

TRABAJOS  
CIENTÍFICOS  
EN MÉXICO

TOMO I  
BIOLOGÍA Y QUÍMICA

  
CENTRO DE INVESTIGACIONES  
EN ÓPTICA, A.C.

## DECLARACIÓN LEGAL

### EDITORES:

María Eugenia Sánchez Morales  
Gloria Verónica Vázquez García  
Amalia Martínez García  
Cristina E. Solano Sosa  
Eva Liliana Ramos Guerrero

ISBN GENERAL 978-607-8821-02-0

Fecha de otorgamiento 14-12-2021

Tomo I: Biología y Química ISBN 978-607-8821-03-7

Fecha de otorgamiento 15-12-2021

El contenido de los artículos es responsabilidad de los autores.

Temacilli EDITORIAL  
Lagos de Moreno, Jalisco  
<http://temacilli-editorial.com>

D. R. Centro de Investigaciones en Óptica, A. C.  
Loma del Bosque 115, Col. Lomas del Campestre  
C. P. 37150 León, Guanajuato  
México  
Hecho en México



# **Trabajos Científicos en México**

**Tomo I:**

**Biología y Química**

## **PREFACIO**

El presente compendio reúne trabajos de investigación realizados en diversas áreas de la ciencia, cuyo objetivo principal es contribuir a la difusión del trabajo científico que se realiza en México. Con este compendio también se pretende promover el trabajo interdisciplinario entre miembros de diferentes disciplinas científicas.

Este trabajo está organizado en siete tomos los cuales corresponden a las siguientes áreas científicas: I) Biología y química, II) Biotecnología y ciencias agropecuarias, III) Ciencias sociales, IV) Físico matemáticas y ciencias de la tierra, V) Humanidades, ciencias de la conducta y divulgación científica, VI) Ingeniería, así como VII) Medicina y ciencias de la salud.

Octubre de 2021  
León, Gto., México

María Eugenia Sánchez Morales  
Gloria Verónica Vázquez García  
Amalia Martínez García  
Cristina E. Solano Sosa  
Eva Liliana Ramos Guerrero



## Tabla de contenido

ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS PARÁMETROS DE SÍNTESIS POR ELECTROHILADO SOBRE LAS PROPIEDADES DE LAS MEMBRANAS DE INTERCAMBIO IÓNICO.....	4
EFFECTO DE LA INSULINA EN EL NÚCLEO DEL TRACTO SOLITARIO COMISURAL SOBRE EL REFLEJO HIPERGLUCÉMICO Y LA RETENCIÓN DE GLUCOSA POR EL CEREBRO. ....	9
MODELOS MATEMÁTICOS, UNA ALTERNATIVA PARA LA PREDICCIÓN DE CONTAMINACIÓN EN EL AGUA .....	14
ANÁLISIS DE PB, CD Y AS ASOCIADOS A FASES DE SUELOS CONTAMINADOS POR JALES MINEROS DE GUANAJUATO, GTO .....	25
OBTENCIÓN DE NANOCÁPSULAS DE METABOLITOS SECUNDARIOS FLUORESCENTES DE <i>MATRICARIA CHAMOMILLA</i> L. (MANZANILLA) CON POTENCIAL INTERÉS EN COSMETOLOGÍA .....	34
EFFECTO DEL ESTRÉS TÉRMICO APLICADO EN DIFERENTES MOMENTOS DE LA GESTACIÓN SOBRE LA IMPLANTACIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO EN HEMBRAS HÁMSTER SIRIO DORADO.....	43
LA LEVADURA <i>PICHIA PASTORIS</i> COMO MODELO PARA IDENTIFICAR LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE COMPUESTOS MIXTOS DE PARACETAMOL Y COBRE.....	49
ESTUDIO DE LA TOXICIDAD AGUDA DEL FUNGICIDA OXICLORURO DE COBRE SOBRE LA BACTERIA MARINA <i>VIBRIO FISCHERI</i> .....	61
SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES INTEGRADOS CON ZIRCONIA PARA USO EN ADSORCIÓN DE FLUORURO .....	67
TIPIFICACIÓN DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> UTILIZANDO DOS MÉTODOS: SPA-TIPO Y PFGE.....	72
SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE $TiO_2$ PARA LA FOTO-DEGRADACIÓN DE CONTAMINANTES ATMOSFÉRICOS .....	83
DISPOSITIVOS ELECTROQUÍMICOS PARA LA DETECCIÓN DE RESÍDUOS DE POLVORA. ..	91
ESTUDIOS DE LOS EFECTOS DEL FITOQUÍMICO DATS SOBRE LOS GENES RELACIONADOS CON FACTORES DE VIRULENCIA Y QUORUM SENSING EN EL PATÓGENO <i>BRUCELLA MELITENSIS</i> .....	95
DESEMPEÑO FOTO-OXIDATIVO EN LA DEGRADACIÓN DE AZUL DE METILENO Y DIBENZOTIOFENO EN PRESENCIA DE FOTOCATALIZADOR A BASE DE $TiO_2/MGO - Ni/MO$ Y LUZ UV.....	101
IMPORTANCIA ETNOBOTÁNICA, FITOQUÍMICA Y FARMACOLÓGICA DE <i>HYPTIS SUAVEOLENS</i> L. POIT.....	109
REVISIÓN HISTÓRICA DE LOS DATOS DE COLECTA DE LA TORTUGA GOLFINA <i>LEPIDOCHELYS OLIVACEA</i> (ESCHSCHOLTZ, 1829) EN MÉXICO .....	118
CRECIMIENTO DE NANOVARILLAS DE NITRURO DE GALIO EN ZEOLITA ZSM-5 EMPASTILLADA.....	128
EFFECTO DE PROCEDIMIENTOS GINECOLÓGICOS SOBRE LA CONDUCTA LOCOMOTORA DE LA RATA.....	138
RELACIÓN PESO-LONGITUD Y FACTOR DE CONDICIÓN DEL PARGO RAYADO ( <i>LUTJANUS SYNAGRIS</i> ) EN LA RESERVA DE LA BIÓSFERA LOS PETENES, CAMPECHE .....	147
EFFECTO DE LA BIOACUMULACIÓN DE CADMIO EN EL DESARROLLO DE <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> VARIEDAD PINTO SALTILLO .....	153

CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS HETERÓTROFAS DEL RÍO BLANCO (MIXTEQUILLA, VERACRUZ) EN MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS.....	163
USO DE TIERRA DE DIATOMEAS Y HUMUS DE LOMBRIZ EN LA EMERGENCIA DE SEMILLAS Y CRECIMIENTO DE RÁBANO ( <i>RAPHANUS SATIVUS</i> ) EN UN HUERTO URBANO (CIUDAD DE MÉXICO).....	169
ESTIMACIÓN DE LA EDAD POR OTOLITOS Y MODELACIÓN DEL CRECIMIENTO DE <i>LUTJANUS INERMIS</i> EN PUERTO ANGEL, OAXACA, MEXICO.....	175
IDENTIFICACIÓN DE GENES BACTERIANOS EN LOS GENOMAS DEL HONGO DEL GENERO <i>METARHIZIUM</i> .....	181
COMPLEJOS DE COORDINACIÓN MONONUCLEARES DE EUROPIO Y ÁCIDOS CARBOXÍLICOS.....	195
CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE 6 AISLADOS FUNGICOS CON POTENCIAL DE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO.....	199
ANÁLISIS DE LA OBTENCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE ACEITE RESIDUAL DE COCINA CON EL USO DE TECNOLOGÍA VERDE.....	209
RECUPERACIÓN DE $\Psi,\Psi$ -CAROTENO A PARTIR DE JITOMATE SENESCENTE MEDIANTE TECNOLOGÍA DE QUÍMICA VERDE.....	214
SÍNTESIS DE BIOPELICULAS DE QUITOSANO/CALÉNDULA PARA LA REGENERACIÓN CELULAR.....	218
MATERIA ORGÁNICA Y PH DE SUELOS AGRÍCOLAS DE LA RIVERA DEL LAGO DE CUITZEO.....	227
ANÁLISIS COMPUTACIONAL DE POLIÉSTERES-URETANOS AUTOCURABLES.....	234
EFFECTO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LUPINOS EXALTATUS ZUCC SOBRE LA LOCOMOCIÓN EN NEURONAS GABAÉRGICAS DEL ORGANISMO MODELO <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i> .....	244
ACTIVIDAD SINÉRGICA DE TRITERPENOS PENTACÍCLICOS EN UN MODELO MURINO DE HIPERSENSIBILIDAD TIPO IV.....	249
TRANSPORTE DE ALGUNOS GASES SIMPLES EN MEDIOS POROSOS.....	259
PRESENCIA DE LOS FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS EN EL MEDIO AMBIENTE.....	265
COMPARACIÓN DEL RECONOCIMIENTO <i>IN SILICO</i> DEL DOMINIO HR2 DE LA PROTEÍNA S DE SARS-COV Y SARS-COV-2, POR LA PROTEÍNA SPLUNC1 Y EL COMPLEJO TLR2/TLR1.....	274
NIVEL DE ACEPTACIÓN DE CONSUMO DE UN PRODUCTO A BASE DE HARINA DE GRILLO (GRILLIDAE ACHETA DOMESTICUS), ANTIOXIDANTES Y FIBRA.....	287
MORFOMETRÍA Y CUANTIFICACIÓN DE HUEVECILLOS EN <i>MACROBRACHIUM ACANTHURUS</i> (CAMARÓN PRIETO) EN EL CAMARÓN (MIXTEQUILLA, VERACRUZ).....	300
DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS HUELLAS LATENTES CONFORME AL TIEMPO, GÉNERO Y EDAD.....	305
EFFECTO DEL CONSUMO DE MIEL DE ABEJA SOBRE LA TASA DE OVULACIÓN, ÍNDICE GONADAL, OVIDUCTAL Y UTERINO EN HEMBRAS HÁMSTER SIRIO DORADO.....	313
CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS EXTRAÍDOS DE MUSA PARADISIACA Y TRADESCANTIA SPATHACEA.....	317
VERIFICACIÓN DE LA EFICACIA DE LA TÉCNICA DE PASTEURIZACIÓN ARTESANAL PARA LA ELIMINACIÓN DE <i>BRUCELLA SPP</i> DE LA LECHE DE CABRA UTILIZADA POR LOS PRODUCTORES DE LA COMUNIDAD DE XOCONOXTLE, YURIRIA, GTO.....	323

ABUNDANCIA DE ÁCAROS EDÁFICOS EN ÉPOCA DE LLUVIAS EN EL CERRO DEL ÁGUILA .....	329
LA PRESENCIA DE MACHOS INHIBE LA CONDUCTA DE CANIBALISMO DE LA HEMBRA HACIA SU CAMADA, EN EL HÁMSTER SIRIO DORADO .....	334
ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN DE LOS REGISTROS GÉNERO <i>ARTIBEUS</i> (CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE) EN MÉXICO DEPOSITADOS EN BASES DE DATOS .....	339
EFFECTO DEL SULFATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA SOBRE LA TRASLOCACION NUCLEAR DE DAF-16 Y LA EXPRESIÓN HSP-16 EN EL NEMATODO CAENORHABDITIS ELEGANS BAJO HIPOXIA QUÍMICA.....	353
TÉCNICAS PARA DESCALCIFICACIÓN DE DIENTES Y HUESO DE MANDÍBULA DE RATA PARA ANÁLISIS HISTOLÓGICO.....	360
ÍNDICE DE AUTORES.....	365

## ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS PARÁMETROS DE SÍNTESIS POR ELECTROHILADO SOBRE LAS PROPIEDADES DE LAS MEMBRANAS DE INTERCAMBIO IÓNICO

Jesús Salvador Jaime Ferrer, Liliana Villafaña López\*

Centro de Innovación Aplicada en Tecnologías Competitivas A.C., Omega 201 León, Gto., 37545, México.

\*lvillafana@ciatec.mx

### RESUMEN

En los últimos años, la energía de gradiente salino (EGS) ha aparecido como una fuente de energía renovable amigable con el medio ambiente. Este tipo de energía es generada al mezclar agua de mar y de río a través de un sistema de electrodiálisis inversa (EDI), el cual está constituido por un conjunto de membranas de intercambio catiónico (MIC) y aniónico (MIA), las cuales son selectivas al paso de cationes y aniones en solución, respectivamente. Las membranas de intercambio iónico (MIIs) deben tener un grado de hinchamiento bajo, una resistencia eléctrica baja y una alta permselectividad para su uso en EDI. El electrohilado es una técnica que permite la síntesis de MII a base de nanofibras. En trabajos anteriores se ha demostrado que se pueden mejorar las propiedades de las membranas por esta técnica, debido a que se aumenta la capacidad de intercambio iónico y se disminuye el grado de hinchamiento.

En el presente trabajo se estudia la influencia de los parámetros de operación del electrohilado como son voltaje, distancia colector-punta, velocidad de flujo, humedad y velocidad de rotación del colector sobre las propiedades de las MIIs. La síntesis de las MIIs se realizó utilizando un equipo semi-profesional de electrohilado Ne100 Nanospinner de la marca Inovenso. Los parámetros estudiados fueron la velocidad de flujo de inyección de la solución polimérica, humedad, velocidad de rotación del colector, pretratamiento y espesor de las membranas formadas. La MIA es una mezcla de poliepoclorhidrina : poliacrilonitrilo : trietilendiamina (1:2:0.83 wt%) en N,N-dimetilformamida, antes de ser electrohilada la mezcla polimérica recibió un pretratamiento de destilación a reflujo a 80°C por 90 minutos. La MIC es una mezcla de policloruro de vinilo : resina de intercambio catiónico : dodecil sulfato de sodio (1.28:1:0.01 wt%) en una mezcla de tetrahidrofurano: N,N-dimetilformamida (3:1 v).

Las MIIs formadas fueron caracterizadas por su espesor, grado de hinchamiento, capacidad de intercambio iónico, densidad de cargas fijas, permselectividad y resistencia eléctrica. Los resultados obtenidos demuestran que el electrohilado es una técnica con alto potencial para la síntesis de las MIIs. Así mismo, se observa que el control de los diferentes parámetros de síntesis es clave para mejorar las propiedades fisicoquímicas de las membranas. En este estudio se concluye que para las dos membranas sintetizadas es necesario trabajar a condiciones de humedad relativa bajas, con una velocidad de rotación del colector adecuada para permitir una mejor distribución de las fibras y por consecuencia una mejor uniformidad de la membrana. También, se observa en los dos tipos de MIIs una mejora en las propiedades cuando el espesor de la membrana es inferior a 100 µm. Finalmente, se concluye que velocidad de flujo y voltaje deben ser optimizados para evitar la presencia de defectos en las fibras.

### INTRODUCCIÓN

Con el aumento de la población y la aparición de nuevas tecnologías dependientes del consumo eléctrico es necesaria la búsqueda de nuevas formas de generación de electricidad, en las cuales sus ciclos de aprovechamiento estén en la medida de lo posible en armonía con los ciclos naturales de la tierra. Dentro de este marco, en los últimos años la comunidad científica se ha interesado en la energía oceánica, dentro de la cual se encuentra la EGS. La EGS es principalmente generada en las desembocaduras de los ríos. En efecto, al mezclarse el agua sin sales del río con el agua de mar con alto contenido en sales, se genera un potencial termodinámico de mezcla el cual puede ser extraíble e idealmente no genera CO<sub>2</sub>. EGS solo produce agua salobre con la misma salinidad que el medio natural y no se agrega ni se quita temperatura al agua. Para poder extraer la energía generada al momento del mezclado es necesario poder controlar este proceso, para ello se utiliza



un sistema de EDI, el cual está constituido por un conjunto de MIC y MIA, las cuales son selectivas al paso de cationes y aniones en solución, respectivamente [1].

Teóricamente, las MIIs utilizadas para la extracción de la EGS por EDI deben favorecer el paso del contraión (cationes en el caso de la MIC y aniones en el caso de la MIA) y limitar el paso del solvente, en este caso el agua. Estas condiciones se traducen en propiedades fisicoquímicas como son un grado de hinchamiento bajo, una resistencia eléctrica baja y una alta permselectividad. Dentro de las estrategias que se han adoptado para mejorar las propiedades de las MIIs, se encuentran el estudio de nuevos materiales de intercambio iónico, nuevos métodos de síntesis y el diseño de nuevas geometrías de membrana. En trabajos preliminares [2,3] se exploró un nuevo método de síntesis de MIIs a base de fibras utilizando la técnica de electrohilado. Dicha técnica permite formar las fibras a partir de una solución polimérica sometida a un campo electrostático de alto voltaje, con un arreglo correcto las fibras pueden generar una membrana. Los primeros resultados demostraron que se pueden mejorar las propiedades de las membranas por esta técnica, debido a que se aumenta la capacidad de intercambio iónico y se disminuye el grado de hinchamiento. En el presente trabajo se estudia la influencia de los parámetros de operación del electrohilado, tales como el voltaje, la distancia colector-punta, la velocidad de flujo, la humedad, la velocidad de rotación del colector, sobre las propiedades de la MIC.

### PARTE EXPERIMENTAL

La MIA se preparó utilizando poliacrilonitrilo (PAN Mw~150,000, Sigma Aldrich) como polímero inerte, poliepoclorhidrina (PECH, Mw~700 000, Sigma Aldrich) como polímero activo, trietilendiamina (DABCO® 33-LV, densidad: 1.02 g/mL, Sigma Aldrich) como polímero funcionalizado y N.N-dimetilformamida (DMF, Karal) como solvente. Cada polímero se disolvió individualmente y después fue mezclado considerando la relación en peso de 1:2:0.83 de PECH: PAN: DABCO. Dicha mezcla polimérica fue estudiada sin destilación y con el efecto de la destilación como pre-tratamiento. Para estudiar el efecto de la destilación, la mezcla polimérica mencionada previamente fue colocada en un matraz de tres bocas acoplado a un sistema de reflujo a 80°C durante 30 min con agitación constante.

La MIC se preparó mezclando policloruro de vinilo (PVC, Mw- 43000) en una mezcla de tetrahidrofurano (THF, anhidro  $\geq 99.9\%$ , densidad: 0.89 g/mL) y N.N-dimetilformamida hasta solubilizar. Posteriormente, se agregó resina de intercambio catiónico triturada (Amberlyst® 15 forma de hidrógeno, humedad  $\leq 1.5\%$ ), la cual había sido secada y tamizada en partículas entre 38-44  $\mu\text{m}$ . Finalmente, se agregó el dodecilsulfato de sodio (SDS, 99%, Mw -288.38 g/mol) y la mezcla se dejó agitar por 12h. Después la mezcla fue sometidas a un tratamiento de ultrasonido por 30 min y nuevamente en agitación mecánica por 15 min. La relación en peso utilizada para preparar dicha mezcla polimérica fue de 1.28:1:0.01 de PVC:Resina de intercambio catiónico:SDS.

Tanto la mezcla polimérica de MIA como de MIC se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente y se colocaron dentro de una jeringa que se instaló en el equipo semi-profesional de electrohilado "Single Nozzle Electrospinning Unit" modelo NE100, de la marca Inovenso. Las fibras formadas se colectaron sobre papel aluminio que recubría un cilindro giratorio, la distancia entre la boquilla del equipo y el colector giratorio se fijó a 17 cm de distancia para la MIA y 10 cm de distancia para la MIC. Para la MIA se utilizó un volumen de 6 mL para formar las fibras y un voltaje constante de 15 kV, mientras que para la MIC el volumen usado fue de 10 mL y se varió el voltaje. Los parámetros estudiados para cada tipo de membrana fueron la velocidad de flujo de inyección de la mezcla polimérica, la humedad ambiental, la velocidad de rotación del colector y espesor de las membranas formadas. Una vez que el proceso de electrohilado terminó la hoja de aluminio se retiró del colector y se sumergió en agua destilada para despegarla las MIIs formadas. Las MIIs obtenidas fueron sometidas a diferentes tratamientos para poder ser caracterizadas.

### RESULTADOS

Las membranas formadas fueron caracterizadas en función de su espesor, grado de hinchamiento, capacidad de intercambio iónico, densidad de carga fija, permselectividad y resistencia eléctrica. El

espesor de las membranas se midió tomando fotos laterales de las MIIIs utilizando el equipo OCA 15 EC con el programa SCA 20. El análisis de las fotos tomadas se hizo con el programa FIJI [4].

El grado de hinchamiento (SD) se calculó a partir de la relación:

$$SD (\%) = \frac{w_h - w_s}{w_s} * 100, \quad (1)$$

en donde  $w_h$  es el peso de la membrana húmeda y  $w_s$  es el peso de la membrana seca, ambos en gramos. La capacidad de intercambio iónico (IEC) se realizó a través de la técnica de titulación utilizando la ecuación:

$$IEC \left( \frac{\text{meq}}{\text{g}} \right) = \frac{V * C}{w_s}, \quad (2)$$

en donde V representa el volumen de titulante consumido (mL), M es la concentración del titulante (meq/mL) y  $w_s$  es el peso de la membrana seca (g). La densidad de cargas fijas ( $CD_{\text{fix}}$ ) se puede calcular a partir del SD y la IEC:

$$CD_{\text{fix}} = \frac{IEC}{SD}, \quad (3)$$

indicándonos la cantidad de grupos responsables de la transferencia de iones por volumen de agua en la membrana.

La permselectividad (S) puede ser calculada a partir de la relación entre el potencial experimental y el potencial teórico, para lo cual se usa la relación:

$$S(\%) = \frac{\Delta E_{\text{exp}}}{\Delta E_{\text{th}}}, \quad (4)$$

en donde  $\Delta E_{\text{exp}}$  es el potencial medido de la membrana (mV) y  $\Delta E_{\text{th}}$  es el potencial teórico de la membrana (mV). Finalmente, la resistencia eléctrica (ER) fue determinada utilizando espectroscopia de impedancia electroquímica y una celda tipo "H" con una configuración de 4 electrodos. La ER se determinó utilizando la relación:

$$ER(\Omega \cdot \text{cm}^2) = (R_{m+s} - R_m) \cdot A, \quad (5)$$

en donde  $R_{m+s}$  es la resistencia de la membrana y la solución que pasa a través de ella ( $\Omega$ ),  $R_m$  representa la resistencia de la membrana ( $\Omega$ ) y A es el área de la membrana utilizada ( $\text{cm}^2$ ).

Como se mencionó previamente, para que una MIIIs sea considerada eficiente debe de tener un grado de hinchamiento bajo junto con una capacidad de intercambio iónico alta, lo cual te da una relación de densidad de cargas fijas elevada. De igual manera, para que se vea favorecido el uso de estas membranas en la electrodiálisis inversa, se espera que tengan una permselectividad muy alta aunada a una resistencia eléctrica baja permitiendo un transporte adecuado de iones. En las tablas 1 y 2 se presentan las propiedades de la MIA y MIC obtenidas con las diferentes condiciones experimentales. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y se muestra su valor promedio con error estándar (ES). En negrita se marcan los mejores resultados de cada parámetro estudiado.

Para la MIA, tabla 1, se observó que el pre-tratamiento con destilación a reflujo presenta mejores resultados que la MIA sin pre-tratamiento. De igual manera, una baja velocidad de flujo de inyección de la mezcla polimérica provee mejores propiedades de permselectividad y resistencia eléctrica que a altas velocidades de flujo. Se estudiaron tres diferentes velocidades de colector encontrando los mejores resultados a 300 rpm, las variaciones relacionadas con la velocidad del colector pueden estar relacionadas con la distribución de las fibras en el colector logrando un mejor entretejido en las MIIIs. Además, las propiedades de las MIIIs se vieron mejoradas cuando el espesor fue inferior a 100  $\mu\text{m}$ , esto tiene que ver con el aumento del transporte de iones a bajos espesores. Finalmente, no se observó un impacto significativo de la humedad ambiental estudiada en las propiedades de las membranas.

Tabla 1. Influencia de diferentes parámetros experimentales sobre las propiedades de las MIA.

Parámetro	Valor	Esesor	Grado de hinchamiento	Capacidad de intercambio iónico	Densidad de carga fija	Permselectividad	Resistencia eléctrica
		$\mu\text{m} \pm \text{ES}$	$\% \pm \text{ES}$	$\text{meq/g} \pm \text{ES}$	$\text{meq/g} \pm \text{ES}$	$\% \pm \text{ES}$	$\Omega \cdot \text{cm}^2 \pm \text{ES}$
Pre-tratamiento	Sin destilación	$61.4 \pm 0.3$	$3.43 \pm 0.07$	$2.70 \pm 0.03$	$78.71 \pm 0.13$	$87 \pm 0.03$	$3.5 \pm 0.02$
	Con destilación	$57.1 \pm 0.2$	$4.36 \pm 0.24$	$3.66 \pm 0.11$	$83.94 \pm 0.29$	$90 \pm 0.02$	$1.3 \pm 0.2$
Humedad	60%	$57.1 \pm 0.2$	$4.36 \pm 0.24$	$3.66 \pm 0.11$	$83.94 \pm 0.29$	$90 \pm 0.02$	$1.3 \pm 0.2$
	80%	$54.3 \pm 0.2$	$4.41 \pm 0.03$	$4.39 \pm 0.4$	$99.54 \pm 0.35$	$89.2 \pm 0.01$	$1.4 \pm 0.04$
Velocidad de flujo	0.225 ml/h	$57.1 \pm 0.2$	$4.36 \pm 0.24$	$3.66 \pm 0.11$	$83.94 \pm 0.29$	$90 \pm 0.02$	$1.3 \pm 0.2$
	0.325 ml/h	$42.9 \pm 0.1$	$4.53 \pm 0.11$	$3.95 \pm 0.02$	$87.19 \pm 0.09$	$87 \pm 1.3$	$1.9 \pm 0.3$
	0.525 ml/h	$64.3 \pm 0.4$	$10.77 \pm 0.04$	$4.33 \pm 0.2$	$40.22 \pm 0.16$	$85 \pm 0.4$	$2.2 \pm 0.02$
Velocidad del colector	100 rpm	$57.1 \pm 0.2$	$4.36 \pm 0.24$	$3.66 \pm 0.11$	$83.94 \pm 0.29$	$90 \pm 0.02$	$1.3 \pm 0.2$
	300 rpm	$41.4 \pm 0.5$	$0.92 \pm 0.21$	$8.69 \pm 1.3$	$944 \pm 0.3$	$93 \pm 0.04$	$0.9 \pm 0.1$
	500 rpm	$51.4 \pm 0.2$	$1.38 \pm 0.37$	$5.29 \pm 0.9$	$383 \pm 0.64$	$91 \pm 0.05$	$1.1 \pm 0.3$
Esesor	$< 100 \mu\text{m}$	$57.1 \pm 0.2$	$4.36 \pm 0.24$	$3.66 \pm 0.11$	$83.94 \pm 0.29$	$90 \pm 0.02$	$1.3 \pm 0.2$
	$> 100 \mu\text{m}$	$122 \pm 0.4$	$12.36 \pm 2.2$	$11.00 \pm 2.1$	$88.99 \pm 0.03$	$88 \pm 0.1$	$2.5 \pm 0.5$

Los valores de humedad ambiental estudiados para la MIC, tabla 2, nos indican que es necesario trabajar a humedades ambientales bajas para así asegurar la formación de las fibras sin defectos. La velocidad de flujo de inyección de la mezcla polimérica tiene un efecto significativo en las propiedades de la membrana; siendo necesario realizar barridos finos para poder encontrar el valor que de los mejores resultados. Por otro lado, la rotación del colector y el intervalo de los voltajes estudiados no presentaron cambios significativos en las propiedades de la MIC. Finalmente, al igual que en la MIA, la MIC se vio favorecida con espesores por debajo de los  $100 \mu\text{m}$ .

Tabla 2. Influencia de diferentes parámetros experimentales sobre las propiedades de las MIC.

Parámetro	Valor	Esesor	Grado de hinchamiento	Capacidad de intercambio iónico	Densidad de carga fija	Permselectividad	Resistencia eléctrica
		$\mu\text{m} \pm \text{ES}$	$\% \pm \text{ES}$	$\text{meq/g} \pm \text{ES}$	$\text{meq/g} \pm \text{ES}$	$\% \pm \text{ES}$	$\Omega \cdot \text{cm}^2 \pm \text{ES}$
Humedad	40%	$82.3 \pm 0.1$	$1.2 \pm 0.09$	$1.64 \pm 0.03$	$136.66 \pm 0.06$	$92 \pm 0.1$	$2.85 \pm 0.1$
	60%	$72.1 \pm 0.03$	$1.5 \pm 0.01$	$1.6 \pm 0.08$	$106.66 \pm 0.09$	$91 \pm 0.03$	$2.9 \pm 0.3$
	80%	$70.3 \pm 0.3$	$10.33 \pm 3.1$	$0.2 \pm 0.01$	$1.93 \pm 0.9$	$74 \pm 0.5$	$10.22 \pm 1.3$
Velocidad de flujo	0.05 ml/h	$66.1 \pm 0.2$	$1.64 \pm 0.65$	$0.9 \pm 0.34$	$54.87 \pm 0.29$	$85 \pm 0.09$	$3.5 \pm 0.1$
	0.10 ml/h	$72.1 \pm 0.03$	$1.5 \pm 0.01$	$1.6 \pm 0.08$	$106.66 \pm 0.09$	$91 \pm 0.03$	$2.9 \pm 0.3$
	0.20 ml/h	$74.5 \pm 0.06$	$5.43 \pm 0.1$	$1.5 \pm 0.2$	$27.62 \pm 0.16$	$79 \pm 0.4$	$6.2 \pm 0.02$
Velocidad del colector	100 rpm	$65 \pm 0.1$	$2.7 \pm 0.3$	$1.55 \pm 0.3$	$57.40 \pm 0.1$	$89 \pm 1$	$4.2 \pm 0.2$
	300 rpm	$72.1 \pm 0.03$	$1.5 \pm 0.01$	$1.6 \pm 0.08$	$106.66 \pm 0.09$	$91 \pm 0.03$	$2.9 \pm 0.3$
	500 rpm	$66 \pm 0.05$	$2.45 \pm 0.1$	$1.52 \pm 0.2$	$62.04 \pm 0.1$	$88 \pm 2$	$5.3 \pm 0.01$
Voltaje aplicado	12kV	$77.2 \pm 0.9$	$1.6 \pm 0.3$	$1.6 \pm 0.1$	$100.64 \pm 0.2$	$90 \pm 1$	$3.2 \pm 0.02$
	17kV	$72.1 \pm 0.03$	$1.5 \pm 0.01$	$1.6 \pm 0.08$	$106.66 \pm 0.09$	$91 \pm 0.03$	$2.9 \pm 0.3$
	20 kV	$68.9 \pm 0.1$	$1.5 \pm 0.09$	$1.6 \pm 0.01$	$105.88 \pm 0.08$	$90 \pm 0.3$	$4.5 \pm 1$
Esesor	$< 100 \mu\text{m}$	$72.1 \pm 0.03$	$1.5 \pm 0.01$	$1.6 \pm 0.08$	$106.66 \pm 0.09$	$91 \pm 0.03$	$2.9 \pm 0.3$
	$> 100 \mu\text{m}$	$123.4 \pm 0.3$	$20.5 \pm 2.1$	$1.54 \pm 0.09$	$7.51 \pm 1.9$	$90 \pm 0.2$	$5.43 \pm 0.2$

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha demostrado que el electrohilado es una técnica con alto potencial para la síntesis de membranas de intercambio iónico. Se observó que el control de los diferentes parámetros de síntesis es clave para mejorar las propiedades fisicoquímicas de las membranas. Podemos concluir que la membrana de intercambio aniónico estudiada en éste trabajo se ve favorecida al ser preparada con el pre-tratamiento de destilación con reflujo, a baja velocidad de flujo y con velocidad del colector controlada. Estas condiciones hacen posible obtener membranas sin defectos junto con una alta relación en la densidad de cargas fijas, permselectividad por arriba del 90% y baja resistencia eléctrica.

La membrana de intercambio catiónico desarrollada en éste trabajo nos sugiere trabajar a condiciones de humedad ambiental relativamente bajas y con barridos de velocidad de flujo finos, ya que así se favorece la evaporación del solvente y la formación de las fibras sin defectos. Estos parámetros permiten obtener altos porcentajes de densidad de carga fija y permselectividad. Por otro lado, la rotación del colector y el voltaje aplicados no mostraron cambios significativos en la membrana preparada; aun así, son parámetros que se deben de controlar para poder obtener fibras con buenas propiedades. Finalmente, el rendimiento en ambas membranas de intercambio iónico se vio favorecido al obtener espesores inferiores a 100  $\mu\text{m}$  ya que mejora el transporte de iones.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Enver Güler, *Journal of Membrane Science & Research*, n° 4, pp. 108-118, 2018.
2. Villafaña-López, L. et al, *Membranes*, 9(11), pp. 145, 2019.
3. Jaime-Ferrer, J.S. et al., *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 18(7), 20200020, 2020.
4. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. doi:10.1038/nmeth.2019.



## EFFECTO DE LA INSULINA EN EL NÚCLEO DEL TRACTO SOLITARIO COMISURAL SOBRE EL REFLEJO HIPERGLUCÉMICO Y LA RETENCIÓN DE GLUCOSA POR EL CEREBRO.

Torres-Magallanes JA<sup>1</sup>, Lemus M<sup>1</sup>, Montero S<sup>1,2</sup>, Roces Dorransoro E<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas y <sup>2</sup>Facultad de Medicina, Universidad de Colima, México.  
rab@uacol.mx.

### RESUMEN

La insulina tiene efecto hipoglucemiante al incrementar la captación de glucosa por células del tejido adiposo y muscular; sin embargo, la función central de la insulina en la homeostasis de la glucosa está poco estudiada. Existen receptores de insulina funcionales distribuidos en la totalidad del cerebro de la rata, siendo el núcleo del tracto solitario comisural (NTSc) una de las áreas con concentraciones más altas. El NTSc es un relevo sensorial-visceral primario que recibe y responde a estímulos respiratorios, cardiovasculares, gastrointestinales y nerviosos.

El objetivo del estudio fue, determinar si un estímulo directo con insulina en NTSc modificaba la glucemia arterial y suprahepática, así como la retención de glucosa cerebral (RGC) en ratas. Los experimentos se realizaron en ratas Wistar machos con peso corporal de 280 a 300 g, mantenidas en ciclos de luz/oscuridad de 12/12, con acceso ad libitum de alimento y agua; con ayuno de 12 horas.

Las ratas se anestesiaron con vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (i.p.) (3,3 mg/100 g) en solución salina, (Pfizer, Mex). Se mantuvo la anestesia con pentobarbital sódico (0,063 mg/min en salina, i.p.). El nivel de anestesia se controló evaluando los reflejos palpebrales y plantar. Se utilizó buprenorfina (0,03 mg / kg subcutáneos) como analgésico. La temperatura corporal se mantuvo a 37 °C. Las ratas se ventilaron artificialmente (ventilador Ugo Basile, Stoelting, Wood Dale IL, E.U.) a través de una cánula traqueal que permitió ajustar la velocidad y el volumen respiratorios con objeto de mantener los valores homeostáticos (pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub> y pH). El protocolo experimental consistió en 14 ratas sanas divididas en dos grupos: a) Experimental, infusión de insulina en el NTSc (n = 7); b) Control, líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa) en NTSc (n = 7).

