas del fruto y evitar mezclar su mucílago en el extracto lo que podría afectar directamente a la síntesis. En la figura 2 se muestra el aspecto que presentó el extracto después de ser filtrado y que fue usado directamente en la síntesis de AgCl-AgNPs, a este extracto se le denominó Extracto Fresco.



Figura 2. Aspecto del extracto acuoso del fruto de zarzamora después de filtración, posee el color característico del fruto.

Para corroborar el contenido en cloro del extracto, se secó y se realizó análisis de composición elemental mediante MEB- EDS, en donde se identificó la presencia de un bajo contenido de cloro (Figura 3), tal y como lo señala (Rodríguez, Guzmán, & Andrade, 2010). Esta cantidad de cloro permitirá obtener NPs AgCl-Ag.

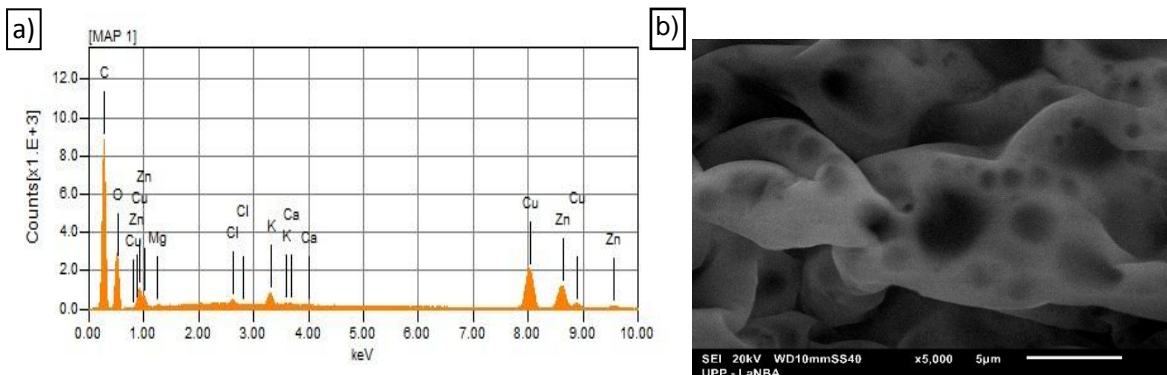


Figura 3. Análisis en MEB a) EDS para determinación de elementos presentes en el extracto, se identificó la presencia de cloro, b) aspecto de la morfología del extracto seco.

Tanto el extracto fresco como el liofilizado fueron caracterizados cualitativamente en una marcha fitoquímica. En la Tabla 1 se muestran los resultados para ambos extractos y se puede apreciar la presencia de azúcares reductores, carbohidratos, flavonoides, saponinas, taninos y lactonas, todos estos compuestos poseen grupos funcionales con pares de electrones de no enlace y que pueden fungir como agentes reductores o estabilizantes de las partículas. De esta forma, los ensayos realizados indican que tanto el extracto natural (EX) como el extracto liofilizado (EX.LF) presentan los mismos compuestos, pudiendo observar que el proceso de liofilización no afecta a los metabolitos extraídos de esta forma y en principio no afectará en la obtención de las NPs. La intención de usar un extracto liofilizado es poder establecer posteriormente un protocolo que permita tener mayor reproducibilidad en los productos de biosíntesis, por lo que este método de conservación no modificará los compuestos contenidos en el extracto.

Tabla 1. Marcha fitoquímica de los extractos utilizados en la biosíntesis						
Metabolitos secundarios / Extracto	Azúcares reductores	Carbohidratos	Flavonoides	Saponinas	Taninos	Lactonas
EX	+	+	+	+	+	+
EX.LF	+	+	+	+	+	+

Ex – Extracto fresco, EX.LF – Extracto liofilizado

A continuación se realizaron experimentos sobre la biosíntesis de AgCl-AgNPs para determinar el volumen que permite la obtención de tamaños de partícula más pequeños. La Figura 4 muestra los espectros de absorción UV-vis de las síntesis realizadas con diferentes volúmenes de extracto, los espectros se registraron a dos tiempos de reacción, 0.5 y 4 h. Se puede apreciar que a 0.5 h la banda registrada presenta baja intensidad de absorción centrada a aproximadamente 520 nm; en cambio a 4 h la intensidad es considerablemente mayor y se ubica a 430 nm, asignado a la absorción de las AgNPs. Kim y col, 2010, indicaron que las bandas de absorción de nanocubos de

AgCl, obtenidos por un método químico, se encuentran ubicadas en 380 y 537nm. A diferencia de lo reportado por Villanueva y col., 2015, que indica que en un medio biológico solo identificaron la banda de absorción característica de AgCl a 380 nm. Es de resaltar que en este proyecto, mediante la biosíntesis con el extracto del fruto de zarzamora se ha identificado principalmente a 520 nm, como Kim y col. 2010, reportaron por método químico. Este resultado motiva a continuar realizando análisis y experimentos complementarios para explicar la diferencia que existe con los métodos biológicos ya reportados.

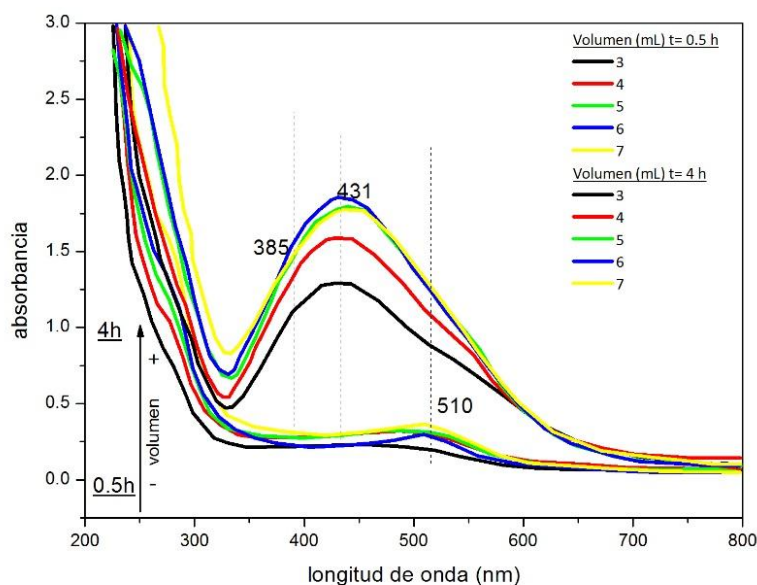


Figura 4. Espectros de absorción UV-vis de la síntesis de AgCl- AgNPs con extracto de zarzamora. Comparación de tiempos de reacción de 0.5 y 4 h. El máximo de la banda de absorción de estas partículas se encuentra ubicada en 520 nm.

En la figura 5 se presentan las distribuciones del tamaño de partícula para cada muestra obtenida con diferentes volúmenes de extracto adicionado. En todos los volúmenes estudiados el comportamiento en la distribución de los tamaños es similar, esto es, se observan dos distribuciones de tamaño, a excepción de la síntesis obtenida con el volumen de 4 mL de extracto, con una sola distribución y moda superior a 200 nm. Con estos resultados, el menor tamaño obtenido en estas pruebas tuvo una moda de 157 nm y dado el comportamiento de las distribuciones del tamaño de partícula, se consideró que para seleccionar el volumen a emplear se tomarían ambos criterios, banda de UV-vis y distribución de tamaños. De tal forma que se elige el menor volumen usado en la biosíntesis que presente mayor intensidad de absorción (5mL).

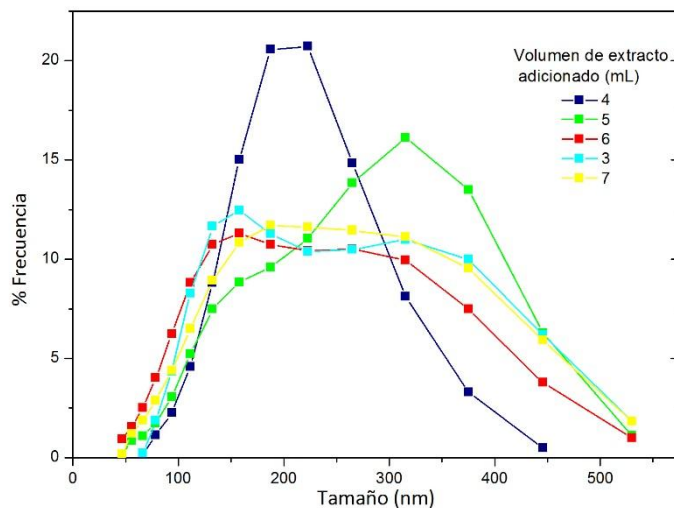


Figura 5. Distribuciones de tamaño de partícula obtenidas con diferente volumen de extracto EX.