Los resultados mostraron que la estimulación del NTSc con insulina provoca cambios significativos en las glucemias arteriales en los minutos post-inyección 5, 10, 20 y 40. No se observaron cambios en la RGC. Se concluyó que la estimulación con insulina en el NTSc es capaz de modular la homeostasis de la glucosa a nivel sistémico, sin alterar los niveles de RGC.

### INTRODUCCIÓN

Está documentada la existencia de receptores de insulina en el cerebro (1). Estos se distribuyen en todo el cerebro de la rata y son idénticos a los receptores clásicos periféricos, tanto en estructura como en función. Un mapa reciente sobre la distribución de receptores en cerebro, ilustra que una de las áreas con más denso número de receptores es el núcleo del tracto solitario (NTSc) (2). El NTSc, funge como relevo para las funciones viscerales que llegan a él, es en este núcleo donde las diversas aferencias quimiorreceptoras hacen sinapsis iniciales (3,4).

Nueva evidencia nos indica, que este núcleo es responsivo a la insulina, debido a que una inyección de esta es capaz de producir una respuesta hipotensora, utilizando vías de regulación simpática (5). Dada la naturaleza integrativa y responsabilidad directa de diversas funciones homeostáticas (Niveles de oxígeno (O<sub>2</sub>), pH, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), temperatura, osmolaridad, potasio, glucosa e insulina.) (6). En este trabajo se postula que, la insulina puede estimular el NTS y abolir una hiperglucemia refleja a través de un incremento en la modulación nerviosa simpática. El objetivo de esta tesis fue estudiar los efectos de la insulina en el NTS sobre la homeostasis de la glucosa en ratas Wistar.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Metodología

#### Universo de estudio

Se utilizaron ratas Wistar macho de 4 meses de edad (280-300 g) alojadas de manera individual en el bioterio del CUIB en condiciones de luz-obscuridad 12/12 h, temperatura de 22-24°C, agua y alimento (Teklad Global Diets con 18% de proteína cruda, 5% de grasa cruda y 5% de fibra cruda) a libre demanda.

#### Tamaño muestral

El tamaño de la muestra para este estudio, se calculó con la fórmula para medias de muestras independientes; según la fórmula, tenemos una  $n = 6.65$  por grupo, pero en base a los trabajos consultados (7) se fijó el tamaño de la muestra en  $n = 7$ .

#### Desarrollo experimental.

Todos los procedimientos experimentales se realizaron en Ratas Wistar con estricto apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-126-ECOL-2000 y NOM-126-SEMARNAT-2000. Los experimentos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Neuroendocrinología del Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas, bajo la supervisión de personal especializado en este tipo de experimentos, de acuerdo a las normas de la Comisión de Bioética y Bioseguridad del Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas y Facultad de Medicina de la Universidad de Colima.

Se siguieron los lineamientos de acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, haciendo hincapié en el título séptimo de dicho documento, para darles un trato digno a los animales de experimentación.

#### Protocolo experimental.

- A) Grupo Problema: Inyección unilateral de 60 nl. de insulina (100 UI/mL) en el NTSc.
- B) Grupo Control: Inyección unilateral de 60 nl. de solución salina al 0.9% en el NTSc (5).

#### Técnicas quirúrgicas generales.

##### Anestesia y analgesia:

- Pentobarbital sódico (3 mg/100 g) por vía intraperitoneal (i.p).
- Pentobarbital sódico (0.063 mg/100 g/ salina) por minuto (i.p).
- Buprenorfina subcutánea (0.3 mg/ 100 g) por vía subcutánea (s.c.).

Se controló periódicamente la profundidad de la anestesia mediante la evaluación de los reflejos palpebral y flexor plantar ante un estímulo doloroso. Las ratas se mantuvieron bajo ventilación artificial con un respirador para pequeñas especies (Stoelting-Ugo Basile), conectado a una cánula endotraqueal (intubación por vía bucal), con una frecuencia de 60 respiraciones/minuto y presión positiva hasta eludir los movimientos respiratorios espontáneos de la rata (8).

##### Cirugía.

La rata se colocó en decúbito dorsal sobre la mesa de operaciones (9), para realizar una incisión por línea media en cara ventral del cuello, a partir de 2 mm de la base maxilar hasta el extremo superior del esternón. La vena yugular externa derecha se disecó en un tramo de 1 centímetro con ganchillos de vidrio, para ser cateterizada posteriormente mediante un tubo de silastic (Dow Corning 602-155) hasta el seno yugular (7). Para cateterizar la arteria femoral, se incidió la región inguinal superior en sentido transversal al pliegue, hasta el tercio superior de la cara interna y media del muslo derecho para visualizar el paquete vaso-nervioso; la arteria femoral se disecó y cateterizó hasta la aorta abdominal con un tubo de polietileno (PE-10 Clay Adams).

Todas las cateterizaciones se realizaron con cánulas heparinizadas sin interrumpir la circulación vascular normal. Al final de cada experimento se verificó la posición correcta de los catéteres. Microinyecciones en el NTS. Las inyecciones en el NTSc, se realizaron después de fijar la cabeza de la rata en un aparato estereotáxico (Stoelting) y se realizó una craneotomía occipital con una fresa de carbono; se introdujo una cánula de vidrio diseñada a de un tubo Microcaps (0.7 mm) conectada a una microjeringa (Hamilton, de 0.1 a 0.5  $\mu$ l) (10,11). Las coordenadas para llegar al NTSc, con

lambda como punto cero, son: anteroposterior (AP) = -5.1 mm, lateral (L) = -0.1 mm y vertical (V) = 8.3 mm a partir de la superficie del cráneo (12).

#### Obtención de muestras de sangre para el análisis de glucosa.

El volumen de sangre colectado en cada toma fue: 0.12 ml. de sangre arterial (arteria femoral) y 0.12 ml. de sangre venosa procedente del cerebro.

La sangre se colectó en los tiempos ilustrados en el siguiente diagrama:

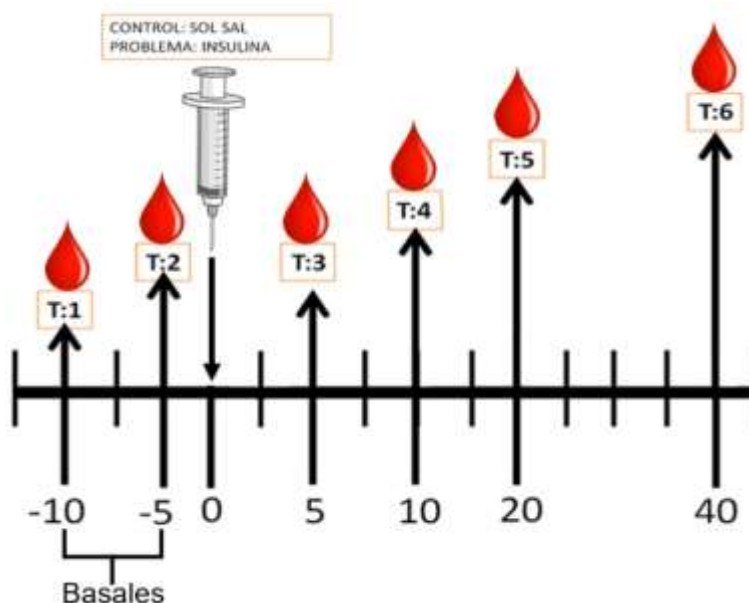


Figura 1. Línea de tiempo experimental. Se realiza la inyección de insulina o solución salina en el minuto 0; se mide la glucemia arterial en los tiempos T:3, T:4, T:5 y T:6. El nivel basal de glucosa correspondió al promedio de la concentración de glucosa obtenida en los tiempos T:1 y T:2; graficándose como  $t = -7.5$  min.

En cada experimento la extracción total de sangre fue de 2 ml. (16% del volumen total); para compensar la pérdida hemática, las ratas recibieron después de cada par de muestras obtenidas, una inyección de 0.4 ml. de NaCl al 0.9%. Cada muestra obtenida se midió con un glucómetro Accu-Chek performa con análisis tipo enzimático-electroquímico.

#### Sacrificio

Una vez terminados los experimentos, las ratas se decapitaron bajo anestesia con guillotina (13), los cerebros, se extrajeron y se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  en un ultracongelador (Revco, Méx.). Posteriormente, se realizaron los cortes en un criomicrotomo (Leica CM1800, Microsystem, Berlín Alem.). Se realizaron cortes del cerebro coronales de  $40\ \mu\text{m}$ . para comprobar que se llegue a la región del NTSc, se verificó el lugar de las inyecciones en este núcleo por la tinción de azul de Evans al 1% (Sigma, Méx.). El colorante se inyectó posteriormente a las drogas de estudio (14), las ratas con inyecciones fuera del NTSc fueron descartadas.

#### Análisis estadístico.

Los valores se expresaron en promedios y/o porcentajes  $\pm$  error estándar. La comparación entre los valores, antes ( $t = -7.5$ ) (promedio entre las 2 basales que se tomaron a  $t = -10$  min y  $t = -5$  min) y después de la aplicación de los fármacos y la estimulación NTSc en cada grupo, se realizó con la prueba "t" pareada, y la prueba "t" student para comparar los valores. La comparación entre todos los grupos se realizó con ANOVA y la prueba de Scheffé. El intervalo de confianza se fijó en 95%.

**RESULTADOS**

La estimulación del NTSc en el grupo experimental (Insulina 60nl) o control (ratas estimuladas con solución salina 0.9%) no provocó un descenso significativo en la retención de glucosa cerebral en ninguna marca de tiempo analizada (Figura 2).

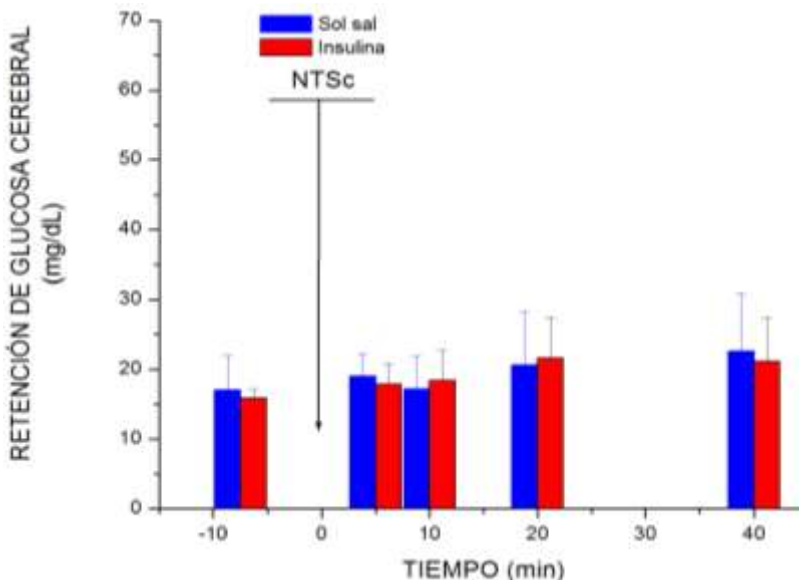


Figura 2. RGC en ratas con inyecciones de insulina o solución salina en NTSc (medias ± error estándar de la media), \*p <0.05 media de cada grupo vs su valor basal.

Al comparar las glucemias arteriales sistémicas del grupo experimental contra el grupo de solución salina se observaron cambios significativos en minutos 5, 10, 20 y 40 (Figura 3).

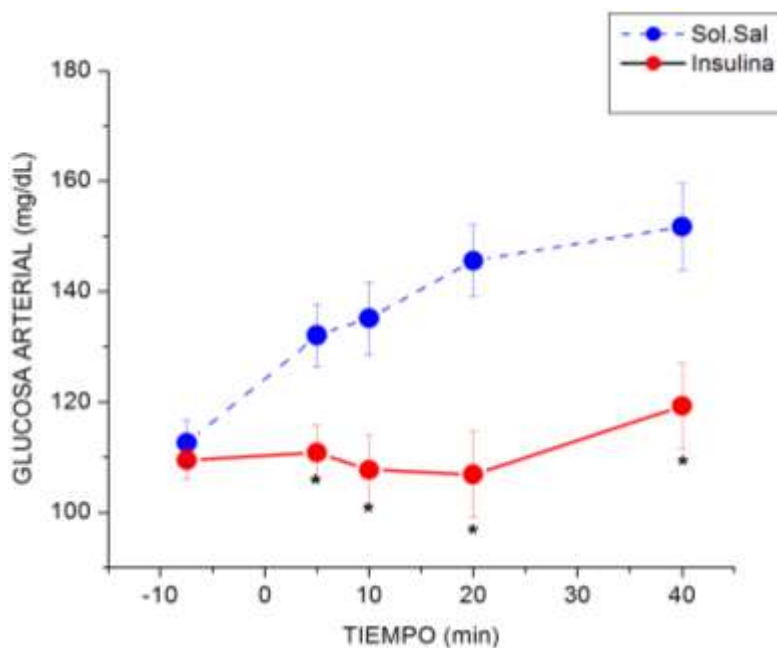


Figura 3. Comparación de la concentración de glucosa arterial en el transcurso del experimento antes y después de la inyección de insulina en el NTSc (medias ± error estándar de la media), \*p <0.05 medias de grupo control vs problema.



## CONCLUSIONES

La inyección de insulina en el NTSc mantuvo la glucemia arterial sin cambios significativos al compararla con sus respectivas basales, a pesar del estímulo traumático por inserción de la micro cánula. La inyección de solución salina en el NTSc no mantuvo la glucemia arterial respecto a sus valores basales, provocándose una elevación de glucemia ante estímulo traumático. La insulina en el NTSc descendió las variables glucémicas significativamente en comparación con las ratas controles ante este estímulo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ann Surg. (1979). The functional importance of sympathetic nerves to the liver and endocrine pancreas. 189(1): 96–100. PMID: PMC1396948.
2. Kleinridders y col., (2014). La acción de la insulina en el cerebro regula el metabolismo sistémico y la función cerebral. *Diabetes*, 63, 43-2232
3. Frohman, L.A. CNS peptides and glucoregulation. *Annu Rev Physiol.* 1983, 45, 95–107
4. Wasserman AM, Ferreira M Jr., Sahibzada N, Hernandez YM, Gillis RA, 2002. GABAmediated neurotransmission in the ventrolateral NTS plays a role in respiratory regulation in the rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 283 (6), R1423–R1441.
5. Hsiao, M. y col. (2008). Señalización defectuosa de fosfatidilinositol 3-quinasa en el control central de efectos cardiovasculares en el núcleo del tracto solitario de ratas espontáneamente hipertensas. *Hypertens Res.* 31, 18-1209
6. Ribeiro, M., Sacramento, J., González, C., Guarino, M., Monteiro, E. y Conde y col. S. (2013). Carotid body denervation prevents the development of insulin resistance and hypertension induced by hypercaloric diets. *Diabetes* 62, 2905-2916. doi: 10.2337/db12-1463.
7. Guarner V, Alvarez-Buylla R. Changes in brain glucose retention produced by the stimulation of an insulin-sensitive reflexogenic zone in rats. *J Auton Nerv Syst.* 1991 Jun 1;34(1):89-94. doi: 10.1016/0165-1838(91)90011-q. PMID: 1940020.
8. Alvarez-Buylla R, de Alvarez-Buylla ER. Carotid sinus receptors participate in glucose homeostasis. *Respir Physiol.* 1988 Jun;72(3):347-59. doi: 10.1016/0034-5687(88)90093-x. PMID: 3406554.
9. Alvarez-Buylla R, Bencosme SA. Reflex hypoglycemia initiated by insulin. *Acta Physiol Lat Am.* 1981;31(1):1-11. PMID: 6765005.
10. Yarkov A, Montero S, Lemus M, Rocas de Alvarez-Buylla E, Alvarez-Buylla R. Arginine-vasopressin in nucleus of the tractus solitarius induces hyperglycemia and brain glucose retention. *Brain Res.* 2001 Jun 1;902(2):212-22. doi: 10.1016/s0006-8993(01)02404-0. PMID: 11384615.
11. Montero SA, Yarkov A, Alvarez-Buylla R. Carotid chemoreceptors participation in brain glucose regulation. Role of arginine-vasopressin. *Adv Exp Med Biol.* 2000;475:749-60. doi: 10.1007/0-306-46825-5\_75. PMID: 10849717.
12. Paxinos, G. & Watson, C. (2014). *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Amsterdam: Elsevier, Academic Press.
13. Waynforth, H. & Flecknell, P. (1992). *Experimental and surgical technique in the rat.* London San Diego: Academic Press.
14. Gauda, Estelle B.; Monteiro, Maria Emilia; Prabhakar, Nanduri; Wyatt, Christopher; Schultz, Harold D. (2018). [Advances in Experimental Medicine and Biology] Arterial Chemoreceptors Volume 1071 (New Directions and Translational Perspectives) || Leptin in the Commissural Nucleus Tractus Solitarii Increases the Glucose Responses to Carotid Chemoreceptors Activation by Cyanide. , 10.1007/978-3-319-91137-3(Chapter 18), 143–149. doi:10.1007/978-3-319-91137-3\_18

## MODELOS MATEMÁTICOS, UNA ALTERNATIVA PARA LA PREDICCIÓN DE CONTAMINACIÓN EN EL AGUA

Diana Garcia Diaz<sup>1</sup>, Rutilio Ortiz Salinas<sup>1</sup>, Samuel Tejeda Vega<sup>2</sup>, Marcela Vergara Onofre<sup>1</sup>, Armando Miguel Gómez Torres<sup>2</sup>, Nemesio Flores Pedraza<sup>3</sup> y Salvador Vega y León<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, <sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, <sup>3</sup>Escuela Preparatoria Oficial Núm. 243.

[dianay\\_5@hotmail.com](mailto:dianay_5@hotmail.com)

### RESUMEN

En la actualidad, la problemática de la disponibilidad de agua para el abastecimiento humano incluye una preocupación cada vez mayor, tanto para las autoridades como para la sociedad en general ya que su calidad en la mayor parte del mundo está lejos de ser la adecuada<sup>1</sup>. En un reporte reciente de riesgos globales del Foro Económico Mundial<sup>2</sup> establece que la crisis del agua es el tercer riesgo global de mayor impacto<sup>3</sup>, debido a que las principales fuentes de agua dulce (ríos, lagos, agua subterránea) se han ido contaminando por el aumento de la actividad industrial, agrícola y desarrollo urbano<sup>4</sup>. El informe del Año Internacional del Saneamiento, publicado en 2008, describe que una quinta parte de la población mundial no tiene acceso al agua libre de contaminantes<sup>7,8</sup>. Actualmente se ha recurrido a la utilización de herramientas informáticas que permiten simular los procesos de transporte y dispersión de los contaminantes vertidos en el agua, que contribuyen a la planificación, prevención y toma de decisiones regulatorias de los recursos hídricos<sup>9</sup>. Estos son modelos matemáticos que, junto con las variables ambientales, describen, explican y evalúan de forma adecuada el comportamiento de los contaminantes presentes en el agua, tales como productos químicos disueltos, nanomateriales, sólidos, carbono orgánico disuelto, bacterias, temperatura, salinidad entre otros<sup>10</sup>. Al crear escenarios a futuro, sirven para la planeación y gestión apropiada de los recursos hídricos de una zona específica. Sin embargo, su aplicación se ve limitada con frecuencia por la falta de conocimientos e información acerca de los principios básicos del modelamiento matemático. Por ello, se consultó bibliografía Nacional e Internacional a través de artículos científicos en las siguientes bases de datos AAAS, AMS, Ebsco, Elsevier, MathSciNet, Redalyc, Researchgate, Scielo, Wiley online library, así como libros y tesis doctorales por su estrecha relación con el tema. El presente trabajo explica de manera teórica los antecedentes, importancia y clasificación de los modelos matemáticos empleados para el recurso hídrico. Donde se describe con detalle algunos modelos comunes en el transporte de contaminantes y su aplicación en diversas partes del mundo con diversos tipos de cuerpos de agua. Finalmente, a partir de la bibliografía, se aprecia un auge en el uso de modelos matemáticos en diversas partes del mundo debido a la alta contaminación de los recursos hídricos. El uso de nuevas herramientas tecnológicas exige una integración de varias disciplinas de estudio para su correcta selección, aplicación e interpretación para garantizar el buen uso del recurso agua en el presente y futuro.

### INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la problemática de la disponibilidad de agua para el abastecimiento humano genera una gran preocupación, no solo para las autoridades si no para la sociedad en general ya que su calidad en la mayor parte del mundo está lejos de ser la adecuada<sup>1</sup>. En un reporte reciente de riesgos globales del Foro Económico Mundial<sup>2</sup>, establece que la crisis del agua es el tercer riesgo global de mayor impacto<sup>3</sup>, ya que las principales fuentes de agua dulce (ríos, lagos, agua subterránea) se han ido contaminando por el aumento de la actividad industrial, agrícola y desarrollo urbano<sup>4,5</sup>. Debido a estas alteraciones la Organización de las Naciones Unidas<sup>6</sup>, estima que 2,200 millones de personas carecen de acceso a servicios de agua libre de contaminantes gestionados de forma segura ya que el 80% de las aguas residuales retornan al ecosistema sin ser tratadas o reutilizadas, afectando la salud pública, el ambiente y el bienestar económico de todas las naciones<sup>7,8</sup>. El reto de mejorar una situación tan compleja requiere de un trabajo conjunto que implica un cambio de conducta y la promoción de la utilización de nuevas prácticas y herramientas para el manejo del agua<sup>1</sup>. Actualmente se ha recurrido a la utilización de herramientas informáticas que permiten simular y predecir los procesos de transporte y dispersión de los contaminantes vertidos en el agua, que

contribuyen a la planificación, prevención y toma de decisiones regulatorias de los recursos hídricos<sup>9</sup>. Estos son modelos matemáticos que, junto con las variables ambientales, describen, explican y evalúan de forma adecuada el comportamiento de los contaminantes presentes en el agua, tales como productos químicos disueltos, nanomateriales, sólidos, carbono orgánico disuelto, bacterias, temperatura, salinidad entre otros<sup>10</sup>. En este sentido existen diversos países como Estados Unidos, Alemania, China, Colombia, Venezuela entre otros que hacen uso de nuevas herramientas tecnológicas para el monitoreo del recurso hídrico con el objetivo de simular los sistemas acuáticos ya que, al crear escenarios a futuro, sirven para la planeación y gestión apropiada de los recursos hídricos de una zona específica<sup>11</sup>. Sin embargo, su aplicación se ve limitada con frecuencia por la falta de conocimientos e información acerca de los principios básicos del modelamiento matemático. Por lo que el objetivo del presente trabajo es explicar de manera teórica antecedentes, importancia y clasificación de los modelos matemáticos empleados para el recurso hídrico, describiendo con detalle algunos modelos comunes en el transporte de contaminantes y su aplicación en diversas partes del mundo en diferentes cuerpos de agua, ya que el uso de nuevas herramientas tecnológicas exige una integración de varias disciplinas de estudio para su correcta selección, aplicación e interpretación para garantizar el buen uso del recurso agua en el presente y futuro.

## TEORIA

### Antecedentes

El uso de modelos matemáticos fue común en Europa durante los siglos XVII y XVIII, pero tuvo un nuevo impulso en el siglo XIX con la aparición comercial de las computadoras y la difusión de ordenadores personales. El periodo de construcción de modelos en Alemania comenzó alrededor de 1870, cuando Ludwig Brill, hermano del matemático Alexander Von Brill, comenzó a reproducir y vender copias de algunos modelos matemáticos<sup>12</sup>.

Durante el siglo XIX, el desarrollo de estos modelos se extendió desde Europa a Estados Unidos, país en donde a finales de la década de 1960 inicia la introducción de modelos matemáticos enfocados a la hidrogeología debido a la creciente presión pública por el control de la contaminación, estimulando la inversión en una serie de estudios especiales para encontrar las mejores formas alternativas para proteger el medio acuático<sup>13,14</sup>.

En otros países también se han preocupado por el estudio y desarrollo de este tipo de modelos para la contaminación del agua, tal es el caso de Kenia-África que a pesar de la escasez de información se logró satisfactoriamente evaluar el impacto del recurso hídrico<sup>15</sup>. En Latinoamérica estos modelos se han aplicado en países como México, Brasil; Perú-Ecuador; República Dominicana y Venezuela. En México el estudio de modelos matemáticos dedicados a la evaluación de contaminación del agua se da a partir de los años 80's<sup>16</sup>.

### Modelo matemático

Un modelo matemático representa propiedades (variables o constantes) de un sistema mediante símbolos ( $x$ ,  $y$ ) y las relaciones entre las propiedades mediante operaciones matemáticas. Muchas veces son sistemas de ecuaciones diferenciales que se resuelven por métodos analíticos o numéricos<sup>17</sup>, que se complementan con paquetes de software computacionales mostrando una reproducción simulada de un sistema en el que se idealizan y se simplifican en mayor o menor medida las condiciones y los procesos más importantes que ocurren en el lugar de interés<sup>18</sup>.

Para evaluar los planes alternativos para el control y manejo de la calidad del agua pueden emplearse modelos matemáticos que relacionan la descarga de contaminantes con los parámetros del agua del cuerpo receptor, siendo una herramienta predictiva para el diseño de sistemas de remediación y a la vez una alternativa para el control y manejo de los recursos hídricos<sup>19</sup>.

Un modelo matemático ideal debe contar con las siguientes características<sup>20</sup>:

- Exacto (tiene pequeños errores).
- Realista (está basado en suposiciones correctas).
- Robusto (inmune a errores de entrada, buen desempeño).
- Generalizable.
- Útil.

### Construcción del Modelo matemático

La cuestión de la calidad del agua es un problema difícil porque el agua es un sistema físico, bioquímico y ecológico complejo. Una solución efectiva para analizar y resolver diversos problemas en los sistemas de agua son los métodos basados en modelos matemáticos ya que ayudan a predecir su comportamiento y a determinar los resultados de las acciones de diferentes procesos ambientales<sup>21</sup>. Por lo anterior, numerosos esfuerzos a nivel internacional han sido dirigidos a establecer unos lineamientos generales a seguir durante la construcción de modelos de calidad del agua<sup>22</sup>.

Antes de iniciar con la modelación se debe considerar<sup>22, 23,24, 25</sup> lo siguiente:

- Identificación del problema o proceso a resolver, junto con los objetivos, que deben ser claros y concisos.
- Delimitación del sistema, componentes y propiedades que necesitan ser considerados en tiempo y espacio.
- Creación del modelo conceptual para entender la dinámica del sistema, identificando fronteras y límites (entradas y salidas) así como variables de estado, parámetros, variables externas y controladoras mediante diagramas o esquemas.
- Parametrización de los elementos del sistema obtenidos de la literatura y/o de las mediciones obtenidas en campo.
- Validación y calibración del modelo con los datos disponibles y obtenidos. Los resultados del modelo y los datos medidos son comparados, y los parámetros de calibración son ajustados hasta que se alcanza una concordancia razonable entre los datos del modelo y los observados.
- Evaluación estructural (cualitativa) y predictiva (cuantitativa) de los datos de salida. Un modelo es estructuralmente evaluado si la relación causa y efecto representan la realidad y hay una evaluación predictiva si el comportamiento del modelo es razonable y acorde con la realidad.

### Clasificación de los modelos matemáticos

Existen diversos modelos según sea el tipo de contaminante, tipo de fuente (puntual o difusa) y según sean sus características (morfológicas, hidráulicas y ecológicas) estimando cambios en las concentraciones de contaminantes y sus diversos procesos de transformación física, química y biológica que ocurren dentro del sistema<sup>26</sup>.

Según sean de los objetivos, los modelos matemáticos pueden clasificarse ampliamente como modelos de simulación (para predecir cambios en la calidad del agua debido a una fuente de contaminación) y modelos de optimización (para la asignación óptima de recursos). La figura 1 ilustra la clasificación de los modelos matemáticos de calidad de agua<sup>26</sup>.



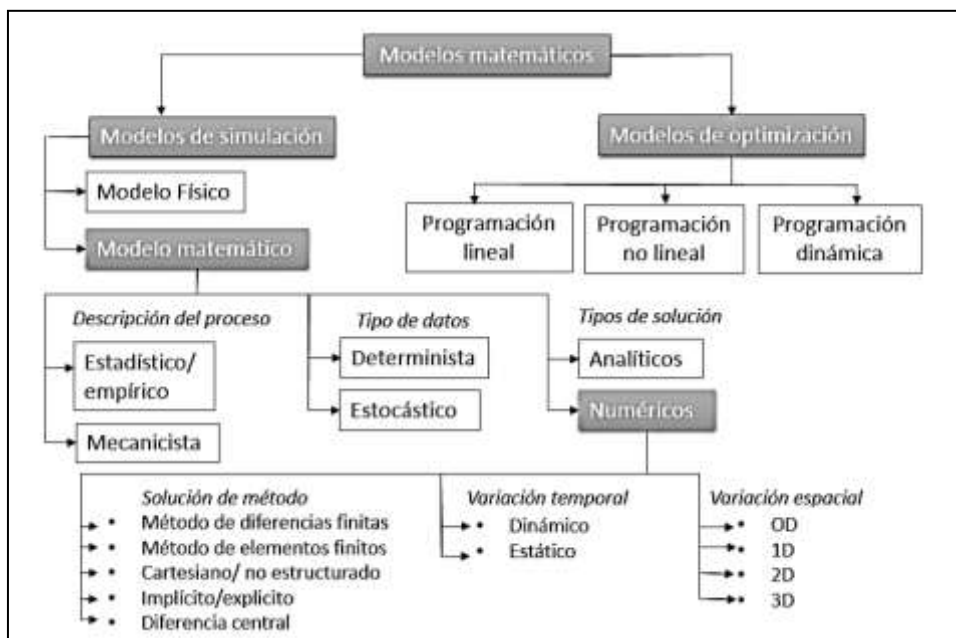


Figura 1. Clasificación de modelos matemáticos<sup>26</sup>.

#### Según la descripción del proceso<sup>27,28</sup>

- Estadístico/ empírico: son descripciones directas de datos y busca relaciones estadísticamente significativas entre variables mediante algunas funciones matemáticas, usando la información recogida experimentalmente del sistema. Cuentan con un alto poder predictivo pero una escasa capacidad explicativa de los mecanismos subyacentes.
- Mecanicista: generalmente son modelos determinísticos, definidos mediante un conjunto o sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias no-lineales, describen el comportamiento de las variables de estado (variables que representan las propiedades relevantes o atributos del sistema) del sistema, expresan hipótesis matemáticamente y proporcionan una descripción cuantitativa y una explicación de los procesos más importantes que ocurren en un sistema biológico.

#### Según el tipo de datos<sup>29</sup>

- Deterministas: se pueden controlar los factores que intervienen en el estudio del proceso o fenómeno y por tanto se pueden predecir con exactitud sus resultados.
- Estocásticos/ Probabilísticos: no es posible controlar los factores que intervienen en el estudio del fenómeno y en consecuencia no produce simples resultados únicos. Cada uno de los resultados posibles se genera con una función de probabilidad que le adjudica una probabilidad a cada uno de éstos.

#### Según los tipos de solución<sup>30</sup>

- Analíticos: Se refieren a un análisis de la calidad o la tendencia de un fenómeno sin calcular un valor exacto.
- Numéricos: Los resultados obtenidos tienen un valor concreto que tiene un cierto significado.

#### Según la variación temporal<sup>30</sup>

- Estáticos: aquellos que no toman en cuenta, explícitamente, a la variable tiempo.
- Dinámicos: son generalmente modelos que contienen o dependen de un elemento de tiempo, especialmente permitiendo interacciones entre variables a lo largo del tiempo.

#### Según la variación espacial<sup>30, 31, 32</sup>

- Cero dimensiones (0D): Supone mezcla completa; los balances de masa se desarrollan por etapas, las ecuaciones de transporte y masa tienen solución analítica y normalmente son rápidas de ejecutar, no permite estratificación; es aplicable a sistemas totalmente mezclados.
- Unidimensionales (1D): simulan los procesos considerando una dimensión en el espacio, asumen que los cambios significativos en los parámetros que determinan la calidad del agua

ocurren solo a lo largo del perfil longitudinal del flujo de agua, midiendo las cargas de concentración de los parámetros del agua que fluyen hacia adentro y hacia afuera, son relativamente rápidos de ejecutar a cualquier otro depósito de agua sin precalibración y con una pequeña base de datos disponible. Su desventaja es que no permite estratificación horizontal.

- Bidimensionales (2D): Permiten la modelación de calidad del agua en sentido del flujo y variaciones con la profundidad o laterales, requieren más datos y su calibración debe ser cuidadosa ya que son sensibles a los cambios de muchos parámetros de la calidad del agua. Su resultado final es un pronóstico de los parámetros cercano a las mediciones de las concentraciones reales.
- Tridimensionales (3D): Representan todas las direcciones. Presentan un gran número de factores que necesitan ser estimados para que el modelo pueda ser utilizado. Incluyen diferenciación lateral (y), longitudinal (x) y de profundidad (z) y pueden representar cualquier geometría, son modelos disponibles con representaciones detalladas de los procesos hidrodinámicos y de calidad; son compatibles con modelos geoquímicos.

Esquema general de un modelo matemático

Un modelo conceptual es un esquema en el cual se debe incluir una descripción general del funcionamiento del sistema, con base en la información secundaria recopilada y en los reconocimientos de campo realizados, localizando y definiendo las entradas (variables del entorno que influyen sobre el comportamiento del sistema), salidas (variables del sistema que son observadas o modifican el entorno), fuentes, sumideros y procesos fisicoquímicos, biológicos, características hidrológicas, hidráulicas, ecológicas, geomorfológicas, topográficas, usos de suelo o calidad del agua<sup>20,24,30, 33</sup>.

A continuación, se muestra un esquema que permite visualizar la representación de un sistema (Figura 2).

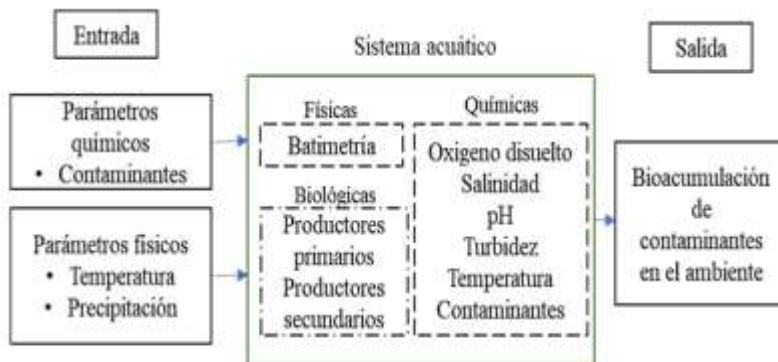


Figura 2. Esquema-representación de un sistema acuático.