Una vez definido el volumen, se realizaron síntesis con ambos extractos EX y EX.LF para obtener las AgCl-AgNPs y probar su actividad antimicrobiana contra las cepas de bacterias gram negativa y gram positiva. En la figura 6 se presentan las granulometrías de las muestras que se sometieron a proceso de separación previo mediante centrifugación para retirar las partículas más grandes y trabajar los antibiogramas con el denominado Sobrenadante. Se esperaba que los tamaños fueran más pequeños en el sobrenadante pero los tamaños son similares a aquellos que no se sometieron al proceso de separación. Lo anterior podría deberse a que la carga superficial de las partículas propicia nuevamente su aglomeración. Se encuentra en curso de caracterización la carga superficial de las partículas para poder explicar este comportamiento.

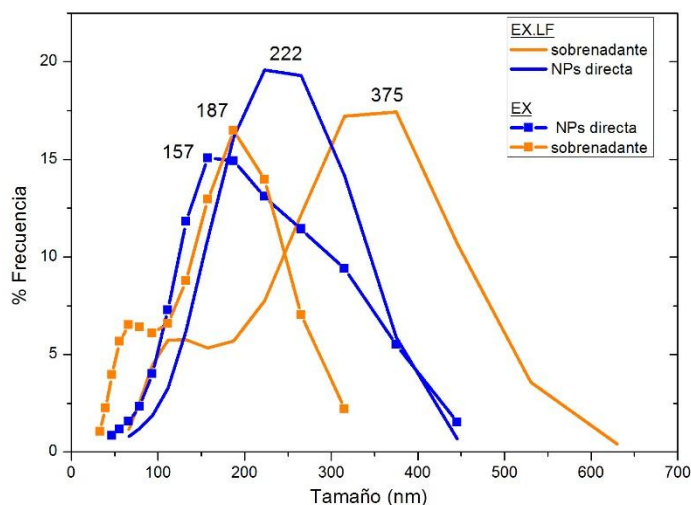


Figura 6. Granulometría de síntesis obtenidas mediante extracto natural no liofilizado (EX) y extracto liofilizado (EX.LF).

Villanueva y col. 2015, indicaron que las nanopartículas de AgCl que obtuvieron con extracto acuoso de perfollo de maíz presentan actividad antimicrobiana. En la tabla 4 se reporta el diámetro del halo de inhibición bacteriana con las NPs obtenidas con diferente extracto (EX y EX.LF). En ambos casos se presenta inhibición que en relación con nanopartículas de Ag comerciales, es mayor. Existen determinados factores que influyen en la actividad antibacteriana como el tamaño de partícula y las características superficiales de la misma, de tal modo que una perspectiva es realizar detalladamente análisis por microscopía electrónica de barrido para obtener mayor información de estas NPs.

Tabla 2: Resultados de actividad bacteriana (medición del diámetro del halo de inhibición, mm)

	Bacterias	Extracto	NPs síntesis directa	Sobrenadante	NPs comerciales
EX.LF	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	±3	±3	±1
	<i>Escherichia coli</i>	0	±4	±4	±3
EX	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	±	±3	0
	<i>Escherichia coli</i>	0	±3	±3	±1