Herramientas disponibles para la simulación de calidad de agua

Existe una gran diversidad de paquetes de software o herramientas de modelación de la calidad de las aguas superficiales. Algunas instituciones han desarrollado portales en Internet donde se recopilan módulos de calidad de agua con acceso a documentación, referencias a los modelos e incluso se permite la comparación entre los mismos<sup>34</sup>. Existen herramientas que simulan zonas de mezcla; ríos, lagos, estuarios, zonas costeras, humedales o cuencas que han sido diseñadas específicamente para los mismos<sup>35</sup>. Algunos ejemplos de modelos para estudios de calidad de aguas en ríos, corrientes y lagos se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Tipos de modelos matemáticos para la calidad de agua

Modelo	Características	Ventajas	Desventajas	Ejemplo de aplicación
<p><b>CE-QUAL-W2</b> (<i>The two-dimensional, laterally averaged, hydrodynamic and water quality model</i>) (El modelo bidimensional, promediado lateralmente, hidrodinámico y de calidad del agua)</p> <p><b>USDA</b></p>	<p>Es un modelo bidimensional, longitudinal-vertical, hidrodinámico y de la calidad del agua, para ríos, estuarios, lagos y embalses. Está programado en el esquema numérico de las diferencias finitas y modeliza la variación de la temperatura, densidad y velocidad a partir de los datos meteorológicos e hidrológicos<sup>36</sup>.</p>	<p>Modelo hidrodinámico de calidad de agua, longitudinal-vertical en sistemas estratificados y no estratificados, se crean simulaciones a largo plazo, su tipo de transporte es advectivo, dispersivo e intercambio de sedimentos, es un modelo gratuito<sup>37</sup>.</p>	<p>Una limitación de la herramienta es el supuesto de mezclado completo en dirección lateral y la suposición de los valores hidrostáticos para la ecuación de momentum. Dado que el impulso vertical no está incluido, el modelo puede dar resultados inexactos donde hay una aceleración vertical significativa, no cuenta con auto-calibración, no simula metales pesados<sup>30</sup>.</p>	<p>Desarrollo de un modelo hidrodinámico y de calidad de agua en la presa de Aguamilpa (Nayarit, México)<sup>21</sup>. El objetivo de este estudio fue la aplicación y calibración de balance hídrico en la presa de Aguamilpa mediante el software CE-QUAL-W2 para conocer el funcionamiento del sistema y establecer políticas de manejo que permitan la sustentabilidad del recurso hídrico.</p>
<p><b>WASP</b> (<i>The Water Quality Analysis Simulation Program</i>) (El Programa de Simulación de Análisis de Calidad del Agua)</p> <p><b>USDA</b></p>	<p>Permite simular el comportamiento dinámico de un sistema acuático como ríos, lagunas y estuarios, incluyendo la columna de agua y los bentos. Este modelo permite analizar sistemas en una, dos y tres dimensiones y para un variado número de contaminantes, es de acceso gratuito<sup>38</sup>.</p>	<p>Debido a las capacidades de manejar múltiples tipos de contaminantes incluidos metales pesados y plaguicidas, tiene la capacidad de vincularse con modelos hidrodinámicos y de cuencas hidrográficas que permiten el análisis de varios años bajo condiciones meteorológicas, tiene la capacidad de ejecutarse en los sistemas operativos: Windows 7 de 64 bits o superior, Mac OSX y Linux Ubuntu<sup>10</sup>.</p>	<p>No modela áreas que secan, como planicies de inundación. Los archivos hidrodinámicos externos suelen ser bastante pesados. Posee módulos separados de eutrofización avanzada y tóxico avanzado<sup>10</sup>.</p>	<p>Aplicación del modelo WASP para la evaluación de la calidad del agua para el control de la eutrofización de un reservorio en los Andes peruanos<sup>39</sup>. El objetivo del estudio fue la utilización de un programa de simulación de análisis de calidad del agua (WASP) para evaluar el proceso de eutrofización en el embalse de El Pañe.</p>
<p><b>SWAT</b> (<i>Soil and Water Assessment Tool</i>) (Herramienta de evaluación de suelos y aguas)</p> <p><b>USDA</b></p>	<p>Es un modelo que combina bases físicas y conceptuales con procedimientos empíricos. Evalúa el impacto del uso y manejo de la tierra sobre la producción y calidad del agua y el movimiento de sedimentos y nutrientes en cuencas hidrológicas durante largos periodos de tiempo<sup>40</sup>. El software puede descargarse de manera gratuita.</p>	<p>Modela al ciclo hidrológico tanto a través del flujo superficial de la cuenca como en el flujo unidimensional en el cauce principal y sus tributarios, permite simular procesos de calidad del agua como pesticidas, nutrientes y bacterias<sup>41</sup>. El modelo hidrológico está basado en la ecuación general de balance hídrico<sup>42</sup>. Tiene interacción con los Sistemas de Información Geográfica<sup>43</sup>.</p>	<p>La interfaz es restrictiva y poco amigable, lo cual dificulta la interpretación de resultados requiriendo de complementos como SWAT-Plot. El acceso a SWAT es gratuito sin embargo depende de un software licenciado como ArcGIS<sup>44</sup>.</p>	<p>Aplicación del modelo SWAT a un río afectado por AMD (río Meca, SW España). Estimación de la carga contaminante transportada<sup>45</sup>. El objetivo fue la evaluación de la carga transportada por el río Meca al embalse de Sancho, utilizando el modelo SWAT.</p>
<p><b>QUASAR</b> (<i>Quality simulation along river systems</i>) (Simulación de calidad a lo largo de los sistemas fluviales)</p> <p><b>EUROPA</b></p>	<p>Analiza el impacto ambiental de contaminantes en la calidad del agua de los ríos. Tiene en cuenta los procesos de descomposición química y el comportamiento biológico, así como las abstracciones. Se puede utilizar tanto en modo de planificación como en modo dinámico<sup>46</sup>. El acceso a QUASAR es gratuito.</p>	<p>Describe los cambios en la calidad del agua a lo largo del tiempo. Proporciona un método para facilitar la comparación entre el estado actual de un río y el que existiría después de un cambio en la red fluvial debido a un evento planificado o no planificado. Los principios del funcionamiento de QUASAR se basan en el balance de masa<sup>46</sup>.</p>	<p>El modelo es más adecuado para simulaciones dinámicas que para simulaciones estocásticas. Como modelo estocástico, QUASAR es muy limitado y no incluye correlaciones y tipos de distribución como se ve en otros modelos<sup>46</sup>.</p>	<p>Simulación de calidad a lo largo de ríos (QUASAR): una aplicación para el Yorkshire Ouse<sup>47</sup>. El objetivo de este estudio fue la aplicación del modelo QUASAR para simular la calidad del agua en el Yorkshire Ouse. Los resultados mostraron que QUASAR se puede utilizar para simular el flujo y la calidad del</p>

				agua en sistemas fluviales complejos como el Yorkshire Ouse.
<b>MIKE 11</b> <b>EUROPA</b>	Se caracteriza como un modelo distribuido y estocástico <sup>48</sup> . Es un modelo unidimensional para la simulación de caudales, calidad del agua y transporte de sedimentos en canales, ríos, sistemas de riego y estuarios <sup>49</sup> . El MIKE 11 es un modelo implícito de diferencias finitas para el cálculo de flujo inestable unidimensional <sup>50</sup> .	Descripción hidráulica precisa en ríos/canales (cuyo flujo es unidireccional), es rápido, ya que posee menos puntos computacionales (nodos) y, por consiguiente, el tiempo de procesamiento es menor; Fácil de analizar y extraer resultados (a través de la interfaz Mike View) <sup>50</sup> .	Los caminos del flujo deben ser conocidos; se requiere más esfuerzo para esquematización del modelo que en modelos 2D; Flujo medio a lo largo de la profundidad y ancho del canal, sin descripción de flujos detallados en planicies de inundación <sup>48,50</sup> .	Aplicación de un modelo hidrodinámico MIKE 11 para el río Éufrates en Iraq <sup>50</sup> . El enfoque del estudio fue el desarrollo de un modelo MIKE 11 basado en datos de corte transversal encuestados. Los resultados de este estudio muestran que el modelo ofrece una buena simulación del flujo.
<b>AQUATOX</b> <b>USDA</b>	Modelo mecanicista estocástico y bidimensional que sólo considera gradiente vertical. Es un modelo único para simular el impacto de la contaminación en la vida biológica y se puede utilizar para lagos, embalses, ríos y estuarios estratificados. También puede simular la transferencia de biomasa y productos químicos de un compartimento del ecosistema a otro, ya que supone que los segmentos individuales se mezclan uniformemente <sup>51</sup> .	Simula la transferencia de biomasa, energía y productos químicos de un compartimento del ecosistema a otro. Esto lo hace al calcular simultáneamente cada uno de los procesos químicos o biológicos más importantes para cada día del período de simulación <sup>51</sup> .	Es un modelo basado en el proceso, esto quiere decir que se opone a los modelos empíricos, que se basan a menudo en relaciones estadísticas. No permite la estratificación dinámica y se presume que los efectos tóxicos son aditivos y no modela metales <sup>26</sup> .	Aplicación de un modelo AQUATOX para la evaluación de los efectos tóxicos directos y los efectos ecológicos indirectos de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en un lago de eutrofización de meseta, China <sup>52</sup> . El estudio mostro que el modelo fue efectivo para estimar los efectos ecológicos indirectos de la competencia, la depredación de presas, la dilución de biomasa y otros efectos pasados a través de la red alimentaria.
<b>HEC-RAS</b> <i>(Hydrologic Engineering Center y River Analysis System)</i> (Centro de Ingeniería Hidrológica y Sistema de Análisis de Río) <b>USDA</b>	Permite el modelado hidráulico de los caudales en un cauce con circulación de los caudales. Se trata de un modelo hidráulico unidimensional en régimen gradualmente variado que permite representar flujo estacionario, flujo no estacionario, transporte de sedimentos y el cálculo del lecho móvil y modelado de la temperatura del agua <sup>53</sup> .	Permite la simulación de distintas situaciones de avenidas fluviales, permitiendo analizar diversas causas y reflejar los resultados tanto en lo que se refiere al área de inundación como a los perfiles de velocidad asociados a la misma. Constituyendo una herramienta útil para la predicción de daños ocasionados por este tipo de fenómenos <sup>54</sup> .	Es un modelo para régimen laminar y tiene problemas en régimen turbulento. La ecuación de la conservación de la energía supone siempre distribuciones hidrostáticas de presiones y la ecuación de fricción permanente de Manning, siendo por tanto la solución una simplificación que no se ajusta a la realidad en los casos donde las presiones y las tensiones turbulentas se alejan del modelo lineal.	Se desarrolló el modelo hidráulico Hec-Ras y se determinó la delimitación de la faja marginal del río Caplina sector Río Seco, para salvaguardar la vida humana y la protección de zonas intangibles de propiedad marginal <sup>55</sup> . El estudio fue satisfactorio para la población ya que el río seguirá su cauce con normalidad.
<b>HSPF</b> <i>(Hydrological Simulation Program FORTAN)</i> (Programa de Simulación Hidrológica FORTAN) <b>USDA</b>	Modelo sofisticado y de alto nivel de la cuenca capaz de realizar simulación continua de la superficie y el flujo subsuperficial asociado a procesos biológicos, físicos, químicos <sup>31</sup> .	Simula el movimiento de contaminantes a través de cuencas hidrográficas. Es un conjunto de códigos de computadora que puede simular los procesos hidrológicos y de calidad del agua asociados en superficies de tierra permeables e impermeables y en arroyos y embalses bien mezclados <sup>56</sup> .	Necesita datos extensos como, por ejemplo, intensidad de lluvia horaria. Definición espacial limitada. No hay guía completa disponible de los parámetros de estimación <sup>57</sup> .	Modelado hidrológico de la cuenca del Seydi Suyu (Turquía) con HSPF <sup>57</sup> . El objetivo de estudio fue comparar las simulaciones de base realizadas para los años de agua de 1991-1994, examinando los efectos del aumento de la temperatura debido al cambio climático.

### Situación actual de la modelación matemática

Actualmente los modelos hidrológicos enfrentan diversos retos para el desarrollo de soluciones sobre el manejo del agua en términos de calidad y cantidad, ya que se necesitan modelos confiables que puedan predecir el comportamiento real de un sistema.

Hoy en día, la comunidad de las ciencias del agua no cuenta con suficientes herramientas y conocimientos necesarios para manejar este tipo de predicciones con el nivel necesario de confianza.

La integración de diversas ciencias es necesaria para conocer todos los procesos hidrológicos, que son relevantes para un problema en particular, ya que es necesario un análisis profundo del sistema hidrológico, con la identificación de procesos relevantes y con el establecimiento de nuevos modelos conceptuales y estructuras de software<sup>58</sup>.

En nuestro país, desafortunadamente, el desarrollo de la aplicación de métodos matemáticos es desigual, ya que a pesar de que los modelos matemáticos del sector hídrico contribuyen a delinear políticas, hace falta ponerlos en práctica en todo el país y que los organismos operadores estatales los utilicen, e inclusive las universidades e instituciones privadas, ya que estos ofrecen bases técnicas de la planeación para el manejo del recurso hídrico<sup>38,59</sup>.

### CONCLUSIÓN

El tema de la calidad del agua es clave para el desarrollo humano sostenible, siendo un problema complejo y, por lo tanto, su solución es necesaria para involucrar a expertos de todos los campos: física, química, matemáticas, entre otros. De lo anterior se ha realizado una serie de investigaciones basados en modelos matemáticos en los sistemas lagunares, principalmente. Se han probado varios modelos matemáticos con la intención de conocer el comportamiento de la contaminación en los sistemas acuáticos, pero son sensibles a los cambios en los parámetros ambientales por lo que requieren una selección cuidadosa. Por lo tanto, el modelado de la calidad del agua presenta un especial desafío para el análisis y caracterización de los sistemas acuáticos, ya que exige la integración de varias disciplinas. Y finalmente en México existen pocos ejemplos de aplicación de modelos matemáticos complejos al estudio de cuerpos acuáticos, siendo el agua un recurso natural de vital importancia debido a la contaminación biológica, física y química.

### BIBLIOGRAFIA

1. M.C. Benez, E.F. M. Kauffer, G. D. C. G. Álvarez, "Percepciones ambientales de la calidad del agua superficial en la microcuenca del río Fogótico, Chiapas", *Frontera norte*, Vol. 22, 43, 2010, pp.129-158.
2. World Economic Forum, "The Global Risks Report 2017", Geneva: World Economic Forum.
3. P.F. Martínez-Austria, C. Díaz-Delgado, G. Moeller-Chavez, "Seguridad hídrica en México: diagnóstico general y desafíos principales", *Ingeniería del agua*, Vol. 23,2, 2019, pp. 107-121.
4. C.E. Graniel, C.M.E. Carrillo, "Calidad del agua del río Zanatenco en el estado de Chiapas", *Ingeniería*, Vol. 10,3, 2006, pp. 35-42.
5. E.M.C. Guerrero, J.G.C. Bautista, J.J.C. Blanco, S.I.C. Laurencio, F.E. R. Mundaca, R. L. Romero, K.G.R. Chirito, Y.G. A. Gonzales, "Modelación de la dispersión de contaminantes del agua de la cuenca del Río Huaura-2017", Repositorio Institucional, 2018.
6. ONU, "Objetivos del desarrollo sostenible", Organización Nacional de las Naciones Unidas, 2019, en línea. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/water-and-sanitation/>
7. WWAP. "Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2017. Aguas residuales: El recurso desaprovechado", (Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos de las Naciones Unidas, UNESCO, Paris, 2017), Capítulo 4, pp. 39-47.
8. A.P. Acuña, "La calidad del agua: un eje clave de política pública", *Tecnología y ciencias del agua*, Vol. 3, 2020, pp. 3.
9. C. Matovelle, "Modelo matemático de calidad de agua aplicado en la microcuenca del río Tabacay", *Revista Killkana Técnica*, Vol. 1, 1, 2017, pp. 39-48.

10. E. Suhendra, C.H. Chang, W.C. Hou, Y.C. Hsieh, "A review on the environmental fate models for predicting the distribution of engineered nanomaterials in surface Waters", *International journal of molecular sciences*, Vol. 21, 12, 2020, pp. 4554.
11. B. Cruz-Arévalo, F. Gavi-Reyes, M. Martínez-Menez, J. Juárez-Méndez, "Uso de suelo y su efecto en el escurrimiento modelado con SWAT", *Tecnología y ciencias del agua*, Vol. 12, 2, 2021, pp. 157-206.
12. G.T. Orlob, "Mathematical Modeling of Water Quality: Streams, Lakes, and Reservoirs", (John Wiley & Sons -International Institute for Applied Systems Analysis (IIASA), USA, 1983), Capítulo 1, pp. 1-7.
13. J.B. Pardo, M.T.L. Imízcoz, I.P. Blanco, "La colección de modelos matemáticos de la Universidad de Zaragoza", *La Gaceta de la RSME.*, Vol. 15,1, 2012, pp. 187-204.
14. I. Polo-Blanco, "Theory and history of geometric models: I Models of surfaces, a Dutch perspective", (University Library Groningen, 2007), Capítulo 1, pp. 1-21.
15. B.C. Martínez, O.R. Rosado, F.G. López, P.P. Hernández, A.M. Becerra, L.V. Villamil, "Aplicación de modelos de simulación en el estudio y planificación de la agricultura, una revisión", *Trop. subtrop. Agroecosyt.*, Vol. 14, 3, 2011, pp. 999-1010.
16. A.G. Barrios, L.A. Ubarri, "Aplicación del modelo SWAT en los Andes venezolanos: Cuenca alta del río Chama", *Revista Geográfica Venezolana*, Vol. 51, 1, 2010, pp.11-29.
17. J.V. Padilla, "La simulación y los modelos matemáticos", *Rev. Vent. Cient.*, Vol. 4,8, 2014, pp. 68-70.
18. D. Boah, S. Twum, "A Review of Water Quality Optimisation Models and Techniques", *Journal of Applied Mathematics and Physics*, Vol. 8,3, 2020, pp. 424-433.
19. Y. Drozdov, A. V. Aleksakhin, Y. V. Aleksakhina, D. A. Petrusevich, "Mathematical models of water pollution evaluation", In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, Vol. 684, 1, 2021, p. 012026.
20. J.P. Vedia, "La simulación y los modelos matemáticos", *Rev. Vent. Cient.*, Vol. 4, 68, 2014.
21. P.J. Rangel, "Desarrollo de un modelo hidrodinámico y de calidad del agua en la presa de Aguamilpa (Nayarit, México)", Tesis Doctoral. Facultad de ingeniería Ambiental. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C, Guadalajara, Jalisco, México, 2012, 176 pp.
22. L.F.P. Gálvez, "Modelación matemática en ingeniería", *Rev. investig. educ. REDIECH.*, Vol. 7, 13, 2016, pp. 47-57.
23. A.A. Rosedo, "Propuesta de un modelo matemático para la transformación de nitrógeno y carbono presentes en lagunas facultativas secundarias, utilizadas en el tratamiento de aguas residuales", Tesis de maestría, Escuela de ingeniería de recursos naturales y del ambiente, Universidad del Valle, Santiago de Cali, 2013, pp.191.
24. B.F. Torres, L.H. Ramírez, C. C. Rodríguez, M.P. Tejera-González, M.C Vásquez-Jaraba, "Validación de un modelo hidrodinámico y calidad del agua para el Río Magdalena, en el tramo adyacente a Barranquilla, Colombia", *Hidrobiológica*, Vol. 25, 1, 2015, pp. 7-23.
25. M.E. Castañeda-Zavaleta, "Directrices para el modelamiento de aguas subterráneas en Perú", Technical Report, Vol. 23, 5, 2017, pp. 37-54.
26. D. Sharma, A. Kansal, "Assessment of river quality models: a review", *Rev Environ Sci Biotechnol.*, Vol. 12,3, 2013, pp. 285-311.
27. L. L. Hurtado, "Modelamiento teórico y modelamiento empírico de procesos, una síntesis", *Scientia Et Technica*, Vol. 2, 31, 2006, pp. 103-108.
28. I.L. López-Cruz, A. Ramírez-Arias, A. Rojano-Aguilar, "Modelos matemáticos de hortalizas en invernadero: trascendiendo la contemplación de la dinámica de cultivos", *Revista Chapingo Serie Horticultura*, Vol. 11, 2, 2005, pp. 257-267.
29. O.A. Montesinos-López, C.M. Hernández-Suárez C.M, "Modelos matemáticos para enfermedades infecciosa", *Salud Pública de México*, Vol. 49, 3, 2007, pp. 218-226.
30. MINIAMBIENTE, "Guía nacional de modelación del recurso hídrico para aguas superficiales continentales. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible", Grupo Divulgación de Conocimiento y Cultura Ambiental, Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, Bogotá, Colombia, 2018, pp. 75.

31. A. [Ziemińska-Stolarska](#), S. Jerzy, "Review of mathematical models of water quality". *Ecol Chem Eng S.*, Vol. 1, 6, 2012, pp. 36-49.
32. J. Barceló, "Simulación de sistemas discretos" (Ingeniería de sistemas, 4ta Ed. ISDEFE., Madrid, España, 1996), Capítulo 1, pp. 17-67.
33. E. A. D. Calle, "Protocolo para la modelación matemática de procesos hidrológicos", *Meteorol. Colomb.*, Vol. 2, pp. 33-38.
34. J.P. Arquiola, "Integración de la modelación de la calidad del agua en un sistema de ayuda a la decisión para la gestión de recursos hídricos", Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, España, 2004, pp. 264.
35. B.E. Jiménez-Cisneros, M. R. Domínguez, "Metodología para evaluar la modificación de la capacidad de autodepuración de los ríos por efecto del cambio climático", Tesis Doctoral, Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, 2013, pp. 143.
36. T.M. Cole y S.A. Wells, "CE-QUAL-W2: A two-dimensional, laterally averaged, Hydrodynamic and Water Quality Model, Version 3.5", Instruction Report EL-06-1, US Army Engineering and Research Development Center, Vicksburg, MS, 2006, pp. 354.
37. S.A. Wells, "CE-QUAL-W2: A Two-Dimensional, Later-ally Averaged, Hydrodynamic and Water Quality Model, Version 4.2.2", (Portland State University, E.U, 2020), Capítulo 1, pp.6-18.
38. T. Wool, R. B. Ambrose Jr, M.L James, A. Comer, "WASP 8: The Next Generation in the 50-year Evolution of USEPA's Water Quality Model", *Water*, Vol. 12, 5, 2020, pp. 1398.
39. A.J. [Mamani- Larico](#), S.A.Z. [Medina](#), "Application of WASP model for assessment of water quality for eutrophication control for a reservoir in the Peruvian Andes", *Lakes & Reservoirs: Research & Management*, Vol. 24, 37, 2019, pp. 37-47.
40. D. Bautista-Ávalos, G. Cruz-Cárdenas, R. Moncayo-Estrada, J.T.S. García, F. Estrada-Godoy, "Aplicación del modelo SWAT para evaluar la contaminación por fuentes difusas en la subcuenca del lago de Chapala, México", *Revista internacional de contaminación ambiental*, Vol. 30, 3, 2014, pp. 263-274.
41. J. F. Weber, S. B. Ocampo, "Calibración del modelo hidrológico SWAT para una cuenca de la región serrana de Córdoba (Argentina)", *Aqua-Lac*, Vol.11,1, 2019, pp. 34-54.
42. E. Torres-Benites, D. S. Fernández-Reynoso, J. L. Oropeza-Mota, E. Mejía-Saenz, "Calibración del modelo hidrológico SWAT en la cuenca El Tejocote", *Atacomulco, Estado de México*, *Terra Latinoamericana*, Vol. 22, 4, 2004, pp. 437-444.
43. O.P. Grey, D.F.S.G. Webber, S.G. Setegn, A.M. Melesse, "Application of the Soil and Water Assessment Tool (SWAT Model) on a small tropical island (Great River Watershed, Jamaica) as a tool in Integrated Watershed and Coastal Zone Management", *Revista de Biología Tropical*, Vol. 62, 3, 2014, pp. 293-305.
44. P. W. Gassman, M. R. Reyes, C. H. Green, J. G. Arnold, "The soil and water assessment tool: historical development, applications, and future research directions", *Transactions of the ASABE*, Vol. 50,4, 2007, pp. 1211-1250.
45. L. Galván, M. Olías, M., R. F. de Villarán, J. D Santos, J. M Nieto, A. M. Sarmiento, C. R. Cánovas, "Application of the SWAT model to an AMD-affected river (Meca River, SW Spain)". Estimation of transported pollutant load", *Journal of hydrology*, Vol. 377, 3-4, 2009, pp. 445-454.
46. S. Ranjith, A. V. Shivapur, P. S. K. Kumar, C. G. Hiremath, S. Dhungana, "Water quality model for streams: a review", *Journal of Environmental Protection*, Vol. 10, 12, 2019, pp. 1612-1648.
47. D.R. Lewis, R.J. [Williams](#), P.J. [Whitehead](#), "Quality simulation along rivers (QUASAR): an application to the Yorkshire Ouse", [Science of The Total Environment](#). Vol. 194, 1, 1997, pp. 399-418.
48. M. A. Torres, I. Nikolskii, M. E. Martínez-Miranda, M. R. Martínez, "Evaluación hidrológica de la cuenca del río Teapa, utilizando el modelo MIKE-SHE", *Tecnología y ciencias del agua*, Vol. 9,4, 2018, pp. 130-146.
49. J. Liang, Q. Yang, T. Sun, J. D. Martin, H. Sun, L. Li, "MIKE 11 model-based water quality model as a tool for the evaluation of water quality management plans". *Journal of Water Supply: Research and Technology—AQUA*, Vol. 64, 6, 2015, pp. 708-718.

50. A. H. Kamel, "Application of a hydrodynamic MIKE 11 model for the Euphrates River in Iraq", *Slovak Journal of Civil Engineering*, Vol. 2, 1, 2008, pp. 1-7.
51. J. Yeom, I. Kim, M. Kim, K. Cho, S.D. Kim, "Coupling of the AQUATOX and EFDC Models for Ecological Impact Assessment of Chemical Spill Scenarios in the Jeonju River, Korea", *Biology*, Vol. 9, 10, 2020, pp. 340.
52. L. Zhang, J. Cuia, T. Songa, Y. Liub, "Application of an AQUATOX model for direct toxic effects and indirect ecological effects assessment of Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a plateau eutrophication lake, China", [Ecological Modelling](#), Vol. 388, 1, 2018, pp. 31-44.
53. C. Alcacer, "Modelización de los Recursos Hídricos: Herramientas de Apoyo de la Decisión e Información (HADIs) en condiciones de Incertidumbre", Tesis Doctoral, Universidad Pablo de Olavide. Sevilla, España, 2015, pp. 516.
54. J. C. R. Ortiz, M. Pérez, G. Delfín, C. Freitez, F. Martínez, "Análisis comparativo entre los modelos HEC-RAS e IBER en la evaluación hidráulica de puentes", *Gaceta Técnica*, Vol. 17, 1, 2017, pp. 9-28.
55. S. M. Irma, E. C. Ticona, A. N. V. Alarcón, "Modelo hidráulico para delimitación de faja marginal río Caplina Sector Río Seco, distrito G. Albarracín L.-Tacna-2020". *Ingeniería Investiga*, Vol. 3, 1, 2021, pp. 534-545.
56. P. Zhang, J. Zhang, Y. Song, "Hydrological Simulation of Taizi River Basin with HSPF Model", *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, Vol. 330, 3, 2019, pp. 032014.
57. A. Mine, B.O. Ulker, A. Erdem, "Hydrological modeling of Seydi Suyu watershed (Turkey) with HSPF", *Journal of Hydrology*, Vol. 285, 1, 2004, pp. 260-271.
58. CONACYT, "Programa especial de ciencia y tecnología en materia de agua documento básico de líneas prioritarias de investigación, desarrollo tecnológico y formación de recursos humanos en materia de agua en México" (Foro consultivo científico y tecnológico, A.C., México, 2012), Capítulo 7, pp. 44-46.
59. J.X. V. Hernández "El gen, la forma, el virus y la idea: una perspectiva personal de la biología matemática", *Miscelánea matemática*. Vol. 32, 2000, pp. 5-38.



## **ANÁLISIS DE PB, CD Y AS ASOCIADOS A FASES DE SUELOS CONTAMINADOS POR JALES MINEROS DE GUANAJUATO, GTO**

Laura Patricia Muñoz Luna, David Tirado Torres, Eladio Delgadillo Ruíz, Felicitas Calderón Vega, Natividad Ramírez Ramírez, Juan Carlos Baltazar Vera y Guadalupe Vázquez Rodríguez.

Universidad de Guanajuato División de Ingenierías Campus Guanajuato, Avenida Juárez No. 77, Col. Centro C.P. 36000, Guanajuato, Gto., México.

[vazquez.g@ugto.mx](mailto:vazquez.g@ugto.mx)

### **RESUMEN**

Se evaluó la movilidad de arsénico, plomo y cadmio en jales mineros históricos dispuestos en la mancha urbana de la ciudad de Guanajuato, Gto., México. Las determinaciones se llevaron a cabo con dos protocolos de extracción una para óxidos de Fe y Mg y la siguiente con extractante específico para movilizar arsénico. Los resultados de las extracciones permitieron diferenciar las concentraciones de metales y arsénico que podrían estar disponibles en los sitios impactados por la deposición de jales. El muestreo de suelos invadidos por jales mineros históricos se llevó a cabo en el área urbana de Guanajuato, Gto., México. Las muestras de suelo de referencia se realizaron en un área sin actividad industrial (5 km de la caseta de cobro Silao-Guanajuato). Las muestras se tamizaron en 117, 125 y 74 micras. Se realizó un análisis mineralógico para conocer su composición, arrojando que se componen mayoritariamente de yeso y calcita. Posteriormente sometieron a una digestión ácida como preparación para la Extracción Secuencial Selectiva para el estudio de la movilidad de los (Elementos Potencialmente Tóxicos) EPT en esta zona de estudio, obteniendo una movilidad de As entre 6 y 36%. Se observó que la mayor movilidad se lleva a cabo en la fase asociada a carbonatos y óxidos de Fe y Mn, siendo la mayor movilidad por intercambio iónico.

### **INTRODUCCIÓN**

El impacto al sistema de cuencas en el estado de Guanajuato se ha presentado entre otras causas, por la disposición de residuos mineros históricos. La dinámica y especiación de metales pesados y arsénico en la matriz del suelo y agua juega un rol importante en la traslocación hacia especies vegetales. Aunado a lo anterior, las condiciones locales específicas de pH y conductividad forman un ambiente que presenta cambios de vez en cuando donde la especiación es observada. La cuenca Silao-Romita presenta vertientes a la presa La Purísima ubicada en Guanajuato, Gto. México; misma que presenta uso potencial pesquero, agrícola y recreativo. En el presente trabajo se analiza la dinámica de plomo, cadmio y arsénico en función a la vulnerabilidad de la disposición de jales mineros evaluando la presencia de metales pesados provenientes de jales mineros dispuestos en la mancha urbana de la ciudad de Guanajuato, Gto., México.

Se realizó una investigación bibliográfica en la que se logró identificar muestreos y técnicas de determinación de metales para estas muestras; las determinaciones se llevaron a cabo con dos protocolos de extracción una para óxidos de Fe y Mg y la siguiente con extractante específico para movilizar arsénico. Los resultados de las extracciones permitieron diferenciar las concentraciones de metales y arsénico presentes en las muestras tomadas de la zona urbana de Guanajuato Capital dentro de la mancha urbana.

En el presente trabajo se describe la metodología utilizada para la realización de dichas determinaciones para finalmente terminar con los resultados obtenidos de las caracterizaciones mineralógicas, las extracciones secuenciales selectivas y el análisis de dichos datos.

### **TEORÍA**

La movilidad de EPT se puede definir como la migración o inestabilidad que presentan estos elementos debido a la alteración de fases estables del suelo o al equilibrio entre la fase sólida y la solución de suelo. Es fundamental conocer la especiación química de los EPT, así como la fracción mineralógica a la que se encuentren asociados, ya que en base a estas depende su disponibilidad y toxicidad para especies vegetales. Los metales en forma de precipitados que pueden llegar a ser disponibles por disolución ácida de la fase en la que se encuentran asociados.

La escala de movilidad de EPT considera las diferentes fases de suelo involucradas, las cuales pueden ser definidas en 6 tipos de fracciones: soluble en agua, intercambiable, asociada a

carbonatos, asociada a oxihidróxidos de hierro y manganeso, asociada a materia orgánica y sulfuros, residual.

En general, la movilidad de los EPT en la rizosfera de especies vegetales tolerantes a ambientes mineros es proporcional a las fracciones intercambiables, asociada a carbonatos e inclusive aquellas asociadas a óxidos de hierro y manganeso; dicho transporte de Elementos Potencialmente Tóxicos, en el suelo, es favorecido por cambios atmosféricos, difusión de oxígeno, porcentaje de humedad, contenido volumétrico de agua, así como del tipo y contenido de materia orgánica presente en el suelo (Baker A. J. M. y Brooks R. R. 1989, I Bautista, A. & Arnaud, 2006, M., Gámez Rodríguez, M., 2004). Las condiciones de intemperismo, así como la actividad biológica pueden modificar las condiciones locales de potencial de óxido-reducción (Eh) y pH, provocando la alteración de las fases minerales primarias y liberación de EPT. Los EPT liberados pueden ser incorporados a las plantas a través del suelo rizosférico previo a su disolución/absorción o ser retenidos en la superficie de las raíces vegetales y eventualmente pueden ser transportados a tallos, hojas y flores (Kabata-Pendias, A. and Pendias, 2002, Visoottiviseth P., 2002).

Factores que afectan la movilidad de EPT en suelos.

Las actividades mineras han dejado residuos que con el tiempo han sido modificados por procesos de alteración químicos, físicos y biológicos, asociados a las condiciones climáticas del lugar de deposición. Estos procesos de alteración son llevados a cabo por reacciones de disolución, oxido-reducción, adsorción-desorción y precipitación (Visoottiviseth P. (2002), las cuales pueden involucrar todos o algunos de los siguientes procesos: oxidación de sulfuros, disolución de óxidos y oxihidróxidos de Fe y Mn en condiciones ácidas y reductoras, desorción en condiciones oxidantes en medios alcalinos, desorción por reducción de superficie específica en la fase sólida y desorción por reducción en la carga de superficie de la fase sólida.