Ex – Extracto fresco, EX.LF – Extracto liofilizado

4. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha demostrado que tanto el extracto acuoso del fruto de zarzamora como el extracto liofilizado contienen los metabolitos secundarios necesarios para propiciar la formación de las NPs de AgCl-Ag. La liofilización no modifica apreciablemente las propiedades del extracto por lo que puede ser una buena estrategia de conservación del mismo para aplicarlo cuando sea requerido. Las AgCl-Ag NPs tuvieron con una moda de tamaño de partícula de 157 nm para el extracto fresco y para el liofilizado de 222 nm. Las partículas obtenidas presentan un mayor halo de inhibición bacteriana que AgNPs comerciales frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Forbes, B. W. (2009). Métodos y estrategias de laboratorio para las pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Diagnóstico microbiológico, 187-200.
2. L, i., & C.A, I. (1998). susceptibilidad a los agentes antimicrobianos. Barcelona : Reverté,S.A.
3. Kim, S., Chung, H., Kwon, J., & Gyun, H. (2010). Facile Synthesis of Silver Chloride Nanocubes and Their Derivatives. Bull. Korean Chem. Soc, 5.
4. Li, M., Yu, H., & Huang, r. (2013). Facile one-pot synthesis of flower-like AgCl microstructures and enhancing of visible light photocatalysis. NANO EXPRESS, 6.
5. Rodríguez, M., Guzmán, S., & Andrade, E. (2010). Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y funcionales de jugo obtenidos mediante tratamiento enzimático en zarzamora comercial (*Rubus spp.*) del estado de Michoacán. 20.
6. Stalin, T., Ganesh, V., & Karthick, V. (2014). Facile synthesis of silver chloride nanoparticles using marine alga and its antibacterial efficacy. Spectrochimica Acta Part A:, 5.
7. Villanueva, M., Yañes, M., & Álvarez, R. (2015). Aqueous corn husk extract – mediated green synthesis of AgCl. Materials letters, 4.
8. Yin , Z., Hua, M., & Ting , L. (2015). Tribulus terrestris leaf extract assisted green synthesis and gas sensing properties of Ag-coated ZnO nanoparticles. Materials Letters, 4.

PROPIEDADES DE LA GOMA DE MEZQUITE PARA SU USO EN DIFERENTES SISTEMAS ALIMENTICIOS

Luis Gerardo Martínez Juárez¹ y Laura Araceli López Martínez¹

¹Coordinación Académica Región Altiplano Oeste (CARAO), de la UASLP.

RESUMEN

Los árboles de mezquite excretan una goma, que es una mezcla de polisacáridos y glicoproteínas altamente ramificada, esta goma en solución tiene la capacidad de reducir la tensión superficial de la solución y actuar como estabilizante y emulsificante¹. Las gomas en general en base a su composición y al sistema alimenticio en el que se encuentren (pH, temperatura y carga eléctrica), varían sus funciones y por lo tanto la capacidad de controlar o mejorar la calidad global del producto. En este estudio se evaluó de manera visual y mediante agitación manual mezclas de 50% de aceite en 50% agua, aceite y agua puros, con diferentes concentraciones de goma de mezquite para evaluar su capacidad espesante y emulsificante, así como aceite con altas concentraciones de goma para evaluar su poder gelante. Como resultados se obtuvo que por sí misma la goma de mezquite no presentó propiedades gelantes en aceite pero sí en agua y en las mezclas de agua y aceite, además de que a bajas concentraciones en estos mismos sistemas su capacidad espesante es alta. Sin embargo cuando la goma de mezquite se mezcla con cera de candelilla y monoglicéridos sí logra formar geles en aceite. Este estudio muestra que la goma de mezquite tiene la capacidad de actuar como espesante además da las bases para realizar estudios más elaborados y poder especificar en qué alimentos es posible utilizarla. Este estudio es también con el fin de utilizar los recursos poco explotados (ej. Goma de mezquite) de la zona Altiplano para fomentar el desarrollo económico.

1. INTRODUCCIÓN

El mezquite es un recurso natural del género *Prosopis* de la familia *Fabaceae*. En México se encuentran diez especies de ese género y es importante por el papel que desempeña dentro del ecosistema de las zonas áridas². Bajo condiciones de estrés, los árboles de mezquite excretan una goma, que es una mezcla de polisacáridos y glicoproteínas altamente ramificada, en el centro está compuesto por residuos de $\beta(1 - 3)$ D-galactosa, a la que oligosacáridos de diferentes tamaños se unen, predominantemente D-galactosa y L-arabinosa y proporciones menores de D-glucuronato, 4-O-metil-D-glucuronato y L-ramnosa. También contiene aproximadamente el 4% de contenido proteico. Por lo anterior la goma de mezquite se puede considerar un proteoglicano arabinogalactano (AGP)¹. En solución forma una estructura globular, por lo que es altamente soluble en agua y tiene la capacidad de reducir la tensión superficial de la solución y actuar como estabilizante y emulsificante sin un incremento significativo en la viscosidad³. Además de la goma de mezquite otras gomas exudadas por árboles son la karaya, arábica y tragacanto.

En base a la composición de la goma y a la sistema alimenticio en el que se encuentren (pH, temperatura, carga eléctrica y fuerza iónica), las gomas varían sus funciones (emulsificantes, estabilizantes, espesantes, gelificantes y formadoras de cuerpo) y por lo tanto la capacidad de controlar o mejorar las propiedades reológicas o de textura de los alimentos, la retención de humedad así como mantener la calidad global del producto⁴. Por lo anterior cada goma tiene

aplicaciones distintas. La goma karaya provee de mayor viscosidad cuando se prepara en agua fría y se disminuye a pH alcalinos, tiene la capacidad de ligar agua y se usa en la preparación de helados, con la finalidad de prevenir la formación de grandes cristales de hielo y la pérdida de agua libre. La goma arábica, que es un polímero heterogéneo capaz de disolverse en agua fría o caliente, se utiliza en la preparación de dulces, con la finalidad de retardar la cristalización del azúcar y promover la emulsificación, en los saborizantes se usa como fijador y encapsulante para evitar la oxidación y volatilización de los componentes, mientras que en la elaboración de la cerveza promueve la estabilización de la espuma debido a su componente proteico, es usada también como emulsionante y estabilizante en emulsiones de bebidas no alcohólicas⁵. La goma de mezquite posee propiedades similares a la goma arábica, sin embargo actualmente no existe mucho estudio de la goma de mezquite y de sus aplicaciones⁶.

Se han elaborado también emulsiones de aceite esencial obtenido de la flor de cempasúchil en agua y como emulsificante goma de mezquite (*Prosopis julifloru*), goma arábica (*Acacia senegal*) o sus mezclas, ellos encontraron que las emulsiones fueron estable a la coalescencia a diferentes pH, especialmente a pH 3, 5 y 7, además de que la goma de mezquite da mayor estabilidad contra la coalescencia que la goma arábica en especial se observa un efecto sinérgico cuando se usan mezclas⁷. Por otro lado, también se ha probado la capacidad encapsulante para el aceite esencial de naranja mediante maltodextrina y goma de mezquite y observaron que la emulsificación del aceite únicamente con las maltodextrinas fue muy bajo pero cuando se mezcló goma de mezquite se elevó abruptamente la emulsificación⁸. También se ha logrado formar exitosamente microcapsulas de aceite esencial de Cardamomo con goma de mezquite evitando la coalescencia en el sistema⁹.

Es importante estudiar el comportamiento la goma de mezquite ya que debido a sus características podría ser un sustituto de otras gomas actualmente utilizadas en la industria alimenticia y cosmética y de esta manera explotar su funcionalidad en diferentes sistemas alimenticios.

HIPÓTESIS

El comportamiento de las gomas es diferente según su estructura. Para las compañías productoras de alimentos es difícil escoger la goma correcta para lograr las características deseadas en sus productos. En este estudio se pretende dar las bases para las posibles aplicaciones de la goma de mezquite en diversos sistemas alimenticios, en base a su comportamiento y a su interacción con diversas gomas de amplio uso en la industria. Además de que se pretende hacer uso de los recursos poco explotados (ej. Goma de mezquite) de la zona Altiplano para fomentar el desarrollo económico.

2. METODOLOGÍA

Para determinar las propiedades emulsificantes, espesantes y/o gelantes de la goma de mezquite se realizaron pruebas con diferentes concentraciones (1 a 10%) de goma de mezquite en aceite en agua y en mezclas 50% de aceite y 50% de agua, además de que se evaluó la interacción de esta goma con otras gomas comerciales (goma arábica, goma guar, goma xantana), con cera de candelilla y con monoglicerido. Para evaluar la interacción se utilizó 5% de goma de mezquite y 5% de las gomas comerciales o del emulsificante. La cera de candelilla y los monogliceridos también se evaluaron en las soluciones sin mezclarse con ningún otro compuesto.