En horizontes profundos, la disminución de oxígeno origina la reducción química de óxidos asociados a la fase sólida formada inicialmente, favoreciendo la solubilidad de cationes y aniones adsorbidos sobre la fase oxidada (Ramos-Arroyo y col., 2004). Se registraron que la disolución de metales pesados de fases secundarias de minerales se lleva a cabo por efecto de las condiciones fisicoquímicas del medio que las contiene, y a los diferentes compartimentos del suelo que las contienen. Por lo tanto, se puede concluir que los EPT se encuentran asociados a diversas fracciones de suelo que pueden llegar a ser móviles en función de la matriz de este. Lo cual permite definir una escala de movilidad relativa que va desde las formas solubles en agua, hasta aquellos metales incorporados en las estructuras cristalinas de arcilla (Kabata-Pendias y Pendias, 2001).

Algunas de las características fisicoquímicas que influyen en la retención o movilidad de los EPT y que permitirán establecer la referencia de disponibilidad de estos bajo diferentes condiciones de alteración son: precipitación/disolución de fase sólida, coprecipitación, carbonatos, materia orgánica, arcillas.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Digestión total de suelos

Con el objetivo de analizar la concentración total de elementos en los suelos, las muestras secas, tamizadas y pulverizadas fueron digeridas, en placa de calentamiento con reflujo controlado utilizando 15 mL de una mezcla de HNO<sub>3</sub>/HCl relación 3:2 v/v, hasta sequedad y redisolución. Las muestras obtenidas fueron filtradas con filtros de papel Whatman #5 (diámetro de poro de 2.5 µm) y analizadas por espectrometría de absorción atómica (EAA).

Siguiendo el mismo procedimiento y condiciones de digestión empleado para las muestras de suelo, se llevaron a cabo digestiones de estándares certificados como control de calidad de la digestión. Los porcentajes de recuperación del suelo de referencia fueron evaluados con los materiales estándar de referencia NIST 2709 y NIST 2710 para concentraciones bajas y altas respectivamente.

### Estudio de movilidad de metales en suelo

Con el objeto de analizar la movilidad de EPT se implementó la prueba de extracción secuencial sucesiva (ESS1) propuesta originalmente por Tessier (1979) y modificada por Xiangdong (2001). La Figura 1 muestra el protocolo de ESS1 empleado. En este caso, también se evaluó la fracción de

EPT solubles en agua desionizada y se ajustó la fracción intercambiable de estos elementos con el siguiente procedimiento.

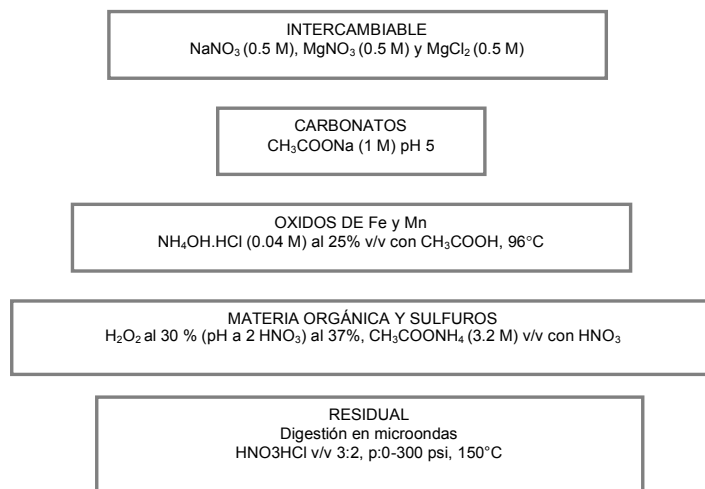


Figura 1 Protocolo de extracción secuencial selectiva (ESS1) propuesta por Tessier (1979) y modificado por Xiangdong (2001).

Las muestras de suelo del sitio de referencia y de deposición de jales, fueron evaluadas con el protocolo ESS1 descrito a continuación:

Para evaluar la movilidad de EPT solubles en agua, 1 g de muestra de suelo seco y tamizado se colocó en vasos de precipitados de 50 mL y se agitó con 16 mL de agua desionizada (pH = 5.46) por 20 minutos en una placa de agitación. Posteriormente la muestra se dejó sedimentar y el sobrenadante se separó por sifonado del sedimento. El sobrenadante se filtró en filtros tipo acrodiscos con material filtrante de fibra de vidrio 0.02 m. La solución filtrada se acidificó con  $\text{HNO}_3$  al 37% y se aforo a 25 mL con agua desionizada para su posterior análisis por EAA.

De acuerdo con el protocolo descrito en la Figura 2.5.1, para la ESS1 de EPT intercambiables se llevó a cabo con 1 g de muestra con el mismo procedimiento mencionado y se agregó 16 mL de  $\text{NaNO}_3$  (0.5 M). El sólido resultante fue agitado con  $\text{MgNO}_3$  (0.5 M) siguiendo el mismo procedimiento mencionado anteriormente. Para asegurar que la extracción por intercambio iónico se completará, el sólido recuperado del paso anterior fue agitado con  $\text{MgCl}_2$  (0.5 M) con el mismo procedimiento.

La fracción de EPT asociada a especies químicas carbonatadas fue evaluada, agitando el sólido recuperado de la extracción de la fracción intercambiable, con 16 ml de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (1 M) y ajustado el pH a 5 con  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . El sobrenadante se recuperó siguiendo los pasos descritos anteriormente. En este paso el tiempo de contacto y agitación con la solución extractante fue de 5 h.

Los EPT asociados a óxidos de hierro y manganeso se extrajeron por inducción de condiciones reductoras. El residuo obtenido de la fracción unida a carbonatos se puso en contacto con 16 ml de  $\text{NH}_4\text{OH.HCl}$  (0.04 M) y 25% v/v con  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , manteniendo el sistema abierto dentro de un baño a 96°C por 6 h. Una vez frío el sistema, las muestras fueron agitadas por 20 minutos y el sobrenadante fue recuperado de acuerdo con el procedimiento de centrifugado, filtrado y acidificación anteriormente descrito.

La destrucción de materia orgánica y sulfuros, para liberar EPT asociados a estas fases, se llevó a cabo en condiciones oxidantes del residuo sólido del paso anterior. La reacción de oxidación se llevó a cabo en tubos de vidrio y en un baño a 85 °C por 2 h, agregando 3 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30 % y ajustado el pH a 2 con  $\text{HNO}_3$  al 37%. Después de enfriar el sistema, se agregaron 3 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% ajustado y el pH se ajustó a 2 manteniendo la reacción por 3 h a las mismas condiciones. La estabilización en solución de los EPT extraídos, se llevó a cabo, una vez que el sistema alcanzo la temperatura ambiente, adicionando 5 ml de  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  (3.2 M) al 20 % v/v con  $\text{HNO}_3$  y 20 minutos

de agitación. El sobrenadante fue recuperado siguiendo el procedimiento anteriormente mencionado. La fracción de EPT unida a la fracción residual fue extraída con HNO<sub>3</sub>/HCl, con los procedimientos de digestión total de suelos y de control de calidad mencionados anteriormente.

Los sobrenadantes de las fracciones SOL, INT, CA, OFM, así como la fracción MOS; se aforaron a 25 mL filtraron y analizaron con respecto a Pb, Cd, As, Zn, Cu, Ca y Fe por EAA.

#### Análisis estadístico

El comportamiento de las concentraciones totales fue analizado mediante estadística descriptiva. Posteriormente se realizó la comparación de concentraciones de EPT y elementos mayores, para realizar este proceso se suele partir de hipótesis, es decir, de unas suposiciones cuya validez cabe confirmar o rechazar. Y para llevar a cabo esta comprobación aplicamos unas pruebas estadísticas o tests, que permiten contrastar la veracidad o falsedad de las hipótesis enunciadas desde el punto de vista estadístico; para este caso se analizó mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) y la prueba F, para la que se estableció un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ .

## RESULTADOS

### Digestión de muestras de suelos

Con respecto a la distribución de las concentraciones totales de Pb, Cd y As (Figura 2), se observó que, para el suelo de referencia, así como los jales reprocesados las concentraciones totales de Pb, As y Cd se mantienen por debajo de los niveles permitidos tomando como referencia los límites sugeridos para áreas residenciales y de recreación (Recommended Canadian Soil Quality Guidelines/residencial Park land, Tabla 1). Sin embargo, se observa como esta concentración se incrementa en las muestras de jales mineros. En el caso de Pb se incrementa hasta 35 ppm para el caso de la partícula de suelo más gruesa y se incrementa hasta 58 ppm en función de la disminución granulométrica. El As llega hasta 19.5 ppm en la partícula de suelo más fina analizada. El Cd se mantiene por debajo de 0.1 ppm. Los resultados en todos los casos no rebasan los criterios recomendados (Tabla 1).

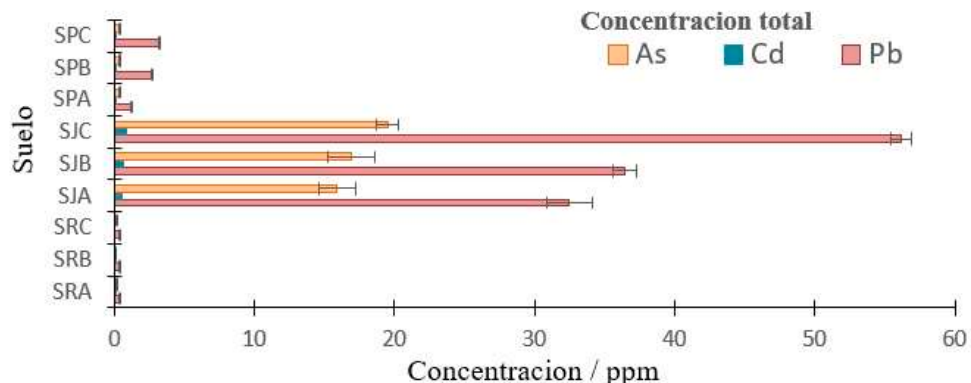


Figura 2. Concentración total en suelos de referencia (SR), jales (SJ) y jales reprocesados (SP) de EPT. A: mayor a 200 micras, B: partícula menor a 200 micras y mayor a 120, C: partícula menor a 120 micras.

Tabla 1. Valores de concentraciones de elementos recomendadas para zona residencial.

	<sup>a</sup> Kabata Pendientes y Pendientes	<sup>b</sup> Recommended Canadian Soil Quality Guidelines/residencial Park land	<sup>c</sup> NOM-147- SEMARNAT-2004 Residencial	<sup>d</sup> NORMA Oficial Mexicana NOM-147- SEMARNAT/SSA1-2004
Pb	200	140	400	400
Cd	8	10	37	37
As	25	25	22	22
Cu	100	63		
Zn	400	200		

a Propuesta de concentraciones máximas aceptables de metales traza considerados fitotóxicos en suelos agrícolas (mg/kg) Kabata-Pendias y Pendias 1992. b Concentraciones de referencia totales uso agrícola/residencial/comercial mg/kg. C Concentraciones de referencia totales. d En caso de que se presenten diversos usos de suelo, debe considerarse el uso que predomine.

#### Movilidad de Pb, Cd y As en suelo

La movilidad de EPT fue analizada mediante extracción secuencial selectiva, donde las diferentes fracciones de la extracción corresponden a las fracciones intercambiable de forma catiónica, asociada a carbonatos, asociada a óxidos de Fe y Mn, asociada a materia orgánica y sulfuros y finalmente a la fracción residual. Este análisis pretende simular algunos procesos que se llevan de forma natural en los suelos a excepción de la destrucción de la fase residual. La Figura 2 presenta los resultados de movilidad de elementos en la fracción intercambiable para Pb. En esta etapa inicial de la extracción, los elementos contenidos en la matriz del suelo son movilizados por intercambio iónico. Se observa una mayor movilidad en el suelo con un tamaño menor a 200 micras del suelo de jales no procesados. Seguida de su movilidad en el suelo reprocesado y finalmente en el suelo de referencia. En el caso del Cd (Figura 3) se observa una mayor movilidad en el suelo reprocesado en la partícula menor a 200 micras, sin embargo, con valores menores a 0.4 ppm. El As (Figura 4) sigue el mismo patrón que el Pb al encontrarse principalmente en los jales sin procesar.

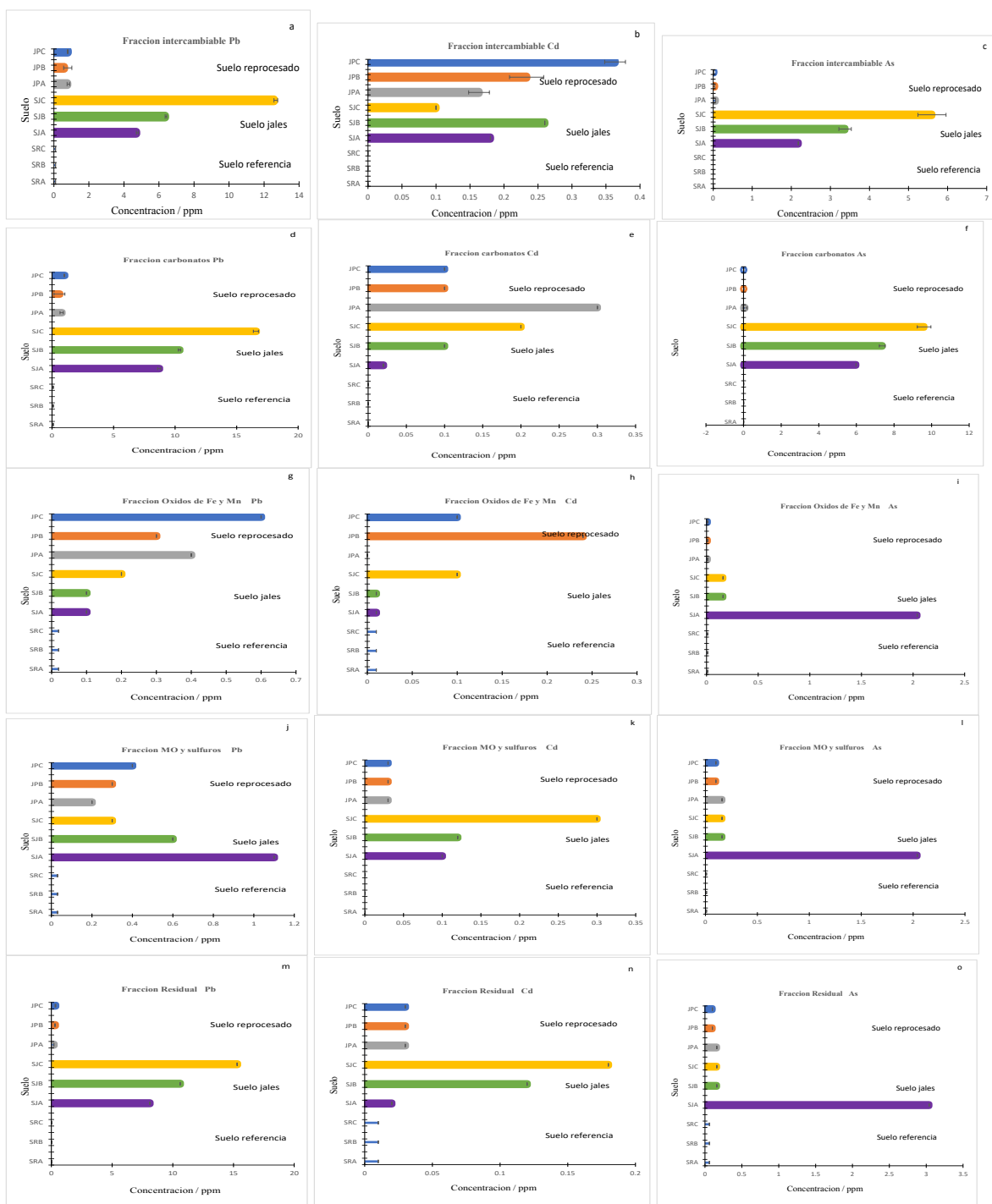


Figura 3. Movilidad en la fracción intercambiable de Pb (a), Cd (b) y As (c), fracción relacionada a carbonatos de Pb (d), Cd (e) y As (f), fracción asociada a óxidos de Fe y Mn de Pb (g), Cd (h) y As (i), fracción relacionada a materia orgánica y sulfuros de Pb (j), Cd (k) y As (l) y fracción relacionada al residual de Pb (m), Cd (n) y As (o) en las muestras de suelo de referencia, reprocesado y jales no procesados. A: mayor a 200 micras, B: partícula menor a 200 micras y mayor a 120, C: partícula menor a 120 micras.

Este análisis de extracción secuencial selectiva pretende simular algunos procesos que se llevan de forma natural en los suelos a excepción de la destrucción de la fase residual. La Figura 3a presenta los resultados de movilidad de elementos en la fracción intercambiable para Pb. En esta etapa inicial de la extracción, los elementos contenidos en la matriz del suelo son movilizados por intercambio iónico. Se observa una mayor movilidad en el suelo con un tamaño menor a 200 micras del suelo de jales no procesados. Seguida de su movilidad en el suelo reprocesado y finalmente en el suelo de referencia. En el caso del Cd (Figura 3b) se observa una mayor movilidad en el suelo reprocesado en la partícula menor a 200 micras, sin embargo, con valores menores a 0.4 ppm. El As (Figura 3c) sigue el mismo patrón que el Pb al encontrarse principalmente en los jales sin procesar. En el análisis de la movilidad de metales en la fase carbonatada de las muestras de suelo, se observa que para el caso de Pb (Figura 3d) sigue el mismo patrón de movilidad presentado en la fracción intercambiable, sin embargo, la concentración liberada es mayor. En el caso de Cd (Figura 3e) la mayor movilidad se presentó en el suelo de jales no procesados con concentraciones similares. El As (Figura 3f) sigue el mismo comportamiento, sin embargo, la concentración liberada es mayor. Lo anterior sugiere una mayor liberación de estos elementos en la fase carbonatada del suelo. Cuando es destruida la fase asociada a óxidos de Fe y Mn, en el caso de Pb (Figura 3g) se observa que la movilidad está centrada en el suelo reprocesado en el tamaño de partícula menor seguido de los suelos con jales gruesos con movilidad máxima de 0.6 ppm. En este caso, se alcanzó a cuantificar Pb en el suelo de referencia, sin embargo, las concentraciones no superan las 0.02 ppm. En el caso de la movilidad de Cd (Figura 3h) se observa el mismo comportamiento antes mencionado. La movilidad de As se ve favorecida en el suelo de jales gruesos en el tamaño de partícula mayor (Figura 3i), en este caso este comportamiento se asocia principalmente al tamaño de la partícula. El caso de la destrucción de materia orgánica y sulfuros, se observa una mayor movilidad de Pb en el suelo con jales gruesos, seguida de los jales reprocesados, sin embargo, la concentración no supera 1.2 ppm (Figura 3j) y se da en el suelo con jales gruesos. El mismo comportamiento se da para Cd con 0.3 ppm de este elemento liberado (Figura 3k) para la muestra de suelo con jales gruesos. El As es liberado mayoritariamente en la muestra de suelo con jales gruesos en partícula más grande (Figura 3l).

#### Análisis Estadístico

Como se mencionó, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), en el que se analizó si existían diferencias significativas estadísticamente entre las Fracciones y las diferentes granulometrías con respecto a los EPT presentes en el suelo, con un nivel de significancia  $\alpha=0.05$  y con ayuda del valor F, el cual es un valor estadístico de prueba que permite determinar si el factor está asociado con la respuesta, si el valor F es suficientemente grande indica que es significativo.

#### Diferencias Significativas.

Para realizar esta parte del análisis se tomaron en cuenta los 3 diferentes suelos: Suelo de Referencia (SR), Jal Grueso (SJ) y Jal Reprocesado (JPA); además se considera que cada uno de ellos se analizó en tres granulometrías diferentes: 80 micras (A), 120 micras (B) y Fondo (C), cada una por triplicado. Además, se analizó, como ya se mencionó en el apartado 4.5, para cada una de las fracciones: Fracción intercambiable, carbonatos, óxidos de Fe y Mn, materia orgánica y sulfuros. El Análisis de varianza mostró que entre los diferentes suelos analizados existen diferencias significativas estadísticamente en los resultados obtenidos para la fracción intercambiable para el Pb, Cd y As; para la Fracción de Carbonatos existen diferencias significativas para Pb y As; mientras que para la Fracción de Óxidos de Mn y Fe solo existen diferencias significativas para Pb; en la Fracción de Materia Orgánica y Sulfuros existe diferencia significativa estadísticamente para Pb y Cd; y finalmente para la Fracción Residual existe diferencia solo en los resultados para Pb. Esta información se presenta en la Tabla 3.6. que muestra una recopilación de los valores del valor F. Se resaltan con rojo todos los valores de F que son mayores al valor F crítico y con azul todos los que son menores. Al tener un valor mayor al valor crítico de F, se puede concluir que los resultados de esos términos son diferentes significativamente.

Tabla 2. Valores de F para cada elemento entre suelos por fracción

Valores de F para cada elemento entre suelos por fracción

FRACCIONES	Pb	Cd	As
INTERCAMBIABLE	9.77490104	9.15768463	13.6269403
CARBONATOS	22.8161265	2.98757764	52.3755942
OXIDOS	15.395	1.47582205	1.53601743
MO Y SULFUROS	5.30211538	6.36538462	1.34790842
RESIDUAL	28.0058389	3.58673469	1.15357918
SUMATORIA	20.7171912	12.7260504	94.9648505
		Valor crítico para F	5.14325285

H0

H1

Si  $F(\text{prueba}) < F(\text{tabla})$  se acepta H0Si  $F(\text{prueba}) < F(\text{tabla})$  se acepta H0

## CONCLUSIONES

Los resultados de la extracción secuencial selectiva reflejan que para Pb en la fracción intercambiable y carbonatada se observó una mayor movilidad en la partícula de suelo menor a 200 micras de jales no procesados seguida de su movilidad en el suelo reprocesado y finalmente en el suelo de referencia. Para el caso del Cd se observó una mayor movilidad en el suelo reprocesado en la partícula menor a 120 micras para la fracción intercambiable. El As se moviliza principalmente de la fracción asociada a carbonatos y preferentemente en el tamaño de partícula fina de este suelo. Los resultados sugieren que los EPT pueden ser movilizados por la presencia de humedad y efecto de lluvia ácida, procesos comunes después de un periodo marcado de sequía.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Baker A. J. M. y Brooks R. R. (1989). Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*. Vol. 1, pp. 81-126.
2. Bautista, A. & Arnaud, M. (2006). Elementos potencialmente tóxicos en suelos agrícolas con manejo de riesgo contaminante. *CIIDIR Unidad Oaxaca, IPN. Naturaleza y Desarrollo*. 4(1), 36-42.
3. Gámez Rodríguez, M. (2004) Propiedad y empresa minera en la Mesa centro-norte de México. Guanajuato, San Luis Potosí y Zacatecas, 1880-1910 [Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Barcelona]. <https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2004/tdx-0119105-161622/mgr1de2.pdf>.
4. Kabata-Pendias, A. and Pendias, H. (2001) Trace elements in soils and plants. 3d. ed. CRC Press. Florida.
5. Visoottiviset P. (2002). The potencial of Thai indigenous plant species for the phytoremediation of arsenic contaminated land. *Environmental pollution* 118: pp. 453-461.



6. Ramos Arroyo, Y. R., Estrategia para identificar jales con potencial de riesgo ambiental en un distrito minero: estudio de caso en el Distrito de Guanajuato, México. *Rev. Mex. Cienc. Geol.* [online]. 2006, vol.23, n.1, pp.54-74. ISSN 2007-2902.
7. Xiangdong Li. (2001). Chemical partitioning of trace and major elements in soils contaminated by mining and smelting activities. *Applied Geochemistry* 16: 1693-1706.
8. Tessier, A. (1979) Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical chemistry*. 51(7) 1979.
9. Canadian Council of Ministers of the Environment, Recommended Canadian Soil Quality Guidelines, March 1997.
10. Norma Oficial Mexicana NOM-141-SEMARNAT-2003, que establece el procedimiento para caracterizar los jales, así como las especificaciones y criterios para la caracterización y preparación del sitio, proyecto, construcción, operación y postoperación de presas de jales.
11. Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio.
12. Norma Oficial Mexicana NOM-157-SEMARNAT-2009, Que establece los elementos y procedimientos para instrumentar planes de manejo de residuos mineros.

## OBTENCIÓN DE NANOCÁPSULAS DE METABOLITOS SECUNDARIOS FLUORESCENTES DE *MATRICARIA CHAMOMILLA* L. (MANZANILLA) CON POTENCIAL INTERÉS EN COSMETOLOGÍA

Joel de Jesús Barba Franco, Xochitl Aparicio Fernández y Virginia Francisca Marañón Ruiz  
Centro Universitario de los Lagos, Universidad de Guadalajara  
jbarba151292@gmail.com

### RESUMEN

*Matricaria chamomilla* L. (manzanilla) es ampliamente utilizada en infusiones y extractos con diversas propiedades como sedante, tónica, carminativa, antiespasmódica, antiséptica, entre muchas otras; debido a la presencia de fitoquímicos, principalmente en sus aceites esenciales. Algunos de los metabolitos secundarios que se han identificado en *M. chamomilla* L., son de tipo fenólico como el  $\alpha$ -bisabolol y diferentes cumarinas; así como sesquiterpenos como la matricina y el chamazuleno, entre otros. Específicamente, las cumarinas presentes en *M. chamomilla* L., han sido reconocidas por su capacidad de absorción de luz en la región ultravioleta dañina para la piel, por lo que los extractos de la planta podrían ser utilizados como filtro para la protección solar. Sin embargo, el principal problema de los metabolitos secundarios de plantas es que son poco estables ante factores físicos como la luz. Esto hace necesaria la búsqueda de técnicas alternativas que conserven la estructura y propiedades benéficas de los metabolitos, a la vez que permitan su utilización y aprovechamiento; las técnicas de encapsulación podrían ser una buena alternativa de investigación a ese respecto. El objetivo de la presente investigación fue encapsular los metabolitos secundarios de *M. chamomilla* L., en una matriz de silicio y medir las propiedades ópticas de las nanocápsulas. Los extractos de *M. chamomilla* L., fueron obtenidos de flores de la planta seca y de sobres para infusiones de una marca comercial; se obtuvieron mediante tres diferentes metodologías de extracción (soxhlet, cleveger y maceración). Los extractos fueron concentrados a presión reducida y se cuantificaron sus rendimientos. Se seleccionó el extracto con mejor rendimiento y se encapsuló por el método Sol-Gel, empleando aceite vegetal como emulsificante en sustitución de Tween 80. El tamaño y morfología de las microcápsulas se midieron con Microscopia de Fuerza Atómica y se realizó una caracterización del extracto y nanocápsulas mediante la técnica UV-Vis y FTIR-ATR. Los rendimientos que se obtuvieron para los extractos de planta seca y sobres de infusión comerciales estuvieron en el intervalo de 0.53-0.60% y 0.36-0.39%, respectivamente. La sustitución de Tween 80 por aceite comercial mejoró el tamaño de las cápsulas obtenidas que se encontraron entre 28 - 904 nm. Además, el espectro UV-Vis mostró máximos de absorción en 280 y 330 nm, región donde se efectúa el mayor daño a las capas de la dermis y epidermis en la piel por la radiación ultravioleta. Esta técnica de encapsulación demostró ser efectiva para la generación de nanocápsulas con potencial para ser empleados como filtro solar.

### INTRODUCCIÓN

En el año 2020 se reportaron 1, 200, 000 casos nuevos de cáncer de piel según cifras de la Organización Mundial de la Salud (OMS), esto puede deberse a que la piel es la barrera epitelial que conecta el cuerpo con factores externos, entre ellos la radiación solar y especialmente los rayos UV<sup>1</sup>. De ahí que los seres humanos han usado distintos artilugios para protegerse de los rayos ultravioleta perjudiciales. Entre estos mecanismos encontramos el uso de barreras físicas como la ropa, gafas de sol, sombreros y ventanas con vidrios protectores. Otra opción es mediante el empleo de productos cosméticos que contienen compuestos activos (cosmecéuticos) orgánicos o inorgánicos que actúan como filtros químicos ó físicos, respectivamente<sup>2</sup>. Por otro lado, en la naturaleza encontramos una gran variedad de metabolitos secundarios que son cromóforos, y podrían tener la función de filtro solar. Por ejemplo: las betalainas, las antocianinas, las clorofilas, las indigotinas, algunos sesquiterpenos conjugados y las cumarinas, entre otras menos comunes. Sin embargo, un reto de trabajar con metabolitos secundarios de origen vegetal es que son poco estables a cambios de temperatura, pH o incluso al contacto con luz<sup>3</sup>. Las cumarinas son metabolitos secundarios estables cromogénicos, que además presentan fluorescencia y absorción en la región del ultravioleta<sup>4</sup>. Las cumarinas herniarina y umbeliferona han sido identificadas en *M. chamomilla* L.,<sup>3,4</sup> de ahí que, emplear extractos de esta planta como filtro solar se convierte en una alternativa de origen natural altamente atractiva para ser empleada en cosmética.

## TEORÍA

La piel, el órgano más grande del cuerpo en términos de superficie, es una barrera epitelial que interconecta el medio ambiente con el cuerpo y múltiples mecanismos la protegen contra los rayos UV. De forma exógena los seres humanos han usado dos mecanismos para protegerse de los rayos ultravioleta perjudiciales; uno es el uso de barreras físicas como la ropa, gafas de sol, sombreros y ventanas con vidrios protectores; éstas, aunque son las formas más efectivas, no son las más cómodas y adecuadas. La segunda opción es mediante el empleo de productos cosméticos que contienen compuestos activos (cosmécuticos) inorgánicos y/u orgánicos que actúan como filtros físicos y químicos<sup>2</sup>. Por otro lado, la naturaleza ha brindado a los seres humanos alternativas para el cuidado de la piel, por ejemplo, Rancan *et al.*, utilizaron extracto de líquenes y boldina como alternativa natural para la protección solar en la región UVB<sup>5</sup>.

Por otro lado, la especie *M. chamomilla* L., (figura 1) ha sido reconocida como poseedora de la propiedad antisolar<sup>6,7</sup>, esto aunado a que ha sido utilizada por cientos de años como parte de la herbolaria tradicional de pueblos europeos y asiáticos por su infinidad de propiedades benéficas a la salud. Fue traída a América por los españoles durante la colonia e incorporada a la herbolaria indígena precedida por una lista de innumerables propiedades curativas<sup>4,8</sup>, las cuales se han atribuido a los metabolitos secundarios presentes en su extracto. Entre los metabolitos secundarios con mayor relevancia de esta especie encontramos algunos terpenos como óxidos de bisabolol<sup>9</sup>, chamazuleno<sup>10</sup> y compuestos fenólicos, por ejemplo, apigenina<sup>7,9</sup> y cumarinas<sup>9,10</sup> presentes en las extracciones de *M. chamomilla*.



Figura 1. Planta de *M. chamomilla* L. Tomada de: [www.google.com](http://www.google.com)

Los rendimientos reportados en la bibliografía para los extractos de *M. chamomilla*, están en el rango de 0.2 - 1.2 % dependiendo de varios factores como los son a) el tipo de extracción practicada, b) si la materia vegetal son cabezuelas frescas, c) si fueron previamente desecadas, o d) si son de sobres de alguna marca comercial para infusión<sup>11</sup>. Por lo que evaluar diversos métodos de extracción a muestras de *M. chamomilla* L., de diverso origen podría brindar un panorama más amplio de los cuidados que deben tenerse al momento de realizar extracciones. Aunado a lo anterior, uno de los retos de trabajar directamente con extractos naturales es la baja estabilidad que presentan los metabolitos secundarios, ya que son lábiles a cambios de pH, temperatura y contacto con la luz<sup>3</sup>. De ahí, que encapsularlos dentro de una matriz polimérica de liberación controlada podría brindar mayor estabilidad<sup>3</sup>. La encapsulación por el método Sol-Gel<sup>12</sup> es una alternativa novedosa para dicho problema.

El proceso de Sol-Gel de encapsulación, consiste en ensamble de redes de polímeros híbridos (metal-cadena orgánica), a través de la formación de una suspensión coloidal (sol), con tamaño de partícula de 1 a 1000 nm, seguida de una hidrólisis y condensación para formar una red en una fase líquida continua (gel). Mediante este proceso se han logrado sintetizar materiales sólidos en forma de polvos, fibras o películas para una diversidad de aplicaciones<sup>12</sup>. La gran relevancia de esta técnica radica en que no se requiere de altas temperaturas de fusión, e incluso se puede producir a temperatura ambiente<sup>13</sup>. En general, existen dos grupos básicos de técnicas de microencapsulación, los químicos y los físicos, siendo este último dividido en métodos fisicoquímicos y físicos-mecánicos. Los procesos *in-situ* tales como la emulsión, la suspensión, la precipitación o la polimerización en

dispersión y las policondensaciones interfaciales son las técnicas químicas de microencapsulación más importantes. Por otra parte, entre las metodologías físicas más importantes se encuentran el disco de giro conocido como spin coating y secado por spray (spray-drying); la técnica de separación de fases poliméricas, conocido como conservación, que es una de solvatación de una solución polimérica homogénea hacia una fase rica en polímeros que se deposita espontáneamente dentro de un revestimiento alrededor del ingrediente dispersado; y la micro encapsulación de Sol-Gel, clasificada como técnica fisicoquímica<sup>12</sup>.

Con base en lo anterior, podemos observar que tener opciones naturales que puedan funcionar como filtro solar para ser incorporado en un producto cosmético podría ser de gran relevancia ya que los extractos de *M. chamomilla* L. contienen metabolitos secundarios con propiedades de absorción en la región UVB y UVA<sup>14,15</sup>. Sin embargo, emplear metabolitos secundarios de las plantas suele representar un reto por su baja estabilidad<sup>3</sup>. Sin embargo, encapsularlos en una matriz de silicio podría permitir la conservación de sus propiedades ópticas para ser utilizados como filtro solar. Por lo que en este trabajo se encapsularon los extractos de metabolitos secundarios de *M. chamomilla* L., con Tetraetil ortosilicato (TEOS), mediante el método Sol-Gel y se evaluó la conservación de su propiedad de absorción en el UV.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Materiales y reactivos

Para la realización del experimento se emplearon los siguientes reactivos Tetraetil ortosilicato (TEOS) (Sigma Aldrich), Sodio metálico (Sigma Aldrich), Cloruro de Calcio (Sigma Aldrich), etanol y acetona grado reactivo.

### Metodología

Extracción de metabolitos secundarios de *M. chamomilla* L.

Los extractos se obtuvieron de muestras secas de flores de *M. chamomilla* L. y de bolsas para infusión, marca "Carabela", mediante tres métodos distintos: maceración, clevenger y soxhlet; y se identificaron como se señala en la tabla 1.

Tabla 1. Identificación de los extractos respecto a los métodos de extracción utilizados.

Método	Bolsa infusión	Flor seca
Maceración	A	B
Soxhlet	C	D
Clevenger	E	F

La obtención de extractos por métodos diferentes: se realizó con la finalidad de comparar los rendimientos. En las tres metodologías se colocaron 250 g de flor seca en 1 L de acetona, o 25 sobres para infusión en 500 mL del mismo disolvente. Para la extracción por maceración, la mezcla se dejó en agitación constante durante 10 h a 700 rpm, protegiendo el matraz del contacto con la luz para evitar oxidación de los compuestos. Por otro lado, para las otras extracciones se montaron los sistemas clevenger y soxhlet, se llevaron a reflujo y se dejaron durante 3 h de extracción. Por último, cada extracción fue concentrada a presión reducida utilizando un rotaevaporador y se determinaron los rendimientos de extracción.

Encapsulación de los metabolitos secundarios de *M. chamomilla* L., por el método Sol-Gel. La encapsulación de los metabolitos secundarios de *M. chamomilla* L., se realizó utilizando una solución de TEOS/etanol 5:1 (v/v) a la cual se le adicionó, lentamente, 0.1 mL de HCl 0.1 M, y posteriormente se puso a calentamiento en reflujo durante una hora. Enseguida se agregó el extracto de manzanilla en una relación 10:1 (v/m) TEOS/extracto y se agitó durante 30 minutos a 700 rpm. Después la solución se colocó en un baño de hielo, para la formación del Sol se agregó gota a gota 2.5 mL de NH<sub>4</sub>OH 0.08 M y se dejó en agitación constante a 700 rpm durante 1.5 horas. Por último, para la formación de nanocápsulas (Gel), se colocaron 100 mL de aceite vegetal a diferentes velocidades de agitación (880 rpm, 1000 rpm y 1200 rpm); y se adicionó por goteo una alícuota de 5 mL del Sol Teos/Extracto. Se dejaron en agitación hasta observar la formación de un precipitado, las microcápsulas fueron filtradas a vacío y secadas a flujo laminar durante 24 h, finalmente se lavaron con suficiente hexano para eliminar cualquier traza de aceite.

#### Caracterización de extractos y encapsulados

La caracterización espectroscópica de los extractos y los encapsulados se realizó empleando un espectrofotómetro de UV-Vis (Marca Agilent, Modelo Cary 60, Australia) con el cual se determinó la absorbancia (u.a.) y la longitud de onda ( $\lambda_{max}$ ) de las muestras para determinar las transiciones electrónicas. Además, mediante espectrofotometría de FT-IR (Marca Bruker, Modelo Tensor II, Alemania) se determinó la transmitancia (%) y el número de onda ( $\nu^{-1}$ ) que brindan información sobre los modos de vibración de los grupos funcionales característicos de los metabolitos secundarios y de las nanocápsulas. La caracterización morfológica de las nanocápsulas se determinó utilizando un microscopio fuerza atómica (AFM) (Nanosurf, easyscan 2, Suiza), para determinar el tamaño, en nm, de las cápsulas y microscopía óptica (microscopio compuesto) para la morfología de los encapsulados.

## RESULTADOS

Los rendimientos obtenidos para cada una de las extracciones se pueden observar en la tabla 2. Los extractos obtenidos de flores secas muestran rendimientos más elevados independientemente del método de extracción; siendo el método soxhlet el que presentó el mayor valor (extracto D). Los rendimientos oscilaron entre 0.53% y 0.60%, para las extracciones realizadas con flor seca, valores dentro lo previamente reportado por A. González y Torrenegra *et al.*, quienes informaron extracciones de *M. chamomilla* L., con rendimiento desde 0.20 hasta 0.90 porciento<sup>16,17</sup>.

Por su parte, las extracciones realizadas con manzanilla proveniente de sobres para infusión muestran rendimientos en el intervalo de 0.36% a 0.39%; lo cual está en el rango reportado por A. González y Torrenegra *et al.*, pero se puede considerar un rendimiento bajo comparado con lo que reportan Muñoz *et al.*, que encontraron rendimientos hasta de 1.1% en extracciones realizadas en sobres para infusión de cuatro distintas marcas comerciales (en dicho reporte no se referencia de las marcas empleadas). La diferencia en los resultados se podría atribuir a dos cosas: la primera es la diferencia de metodología y disolvente utilizados, ya que Muñoz *et al.*, realizaron una extracción mediante infusión; y la segunda posible causa podría ser la marca de la de infusión comercial empleada<sup>16,17,18</sup>. De los presentes resultados se puede inferir que la extracción por método Soxhlet presenta mejor rendimiento con valores de 0.39% para las muestras de sobres de infusión y 0.60% para el ensayo con flor seca.

Tabla 2. Rendimiento de las extracciones realizadas en muestras de *M. chamomilla* L. por tres métodos diferentes.

RENDIMIENTOS DE LAS EXTRACCIONES DE <i>M. chamomilla</i> L.					
Experimento	Tipo de muestra	Método	Clave de identificación	Cantidad de extracto (g)	Rendimiento (%)
1	Bolsa	Maceración	A	0.0910	0.36
2	Flor	Maceración	B	1.3251	0.53
3	Bolsa	Soxhlet	C	0.0975	0.39
4	Flor	Soxhlet	D	1.5073	0.60
5	Bolsa	Clevenger	E	0.0976	0.39
6	Flor	Clevenger	F	1.4530	0.58

Para la caracterización de los extractos de *M. chamomilla* L. se obtuvieron los espectros UV-Vis y de FT-IR (Figura 2). La figura 2a muestra el espectro UV-Vis del extracto D, donde se pueden observar tres picos de absorbancia a 221 nm y 290 nm; así como un hombro a 319 nm que corresponden a las transiciones electrónicas características para el extracto de *M. chamomilla* L.<sup>12.</sup>, en acetona. Por otro lado, el espectro de infrarrojo del extracto de *M. chamomilla* L., muestra la unión de todos los extractos A, B, C, D, E y F. Se observa una banda 3187  $\text{cm}^{-1}$  la cual es característica de un enlace N-H de alargamiento correspondiente a una amina secundaria, además tenemos una banda 3324  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a un alargamiento de polifenoles el cual se podría adjudicar a los flavonoides y cumarinas de los extractos (figura 2b). Además, se presenta una banda en 1586  $\text{cm}^{-1}$ , la cual corresponde a un alargamiento del doble enlace (C=C) de aromático, también característico del tipo de compuestos antes mencionados<sup>15</sup>.

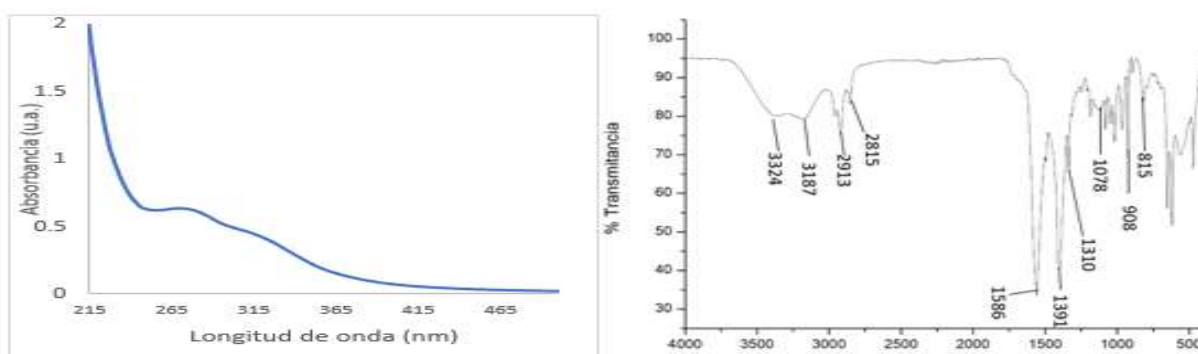


Figura 2. Espectros de los extractos de *M. chamomilla* L. (A-F) y disueltos en acetona, obtenidos por medio de (a) UV-Vis (b) espectro FTIR con ATR.

La encapsulación de los metabolitos secundarios de la manzanilla se realizó con una alícuota de los extractos "D" en tres diferentes velocidades de agitación (880, 1100 y 1200 rpm), los polvos obtenidos se identificaron como MC<sub>1</sub>, MC<sub>2</sub> y MC<sub>3</sub>, respectivamente. La figura 3 muestra las micrografías obtenidas por MFA y microscopía óptica de los tres encapsulados. Dichos procedimientos se realizaron por triplicado a las tres diferentes velocidades para comparar los resultados y verificar cual era la velocidad óptima de encapsulación. Se puede observar en la figura 3a que la agitación a 880 rpm (MC<sub>1</sub>) generó, cápsulas de diferentes tamaños, en el rango de 10  $\mu\text{m}$  hasta 870 nm, es decir, poco homogéneas. Para la síntesis de MC<sub>2</sub>, con una velocidad de agitación de 1100 rpm, se

obtuvieron partículas de menor tamaño, desde 34.35 nm hasta 391 nm. Por último, con la velocidad de agitación más elevada, MC<sub>3</sub>, el tamaño de las cápsulas fue de 430 nm hasta 563 nm, mucho más homogéneo. Se puede asumir que la velocidad de agitación óptima, en relación a menor dispersión en el tamaño de las nanocápsulas, es la de 1200 rpm; mientras que a velocidades bajas como los 880 rpm, se presenta la mayor polidispersidad de las nanocápsulas. Se concluye que la velocidad de agitación es un factor importante a considerar al fabricar estos sistemas bajo estas condiciones de experimentación. Por otra parte, aunque se empleó la metodología reportada por Radin *et al.*, el cambio de emplear aceite vegetal de canola en lugar de Tween 80 bajo esta metodología, permitió que obtuviera nanocápsulas comparables a las del autor, en el orden de 300  $\mu\text{m}$ <sup>12,19</sup>.

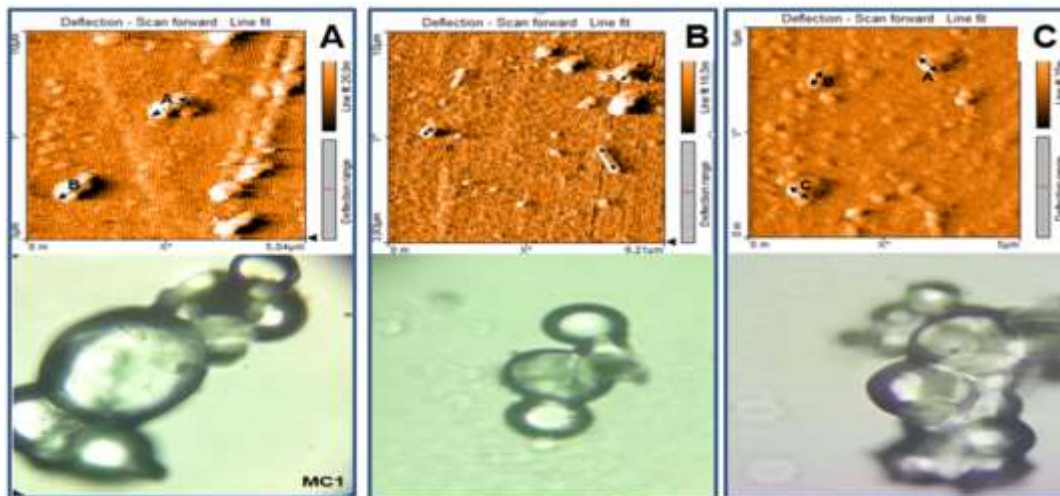


Figura 3: Micrografías obtenidas por Microscopía de Fuerza Atómica y Microscopía Óptica (100X) para las muestras encapsuladas (a) MC<sub>1</sub> (b)MC<sub>2</sub> (c) MC<sub>3</sub>.

Los espectros de UV-Vis de las micro cápsulas presentan los 3 máximos de absorción característicos del extracto de la *M. chamomilla* L, en  $\lambda_{\text{max}} = 205$  nm que es el que presenta la absorbancia más alta, y las otras dos en forma de una meseta a  $\lambda_{\text{max}} = 275$  nm y  $\lambda_{\text{max}} = 325$  nm (figura 4).

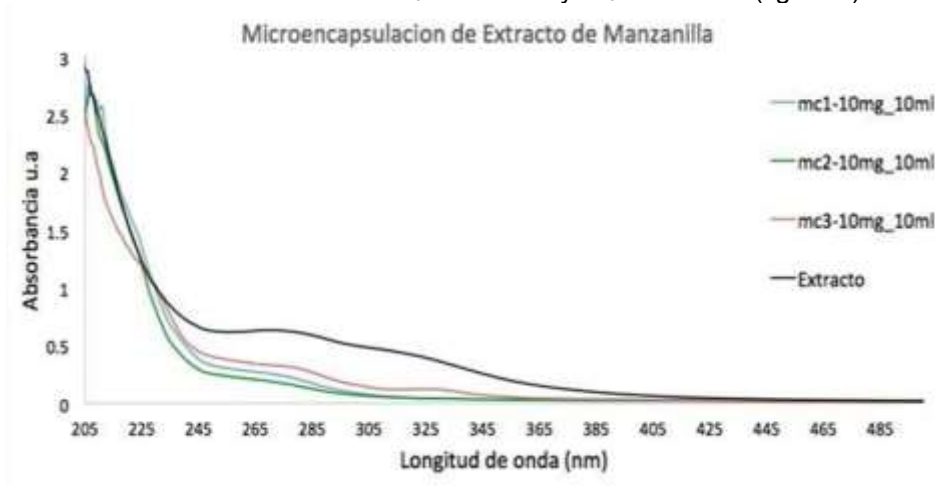


Figura 4. Comparación de los espectros UV-Vis del extracto de *M. chamomilla* L., y los encapsulados MC<sub>1</sub>, MC<sub>2</sub> y MC<sub>3</sub> obtenidos durante la experimentación disueltos en acetona.



Se puede observar que presentaron un ligero desplazamiento batocrómico de 10 nm. Cuando se forman los encapsulados de MC<sub>1</sub>, MC<sub>2</sub> y MC<sub>3</sub> las absorbancias son proporcionales a la concentración que se hizo del extracto al encapsular. La absorción que presentan las nanocápsulas se encuentra en el rango de absorción del ultravioleta; donde para la zona UVB absorbieron desde 280-315 nm y para la zona UVA desde 315-400 nm<sup>15</sup>. Estas absorciones pertenecen a la región del espectro electromagnético que causa el mayor daño a las capas de la dermis y epidermis en la piel, ocasionando envejecimiento y generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), que son las precursoras del cáncer en la piel<sup>1</sup>. Por lo que debido a que las nanocápsulas@extracto de *M. chamomilla* L., absorben en esa región pueden ser empleadas como bloqueador<sup>7</sup>.

La figura 5 muestra el espectro FT-IR de las nanocápsulas obtenidas mediante la síntesis MC<sub>1</sub>. Se observa la aparición de una banda ancha en la región de 3354 cm<sup>-1</sup> la cual se puede atribuir a la vibración del grupo funcional hidroxilo (-OH). Además, se observó la aparición de una banda de alargamiento 2974 cm<sup>-1</sup> que corresponde a los grupos metilos (-CH<sub>3</sub>), también se observa una banda en 1605 cm<sup>-1</sup> cuya frecuencia es la región característica del enlace (C=O) del grupo carboxilo; por último, observamos una banda en la región de 1045 cm<sup>-1</sup> la cual se puede atribuir a la flexión del enlace Si-O-Si de la cápsula<sup>15</sup>.

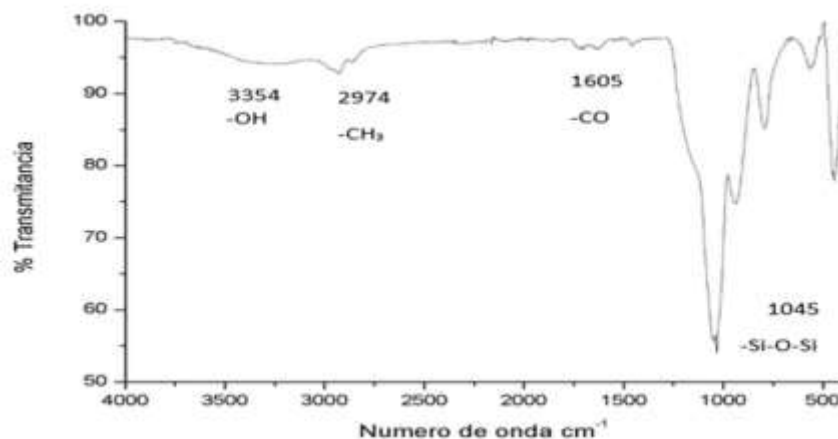


Figura 5. Espectro FT-IR de las nanocápsulas *M. chamomilla* L., obtenidas de la síntesis MC<sub>1</sub>.

La figura 6 describe el proceso de la generación de las microcápsulas mediante el método modificado de Radin *et al.*, empleando aceite de canola. La síntesis se logra a través de la generación de una emulsión mediante una agitación vigorosa (1200 rpm, 1100 rpm y 880 rpm) creando las micelas que conforman el núcleo (core)<sup>19</sup>.

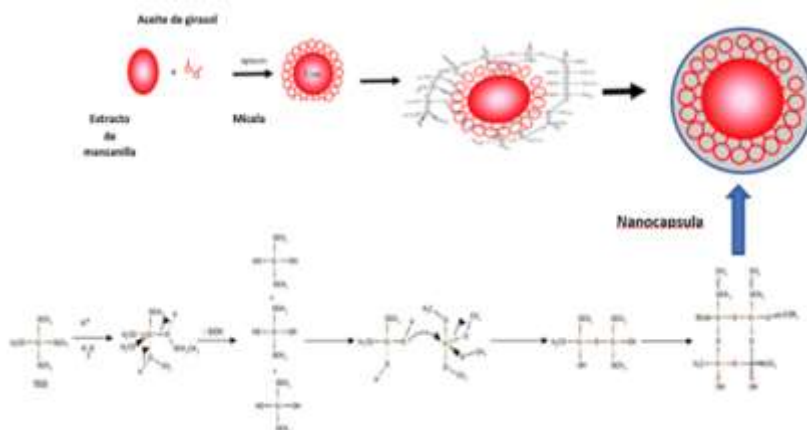


Figura 6. Proceso para la encapsulación del extracto de *M. chamomilla* L. con aceite de girasol.



Posteriormente, mediante la reacción de Sol-Gel con la adición del precursor de TEOS, se promueve la formación de la red de sílice, la cual se cataliza en medio básico con  $\text{NH}_4\text{OH}$  para formar los enlaces Si-O-Si de la red polimérica, lo que se conoce como la coraza o shell<sup>19</sup>. Esta metodología permitió generar nanocápsulas@extracto de *M. chamomilla* L. que pueden ser empleadas para aplicaciones en cosmetología por el tamaño generado.

## CONCLUSIONES

Las extracciones de la flor de *M. chamomilla* L., presentaron mayores rendimientos en comparación con las realizadas a las bolsas para infusión, independientemente del método de extracción; observándose los mayores rendimientos de extracción con el método soxhlet, 0.39% para bolsas de infusión y 0.60% para flor de *M. chamomilla* L.

Se realizó la encapsulación de los extractos de *M. chamomilla* L., utilizando aceite comercial de canola como emulsificante. Se obtuvo el nanoencapsulado de los extractos de *M. chamomilla* L., en una membrana de sílice empleando TEOS como precursor, lo cual no se había reportado anteriormente en la bibliografía consultada. La síntesis de nanocápsulas empleando aceite comercial con una agitación a 1100 rpm fue la que mostró una mejor encapsulación y morfología presentó con tamaño de rango desde 28 nm.

Por otra parte, se observó que, para la generación de las microcápsulas mediante el método de aceite, primero se hace una emulsión, y por agitación vigorosa junto con la presencia del surfactante se forman micelas que son microgotas que forman el núcleo (core). Con la adición del precursor de TEOS, se promueve la formación de la red de sílice, la cual se cataliza en medio básico para formar los enlaces Si-O-Si, lo que se conoce como la coraza o shell. Por último, esta metodología permitió generar nanocápsulas@extracto de *M. chamomilla* L. cuya zona de absorción en la zona del ultravioleta A y B, permitió generar un material promisorio para ser empleado en aplicaciones de cosmetología como bloqueador solar.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud, Cáncer en: <https://www.who.int> (Consultado en: 14/07/2021).
2. Mejía-Giraldo, J. C., Atehortúa, L. y Puertas-Mejía, M. A. (2014), Foto-protección: mecanismos bioquímicos, punto de partida hacia mejores filtros solares. *Dermatología CMQ*. 12(4): 272-281.
3. Garbuio, D. C., Zamarioli, E. C., Oliveira-De Melo, M., Maia-Campos, P. M. B G., Campos-de Carvalho, E., De Freitas, L. A. P. (2018), Seguridad de una formulación conteniendo micropartículas de quitosano con manzanilla: ensayo clínico, enmascarado y controlado, *Revista Latinoamericana de Enfermagem.*, 26, 1-11.
4. Ríos, R. Y. K., Otero, J. A. C., Muñoz, H. D. L., Echeverry, R. M., Robledo, R. S. M., Yepes, C. M. A., 2008. Actividad citotóxica leishmanicida *in vitro* del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.), *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacológicas*. 37 (2): 200-211.
5. Rancan, F., Rosan, S., Boehm, K., Fernández, E., Hidalgo, M. E., Quihot, W., Rubio, C., Boehm, F., Piazena, H., Oltmanns U. (2002), Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 68, 133-139.
6. Ramos, M. F., Santos, E. P., Bizarri, C. H., Mattos, H. A., Padilha, M. R., Duarte, H. M. (1996), Preliminary studies towards utilization of various plant extracts as antisolar agents. *Internacional Journal of Cosmetic Science*. 18, 87-101.
7. Singh, O., Khanam Z., Misra, N., y Kumar-Srivastava, M. 2011. Chamomilla (*Matricaria chamomilla* L.) an overview. *Pharmacognosy review*. 5 (9): 82-96.
8. García, P. C. M., Kim, B. N., Bich, T. N., Tillan, C. J., Romero, D. J. A., López, O. D., Fuste, M. V., (2009), Metabolitos secundarios en los extractos secos de *Passiflora incarnata* L.,

- Matricaria recutita* L. y *Morinda citrifolia* L., Revista Cubana de Plantas Medicinales, 14(2), 1-7.
9. Homami, S., Jaimand, K., Rezaee, Mohammad., Afzalzadeh. (2016), Comparative studies of different extraction methods of essential oil from *Matricaria recutita* L. In Iran., Journal of the Chilean Chemical Society. 61(2), 2982-2984.
  10. Raal, A., Arak, E., Orav, A., Ivas, K., (2003). Comparison of essential oil content of *Matricaria recutita* L. from different origins, Ars Pharmaceutica, 44(2), 159-165
  11. González, L., (2012), Aceite de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) y su potencial de producción sustentable para uso medicinal. Licenciatura, Universidad Autónoma Agraria, Torreón.
  12. Ciriminna, R., Sciortino, M., Alonzo, G., de Schrijver A., Pagliaro, M. 2011, From molecules to systems: Microencapsulation in silica-Based Materials. Chemical Reviews. 111(2), 765-789.
  13. Brinker, C. J., Sherer, G. W. (1990), Sol-Gel science, En: Sol- Gel Processing, Academic Press, INC, Boston., London., 2-10.
  14. Domínguez, X. A. (1985), Métodos de investigación fitoquímica, En: Coumarinas, Editorial Limusa., México, 111-126.
  15. Sánchez, P., A. (2010), Caracterización de las infusiones utilizadas como Té, Tesis Licenciatura, Instituto Politécnico Nacional, México.
  16. González, V. A. A. (2012), Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas de las amazonas., Tesis de licenciatura., Universidad Nacional de Bogotá, Bogotá.
  17. Torrenegra, M., Conde, C., Pájaro, N., Méndez, G., Tovar, C. (2017), Evaluation of the antioxidant activity of essential oil from *Matricaria chamomilla* L., Revista Cubana de Farmacia, 51 (1): <http://www.revfarmacia.sld.cu/index.php/far/rt/printerFriendly/195/156> (consultado el 08/09/2018).
  18. Muñoz-Velázquez, E. E., Rivas-Díaz, K., Loarca-Piña, Ma. G. F., Mendoza-Díaz, S., Reynoso-Camacho, R., y Ramos-Gómez, M. (2012), Comparación del contenido fenólico, capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria de infusiones herbales comerciales. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 3 (3), 481-495.
  19. Radin, S., Chen, T. y Ducheyne, P. (2009), The controlled release of drugs from emulsified, sol gel processed silica microspheres. Biomaterials. 30 (5), 850 – 858.

## EFFECTO DEL ESTRÉS TÉRMICO APLICADO EN DIFERENTES MOMENTOS DE LA GESTACIÓN SOBRE LA IMPLANTACIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO EN HEMBRAS HÁMSTER SIRIO DORADO.

Demetrio Alonso Ambríz García, Alfredo Trejo Córdova, José Roberto Vázquez Avendaño, Bárbara Vargas Miranda y María del Carmen Navarro Maldonado.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa [deme@xanum.uam.mx](mailto:deme@xanum.uam.mx)

### RESUMEN

El calentamiento global ha orientado al estudio de sus efectos sobre la reproducción en animales, especialmente silvestres, como un elemento importante para su sobrevivencia. El estrés térmico reduce la fertilidad, altera los ciclos estrales y provoca mortalidad embrionaria o fetal. El hámster Sirio Dorado (*Mesocricetus auratus*), al ser un roedor de cola corta, tiene limitaciones para la termorregulación, prefiriendo, ante una temperatura adversa aislarse en madrigueras subterráneas. Por esta razón es un buen modelo para estudiar el efecto del estrés térmico. En el presente estudio se utilizaron hámsteres hembras jóvenes de 3 meses de edad, con estros regulares. Se registraron sus pesos y se aparearon con machos fértiles durante la noche (día 0), a la mañana siguiente se verificó la presencia de espermatozoides en el lavado vaginal, bajo el microscopio. El grupo experimental (GE, n= 9) se sometió a estrés térmico (a 45°C), dentro de una cámara climática, durante tres periodos de 10 minutos/día, a los 4, 7 o 9 días de gestación, alternando descansos a temperatura ambiente de 23°C por 10 minutos. Este esquema se realizó durante 4 días. El grupo control (GC, n=9) fue introducido en la cámara climática a periodos similares pero a 23°C. A los 8, 11 y 13 días de gestación (es decir, a 4 días del estrés térmico), los animales del GE y GC fueron pesados (125g y 133gr, respectivamente) y sacrificados. Se disecó el útero grávido, se limpió de grasa y otros residuos y se pesó. Se contaron los sitios de implantación y/o de desarrollo embrionario. Se calculó el peso relativo (útero grávido/peso corporal), encontrando que fueron similares en ambos grupos al día 8 y 11 de gestación (GC y GE, t-Student,  $p>0.05$ ) (1.57g, 6.6g vs. 1.45g, 6.56g, respectivamente). Sin embargo, al día 13 de gestación, el peso relativo del útero grávido fue diferente estadísticamente ( $p<0.05$ ) entre grupos (GC=16.46g y GE= 13.19g, respectivamente). Lo que demuestra que el estrés térmico (GE) no tuvo efecto sobre el peso relativo uterino en los primeros días de la gestación, pero si mostró un peso significativamente menor en el periodo final de la gestación, cuando ocurre el mayor crecimiento de los productos, considerando que la gestación en esta especie dura 16 días, lo que llevaría al nacimiento de crías de menor peso y en condiciones más difíciles para su sobrevivencia. En cuanto al número de sitios de implantación o de desarrollo embrionario, no se encontraron diferencias significativas entre grupos ( $p>0.05$ ), siendo, a los días 8, 11 y 13 de gestación, de 13, 13 y 11 vs. 13, 13 y 10.5, respectivamente. Dado que en ambos grupos disminuyó el número de sitios de implantación al día 13 de gestación, es probable que ello no se vincule con el estrés térmico. A diferencia de otras especies de mamíferos, en el hámster no se encontró un mayor efecto del estrés térmico en periodo preimplantacional sobre la mortalidad embrionaria.

### INTRODUCCIÓN

Existe una gran preocupación mundial por los cambios que están ocurriendo en el clima del planeta, y esto pareciera deberse, de manera externa o pasiva, al actuar humano, cuando debería existir una profunda preocupación por los cambios que nuestras actividades y productos de consumo, han infringido a nuestro ambiente (Roca, 2011). Es plenamente conocido que, recientemente, las catástrofes ambientales se han manifestado con grandes ondas de calor, por ejemplo, en Canadá ocasionaron la muerte de al menos 500 personas. En Estados Unidos de Norteamérica provocaron grandes incendios. Mientras que en contraparte, en Alemania y Bélgica severas lluvias ocasionaron cuantiosas pérdidas materiales y alrededor de 200 pérdidas humanas. En todos estos hechos, en los que se ha pronunciado la naturaleza, cabe la pregunta ¿Habrán muerto, además, otras especies del planeta: microorganismos, plantas y animales? ¿Se habrán cuantificado y divulgado las pérdidas en la naturaleza provocadas por el embate de las actividades antrópicas directas o indirectas? De entre las investigaciones vinculadas a estudiar el impacto de estas actividades sobre el ambiente, se han descrito las que señalan que las especies silvestres enfrentan serios problemas para su

sobrevivencia. Sus poblaciones se encuentran en severo riesgo, no tanto por la categorización como especies vulnerables o en riesgo, sino porque el entorno, el ambiente, es decir su hábitat inmediato, ha sido modificado y con ello, se han modificado: la temporada de lluvias, la temperatura ambiental, la cantidad de agua disponible y otros elementos más del bioma (González, 2012; Delgado *et al.*, 2018).

En cuanto al calentamiento global, se ha relacionado con algunas dificultades que especies termo dependientes tienen para su sobrevivencia, por ejemplo, aquellas cuya determinación del sexo de las crías depende de la temperatura ambiental en momentos críticos del desarrollo, pudiéndose cambiar el patrón en la proporción de sexos, o las épocas de apareamiento, anidación, migración, etcétera y, en consecuencia, poner en riesgo la sobrevivencia de la población y de la especie. Las voces de alerta han sonado. Algunas especies (animales o vegetales) son denominadas “bandera”, porque su permanencia, distribución o comportamiento son indicadores de las condiciones del bioma, así como la forma de predicción sintomática de otras especies simpátricas (Roca, 2011). El caso del hámster Sirio Dorado es interesante, puesto que aún existe como especie en vida libre en su zona originaria de distribución (sur de Asia) donde presenta características conductuales particulares, como vivir aislado del resto de sus congéneres. Así, machos y hembras se encuentran aislados y prefieren la mayor parte del tiempo estar en solitario, bajo tierra, en complejas madrigueras, reuniéndose solo para el apareamiento o la lactancia (figura 1) (Mele y Canonaco, 2014).



Figura 1. El hámster prefiere vivir aislado, las hembras solo permanecen con sus crías durante la lactancia.

La hembra presenta una gestación corta de tan solo 16 días, de los cuales, durante los 4 primeros días, el embrión temprano se encuentra en la luz del oviducto migrando hacia el útero donde se implantará hacia el día 5. Al final de la gestación la hembra parirá una camada de entre 6 a 12 crías, a las cuales tendrá especial atención durante unos 21 días, tiempo en el que la reserva láctea será baja y el hambre hará que las crías busquen otras alternativas para su alimentación, toda vez que han completado el desarrollo mínimo necesario para una vida independiente. Esta especie es importante ya que, dado que vive preferentemente bajo tierra para amortiguar la temperatura ambiente, podría ser de las más sensibles a los cambios en la temperatura ambiente ocasionados por el calentamiento global (figura 2).



Figura 2. El estrés térmico podría ocasionar problemas de fertilidad o de sobrevivencia de las crías en el hámster.

Por otro lado, el efecto del calentamiento global, también denominado shock calórico o estrés térmico, ha sido estudiado en diferentes especies de animales domésticos, donde es bien conocido que al inicio de la gestación (primer tercio) podría ocasionar la muerte del embrión, derivado del estrés fisiológico y oxidante (Sakatani *et al.*, 2008; Lozano *et al.*, 2010). Además, la temperatura ambiente por arriba de los 40°C, puede ocasionar la elevación de la temperatura corporal de los organismos y en consecuencia, aumentar su temperatura corporal de 1 hasta 5°C, lo que expone sensiblemente la vida de los embriones en formación, y en el tercer tercio influir sobre la fisiología de la placenta ocasionando muerte embrionaria tardía (Lozano *et al.*, 2010).

La presente investigación tuvo la finalidad de evaluar si el estrés térmico, tiene algún efecto sobre la implantación y la sobrevivencia de los embriones del hámster Sirio Dorado.

## METODOLOGÍA

Se utilizaron hámsteres Sirio Dorado hembras jóvenes de 3 meses de edad, clínicamente saludables, con estros regulares cada 4 días. Fueron mantenidas en condiciones de bioterio en un fotoperiodo de 14 h luz por 10 h de oscuridad, a temperatura ambiente de 23°C. Recibieron alimento a libertad a base de nutricubos comerciales, así como agua fresca. El cambio de cama (viruta cernida y esterilizada) se realizó dos veces por semana en cajas comunitarias (hasta 5 hembras/caja) y una vez por semana en cajas individuales (sementales de 6 meses de edad). Se registraron los pesos de las hembras y se aparearon por la tarde del proestro en cajas individuales con machos de fertilidad comprobada, durante toda la noche (día 0). A la mañana siguiente, se verificó la presencia de espermatozoides en las hembras a través de un lavado vaginal con solución salina visto bajo el microscopio en campo claro a 10X. Esta evidencia se utilizó como criterio de fertilidad, dado que el porcentaje de gestación es cercano al 100% en estas condiciones. El grupo experimental (GE) consistió en 9 individuos (n= 9) que fueron subdivididos en 3 subgrupos (n=3). A los 4, 7 o 9 días de gestación (una fecha por subgrupo), se sometieron durante tres periodos continuos de 10 minutos a estrés térmico (45°C) dentro de una cámara climática (estufa bacteriológica adaptada), alternando descansos a temperatura ambiente (23°C) por 10 minutos, utilizando una caja individual. Este esquema se realizó durante 4 días continuos. El grupo control (GC, n=9) fue introducido en la cámara climática en periodos similares pero a 23°C. A los 8, 11 y 13 días de gestación (es decir, 4 días del estrés térmico), los animales del GE y GC fueron pesados (promedio de 125g y 133gr, respectivamente) y sacrificados. Se disecó el útero grávido (figura 3), se limpió de grasa y otros residuos y se pesó. Se contaron los sitios de implantación y/o de desarrollo embrionario. Se calculó el peso relativo (útero grávido/peso corporal) y finalmente se hicieron análisis estadísticos (t-Student).



Figura 3. Útero grávido de hembra hámster Sirio Dorado a los 8 días de gestación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estrés térmico implementado en este estudio (45°C por 10 min), ocasionó una importante sudoración y ptialismo, con una ansiedad inicial seguida de letargia, que se recuperó en el periodo de descanso (23°C por 10 min) para el periodo siguiente. El efecto crónico se manifestó como una reducción en la ganancia de peso corporal en el grupo experimental (GE). Como es conocido, la gestación es anabólica, preparando a la hembra al almacenamiento de recursos nutricios para contender con la siguiente etapa (lactancia) que es catabólica (Lozano *et al.*, 2010). Esta reducción

en la ganancia de peso se dio desde el día 8 de la gestación y continuó hasta el día 13, como se muestra en la figura 4.