Experimento 1.- Se mezcló cada una de las gomas y de los emulsificantes con aceite, agua y en una mezcla 50%aceite y 50% agua y se evaluó su comportamiento visualmente por 15 días.

Experimento 2.- Se mezcló la goma de mezquite (50%) con las diversas gomas y emulsificantes comerciales (50%) utilizados en esta investigación y se evaluó su comportamiento visualmente por 15 días.

La goma de mezquite se recolecta en Salinas de Hidalgo, S.L.P, y posteriormente se procedió a purificarla (Figura 1), lo primero que se hizo fue una separación manual de impurezas posteriormente se disolvió en agua, se filtró, se secó por 12 hrs a 60°C y finalmente se trituro. Esta purificación se realizó con la finalidad de evitar resultados erróneos por las impurezas que se tenían al recolectar la goma así como aumentar el área de contacto de la goma cuando se tuvo en forma de polvo.

3. RESULTADOS

Experimento 1.- En la tabla 1 se muestra el comportamiento de la goma de mezquite en las diferentes soluciones, así como el comportamiento de las gomas y de los emulsificantes en estos mismos medios. Cabe mencionar que en esta etapa no se realizaron mezclas.

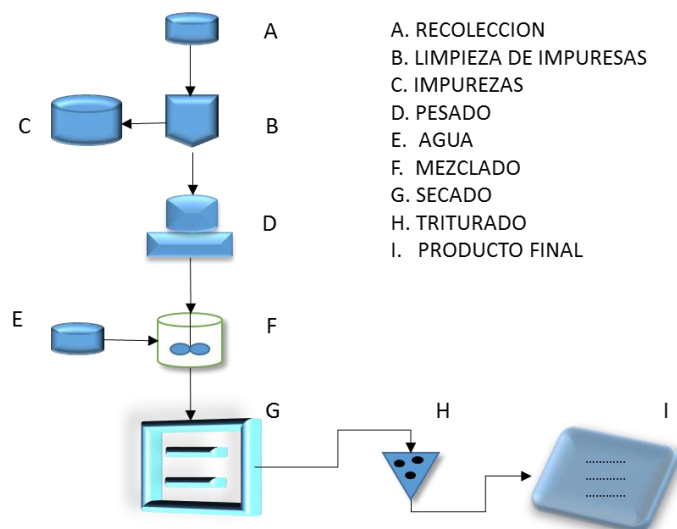


Figura 1. Diagrama de purificación de la goma de mezquite

Tabla 1. Comportamiento de las gomas y emulsificantes en los diferentes medios

	Agua	Aceite	50% Aceite- 50% Agua
Goma de Mezquite (Figura 1)	Estable durante los 15 días. Aún a la concentración de 10% no formo gel.	Precipito el primer día	Capacidad espesante por 5 días. No formo gel aún a la concentración de 10%
Monoglicerido	Insoluble	Formo gel desde la concentración de 5% aunque los geles a 10% fueron geles muy estables	Formo gel aunque fueron menos rígidos que con el puro aceite
Cera de candelilla	Insoluble	Formo geles débiles a la concentración de 2% y aumento la dureza del gel conforme se aumentó la concentración de cera	Formo gel aunque fueron menos rígidos que con el puro aceite

Experimento 2. se evaluó las interacciones de la goma de mezquite (50%) con diversas gomas y emulsificantes comerciales (50%). Los resultados se muestran en la tabla 2

Tabla 2. Interacciones de la goma de mezquite con diversas gomas y emulsificantes comerciales

	Agua	Aceite	50% Aceite – 50% Agua
Con Goma Arábica Figura 2	Forma un gel estable por los 15 días de almacenamiento	Espesante durante 2 días, posteriormente separación de fases	Espesante poco estable, aproximadamente 2 días
Con Goma Guar	Forma gel débil	No existió interacción	Insolubles
Con Goma Xantana	Forma gel estable por los 15 días de almacenamiento	No existió interacción	Insolubles
Con Monoglicerido	No se pudo homogenizar la muestra	Se formó un gel se empezó a ver separación de fases desde el primer día	Se forma un gel estable
Con Cera de candelilla	No se pudo homogenizar la muestra	Se formó un gel se empezó a ver separación de fases desde el primer día	Se forma un gel estable

La goma de mezquite presento características tanto espesantes, emulsificantes y gelantes dependiendo el medio de solución en el cual se encontraba así como de las interacciones con otros compuestos.