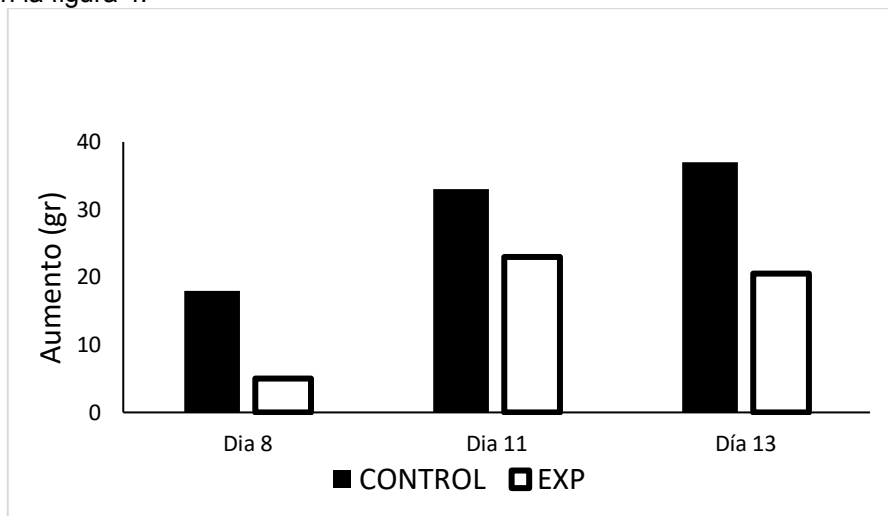


Figura 4. Aumento promedio del peso corporal en hembras hámsteres sometidas a estrés térmico.

Este efecto es coincidente con el efecto del cortisol, liberado en episodios de estrés agudo o crónico. A pesar de la reducción en las ganancias de peso señaladas, el peso relativo del útero grávido fue similar entre grupos (GC y GE) al día 8 y 11 de gestación, lo que indica que el organismo contiene con mecanismos internos para no detener el crecimiento embrionario y el desarrollo uterino en un sentido de compensación, a costa de las reservas corporales (Lozano *et al.*, 2010). Sin embargo, para el día 13 (tercer tercio de la gestación), el GE tuvo un menor peso relativo del útero grávido ( $P < 0.05$ ), lo que supone un menor peso de los críos y un compromiso para contender por su sobrevivencia (figura 5).

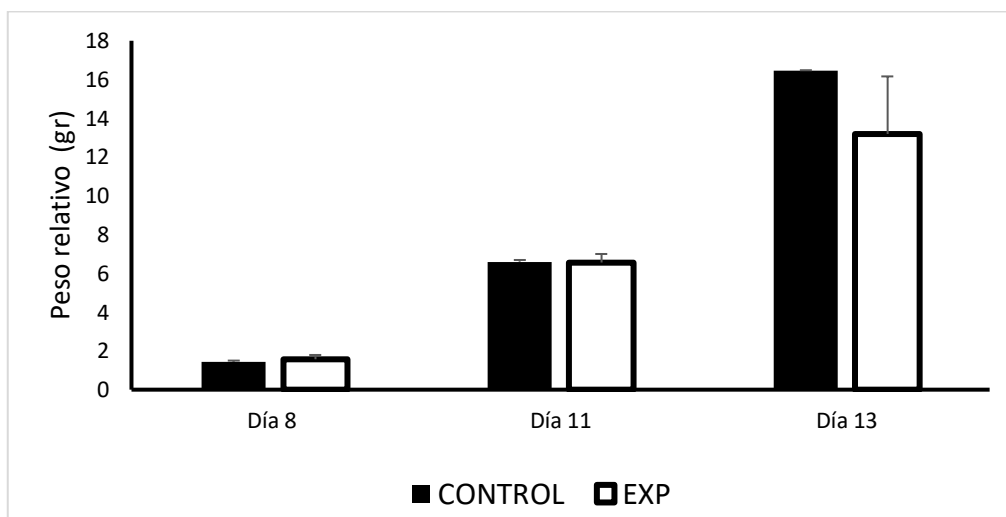


Figura 5. Peso relativo del útero grávido ( $x \pm DE$ ) en hembras hámsteres sometidas a estrés térmico ( $n=18$ ).

Es posible que en este evento, tenga relación la protección de la familia de las proteínas denominadas HSP (Heat Shock Protein, por sus siglas en inglés) (Peksel *et al.*, 2017). Estudios señalan que especies como las cabras, que se desarrollan en climas cálidos en zonas áridas, tienen un mayor contenido de estas proteínas, para equilibrar los cambios de clima y el estrés térmico (Tabarez, *et al.*, 2009), sin embargo, es claro que esto es dentro del marco de la capacidad

fisiológica, fuera de él, el efecto deletéreo sobre la reproducción o la salud será inevitable. El hámster Sirio Dorado, por ser originario de zonas áridas pudiera tener este efecto protector hacia el estrés térmico, sin embargo, de los resultados anteriores se observa una ventana de sensibilidad a dicho estrés, si se aplica al día 9 de la gestación y quizá posteriores, que es cuando el embrión tiene el mayor desarrollo corporal, es decir, en el tercer tercio de la gestación.

En la figura 6 vemos que el número de embriones entre grupos fue similar, y que si bien, el GE mostró una disminución en el peso relativo uterino al día 13 de gestación (figura 5), esto indica que el peso de cada embrión es menor que los del GC, lo cual confirma que las crías del grupo que recibió el estrés térmico tendrían menor oportunidad de desarrollo y, en consecuencia, de sobrevivencia. A pesar de que en ambos grupos el número de embriones disminuyó en el día 13 de gestación con respecto al día 8 y 11, consideramos que no se relaciona con el estrés térmico. Los 3 subgrupos sometidos al shock térmico fueron independientes, por lo que la aparente reducción del número de crías al día 13, no debe interpretarse como una consecuente pérdida embrionaria. Destaca también que, a pesar de haberse sometido a las hembras a estrés térmico al inicio de la gestación (primer tercio), al día 4, cuando el embrión se encuentra en la luz del oviducto y útero (Lozano et al., 2010), no hubo diferencias entre el GC y GE, indicando que no afectó la sobrevivencia en esa etapa. Cuando se dio el estímulo en el segundo tercio de la gestación (día 7), es decir, al momento en que está ocurriendo la placentación y la organogénesis (Tabarez *et al.*, 2009), tampoco hubo efecto entre grupos. Finalmente, tampoco hubo efecto del estrés térmico sobre el número de embriones al tercer tercio de la gestación (día 9). Lo que refuerza la idea del estado protector interno de esta especie ante el estímulo térmico impartido. Pero si reiterar que el peso relativo uterino disminuyó en este tercer tercio, comprometiendo el desarrollo de los embriones y posiblemente su posterior sobrevivencia, situación que habrá que estudiar más adelante.

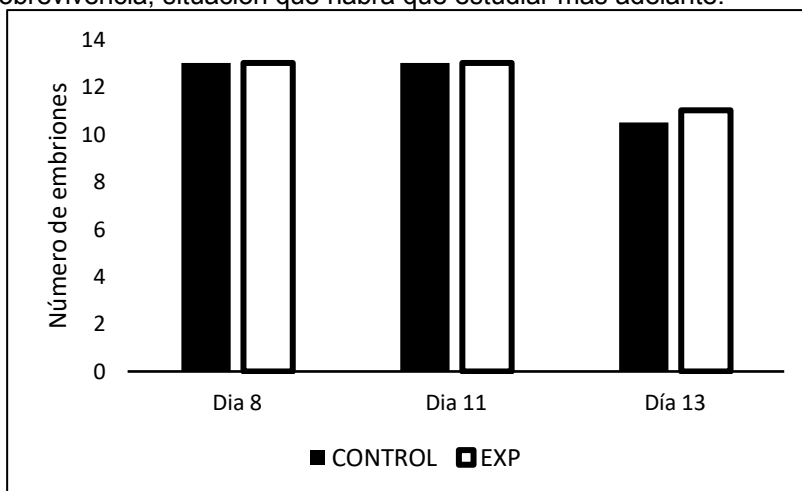


Figura 6. Número de embriones promedio en hámsteres sometidas a estrés térmico (n=18).

## CONCLUSIÓN

No se observó efecto sobre la implantación ni en la sobrevivencia embrionaria. Se encontró disminución en la ganancia de peso que en los dos primeros tercios de la gestación, fue compensada para mantener el índice de peso relativo uterino, no así en el tercer tercio, con un peso de los embriones menor que podría comprometer su sobrevivencia.

## BIBLIOGRAFÍA

1. M, Mele y M. Canonaco, "Caestatin and orexin-A influence hámster thermic states during hibernation", *Temperature*, 2014, 1:1 pp24-25 : <https://doi.org/10.4161/temp.29547>
2. G.C. Delgado, M, Van Staden y E. Villaseñor, "Dialogo Mexicano de Talanoa" UNAM, 2018, 45pp.

3. M, Sakatani, K, Yamanaka, S, Kobayashi y M Takahashi, "Heat shock derives reactive oxygen species induced embryonic mortality in In vitro early stage bovine embryos, J. Reproduction and Development 2008, 54 (6) 496-501pp
4. A. Tabarez-Rojas, H. Porras, H. Vaquera, J. Hernández, J. Valencia, S. Rojas, J. Hernández, "Desarrollo embrionario en ovejas Pelibuey y Suffolk en condiciones de estrés calórico" Agrocienza, 2009, 43, 671-680pp
5. R. Lozano, M, Asprón, C. Vázquez, E. González, C. Aréchiga, "Efecto del estrés calórico sobre la producción embrionaria en vacas superovuladas y la tasa de gestación en receptoras" Rev. Mex. de Ciencia Pecuaria 2010, 1(3) 189-203pp
6. A. Roca, "Efecto del estrés calórico en el bienestar animal, una revisión en tiempo de cambio climático" Espamciencia, 2011, 2(1) 15-26pp
8. J. González, "El estrés calórico en los bovinos" Sitio Argentino de Producción Animal, 2012, 68-74pp
9. B. Peksel, I. Gombos, M. Peter, L. Vight Jr, L. Tizslavicks, M. Brameshuber, G. Balogh, G. Schutz, I. Horvát, L. Vight, Z. Torok, "Mild heat induces a distinct "eustress" response in Chinese hamster ovary cell but does not induced heat shock protein synthesis, Scientific Reports, 2017, 7 (15643) 1-12pp.



## LA LEVADURA *PICHIA PASTORIS* COMO MODELO PARA IDENTIFICAR LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE COMPUESTOS MIXTOS DE PARACETAMOL Y COBRE

Cristhian Eduardo Maciel-Flores<sup>1</sup>, Juan Antonio Lozano-Álvarez<sup>2</sup> y Eglá Yareth Bivián-Castro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de los Lagos, Av. Enrique Díaz de León 1144, Col. Paseos de la Montaña, 47460, Lagos de Moreno, Jalisco, México.

<sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Bioquímica, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad 940 Cd. universitaria, Aguascalientes, México, C.P. 20131.

[cristhian.maciel312@academicos.udg.mx](mailto:cristhian.maciel312@academicos.udg.mx)

### RESUMEN

La levadura metilotrófica *Pichia pastoris* ha sido ampliamente usada como microorganismo hospedador para la expresión de proteínas heterólogas, esto por su capacidad de crecimiento a altas densidades celulares en medios de cultivo mínimos usando como única fuente de carbono el metanol. Existe poca información del empleo de *P. pastoris* como modelo biológico, es por ello el interés de establecer las condiciones de cultivo y variables de respuesta adecuadas para su uso como tal. Se sabe que el paracetamol es uno de los analgésicos de mayor prescripción a nivel mundial y que dentro de las dosis recomendadas presenta pocos o nulos efectos secundarios, pero en casos de sobredosis puede provocar daño hepático. El cobre, considerado un metal traza juega un papel importante en funciones metabólicas como parte de algunas metaloenzimas dentro de los sistemas biológicos. Por otro lado, se sabe que en humanos la homeostasis del cobre se ve alterada cuando se presentan patologías como enfermedad coronaria, en diferentes tipos de cáncer, así como en algunas enfermedades neurodegenerativas tales como Alzheimer y Parkinson. Por medio de la síntesis en estado sólido como lo es la mecanosíntesis, técnica considerada amigable con el medio ambiente por no emplear solventes durante el procedimiento, se sintetizaron 11 compuestos mixtos de cobre con ligantes como paracetamol (Para), histamina (Hsm) e histidina (His), los cuales presentaron coloración verde o amarilla. Los compuestos sintetizados se caracterizaron por FT-IR. Para las pruebas biológicas se usó una cepa recombinante de *P. pastoris Mut<sup>s</sup>* la cual contiene el gen del hongo *Talaromyces minioluteus* que expresa la enzima dextranasa bajo el promotor pAOX1. Se midió el crecimiento en dos medios de cultivo: complejo (YPG) y definido (FM22) donde en este último se hicieron variaciones (con o sin solución de sales PMT<sub>4</sub>). De acuerdo con los resultados obtenidos se definió que el medio complejo YPG era el adecuado para las posibles pruebas biológicas, por lo que se realizó la cinética de crecimiento en este medio donde se observó que la levadura *P. pastoris* alcanza la fase estacionaria entre las 24 - 27 h. Se midió la expresión de la enzima dextranasa inducida por metanol y por los precursores de los compuestos mixtos sintetizados tales como la sal metálica (CuCl<sub>2</sub>) y los ligantes (His, Hsm y Para). Donde de acuerdo con los resultados obtenidos se concluyó que la expresión de la enzima dextranasa bajo las condiciones de cultivo descritas en este trabajo es mínima o muy baja, por lo que no se recomienda ser usada como indicador o variable de respuesta ante la exposición de la levadura *P. pastoris* con los compuestos de coordinación mixtos sintetizados.

Agradecimiento: CONACyT por beca de maestría-CEMF.

### INTRODUCCIÓN

El paracetamol o acetaminofén es un metabolito activo de la fenacetina que presenta efectos analgésico y antipirético. A pesar de que se considera seguro se sabe que el paracetamol en sobredosis puede causar daño hepático y renal. En la actualidad aún se desconoce con exactitud el mecanismo de acción de paracetamol (1, 2). Por otro lado, el paracetamol es un fármaco que presenta bajos efectos secundarios en humanos y con la finalidad de conocer más sobre sus propiedades, es que es objeto de estudio para varios grupos de investigación, por lo tanto, se ha reportado la adición de zinc, cobre, aluminio, entre otros elementos a su estructura química, donde algunos compuestos mostraron la disminución de efectos secundarios, así como presencia de actividad antimicrobiana, entre otras (3 - 5).

Los metales que se encuentran en pequeñas cantidades dentro de los sistemas biológicos y que a su vez estos presentan actividad biológica importante, son denominado biometales, tal es el caso del cobre, el cual se encuentra en los sistemas biológicos donde forma parte como cofactor en los

sitios activos de distinta metaloenzimas. Por lo contrario, la plata no es considerada un biometal ya que no es esencial para la fisiología humana, pero es empleada principalmente como agente biosida frente a distintos microorganismos (6 - 9). Por otro lado, recientemente se han reportado la síntesis de compuestos de coordinación de plata y cobre con diferentes fármacos los cuales presentaron actividad biológica importante (10 - 12).

Es por ello que se hace la propuesta de nuevas estructuras de compuestos de coordinación mixtos de plata y cobre con paracetamol, así como la determinación de su actividad biológica en la levadura *P. pastoris*, la cual ha sido poco empleada como modelo biológico frente a compuestos de coordinación mixtos.

## TEORÍA

Paracetamol.

El paracetamol o acetaminofén, fue sintetizado por primera vez en 1878 por Harmon Northrop Morse por la vía de reducción del *p*-nitrofenol con estaño en ácido acético glacial, pero no fue hasta 1893 que fue introducido a la práctica clínica, sin embargo, no fue utilizado ampliamente hasta 1943. La estructura química del paracetamol que se muestra en la figura 1, consiste en un anillo de benceno sustituido en la posición 1 por un nitrógeno de un grupo amida donde esta es una acetamida y en la posición 4 se encuentra un grupo hidroxilo. Algunos autores clasifican al paracetamol como un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) por sus propiedades analgésicas y antipiréticas donde su principal mecanismo de acción es la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX) (13 - 15).

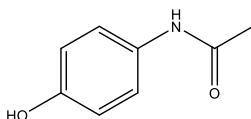


Figura 1. Estructura química del paracetamol (15).

Los AINEs comprenden uno de los grupos terapéuticos de más amplia prescripción en nuestro país y en el mundo; tan sólo en México existen más de 300 registros de medicamentos que dentro de su formulación contienen al principio activo paracetamol. En la actualidad se encuentran disponibles en México, ya sea solos o en combinación con otros principios activos; los cuales pueden adquirirse con receta médica y de venta libre. En un estudio acerca de la automedicación se determinó que 68% de los medicamentos adquiridos fueron AINEs, y es por lo que el paracetamol se considera uno de los medicamentos de venta libre más populares en todo el mundo (1, 2).

Usos médicos del paracetamol y efectos secundarios.

El paracetamol es el metabolito activo de la fenacetina, ejerce un efecto analgésico contra el dolor debido a una variedad de causas. Su mecanismo de acción exacto aún no se ha determinado, por lo que es posible que implique varias vías del dolor, pero existen evidencias de efectos sobre la producción de prostaglandinas, además de vías serotoninérgicas, opioides, óxido nítrico y cannabinoides que probablemente sea una combinación de vías interrelacionadas la responsable de sus acciones terapéuticas. Su efecto como analgésico simple y antipirético se explica en la intervención en el metabolismo del ácido araquidónico para la producción de prostanoïdes (prostaglandinas y tromboxanos), donde se sugiere que el paracetamol interfiere indirectamente al actuar como un cosustrato reductor en el sitio de peroxidasa (POX), inhibiendo la COX dependiente de peróxido (16, 17).

Sus usos terapéuticos son como analgésico y antipirético. Por su efecto analgésico es indicado en dolor leve a moderado como cefalea, mialgia, dolor puerperal y pertenece según la clasificación de la organización mundial de la salud (OMS) al primer eslabón para el tratamiento del dolor, donde su elección se ve favorecida ante su escaso efecto antiagregante, en relación con los demás AINEs. Así mismo puede funcionar en sinergia cuando se combina con agentes como ibuprofeno, codeína, tramadol y cafeína, mejorando la eficacia analgésica y minimizando los efectos secundarios del agente adjunto (16 - 18).

En los seres humanos el hígado es el encargado de metabolizar el paracetamol y es excretado por medio de la orina como glucurónido de paracetamol (47 - 62%), sulfato de paracetamol (25 - 36%), 3-hidroxi-paracetamol y *N*-acetil-*p*-benzoquinona imina (8 - 10%) y paracetamol (1 - 4%) (19).

La dosis autorizada de paracetamol es la misma para todas las vías de administración en adultos de más de 50 kg, 1 g hasta cuatro veces al día con un mínimo de 4 h entre cada administración. A dosis terapéuticas como efecto adverso puede ocurrir aumento leve de las enzimas hepáticas, con dosis mayores se puede observar mareo, excitación y desorientación. Se sabe que el paracetamol en sobredosis produce daño hepático y/o renal e incluso la muerte, es por ello y a su actividad analgésica que se han realizado esfuerzos para mejorar su actividad analgésica y disminuir su toxicidad (17, 20).

Compuestos de coordinación con fármacos.

Los cationes biometálicos interactúan en los sistemas biológicos con moléculas de agua y en diferentes partes de biomoléculas orgánicas e inorgánicas, esto como sustituyentes naturales o sustancias introducidas en el cuerpo humano. De forma natural algunos biometales del grupo *d* con característica de iones M(II), se pueden encontrar en el cuerpo humano en pequeñas cantidades y son principalmente los centros activos de enzimas de diversas funciones, estos se introducen en el organismo a diario a través de una variedad de alimentos, que satisfacen los requerimientos diarios. En la tabla 1 se muestran las concentraciones de algunos biometales presentes en el cuerpo humano (6).

Tabla 1. Biometales M(II) en el cuerpo humano (6).

Biometal	Contenido corporal	Contenido en sangre	Órganos objetivo	Requerimiento diario (mg/día)
Cu	80 - 120 mg	0.8 - 1.6 mg/L	Sistema esquelético, músculos, cerebro, hígado.	0.9 - 1.3
Zn	2 - 3 g	6.3 mg/L	Páncreas, huesos, dientes, hígado, riñones.	2 - 15
Co	3 mg	0.39 µg/L	Hígado, páncreas, riñón, corazón	1.5
Mn	12 mg	4.15 µg/L	hígado, páncreas, riñón.	2 - 5

Debido a la importancia de los biometales para los seres vivos se ha reportado en la literatura diversos estudios sobre las interacciones entre estos iones metálicos y numerosos fármacos con potencial aplicación biológica. Recientemente se reportó la síntesis y caracterización de compuestos de coordinación mixtos de paracetamol y ácido ascórbico o vitamina C (Asc), donde estos se coordinan al ion metálico a través de los oxígenos del carbonilo amídico y los grupos hidroxilos de los extremos del doble enlace entre los carbonos 2 y 3, respectivamente; y tres moléculas de agua. El compuesto presenta una fórmula molecular igual a  $[M(\text{Para})(\text{Asc})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ , donde M puede ser: plomo(II), cadmio(II) o cobre(II). Por otro lado, un compuesto de coordinación binario donde el paracetamol se encuentra coordinado en dos sitios, es decir, funciona como ligante bidentado, esto a través de los oxígenos del carbonilo amídico y el nitrógeno de la amida. El compuesto presenta una fórmula molecular igual a  $[\text{Al}(\text{Para})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+}$  y se considera su uso en terapias de quelación. En la figura 2a y 2b se muestran las estructuras químicas propuestas para los compuestos mixtos y binario, respectivamente (4).

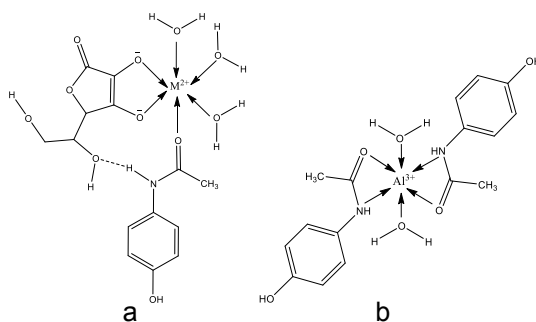


Figura 2. Estructura química para los compuestos a) mixtos  $[M(\text{Para})(\text{Asc})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$  y b) binario  $[\text{Al}(\text{Para})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+}$  (4).

Otros compuestos de coordinación con paracetamol obtenidos mostraron actividad antimicrobiana (bacterias y hongos), en los cuales el paracetamol se encuentra coordinado al ion metálico a través de los oxígenos del grupo hidroxilo fenólico funcionando como ligante monodentado, así como dos moléculas de agua. Los compuestos presentaron una fórmula molecular igual a  $[\text{M}(\text{Para})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot n\text{H}_2\text{O}$  donde M puede ser: mercurio(II), plomo(II) o cadmio(II). En las pruebas biológicas el compuesto con mercurio(II) presentó una alta actividad contra: *A. flavus* > *E. coli* > *A. oryzae* - *A. niger* > *B. subtilis* en comparación con paracetamol libre. Por otro lado, los compuestos de cadmio(II) y plomo(II) mostraron actividad antimicrobiana contra: *E. coli*, *A. oryzae* y *A. niger*, *A. Flavus* y *B. subtilis*, respectivamente. Además, estos compuestos mostraron en otro estudio con ratas albinas macho adultas que los que contenían como núcleo metálico plomo(II) o mercurio(II) se aumentaba el efecto hepatotóxico del paracetamol, sin embargo, el compuesto con cadmio(II) mostró tener éxito en aliviar el efecto hepatotóxico del paracetamol, así como mejorar las capacidades antioxidantes (5).

También se han utilizado las quinolonas, por ser un grupo de fármacos antimicrobianos que ejercen su acción directa por la inhibición de la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN), en la síntesis de nuevos compuestos de coordinación con objetivos diversos. En 2009 se reportó un compuesto de coordinación mixto de cobre(II) con una quinolona el ácido nalidíxico (nal) e hsm, donde el nal está coordinado al ion metálico a través de los oxígenos de los grupos carboxilato y ceto; y la hsm está coordinada a través de los nitrógenos de la amina alifática y el grupo imidazol. Por otro lado, tiene un ion cloruro como contraión. El compuesto presenta una fórmula molecular igual a  $[\text{Cu}(\text{hsm})(\text{nal})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , fue estudiado *in vivo* en *B. subtilis*, donde demostró tener interacción con la estructura del ADN del microorganismo. En la figura 3 se muestra la estructura del compuesto (12, 21).

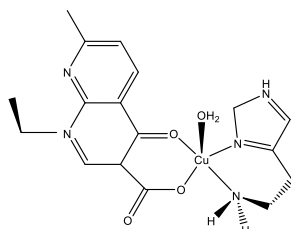


Figura 3. Estructura química del compuesto  $[\text{Cu}(\text{hsm})(\text{nal})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (12).

Por otro lado, la plata a diferencia del cobre no es considerada un biometal, a la actualidad no se le conoce alguna actividad biológica, por lo que se considera no esencial en la fisiología humana, pero a pesar de eso se ha reportado su acumulación en distintos órganos en el ser humano. La plata por su toxicidad es principalmente usada como antibacteriano en diferentes formas como: en nanopartículas, plata coloidal o compuesto que contengan iones de plata. Por otro lado, recientemente se han reportado compuestos de coordinación de plata con diferentes fármacos como los es el miconazol (mcz) y metronidazol (mtz), donde estos se encuentran coordinados al ion metálico a través de los nitrógenos de los grupos imidazoles. Estos compuestos de coordinación presentaron actividad biológica importante como antineoplásicos, antibacterianos y antifúngicos,

esto comparado con los fármacos libres y una sal de plata. En la figura 4 se presentan las estructuras de los compuestos donde X puede ser  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{BF}_4^-$  o  $\text{SbF}_6^-$  (9 - 11, 22).

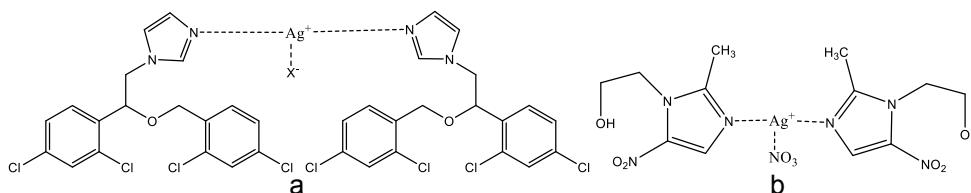


Figura 4. Estructura química de los compuestos a)  $[\text{Ag}(\text{mcz})_2]\text{X}$  y b)  $[\text{Ag}(\text{mtz})_2]\text{NO}_3$  (11, 21).

#### *Pichia pastoris*.

La levadura *Pichia pastoris* es un organismo unicelular que es de fácil manipulación, pertenece al grupo de células eucariotas por lo que es capaz de realizar muchas de las modificaciones postraduccionales realizadas por las células eucariotas superiores. Ya que muchas proteínas que terminan como cuerpos de inclusión inactivos en sistemas bacterianos, estas se producen como moléculas biológicamente activas en *P. pastoris* (23).

El uso de levaduras metilotróficas como *P. pastoris* para la expresión de proteínas recombinantes ha aumentado considerablemente, especialmente en aplicaciones farmacéuticas. *P. pastoris* se ha utilizado ampliamente por tener ciertas ventajas como: ser un microorganismo generalmente reconocido como seguro, por sus siglas en inglés GRAS (*general regardin as safe*), opta por una vía metabólica aeróbica sobre una anaeróbica, lo que evita la producción de metabolitos de fermentación como el ácido acético y el etanol. Como eucariota, tiene la capacidad de realizar modificaciones proteicas postraduccionales, posee un sistema de excreción de proteínas eficiente y por último crece a altas densidades celulares en medios mínimos definidos. La capacidad de *P. pastoris* para oxidar metanol a través de las enzimas alcohol oxidasa (AOX1 y AOX2) se utiliza en la construcción de cepas modificadas genéticamente. Donde el promotor del gen AOX1 (pAOX1) es más utilizado para controlar la expresión de proteínas recombinantes (24).

Existen varias cepas de *P. pastoris*, las cuales son clasificadas en cuanto a su capacidad de metabolizar el metanol como: la cepas Mut<sup>+</sup> estas poseen un crecimiento en metanol igual al de la cepa silvestre, ya que portan los genes AOX1 y AOX2 funcionales, las cepas Mut<sup>S</sup> poseen un lento crecimiento en presencia de metanol respecto a la cepa silvestre, a causa de que sólo el gen AOX2 se encuentra funcional y el último grupo lo componen las cepas Mut<sup>-</sup>, las cuales no pueden emplear el metanol como fuente de carbono y energía, ya que poseen a los genes AOX1 y AOX2 inactivados. Estos tres grupos se distinguen por sus velocidades específicas de crecimiento en presencia de metanol: Mut<sup>+</sup> (0.14 h<sup>-1</sup>), Mut<sup>S</sup> (0.04 h<sup>-1</sup>) y Mut<sup>-</sup> (0.0 h<sup>-1</sup>) (25).

## PARTE EXPERIMENTAL

### Síntesis y caracterización.

La síntesis de los compuestos se realizó por mecanosíntesis como se muestra en el diagrama 1, la cual es una síntesis en estado sólido en la que se lleva a cabo una reacción química haciendo uso de energía mecánica ejercida a través de una molienda. Por otro lado, esta técnica se considera amigable con el medio ambiente por no emplear disolventes en su proceso (26, 27).

Para la síntesis de los compuestos se utilizó L-histidina, diclorhidrato de histamina, acetaminofén (paracetamol) y cloruro de cobre dihidratado, todos de la marca Sigma-Aldrich y sin previa purificación. Se realizaron 11 síntesis en las que hubo variación de ligantes y orden de adición, así como tiempos de síntesis, las condiciones para cada una de las reacciones se muestran en la tabla 2. Los sólidos obtenidos por cada una las síntesis realizadas se caracterizaron por infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) en el rango de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup> usando un sistema HATR.



Diagrama 1. Procedimiento general para la mecano-síntesis.

Tabla 2. Condiciones generales de síntesis.

RXN	Código	Orden adición	Tiempo síntesis (min)	Adición NaOH	Peso producto (g)	ADUCTOS
1	CuPHsm301	Cu-Para-Hsm	30	-	0.4246	CuCl <sub>2</sub> •Para•Hsm
2	CuPHsm302	Cu-Hsm-Para	30	-	0.3885	CuCl <sub>2</sub> •Para•Hsm
3	CuPHsm303	Para-Cu-Hsm	30	-	0.4153	CuCl <sub>2</sub> •Para•Hsm
4	CuPHsm303-1	Para-Cu-Hsm	30	-	0.3859	CuCl <sub>2</sub> •Para <sub>2</sub> •Hsm <sub>2</sub>
5	CuPHsm304	Hsm-Cu-Para	30	-	0.3829	CuCl <sub>2</sub> •Para•Hsm
6	CuPHsm304-1	Hsm-Cu-Para	30	-	0.3705	CuCl <sub>2</sub> •Para <sub>2</sub> •Hsm <sub>2</sub>
7	CuPHis302	Cu-His-Para	30	-	0.3141	CuCl <sub>2</sub> •His <sub>2</sub>
8	CuPHis301	Cu-Para-His	30	-	0.407	CuCl <sub>2</sub> •His <sub>2</sub>
9	CuPara301	-	30	-	0.2648	-
10	CuPHsm704-1	Hsm-Cu-Para	70	-	0.2972	CuCl <sub>2</sub> •Para <sub>2</sub> •Hsm <sub>2</sub>
11	CuPHsm704	Hsm-Cu-Para	70	-	0.1	CuCl <sub>2</sub> •Para <sub>2</sub> •Hsm <sub>2</sub>

## Pruebas biológicas.

Para las pruebas biológicas se usó una cepa recombinante de *P. pastoris Mut<sup>s</sup>* la cual contiene el gen del hongo *Talaromyces minioluteus* que expresa la enzima dextranasa bajo el promotor pAOX1. Estas pruebas se realizaron en el medio de cultivo complejo YPG (Composición por litro: glicerol 20.0 g, extracto de levadura 10.0 g y peptona de caseína 20.0 g) siguiendo el procedimiento que se muestra en el diagrama 2. El inóculo inicial se hizo en matraz Fernbach de 2 L donde se adicionó 500 mL de medio, después este se inoculó directamente de la caja Petri donde se tenía la cepa de *P. pastoris*, el matraz se mantuvo en agitación orbital a 125 rpm y 28°C por 48 - 72 h hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm aproximada de 13 ( $DO_{600} \approx 13$ ). Para las pruebas biológicas se utilizaron matraces Erlenmeyer bafleados de 500 mL donde se adicionó 100 mL de medio y se inoculó con 5 mL del inóculo inicial, se mantuvo en agitación orbital a 125 rpm y 28°C por 24 o 96 h. Por último, cada uno de los matraces se muestrearon cada 3 o 24 h donde se midió la  $DO_{600}$  y se tomó 1.5 mL el cual se mantuvo en congelación para su posterior uso. Cabe mencionar que cada material y medio de cultivo utilizados fueron esterilizados en autoclave a 121°C y 15 psi por 15 min.

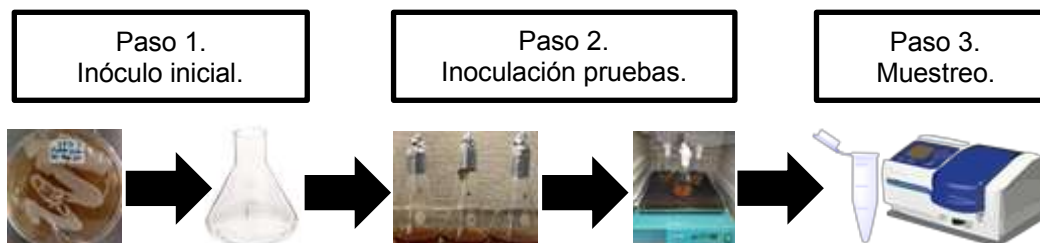


Diagrama 2. Procedimiento general para las pruebas biológicas.

En primer lugar, se determinó la cinética de crecimiento, después se realizó un experimento que consistió en utilizar 6 matraces, a cada uno ellos se les adicionó distintos precursores de los compuestos mixtos sintetizados a una concentración final de 1 mM y a las 24 h de fermentación, esto de acuerdo al diseño experimental que se muestra en la tabla 3. Por último, para cada uno de los matraces se determinó la actividad de la enzima dextranasa mediante la liberación de azúcares reductores.

Tabla 3. Diseño experimental para pruebas biológicas.

Matraz	<i>P. pastoris</i>	MeOH	Paracetamol	Histamina	CuCl <sub>2</sub>
CTRL	-	-	-	-	-
M1	+	-	-	-	-
M2	+	+	-	-	-
M3	+	-	+	-	-
M4	+	-	-	+	-
M5	+	-	-	-	+

#### Actividad dextranasa.

Para determinar la actividad de la enzima dextranasa las muestras biológicas fueron centrifugadas a 17000 rpm durante 5 min, en tubos eppendorf se recuperó 0.1 mL del sobrenadante, se les adicionó 0.4 mL de buffer de acetatos a pH 5 y 0.5 mL de una solución de dextrano al 2.5% preparada a partir de un producto comercial (Rheomarcrodex<sup>®</sup>, dextrano 10% en solución salina, PISA<sup>®</sup>). Después estos tubos se colocaron a 40°C por 10 min seguido de un baño de hielo. Los azúcares reductores liberados se determinaron con el uso del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) (28). Se definió como una unidad de actividad de dextranasa a la cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de equivalente de glucosa por minuto a 40°C.

#### Método colorimétrico DNS.

Para la determinación de los azúcares reductores liberados se realizó una curva patrón donde se siguieron 3 pasos, para esto se prepararon soluciones de glucosa a diferentes concentraciones (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg/mL). Paso 1: en tubos de ensayo se colocaron 0.5 mL de cada una de las soluciones y se les agregó 0.5 mL del reactivo DNS. Paso 2: los tubos se colocaron en agua hirviendo por 5 min seguido de un baño de hielo. Paso 3: a cada tubo se les adicionó 5 mL de agua destilada y se midió su absorbancia a 540 nm. Para las muestras biológicas de los tubos eppendorf se recuperó 0.5 mL en tubos de ensayo y se les agregó 0.5 mL del reactivo DNS, después se realizó el procedimiento del paso 2 al 3 descrito anteriormente.

## RESULTADOS

### Síntesis y caracterización.

De las síntesis realizadas se obtuvieron 11 sólidos los cuales se muestran en la figura 5, presentaron colores amarillos o verdes, se les realizó análisis FT-IR y de acuerdo con los resultados obtenidos para esta técnica de caracterización se logró asignar en 3 grupos distintos a cada uno de los sólidos. En el primer grupo se incluyeron los sólidos obtenidos con los códigos CuPHsm301, CuPHsm302, CuPHsm303 y CuPHsm304, que fueron de color amarillo. En el segundo grupo se incluyeron los sólidos obtenidos con los códigos CuPHsm303-1, CuPHsm304-1, CuPHsm704-1 y CuPHsm704, que fueron de color verde y en el tercer grupo se incluyeron los sólidos obtenidos con los códigos CuPHis301 y CuPHis302, que fueron de color verde.



Figura 5. Sólidos obtenidos por cada una de las síntesis.

De acuerdo con los resultados FT-IR obtenidos se propone que los sólidos del primer y segundo grupo presentan los aductos ( $\text{CuCl}_2 \cdot \text{Para} \cdot \text{Hsm}$ ) y ( $\text{CuCl}_2 \cdot \text{Para}_2 \cdot \text{Hsm}_2$ ), respectivamente. Para ambos grupos el paracetamol se coordina al cobre de manera monodentada a través del oxígeno del grupo hidroxilo fenólico y la histamina de manera bidentada a través de los nitrógenos del grupo imidazol y de la amina alifática. Los sólidos del tercer grupo presentan el aducto ( $\text{CuCl}_2 \cdot \text{His}_2$ ), donde se propone que la histamina se encuentra coordinada de manera tridentada a través de los nitrógenos del grupo imidazol y la amina alifática y a través del oxígeno del grupo carboxilato (29 - 35). Por último, de acuerdo a los resultados de FT-IR para el sólido obtenido con el código CuPara301 no existe una coordinación entre el cobre y el paracetamol. En la tabla 4 se muestran las asignaciones de las señales representativas de cada uno de los compuestos en comparación con los ligantes libres. Las asignaciones de las señales del Para (5), Hsm (36) e His (37) fueron previamente reportadas.

Tabla 4. Asignación de señales de los espectros FT-IR ( $\text{cm}^{-1}$ ).

COMPUESTOS	$\nu(\text{NH}_2)$	$\nu(\text{OH})$	$\nu(\text{C}=\text{O})$	$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$	$\delta(\text{NH}_2)$	$\delta(\text{OH})$	$\nu(\text{CO})$	$\delta(\text{rOH})$	$\delta(\text{COO}^-)$
				$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$					
HSM	3085	-	-	-	1623	-	-	-	-
					1473				
HIS	3073	-	-	1628	1579	1313	-	-	793
				1409	1497				
PARA	-	3160	1649	-	-	1326	1252	626	-
CuPHis301	-	3158	1651	1633	1564	-	1249	623	-
				1414					
CuPHsm301	-	-	1652	-	1565	-	1254	-	-
CuPHsm301-1	-	3139	1652	-	1564	1327	1254	-	-

#### Pruebas biológicas.

En la cinética de crecimiento la cual se muestra en la figura 6, se logró observar las fases del crecimiento de la levadura *P. pastoris*: la fase de latencia, la fase exponencial o logarítmica y la fase estacionaria, las cuales, bajo las condiciones aquí descritas de inóculo inicial y agitación orbital, se encontraron entre las 0 - 7, 9 - 18 y 24 - 27 h, respectivamente.



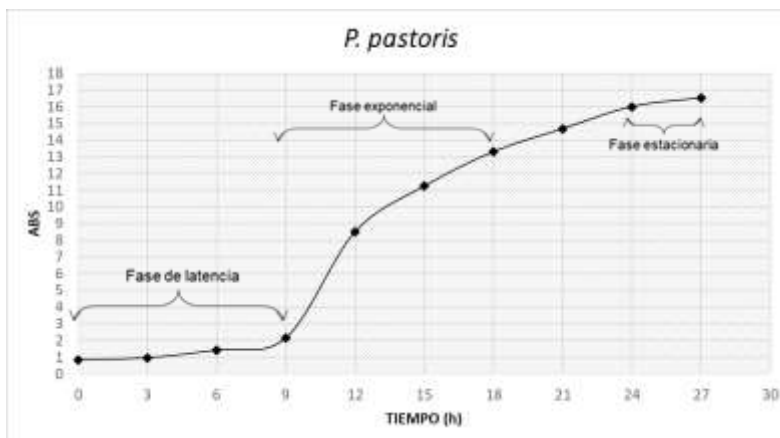


Figura 6. Cinética de crecimiento de *P. pastoris*.

Una vez que se definió el tiempo en que la levadura alcanzó la fase estacionaria se realizaron las pruebas biológicas descritas en la tabla 3. Donde se observó que la levadura en los matraces del M1 al M5 alcanzaba la fase estacionaria a las 24 h, en el matraz CTRL no se observó crecimiento celular tal como se esperaba ya que este no fue inoculado, en la figura 7 se muestra la gráfica. Cada uno de los matraces a las 24 h alcanzaron una  $DO_{600}$  entre 15.25 a 16.04, a partir de ahí y hasta las 96 h se observó un leve descenso a una  $DO_{600}$  entre 12.71 a 13.94. De acuerdo con los datos obtenidos, se sugiere que los compuestos adicionados a la concentración de 1 mM, la cual es usada para la inducción de la expresión de enzimas en hongos (38), no afectan significativamente la generación de biomasa de la levadura, esto de acuerdo con reportes previos donde emplean sulfato de cobre para la inducción de genes en *P. pastoris* (39). Por otro lado, también se han reportado otros trabajos en levaduras que sugieren que el paracetamol no afecta su crecimiento (40).

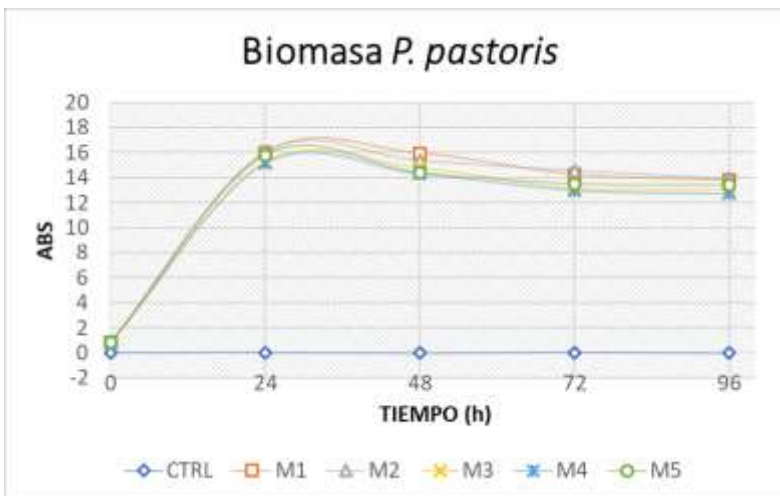


Figura 7. Biomasa generada de *P. pastoris* en cada experimento.

Las muestras recuperadas cada 24 h de los matraces se les midió la actividad de la enzima dextranasa por medio de los azúcares reductores liberados, estos fueron calculados con la ecuación obtenida de la curva patrón de azúcares reductores ( $Y = 1.2234X - 0.0422$ ,  $R^2 = 0.9963$ ). Los datos obtenidos se graficaron, se observó que de las 24 a las 96 h los matraces no presentaron diferencia significativa en la actividad de la enzima dextranasa. Los matraces M1 al M5 presentaron 0.047 a 0.06 U/L, el matraz CTRL presentó 0.027 U/L y M1 al M5 presentaron 0.054 a 0.066 U/L y el matraz CTRL presentó 0.024 U/L, respectivamente. En la figura 8 se muestra la gráfica de los datos obtenidos. Se

observaron actividades pequeñas de actividad de dextranasa, esta actividad en general es atribuida a agentes reductores presentes en el medio de cultivo debido a que los valores obtenidos no se acercan a los previamente reportados para *P. pastoris* con el uso de bioreactores (41).



Figura 8. Actividad de enzima dextranasa.

## CONCLUSIONES

Por síntesis en estado sólido como la mecosíntesis en este trabajo se obtuvieron 3 compuestos diferentes los cuales presentan los aductos:  $(\text{CuCl}_2 \cdot \text{Para} \cdot \text{Hsm})$ ,  $(\text{CuCl}_2 \cdot \text{Para}_2 \cdot \text{Hsm}_2)$  y  $(\text{CuCl}_2 \cdot \text{His}_2)$ . En las condiciones de mecosíntesis aquí descrita se observa que el orden de adición de los reactivos, así como los tiempos de síntesis no afecta significativamente la obtención de los productos.

El tratamiento previo de la Hsm con NaOH, así como la adición de este durante la síntesis origina la obtención de los sólidos color verde. Por lo contrario, el no uso de NaOH origina la obtención de los sólidos color amarillo.

Respecto a la parte biológica, bajo las condiciones de fermentación ricas en glicerol aquí descritas, no se logró la expresión de la enzima dextranasa.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Rios Quintana, R., Estrada Hernández. L. O., 2018. Descripción y cuantificación de riesgos atribuidos a analgésicos antiinflamatorios no esteroideos no selectivos consumidos por la población mexicana. *Med. Int. Méx.* 34, 173-187.
2. Prescott, L. F., 1996. Paracetamol (acetaminophen). A critical bibliographic. *J. Pharm. Pharmacol.* 48, 882.
3. Ledeti, I., Simu, G., Vlase, G., Savoiu, G., Vlase, T., Suta, L. M., Popoiu, C., Fulias, A., 2013. Synthesis and solid-state characterization of Zn(II) metal complex with acetaminophen. *Rev. Chim.* 64, 1127-1130.
4. Chandrathilaka, A. M. D. S., Ileperuma, O. A., Hettiarachchi, C. V., 2013. Spectrophotometric and pH-metric studies on Pb(II), Cd(II), Al(III) and Cu(II) complexes of paracetamol and ascorbic acid. *J. Natn. Sci. Foundation Sri Lanka.* 41, 337-344.
5. El-Megharbel, S. M., hamza, R. Z., Refat, M. S., 2014. Preparation, spectroscopic, thermal, antihepatotoxicity, hematological parameters and liver antioxidant capacity characterizations of Cd(II), Hg(II), and Pb(II) mononuclear complexes of paracetamol anti-inflammatory drug. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* 131, 534-544.
6. Nenad, S. K., Ruzica, S. N., Maja, N. S., Nada, G. N., Dragan, M. D., 2015. Coordination compounds of M(II) biometal ions with acidtype anti-inflammatory drugs as ligands – A review. *Tropical journal of pharmaceutical research.* 14, 337-349.

7. Victorava, L F., Feoktistova, Y C., 2018. El metabolismo del cobre. Sus consecuencias para la salud humana. *Revista de ciencias médicas de Cienfuegos*. 4, 579-587.
8. Saeki, K., Nakajima, M., Loughlin, T. R., Calkins, D. C., Baba, N., Kiyota, M., Tatsukawa, R., 2001. Accumulation of silver in the liver of three species of pinnipeds. *Environmental pollution*. 112, 19-25.
9. Hadrup, N., Lam, H. R., 2014. Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver - a review. *Regulatory toxicology and pharmacology*. 68, 1-7.
10. Stryjska, K., Radko, L., Checinska, L., Kusz, J., Posyniak, A., Ochocki, J., 2020. Synthesis, spectroscopy, light stability, single-crystal analysis, and in vitro cytotoxic activity on HepG2 liver cancer of two novel silver(I) complexes of miconazole. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 3629-3647.
11. Stryjska, K., Korona Glowniak, I., Checinska, L., Kusz, J., Ochocki, J., 2021. Synthesis, spectroscopy, single-crystal structure analysis and antibacterial activity of two novel complexes of silver(I) with miconazole drug. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1510-1528.
12. Bivián Castro. E. Y., López, M. G., Pedraza Reyes, M., Bernes, S., Mendoza Díaz, G., 2009. Synthesis, characterization, and biological activity studies of copper(II) mixed compound with histamine and nalidixic acid. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 1, 1-8.
13. Hass, H., 1983. History of antipyretic analgesic therapy. *The American journal of medicine*. 1-3.
14. López Zavala, M. A., Anglés Vega, D., Álvarez Vega, J. M., Castillo Jerez, O. F., Cantú Vega, R. A., 2020. Electrochemical oxidation of acetaminophen and its transformation products in surface water: effect of pH and current density. *Heliyon*. 6, 1-11.
15. Ellis, F., 2002. Paracetamol – a curriculum resource. Royal society of chemistry, London, pag. 1-24.
16. Katzung, B. G., 2019. Medicamentos antiinflamatorios no esteroideos, fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad, analgésicos no opioides y medicamentos utilizados en la gota. En: Negm, A., A. (Eds.), *Farmacología básicas y clínica*. 14ª edición, Mc Graw Hill, México, pág. 642-666.
17. Sharm, C. V., Mehta, V., 2014. Paracetamol: mechanisms and update. *Continuing Education in anaesthesia, critical care & pain*. 14, 153-158
18. Tabares Zas, V., Rodríguez Rodríguez, J. R., Silva Jiménez, E., 2013. El dolor y su manejo en los cuidados paliativos. *Panorama Cuba y Salud*. 8, 41-48.
19. Kulo. A., Peeters, M. Y., Allegaert, K., Smits, A., Hoon, J., Verbesselt, R., Lewi, L., Velde, M., Knibbe, C. A. J., 2012. Pharmacokinetics of paracetamol and its metabolites in women at delivery and post-partum. *British journal of clinical pharmacology*. 75, 850-860.
20. Refat, M. S., Mohamed, G. G., El-Sayed, M. Y., Killa, H. M. A., Fetoo, H., 2017. Spectroscopic and thermal degradation behavior of Mg(II), Ca(II), Ba(II) and Sr(II) complexes with paracetamol drug. *Arabian journal of chemistry*. 10, S2376-S2387.
21. Parra Ruiz, J., Peña Monje, A., Martínez Pérez, M. A., Hernández Quero, J., 2006. Quinolonas. Sulfamidas. Trimetoprima. Cotrimoxazol. *Medicine*. 9, 3538-3573.
22. Radko, L., Stypula Trebas, S., Posyniak, A., Zyro, D., Ochocki, J., 2019. Silver(I) complexes of the pharmaceutical agents metronidazole and 4-Hydroxymethylpyridine: comparison of cytotoxic profile for potential clinical application. *Molecules*. 24, 1949-1961.
23. Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J., Higgins, D. R., 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*. 16, 23-52.
24. Marín Muñoz, M. A., Jáuregui Rincón, J., Serrano Carreón, Chávez Vela, N. A., 2019. Dextranase production by recombinant *Pichia pastoris* under operational volumetric mass transfer coefficient (kLa) and volumetric gassed power input (Pg/V) attainable at commercial large scale. *Preparative biochemistry and biotechnology*. 1, 1-10.
25. Serrano Rivero, Y., Marrero Domínguez, K., Fando Calzado, R., 2016. *Pichia pastoris*: una plataforma para la producción de proteínas heterólogas. *CENIC ciencias biológicas*. 47, 67-77.
26. Gaffet, E., Bernard, f., Niepce, J. C., Charlot, F., Grass, C., Caer, G. L., Guichard, J. L., Delcroix, P., Mocellin, A., Tillement, O., 1998. Some recent developments in mechanical activation and mechanosynthesis. *J. Mater. Chem.* 9, 305-314.

27. Peneque Quevedo, A. A., 2019. Mecanoquímica: una visión general más allá de la química inorgánica. *Rev. Cub. Quim.* 31, 1-17.
28. Miller, G. L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.
29. Obaleye, J. A., Aliyu, A. A., Rajee, A. O., Bello, K. E., 2021. Synthesis, characterization, in-vitro anti-inflammatory and antimicrobial screening of metal(II) mixed diclofenac and acetaminophen complex. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* 35, 77-86.
30. Belfilali, I., Louhibi, S., Mahboub, R., Touzani, R., El kadiri, S., Roisnel, T., 2013. Study of the histamine copper (II) chloride complex catalytic activity. *Res. Chem. Intermed.* 41, 1819-1831.
31. Mesu, J. G., Visser, T., Soulimani, F., Van Faassen, E. E., Peinder, P., Beale, A. M., Weckhuysen, B. M., 2006. New insights into the coordination chemistry and molecular structure of copper(II) histidine complex in aqueous solutions. *Inorg. Chem.* 45, 1960-1971.
32. Socrates, G., 2001. Amine, imines, and their hydrohalides. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies. Tables and Charts*, 3rd edition, John Wiley & Sons, England, pag. 107-113.
33. Socrates, G., 2001. Aromatic compounds. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies. Tables and Charts*, 3rd edition, John Wiley & Sons, England, pag. 157-165.
34. Socrates, G., 2001. Alkane group residues: C-H group. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies. Tables and Charts*, 3rd edition, John Wiley & Sons, England, pag. 50-67.
35. Socrates, G., 2001. The Carbonyl Group: C=O. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies. Tables and Charts*, 3rd edition, John Wiley & Sons, England, pag. 115-148.
36. Kastas, G., Pasaoglu, H., Karabulut, B., 2011. Magnetic, structural and computational studies on transition metal complexes of a neurotransmitter, histamine. *Journal of molecular structure.* 1000, 39-48.
37. Petrosyan, A. M., 2007. Vibrational spectra of L-histidine perchlorate and L-histidine tetrafluoroborate. *Vibrational Spectroscopy.* 43, 284-289.
38. Vinoth Kumar, V., Dinesh Kirupha, S., Periyaraman, P., Sivanesan, S., 2011. Screening and induction of laccase activity in fungal species and its application in dye decolorization. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5, 1261-1267.
39. Balakumara, P. A., Forster, J., Zimmermann, M., Charumathi, J., Schimitz, A., Czarnotta, E., Lehnen, M., Sudarsan, S., Ebert, B. E., Blank, L. M., Meenakshisundaram, 2016. The trade-off of availability and growth inhibition through copper for the production of copper-dependent enzymes by *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnology.* 16, 1-12.
40. Huseinovic, A., Van Leeuwen, J. S., Van Welsem, T., Stulemeijer, I., Van Leeuwen, F., Vermeulen, N. P. E., Kooter, J. M., Vos, J. C., 2017. The effect of acetaminophen on ubiquitin homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS ONE.* 12, 1-19.
41. Marín Muñoz, M. A., Jáuregui Rincón, J., Serrano Carreón, L., Chávez Vela, A., 2019. Dextranase production by recombinant *Pichia pastoris* under operational volumetric mass transfer coefficient (kLa) and volumetric gassed power input (Pg/V) attainable at commercial large scale. *Preparative biochemistry and biotechnology.* 49, 606-615.

## ESTUDIO DE LA TOXICIDAD AGUDA DEL FUNGICIDA OXICLORURO DE COBRE SOBRE LA BACTERIA MARINA *VIBRIO FISCHERI*

Gerardo Solís González, Martha Estrella García Pérez, Héctor Eduardo Martínez Flores y María Carmen Bartolomé Camacho

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
carbarcam@hotmail.com

### RESUMEN

Debido al incremento en la demanda mundial de alimentos por el incesante crecimiento demográfico, los agricultores han tenido que aplicar grandes cantidades de plaguicidas con el fin de acrecentar la producción y calidad de las cosechas tratando de disminuir los efectos adversos generados por el clima y las plagas. Dentro de los plaguicidas, los fungicidas basados en cobre son unos de los más utilizados y, debido a sus propiedades fisicoquímicas, pueden persistir en el ambiente. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar la toxicidad aguda del fungicida oxiclóruo de cobre a través de bioensayos para determinar la Concentración Efectiva media ( $CE_{50}$ ), utilizando al bioindicador *Vibrio fischeri*, los cuales se basan en medir la disminución de la bioluminiscencia natural de esta bacteria al ser enfrentada con el agente tóxico en estudio. La metodología utilizada es la descrita por Microtox®; primeramente, se saló la sustancia de estudio (oxiclóruo de cobre), con NaCl al 2% pH 6-8 y se prepararon diluciones desde la muestra sin diluir hasta concentración de 1/16. Se incubó la bacteria *V. fischeri* resuspendida en NaCl al 2% por una hora, posteriormente, se enfrentó a las diluciones previamente preparadas del fungicida oxiclóruo de cobre, se dejó en incubación por 15 minutos y la variación en la bioluminiscencia de *V. fischeri* se midió empleando el luminómetro BG-1 obteniendo así la  $CE_{50}$ . En dicho bioensayo se obtuvo una  $CE_{50}$  de 12.68 mg L<sup>-1</sup> (5.93-27.13), para el oxiclóruo de cobre, clasificándolo en la categoría III de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US-EPA) como sustancia tóxica para el ambiente acuático. Los resultados obtenidos mostraron que el oxiclóruo de cobre es tóxico para el ambiente acuático a corto plazo generando daños ecotoxicológicos graves en los cuerpos de agua que son punto final de este fungicida. Sin embargo, es necesario estudiar el efecto de otras sustancias metálicas o análogas del cobre, así como herbicidas e insecticidas que son aplicados a los cultivos y su respuesta individual y en mezcla, así como su interacción con este plaguicida.

### INTRODUCCIÓN

Aunque la contaminación puede provenir de dos fuentes principales natural y antropogénica, la contaminación está relacionada frecuentemente con esta última, dicha contaminación se caracteriza, principalmente, por la introducción o incremento de sustancias que pueden causar daño sobre la salud humana, perjudicar los recursos vivos y los sistemas ecológicos (Alloway y Ayres, 1997; Bautista, 1999). Así mismo, la contaminación puede ser clasificada de acuerdo con lugar donde se presente, por ejemplo: contaminación del suelo, del agua y del aire.

En particular, la contaminación del agua está dada por la adición de materia extraña indeseable que afecta su calidad, drena por las escorrentías hacia los ríos o por medio de aguas subterráneas o es descargada directamente en lagos y mares. Los principales contaminantes presentes en el agua son detergentes, plaguicidas, herbicidas, metales, fertilizantes y residuos sólidos (Solís y López, 2003). Ante el exponencial crecimiento demográfico, se acrecentó la demanda de alimentos y, los agricultores, para satisfacerla han tenido que tomar medidas con el fin de aumentar la calidad y cantidad de las cosechas, así como para disminuir los efectos adversos por el clima o las plagas que merman la producción de los productos del campo (Solís et al., 2019). El uso indiscriminado y a veces fraudulento de plaguicidas y de sustancias reguladas en países subdesarrollados, que inclusive están prohibidos en algunos países desarrollados (ej. Unión Europea y Estados Unidos), ha causado un efecto negativo en plantas, suelo y aguas subterráneas en el área donde esas sustancias son aplicadas. Algunos plaguicidas, según su estructura y características fisicoquímicas, persisten en el ambiente, propiciando con ello la acumulación en agua y suelo principalmente, integrándose en la cadena trófica hasta llegar a los seres humanos (WHO, 1994; Jaramillo, Meléndez y Aldana, 2009). La contaminación ambiental también está presente en la población humana a través

de la absorción de plaguicidas por inhalación durante su aplicación y consumo a través de los alimentos (Solís et al., 2019).

El oxiclورو de cobre es uno de los fungicidas más utilizados debido a su modo de acción de contacto (protectante), es decir, afecta al mismo tiempo varias de las funciones celulares del agente patógeno. De manera general, el cobre entra en contacto con las esporas impidiendo su germinación o desarrollo (acción fungistática) y después de dos horas de exposición al producto se logra una acción fungicida, por la penetración del producto dentro de las células. Los fungicidas cúpricos producen estrés oxidativo a través de la generación de radicales libres sobre distintos grupos funcionales como SH-, NH<sub>2</sub>-, COO-, en pared y membranas celulares, así como alteraciones en enzimas clave (Melgarejo y Abella, 2011).

El cobre es un metal esencial para la mayoría de los seres vivos, pero en concentraciones altas puede ser tóxico. Además, el cobre utilizado como ingrediente activo de algunos fungicidas (en este caso, oxiclورو de cobre) ha reportado una persistencia extrema en suelo y agua a pesar de su baja solubilidad (Gladstone, 2002; IRET, 2020).

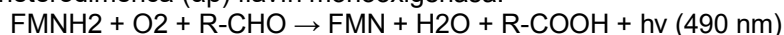
Por otra parte, algunos organismos logran asimilar el cobre produciendo como respuesta la bioacumulación de este metal al formar complejos con sustancias orgánicas de difícil excreción (Scelzo, 1997). Es por esto que la utilización de compuestos metálicos en la agricultura supone un riesgo debido a la persistencia y a la bioacumulación en los organismos pudiendo biomagnificarse a través de la cadena trófica.

El conocimiento de la toxicidad de las sustancias sólo puede obtenerse por estudios retrospectivos de casos de intoxicación o por ensayos con animales, plantas y microorganismos mejor conocidos como bioensayos (Repetto, 1988).

El uso de bioensayos ha permitido determinar los efectos tóxicos de una sustancia y su repercusión en una población y su medio ambiente. Estos ensayos pueden evaluar la toxicidad de un compuesto de manera aguda o crónica utilizando especies representativas de diferentes niveles tróficos, representando el estado general del sistema de estudio al extrapolar los resultados a los demás niveles de la cadena trófica (Baker et al., 2003; Castillo, 2004).

El bioindicador utilizado en este estudio fue la bacteria marina *Vibrio fischeri*. Es una bacteria gram negativa, es decir, que se tiñe de color rosáceo para su visualización, que tiene forma de barra, anaerobia facultativa, que pueden vivir en presencia o en ausencia de oxígeno. Perteneció a la familia *Vibrionaceae* cuya característica más representativa es la bioluminiscencia (producción de luz por parte de ciertos organismos vivos), la cual habita en todos los ambientes marinos donde se encuentra predominantemente en relaciones de simbiosis con varios animales marinos, principalmente en moluscos. Una de sus principales características son sus propiedades bioluminiscentes. La investigación en ecotoxicología con diferentes especies de bacterias luminiscentes ocupa un importante lugar en la evaluación de los contaminantes del agua en ciertos ecosistemas. Sus características genéticas, fisiológicas, nutricionales y funcionales han sido evaluadas comparando los cambios que se producen en estos organismos, fundamentalmente en presencia de agentes tóxicos. Ello ha dado lugar a la existencia de protocolos normalizados con bacterias luminiscentes para ensayos de toxicidad. *Vibrio fischeri* se ha utilizado con frecuencia, ya que es un organismo conocido y los protocolos operativos están estandarizados ya que las pruebas de bioluminiscencia de inhibición ofrecen respuestas robustas, fáciles de manejar y rentables (M. Salizzato, V. Bertato, B. Pavoni, AV Ghirardini y PF Ghetti., 1998).

La prueba de bioluminiscencia viene regulada por la ISO 11348-2:2007: Es importante destacar la estabilidad en la emisión de luz, así como la gran sensibilidad que presenta a una amplia variedad de sustancias tóxicas. Las reacciones de emisión de luz en la mayoría de las bacterias involucran la oxidación de riboflavín fosfato reducido (FMNH<sub>2</sub>) en una larga cadena de un aldehído con emisión de luz verdeazulada,  $\lambda_{\max} = 490\text{-}505\text{ nm}$ . Dicha reacción está catalizada por la enzima luciferasa bacteriana, una heterodimérica ( $\alpha\beta$ ) flavín monooxigenasa.



La reacción de bioluminiscencia bacteriana está ligada al sistema de transporte de electrones en la respiración celular y es indicativa del estado metabólico de la célula, de modo que una disminución de la bioluminiscencia indica la disminución de la respiración celular. Los contaminantes físicos, químicos y biológicos afectan a la respiración celular alterando el porcentaje de síntesis de proteínas y lípidos y modificando por tanto el nivel de emisión de luminiscencia. En presencia de agentes

contaminantes, la bioluminiscencia natural de *Vibrio fischeri* disminuye. La prueba de bioluminiscencia consiste en la medida de la luz emitida por las bacterias *Vibrio fischeri* antes de entrar en contacto con la muestra y después de contactar con ella pasado un tiempo de incubación. Es asumible que la diferencia de luminosidad observada es debida al efecto de la muestra. El grado de pérdida de luz indica el grado de toxicidad de la muestra.

El principio del método se basa en un bioensayo que examina la toxicidad aguda de muestras medioambientales y compuestos puros basándose en la reducción de la bioluminiscencia natural de la bacteria marina *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*) en presencia de agentes contaminantes. La toxicidad se expresa como la concentración de agente que produce la reducción del 50 % de la luminiscencia inicial ( $EC_{50}$ ).

## PARTE EXPERIMENTAL

### Sustancia de ensayo

La sustancia de ensayo utilizada fue el fungicida oxiclورو de cobre con una pureza de 92.4 % [ $Cu_2(OH)_3Cl$ ] con un contenido de 59.5 % de cobre en concentración no menor de 550 g Cu  $Kg^{-1}$  oxiclورو de cobre (Agrocuper Ecovert, Agroquímica S. A. de C. V., México).

### Material biológico

La bacteria marina *Vibrio fischeri*, resuspendida en solución de NaCl al 2 % e incubada la suspensión durante una hora. Posteriormente, al haberse atemperado la suspensión de bacterias, se preparan alícuotas de 100  $\mu L$ .

### Bioensayo de toxicidad sobre *Vibrio fischeri* por medición de bioluminiscencia

La sustancia de ensayo se debe diluir con NaCl al 2 % y tener un pH en el rango entre 6 y 8. Posteriormente se hace una serie de diluciones con NaCl al 2 % y se disponen en el Peltier como se muestra en la Tabla 1. Posteriormente, se dejarán pasar 15 minutos de incubación. De cada uno de los estándares se realiza la medida por duplicado y una vez que se hayan medido todos los tubos, el luminómetro dará los valores de la Concentración Efectiva media ( $CE_{50}$ ) y la curva de inhibición de luz. Para comprobar la validez de los resultados, se empleará un patrón de  $ZnSO_4$ , cuyo valor de  $CE_{50}$  es conocido.

Tabla 1. Diluciones elaboradas con la sustancia de estudio,  $Cu_2(OH)_3Cl$ , con solución de NaCl 2 % y disposición de las muestras en el Peltier.

	I	II	III	IV	V	VI
Hilera A	Blanco	1/16	1/8	1/4	1/2	Muestra original
Hilera B	100 $\mu L$ de bacterias + 100 $\mu L$ de blanco	100 $\mu L$ de bacterias + 100 $\mu L$ de muestra 1/16	100 $\mu L$ de bacterias + 100 $\mu L$ de muestra 1/8	100 $\mu L$ de bacterias + 100 $\mu L$ de muestra 1/4	100 $\mu L$ de bacterias + 100 $\mu L$ de muestra 1/2	100 $\mu L$ de bacterias + 100 $\mu L$ de muestra sin diluir

### Análisis estadístico

Los valores de la  $CE_{50}$  y NOEC fueron obtenidos por regresión no lineal a través de la relación Concentración-Respuesta. La prueba de distribución normal de los datos se realizó a través de la prueba D'Agostino-Pearson por el sistema estadístico Graphpad Prism v7.0 (Graph-Pad Software Inc., USA) basada en la prueba de normalidad por D'Agostino y Pearson (1973). La curva de inhibición de luminiscencia será obtenida a través de los valores de la  $CE_{50}$  obtenidos de los datos dados por el luminómetro.

## RESULTADOS

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US-EPA) propone un sistema de categorización de sustancias o contaminantes en ambientes acuáticos en pruebas de toxicidad

aguda ( $CL_{50}$ ,  $CI_{50}$  o  $CE_{50}$  expresado en  $mg L^{-1}$ ). Dicha categorización segmenta a las sustancias de ensayo en cuatro categorías tal y como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Categorización de sustancias de acuerdo con la  $CE_{50}$  (US-EPA, 1996).

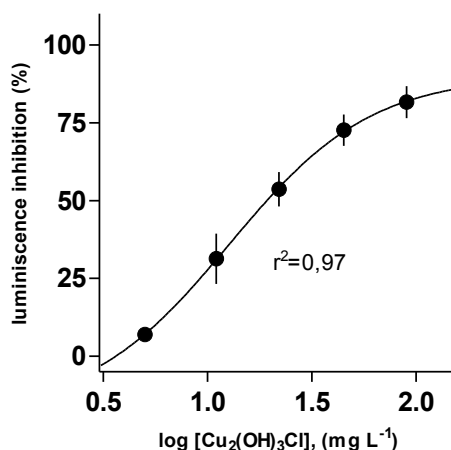
Toxicidad aguda ( $CE_{50}$ en $mg L^{-1}$ )	Categoría
$\leq 1$	I: Sustancias muy tóxicas para el ambiente acuático.
1-10	II: Sustancias tóxicas para el ambiente acuático.
10-100	III: Sustancias peligrosas para el ambiente acuático.
$\geq 100$	IV: Se consideran no tóxicas.