Figura 2. Goma de mezquite en medio acuoso y en aceite



Figura 3. Goma de mezquite con goma arábica en una solución de 50% de agua y 50% de aceite a los 2 días de almacenamiento



Figura 3. Goma de mezquite con monoglicerido en una solución de 50% de agua y 50% de aceite a los 5 días de almacenamiento

4. CONCLUSIONES

Este es un estudio preliminar que abre las puertas para realizar experimentos más específicos de la goma de mezquite, ya que como se puede observar la goma de mezquite presenta características espesante, emulsificantes y gelantes dependiendo el medio en el que se encuentre, la concentración, así como las interacciones que se presenten con otros compuestos, como con otras gomas o emulsificantes.

Falta mucha investigación a este respecto como variar la concentración de los emulsificantes para evaluar las interacciones reales de la goma de mezquite con estos, así como evaluar condiciones de pH y concentración salina. Además esta investigación es importante ya que busca nuevas alternativas tecnológicas que incluyan la explotación no destructiva de este recurso, en espera de proveer de beneficios económicos a los habitantes de regiones áridas donde se encuentra este árbol.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acedo-Carrillo J. I., Rosas-Durazo A., Herrera-Urbina R., Rinaudo M., Goycoolea F. M. & Valdez M. A. 2006. Zeta potential and drop growth of oil in water emulsions stabilized with mesquite gum. *Carbohydrate Polymers*. 65: 327–336.
2. Valenzuela, N. L. M., Trucios C. R., Ríos S. J. C., Flores H. A. & González B. J. L. 2011. Caracterización dasométrica y delimitación de rodales de mezquite (*Prosopis* spp) en el estado de Coahuila. *Revista Chapingo serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 17: 87-96.
3. López-Franco Y. L., Córdova-Moreno R. E., Goycoolea F. M., Valdez M. A., Juárez-Onofre J. & Lizardi-Mendoza J. 2012. Classification and physicochemical characterization of mesquite gum (*Prosopis* spp.). *Food Hydrocolloids*. 26: 159-166.
4. Aurand, L. W., Woods, A. E. & Wells, M. R. (1987) *Food Composition and Analysis*. An AVI Book, New York.
5. Funami T., Kataoka Y., Omoto T., Goto Y., Asai I., & Nishinari K. 2005. Food hydrocolloids control the gelatinization and retrogradation behavior of starch. *Food hydrocolloids*. 19:15-24
6. Pasquel A. 2001. Gomas: Una aproximación a la industria de alimentos. *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*. 1:1-8.
7. Beristain C. I., García H. S. & Vernon-Carter E. J. 2002. Effect of Water Activity on the Stability to Oxidation of Spray-Dried Encapsulated Orange Peel Oil Using Mesquite Gum (*Prosopis Juliflora*) as Wall Material. *Journal of Food Science*. 67: 206–211.
8. Vernon-Carter E. J., Gomez S. A., Beristain C. I., Mosqueira G., Pedroza-Islas R. & Moreno-Terrazas R. C. 1996. Color degradation and coalescence kinetics of Aztec marigold oleoresin-in-water emulsions stabilized by mesquite or arabic gums and their blends. *Journal of Texture Studies*. 27:625-641.
9. Beristain C. I., Garcia H. S. & Vernon-Carter E. J. 1999. Maltodextrina como material encapsulante de aceite esencial de naranja secado por aspersion. *Food Science and Technology International*. 5: 353
9. Beristain C. I., Garcia H. S. & Vernon-Carter E. J. 2001. Spray-dried Encapsulation of Cardamom (*Elettaria cardamomum*) Essential Oil with Mesquite (*Prosopis juli-ora*) Gum. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol*. 34:398-401.