Se obtuvo una  $CE_{50}$  del fungicida oxiclورو de cobre de  $12.68 mg L^{-1}$  (5.93-27.13) y una NOEC de  $3.41 mg L^{-1}$  (0.22-0.73) sobre la bacteria marina *Vibrio fischeri* tras la exposición al fungicida (Tabla 3), lo que la incluye dentro de la Categoría III como una sustancia peligrosa para el ambiente acuático de acuerdo con la clasificación propuesta por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US-EPA) para la categorización de los contaminantes acuáticos por toxicidad aguda.

Tabla 3. Valores de la  $CE_{50}$  y NOEC del oxiclورو de cobre sobre la bacteria marina *Vibrio fischeri* por disminución de bioluminiscencia.

Índice de toxicidad	$mg L^{-1}$ (L. C. 95 %)
$CE_{50}$	12.68 (5.93-27.13)
NOEC	3.41 (0.22-0.73)

El efecto de la exposición aguda de *Vibrio fischeri* con el fungicida oxiclورو de cobre, resultó en una respuesta peligrosa sobre dicha bacteria al presentarse una disminución de la bioluminiscencia, esto se observa en la Gráfica 1, en donde a mayor concentración del fungicida aumenta también la respuesta tóxica.



Gráfica 1. Curva Concentración-Respuesta de la exposición aguda de *Vibrio fischeri* con el fungicida oxiclورو de cobre y la disminución de su bioluminiscencia.



## DISCUSIÓN

Uno de los problemas ambientales es el de los efectos negativos derivados del uso inadecuado de agroquímicos, por lo que evaluar los posibles efectos adversos que causan sobre el medio ambiente es indispensable para ayudar a la regulación de éstos, Iannacone y Alvaríño (2011), mencionan que la investigación del efecto ecotoxicológico proporciona más solidez a la evaluación de la calidad del agua, ayudando a que se establezcan mejores criterios de calidad para la protección de la vida acuática.

Ossana (2011), manifiesta que el cobre es un metal pesado comúnmente encontrado en los ecosistemas acuáticos, debido a su amplia y diversa utilización. El uso del cobre en la agricultura está muy extendido, tanto a nivel fitosanitario como a nivel fertilizante.

De acuerdo con los resultados exhibidos en este estudio ( $CE_{50}$  12.68 mg L<sup>-1</sup> y NOEC 3.41 mg L<sup>-1</sup>), se han encontrado estudios previos sobre el cobre, específicamente en la prueba realizada por Kungolos, Emmanouil, Tsiridis y Tsiropoulos (2009), donde utilizaron a la bacteria marina *Vibrio fischeri* en dicho bioensayo. Estos autores utilizaron Cloruro de cobre dihidratado como sustancia de estudio ( $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ ), que es una sal basada en cobre como la utilizada en esta prueba (oxicloruro de cobre). Estos autores reportaron una  $CE_{50}$  de 0.18 mg L<sup>-1</sup> (0.17-0.19), donde es posible observarse que, contrastando con nuestros resultados, la toxicidad del cobre en el ensayo de Kungolos et al., es 70 veces mayor.

La mayoría de los estudios realizados sobre la toxicidad del oxicluro de cobre en distintos organismos acuáticos coinciden sobre su peligrosidad de moderada a alta. Sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados obtenidos, comparado con el ensayo de Kungolos et al., fue mucho más tóxico que en nuestro estudio comportándose como menos sensible, posiblemente por la sustancia basada en cobre utilizada para el ensayo puesto que puede haber un cambio en la liberación del ion cuproso al medio y haber cantidades variables de cobre que provoque el efecto tóxico.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos mostraron que el oxicluro de cobre es tóxico para el ambiente acuático a corto plazo generando daños ecotoxicológicos graves en los cuerpos de agua que son punto final de este fungicida. Sin embargo, es necesario estudiar el efecto de otras sustancias metálicas o análogas del cobre, así como herbicidas e insecticidas que son aplicados a los cultivos y su respuesta individual y en mezcla, así como su interacción con este plaguicida.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alloway, B., & Ayres, D. (1997). Chemical principles of environmental pollution (Second ed.). New York: CRC Press.
2. Baker, S., Herrchen, M., Kund-Rinke, K., Klein, W., Kördel, W., Peijnenburg, W. & Rensing, C. (2003). Underlying issues including approaches and information needs risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56:6-19.
3. Bautista, F. Z. (1999). Introducción al estudio de la contaminación del suelo por metales pesados (Primera ed.). Mérida, Yucatán: UADY.
4. Castillo, G. (2004). Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. IDRC/IMTA. 202 p.
5. Cyrino de O.E., Matos L.R., Roma P. F.J. 2004. Estudio comparativo sobre la susceptibilidad de las especies de agua dulce a los pesticidas a base de cobre. *Chemosphere* 56 (2004) 369-374. 6 pp
6. D'Agostino, R., Pearson, E. S. (1973). Test for Departure from Normality. Empirical Results for the Distributions of  $b_2$  and  $\sqrt{b_1}$ . *Biometrika* 60, 613-622.
7. Gladstone, S. (2002). Informe de consultoría preparado para PROARCA/SIGMA. Contaminación por plaguicidas en las Cuencas Hidrográficas que desembocan en el Golfo de Fonseca y oportunidades para su prevención y mitigación. USAID.
8. Iannacone, J., Alvaríño, L., & Mamani, N. (2011). Estimación de la Toxicidad Combinada de Mezclas de Furadán 4F® y Monofos® sobre *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 6(1): 23–29.

9. IRET (Instituto Regional de Estudios de Sustancias Tóxicas). (2020). Manual de Plaguicidas de Centroamérica. Universidad Nacional Heredia, Costa Rica: Plaguicidas en Centroamérica. Recuperado de: <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/423-oxicloruro-de-cobre>
10. Jaramillo, F., Meléndez, M. E., & Aldana, M. L. (2009). Toxicología de los Plaguicidas. En Toxicología Ambiental. 270. Textos Universitarios. Universidad Autónoma de Aguascalientes – Universidad de Guadalajara, México.
11. Kungolos, A.; Emmanouil, C.; Tsiroidis, V.; Tsiropoulos, N. (2009). Evaluation of toxic and interactive toxic effects of three agrochemicals and copper using a battery of microbiotests. , 407(16), 4610–4615. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.04.038
12. Melgarejo, J. & Abella, F. (2011). Fungicidas. Mecanismo de acción de los fungicidas. Revista Ventana al Campo. 11: 193-202.
13. Ossana, N. (2011). Biomarcadores de contaminación acuática: estudios en los ríos Luján y Reconquista. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.
14. Panagoula, B., Panayiota, M. & Iliopoulou-Georgudaki, J. (2002). Acute Toxicity of Tbt and Irgarol in Artemia salina. International Journal of Toxicology, 21(3), 231-233.
15. Papadopoulus, A., Lazaridou, E., Mauridou, G., & Touraki, M. (2004). Glutathione S-transferase in the branchiopod Artemia salina. Marine Biology, 144(2).
16. Repetto, M. & Sanz, P. (1988). En Toxicología fundamental. Editorial Científico Médicas. 2da edición. 408.
17. Salizzato, M.; Bertato, V.; Pavoni, B.; Ghirardini, AV.; Ghetti, PF. (1998). Sensitivity limits and EC50 values of the Vibrio fischeri test for organic micropollutants in natural and spiked extracts from sediments: Environmental Toxicology and Chemistry [Env. Toxicol. Chem.], vol. 17, no. 4, pp. 655-661.
18. Scelzo, M. (1997). Copper toxicity in nauplii larvae of the commercial shrimp Artemisia longinaria (Crustacea, Decapada, Penaidae). Invest. Mar. Valparaiso, 25: 177-185.
19. Solís, G., Cortés, A. A., Téllez, Z. I. & Bartolomé, M. C. (2019). Toxicidad aguda del herbicida N-(fosfonometil) glicina sobre representantes planctónicos Artemia franciscana y Microcysits aeruginosa. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 22: 1-8.
20. Solís, L. M., & López, J. A. (2003). Principios básicos de contaminación ambiental (Primera ed.). Toluca, México: UAEM.
21. US-EPA. (1996). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. US Environmental Protection Agency4th Ed. EPA/600/4-90/027F
22. WHO. (1994). Glyphosate. Environmental Health Criteria, No. 159. Geneva: World Health Organization, USA.

## SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES INTEGRADOS CON ZIRCONIA PARA USO EN ADSORCIÓN DE FLUORURO

Israel Águila Martínez<sup>1</sup>, Pablo Eduardo Cardoso Ávila<sup>2</sup>, Jesús Castañeda Hernández<sup>1</sup>, Rita Patakfalvi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitario de los Lagos, Universidad de Guadalajara, Av. Enrique Díaz de León 1144, Col. Paseos de la Montaña, 47460, Lagos de Moreno, Jalisco, México

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones en Óptica, Loma del Bosque 115, Colonia Lomas del Campestre, 37150, León, Guanajuato, México  
rpatakfalvi@culagos.udg.mx

### RESUMEN

Uno de los contaminantes del agua más difundidos en el mundo es el fluoruro, el cual presenta efectos adversos sobre la salud de las personas. La zona centro - occidente mexicana, a la que pertenece la zona de Los Altos de Jalisco, es parte del Eje Volcánico Transversal, que es caracterizado por la termalidad de su agua subterránea y una alta concentración de fluoruro, debido a la solubilización de los minerales que contienen en su composición al ión en cuestión. El consumo de agua con altos niveles de fluoruro mayores a los niveles permitidos por la Organización Mundial de la Salud y otras organizaciones tanto nacionales como internacionales, que se encuentra en 1.5 ppm, puede traer consecuencias perjudiciales para la salud del ser humano. Los métodos de eliminación del ion fluoruro son variados, entre los que se encuentran el intercambio iónico, la separación por medio de membranas, métodos electroquímicos, ósmosis inversa y los procesos de adsorción. Los procesos de adsorción han ganado un auge por la fácil preparación de los materiales implicados en el proceso, el alto porcentaje de remoción y el bajo costo de operación. Se han utilizado diversos tipos de materiales como adsorbentes en la remoción del fluoruro como los compósitos, las nanopartículas metálicas, los óxidos metálicos y algunos polímeros; sin embargo, los materiales que contienen zirconio en su estructura han mostrado características de remoción importantes con respecto a los que no lo contienen. En este trabajo se presenta la síntesis de nanopartículas de óxidos metálicos binarios a partir de zirconio y hierro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{ZrO}_2$ ), por medio del método de coprecipitación, modificando las velocidades de la agregación de la base a 1 y 5 mL/min, con propiedades excelentes para ser utilizados en la remoción del ion fluoruro del agua. Las nanopartículas de óxidos se sintetizaron mediante el método de coprecipitación básica. La caracterización de los compuestos se llevó a cabo mediante espectroscopía infrarroja (FTIR) para determinar los grupos funcionales presentes en los materiales y mediante difracción de rayos X. Los resultados confirmaron la presencia de magnetita y óxido de zirconio. Se utilizaron las técnicas de SEM (Microscopía electrónica de barrido) y EDXA (Espectroscopía Infrarrojo de Energía Dispersiva) para identificar las características morfológicas y la composición porcentual atómica de las muestras. Para medir la capacidad de adsorción de los materiales sintetizados, se utilizaron 50 mg del compuesto y 50 ml de disolución con concentración de 10 mg/L de ion fluoruro. Se pusieron en agitación la mezcla y después de cierto tiempo se separaron magnéticamente el adsorbente y se midió el fluoruro adsorbido en el sobrenadante por medio de un electrodo de ión selectivo. El porcentaje de remoción del ión fluoruro de los compuestos sintetizados varió respecto a la velocidad de goteo en la síntesis, obteniéndose un 33% de remoción para el compuesto sintetizado a 1 mL/min y un 12% para el compuesto sintetizado a una velocidad de 5 mL/min. Lo anterior, aunado a los resultados obtenidos por SEM, sugiere que las nanopartículas sintetizadas con una velocidad de goteo de la base más lenta presentan una distribución más uniforme y una relación masa-volumen mayor, lo que les confiere una capacidad de adsorción mayor.

### INTRODUCCIÓN

Uno de los contaminantes más difundidos en el mundo es el fluoruro, el cual además presenta efectos adversos sobre la salud de las personas. En particular, la zona centro - occidente mexicana, a la que pertenece la zona de Los Altos de Jalisco, es parte del Eje Volcánico Transversal, que es caracterizado por la termalidad de su agua subterránea y una alta concentración de fluoruro, debido a la solubilización más alta de los minerales que contienen en su composición al ion en cuestión (Hurtado-Jiménez and Gardea-Torresdey 2005). El consumo de agua con altos niveles de fluoruro

mayores a los niveles permitidos por la OMS (Organización Mundial de la Salud) y otras organizaciones tanto nacionales como internacionales, que se encuentra en 1.5 ppm, puede traer consecuencias perjudiciales para la salud del ser humano, variando sus efectos nocivos según la concentración del contaminante presente.

Los métodos de eliminación del contaminante son variados, entre los que se encuentran el intercambio iónico, la separación por medio de membranas, métodos electroquímicos, ósmosis inversa y los procesos de adsorción (Meenakshi and Maheshwari 2006). Cada método cuenta con sus ventajas y desventajas; sin embargo, al día de hoy los procesos de adsorción han ganado un auge por la fácil preparación de los materiales implicados en el proceso, el alto porcentaje de remoción y el bajo costo de operación (Bhatnagar and Minocha 2006). Se han utilizado diversos tipos de materiales como adsorbentes en la remoción del fluoruro como los compósitos, las nanopartículas metálicas, los óxidos metálicos y algunos polímeros; sin embargo, los materiales que contienen zirconio en su estructura han mostrado características de remoción importantes (Blackwell and Carr 1991), con respecto a los que no lo contienen.

Con base a lo anterior es de vital importancia el estudio de nuevos materiales adsorbentes, que contengan en su estructura química al zirconio, con el fin de que permitan una remoción eficaz del contaminante. Debido a la versatilidad y amplio rango de propiedades físicas y químicas, los materiales nanoestructurados han demostrado ser prometedores prospectos en diversas aplicaciones, incluida la adsorción de contaminantes en el agua. El zirconio, así como el óxido de zirconio, es conocido por tener una alta afinidad hacia aniones, por lo que su uso en la remoción de diversos contaminantes con cargas negativas en su superficie es de relevancia hoy en día, siendo un indiscutible en la remoción del ion fluoruro (Riahi, Bagherzadeh, and Hadizadeh 2015).

La adsorción parece ser el método más eficiente para eliminar el fluoruro. Debido a las grandes áreas superficiales, es probable que los adsorbentes nanométricos puedan ser una herramienta útil para mejorar la capacidad de adsorción en el tratamiento del agua potable. Sin embargo, las partículas ultrafinas no se pueden aplicar en los reactores habituales y la separación sólido / líquido en reactores de tanque completamente agitados es difícil o imposible. Los adsorbentes magnéticos superan las deficiencias de los nanomateriales no magnéticos y son muy prometedores para su aplicación en el campo de la preconcentración y eliminación de contaminantes debido a su relativamente sencilla separación del medio. En el presente trabajo se presenta un material adsorbente de fluoruro a base de un óxido bimetálico de Zr-Fe con propiedades magnéticas para adsorción de fluoruro en agua con una metodología de recuperación sencilla a partir de un campo magnético externo.

## PARTE EXPERIMENTAL

Síntesis de  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2$  por el método de coprecipitación básica

La síntesis de las nanopartículas se llevó a cabo por el método de coprecipitación en medio básico. Se preparó una disolución de sales de  $\text{Zr}^{4+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ ; a partir de  $\text{ZrOCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_2$  y  $\text{FeCl}_3$  (Sigma Aldrich), disueltas en agua desionizada a dos distintas velocidades de goteo de la base empleada, esto es, a 1 y 5 mL/min. Se agregó por goteo una disolución básica de NaOH 6M hasta la precipitación de las sales. Se lavaron las muestras varias veces con agua desionizada y se separaron por aplicación de un campo magnético externo. Se colocaron en diálisis en una disolución de pH 3 para estabilizarlas. Posteriormente se secaron en un horno en calor seco a 90°C por 18 h y se resguardaron para las pruebas siguientes.

Estudios de adsorción

Para medir la capacidad de adsorción de los materiales sintetizados, se utilizaron 50 mg de los adsorbentes y 50 mL de las soluciones estandarizadas con una concentración de 10 mg/L de ion fluoruro, preparada a partir de agua desionizada y fluoruro de sodio (Sigma Aldrich), a un pH de 7 y 3, el cuál se estandarizó por medio de HCl 0.1N y NaOH 0.1 N. Se pusieron en agitación, después de cierto tiempo se separaron del medio por medio de un campo magnético externo, posteriormente

se midió el fluoruro adsorbido utilizando un potenciómetro de la marca HANNA INSTRUMENTS modelo HI 98402 con un rango de medición desde 0.05 mg/L hasta 1.9 g/L.

## RESULTADOS

Las nanopartículas obtenidas fueron caracterizadas por espectroscopía infrarroja, obteniéndose los picos característicos para cada compuesto los cuales se muestran en la Figura 1. Para el compuesto binario  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2$ , para el óxido de zirconio encontramos sus picos característicos en 1600 y 1340  $\text{cm}^{-1}$  (Riahi, Bagherzadeh, and Hadizadeh 2015), pertenecientes al estiramiento del óxido de zirconio y el óxido hidratado de zirconio, y para el hidróxido de hierro el pico en 880  $\text{cm}^{-1}$ , correspondiente al estiramiento del enlace Fe-OH (Zhang et al. 2017). La señal que se muestra en 3300  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a la vibración de tensión del grupo hidroxilo (-OH) (Dou et al. 2012). En general es posible observar que existe una mayor intensidad en las señales características del compuesto para el material sintetizado a una menor velocidad de goteo.

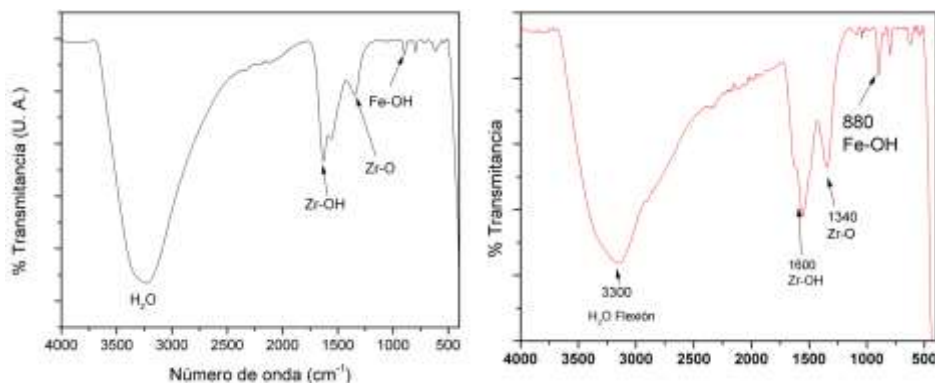


Figura 1. Espectro infrarrojo del compuesto  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2$  (Izquierda goteo 5mL/min, derecha goteo 1mL/min)

Como se muestra en el patrón de difracción de rayos X de la Figura 2, para la relación Fe:Zr 1:1, los picos de difracción en los valores de  $2\theta = 30.4^\circ$ ,  $35.2^\circ$ ,  $50.6^\circ$  y  $60.3^\circ$  fueron indexados los (111), (220) y (311) planos de óxido de zirconio, para las fases cristalinas monoclinica (m) y tetragonal (t), respectivamente. También, los picos de difracción en los valores de  $2\theta = 30.0^\circ$ ,  $35.5^\circ$ ,  $57.2^\circ$ ,  $62.7^\circ$  y  $89.9^\circ$  fueron indexados a los planos (220), (311), (511), (440) y (731) de magnetita (F), en la que no se observaron picos de impurezas y se detectó la estructura de espinela de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Riahi, Bagherzadeh, and Hadizadeh 2015). En general es posible observar que existe una mayor intensidad en las señales características del compuesto para el material sintetizado a una menor velocidad de goteo.

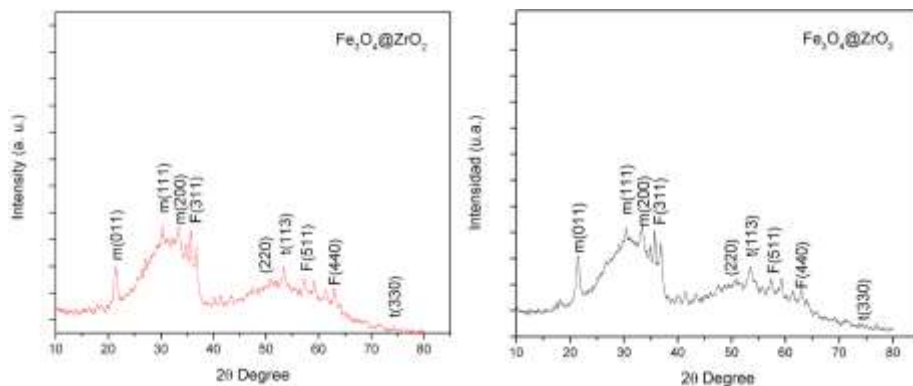


Figura 2. Difractograma de rayos X del compuesto  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2$  (Izquierda goteo 5mL/min, derecha goteo 1mL/min)

Como se puede ver en la imagen de microscopia electrónica de barrido (Figura 3), la morfología de las partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2$  a granel es irregular pero su distribución es uniforme. Así mismo es posible observar que la muestra sintetizada con una velocidad de goteo más lenta presenta más homogeneidad en el material.

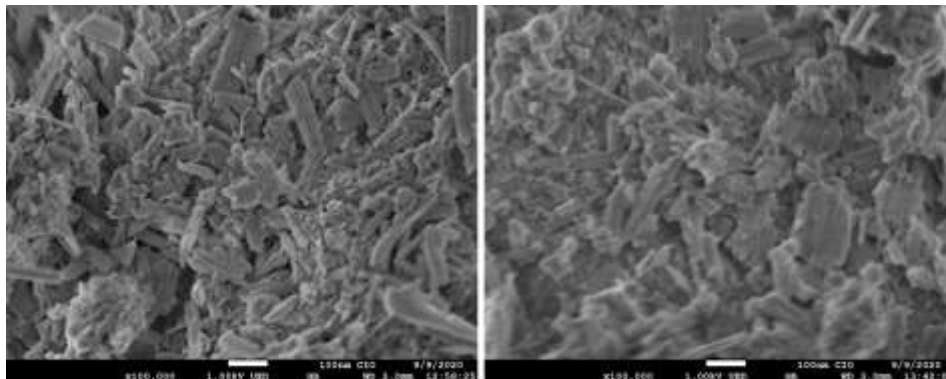


Figura 3. Micrografía de microscopia electrónica de barrido del compuesto  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2$  (1:1)

En la Tabla 1 se muestran los resultados para las pruebas de adsorción con los distintos materiales sintetizados, a 1 y 5 mL/min de goteo de la base, a dos pH, neutro y ácido respectivamente.

Tabla 1. Porcentaje de remoción del ion fluoruro de las diferentes muestras a pH 7 y 3.

Prueba	Velocidad de goteo	Porcentaje de remoción pH 7	Porcentaje de remoción pH 3
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2$ p1	1 mL/min	31.2%	99.5%
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2$ p2	5 mL/min	30%	99.5%

## CONCLUSIONES

La caracterización de las muestras mostró un material con mayor proporción amorfa, sin embargo, pueden observarse los picos característicos de las fases cristalinas de la estructura espinela de la magnetita y de las fases monoclinica y tetragonal del óxido de Zirconio, mostrándose mayor intensidad de señales, tanto en los difractogramas como en los espectros infrarrojos, en el material sintetizado a una velocidad de goteo más lenta (1mL/min). Las nanopartículas tuvieron un mejor porcentaje de remoción cuando fueron sintetizadas utilizando una velocidad de goteo de 1 mL/min; sin embargo, comparándose con los resultados de las demás velocidades de goteo de la base añadida, la remoción no varió significativamente. Lo anterior, nos llevó a elegir la proporción la velocidad de goteo 1 mL/min, debido a la formación de un material más homogéneo y con señales características del compuesto más intensas. El material es efectivo al ser removida por medio de un campo magnético externo. De la Tabla 1 puede observarse que el mayor porcentaje de remoción a pH 3 y 7 se obtiene con la velocidad de goteo de 1 mL/min, sin embargo, sus diferencias no son significativas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bhatnagar, Amit, and A. K. Minocha. 2006. "Conventional and Non-Conventional Adsorbents for Removal of Pollutants from Water - A Review." *Indian Journal of Chemical Technology* 13 (3): 203–17.

2. Blackwell, J. A., and P. W. Carr. 1991. "Study of the Fluoride Adsorption Characteristics of Porous Microparticulate Zirconium Oxide." *Journal of Chromatography A* 549 (C): 43–57. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)91417-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)91417-1).
3. Dou, Xiaomin, Dinesh Mohan, Charles U. Pittman, and Shuo Yang. 2012. "Remediating Fluoride from Water Using Hydrous Zirconium Oxide." *Chemical Engineering Journal* 198–199: 236–45. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.05.084>.
4. Hurtado-Jiménez, Roberto, and Jorge Gardea-Torresdey. 2005. "Estimación de La Exposición a Fluoruros En Los Altos de Jalisco, México." *Salud Publica de Mexico* 47 (1): 58–63. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342005000100009>.
5. Meenakshi, and R. C. Maheshwari. 2006. "Fluoride in Drinking Water and Its Removal." *Journal of Hazardous Materials* 137 (1): 456–63. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.02.024>.
6. Riahi, F., M. Bagherzadeh, and Z. Hadizadeh. 2015. "Modification of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Superparamagnetic Nanoparticles with Zirconium Oxide; Preparation, Characterization and Its Application toward Fluoride Removal." *RSC Advances* 5 (88): 72058–68. <https://doi.org/10.1039/c5ra14833b>.
7. Zhang, Chang, Yongqiu Li, Fenghua Wang, Zhigang Yu, Jingjing Wei, Zhongzhu Yang, Chi Ma, Zihao Li, Zi Yi Xu, and Guangming Zeng. 2017. "Performance of Magnetic Zirconium-Iron Oxide Nanoparticle in the Removal of Phosphate from Aqueous Solution." *Applied Surface Science* 396: 1783–92. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.11.214>.

## TIPIFICACIÓN DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS UTILIZANDO DOS MÉTODOS: SPA-TIPO Y PFGE.

Orpha Ithamar Salazar López<sup>1</sup>, Jaime Bustos-Martínez<sup>1</sup>, Samuel González García<sup>2</sup>, María Teresa Nuñez Cardoso<sup>3</sup> y Aída Hamdan Partida<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Depto. Atención a la Salud, UAM-Xochimilco, <sup>2</sup> Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, <sup>3</sup> Depto. El Hombre y su Ambiente, UAM-Xochimilco.  
[jbustos@correo.xoc.uam.mx](mailto:jbustos@correo.xoc.uam.mx)

### RESUMEN

La relación que existe entre el ser humano y los microorganismos dan lugar a una interacción beneficiosa o perjudicial, de acuerdo a su naturaleza. Estos se pueden clasificar en comensales, aquellos que colonizan las superficies corporales sin causar daño o en parásitos, los que dañan al hospedero mediante una invasión directa o la producción de sustancias tóxicas.

Existe una gran lista de bacterias potencialmente patógenas, que infectan con más frecuencia al tracto respiratorio superior, entre las que se encuentra *Staphylococcus aureus*, se destaca como un importante patógeno humano, produciendo infecciones tanto en la comunidad como a nivel hospitalario. Las infecciones causadas por *S. aureus* son a menudo agudas, piogénicas y superficiales, aunque también pueden producir con menor frecuencia infecciones profundas como osteomielitis, neumonía y endocarditis aguda.

El objetivo de este proyecto fue evaluar dos métodos de tipificación de *Staphylococcus aureus*: tipificación por el gen *spa* (spa-tipo) y la electroforesis de campos pulsados (PFGE).

Se purificó el DNA de 10 cepas de *S. aureus*. Para la amplificación del gen *spa* se realizó una reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) de las cepas analizadas, siguiendo las indicaciones del sitio *spa*-Ridom, los amplicones se mandaron secuenciar y las secuencias se analizaron en el sitio web de *spa*-Ridom, para obtener el *spa*-tipo. Por otro lado, la caracterización de la clonalidad genotípica de 10 cepas de *S. aureus* se realizó por medio de la electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE). Los geles obtenidos se analizaron con los programas Gene-Directory y Gene-Tools.

Mediante la tipificación del gen *spa*, se logró identificar 6 *spa*-tipos en las diez cepas: t1406, t701, t1710 t021, t723, t922. Los *spa*-tipos t-701, t-1406 y t1710 lo presentaron dos cepas cada uno.

Mientras que por PFGE, de las 10 cepas de *S. aureus* analizadas el dendrograma generado con los pulsotipos nos muestra 3 clados, en el clado 1 se tiene una cepa; en el clado 2 se encontraron 2 cepas y en el clado 3 hay 7 cepas.

Podemos concluir que la tipificación de las cepas de *S. aureus* puede llevarse a cabo por los dos métodos, sin embargo el método de tipificación por el gen *spa* tiene más ventajas ya que la metodología es más sencilla y no se requiere de un equipo tan especial como el equipo de campos pulsados.

### INTRODUCCIÓN

*Staphylococcus aureus* es uno de los patógenos con mayor importancia médica, esto se debe a que posee características muy específicas tales como la resistencia a los antibióticos la gravedad de su virulencia y la capacidad no sólo de colonizar a seres humanos sino también en animales, tomando en cuenta esto, *S. aureus* se ha convertido en un gran problema para el sector de salud pública no sólo en México sino también a nivel Mundial.

*Staphylococcus aureus* se destaca como un importante patógeno humano, produce infecciones tanto en la comunidad como a nivel hospitalario (Sheagren, et al., 1998).

De aquí surge la importancia de conocer más acerca de este patógeno, ya que, además de los animales, los mecanismos de invasión abarcan también fomites y el contacto de persona a persona. De esta manera, al ser una especie bacteriana relativamente común, es natural que surjan investigaciones para mantenerse al tanto de la evolución de este patógeno. Una de las interrogantes, que antes consternaba mucho a los científicos, era cómo podía ser tan fácil la diseminación de esta bacteria. La respuesta está en la gravedad de su virulencia.



*Staphylococcus aureus*, se considera como la responsable de una amplia gama de enfermedades, que van desde una “simple” infección de piel hasta infecciones que pueden causar la muerte. Otro impacto en la salud, es su resistencia a los antibióticos, sobre todo a la metilina, de ahí se tienen las cepas MRSA (*Staphylococcus aureus* Metilina Resistente).

Por eso, es importante hacer estudios para poder tipificar este microorganismo y mantener un control epidemiológico de esta bacteria y proponer medidas de control.

## TEORÍA

El género *Staphylococcus* está conformado por cocos Gram-positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$ . En 1880 el cirujano escocés Sir Alexander Ogston introdujo por primera vez el nombre de *Staphylococcus*, derivado del vocablo griego “*staphyle*” que significa racimo de uvas (Kloss, *et al.*, 1992)

Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, además de ser anaerobias facultativas y son capaces de crecer en un medio elevado de concentración de sal (NaCl al 10%) y a temperaturas de 18-40 °C (Kuroda, *et al.*, 2001). Éste género se caracteriza principalmente por su parecido a un racimo de uvas (Harris, *et al.*, 2002).



Figura 1. Morfología colonial de *Staphylococcus aureus* en agar Sal Manitol, tomado en el laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la UAM-X, 2019.

En los medios de cultivo tradicionales como lo es Agar Sal manitol, la mayoría de las cepas crecen después de incubarse durante 24 horas, formando colonias de 0.5-15  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las colonias de *S. aureus* se observan lisas, elevadas, brillantes y de bordes enteros, además de presentar una consistencia cremosa con una coloración que va del amarillo a dorado (Figura1)

Para la identificación de *S. aureus* se realiza empleando pruebas bioquímicas como; la prueba de catalasa, fermentación de glucosa que nos permite en diferenciarlo con el género *Micrococcus*, la prueba de coagulasa y la tinción de Gram. *S. aureus* también se puede identificar a través de diferente técnicas moleculares como la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) y PCR (Vivoni, *et al.*, 2005)

El diagnóstico molecular es de suma importancia para poder detectar el agente etiológico, además para determinar la resistencia a los antimicrobianos.

La técnica de electroforesis en campos pulsados (PFGE) es utilizado para establecer la relación entre clonas de aislados de *S. aureus*, es el «estándar de oro», método de referencia para la tipificación molecular de *S. aureus* resistentes a la metilina en epidemias intrahospitalarias, así como transmisiones hospital-hospital (Thurlow, *et al.*, 2012).

La técnica de PFGE actualmente se considera el estándar de referencia para tipificar aislamientos de MRSA y se ha demostrado ser uno de los métodos para estudiar brotes epidémicos. La tipificación por PFGE de cepas MRSA se fundamenta en la digestión de DNA cromosomal purificado con la enzima de restricción *SmaI*, para un posterior corrimiento y visualización en geles de agarosa (Zendejas Manzo., *et al.* 2014).

También existe el método de tipificación con el gen de la proteína A (*spa* typing). Esta técnica tiene un gran poder discriminativo; se ha mostrado que la tipificación por *spa*, en contraste con las técnicas de PFGE y MLST, puede usarse para estudiar, tanto la evolución molecular como los brotes epidémicos en los hospitales; se requiere el análisis de las secuencias obtenidas de los aislamientos estudiados (Schouls, *et al.*, 2009).

El gen *spa* tiene un tamaño aproximado de 2 Kb; este gen posee unas regiones repetitivas llamadas secuencias repetidas cortas (SSR), que consisten de un número variable de nucleótidos repetidos

de 21-27 pb, por lo que al realizar una tipificación del gen *spa*, se analiza el número y secuencia de las repeticiones (Young, *et al.*, 2010).

### PARTE EXPERIMENTAL

Se utilizaron 20 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de la nariz o faringe de alumnos de la universidad, a los cuáles se les solicitó su consentimiento informado.

La extracción del DNA de las cepas de *Staphylococcus aureus*, se realizó con el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) de acuerdo con el protocolo establecido por el fabricante.

Se inició a partir de cepas aisladas de *S. aureus* crecidas en caldo soya tripticaseína, se tomó 1 mL de cada cultivo de las muestras centrifugándose durante 2 minutos a 13 000 rpm, se decantó el sobrenadante y a los pellets celulares se les agregó 480 µL de EDTA 50mM, adicionando 5 µL de lisostafina (SIGMA L7386-5MG: 1mg/ml en 20 mM de acetato de sodio pH 4.5) y 60 µL de lisozima (10 mg/mL) incubándose durante una hora a 37°C.

Posteriormente, se centrifugó durante 2 minutos a 13,000 rpm y se decantó el sobrenadante; agregándose 600 µL de la solución lisis nuclear mezclando a través del método de pipeteo, incubándose a baño maría por 5 minutos a 80°C. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente, añadiendo 3 µL de la solución RNasa, incubándolo por 37°C por 30 minutos.

Por último, se agregó 200 µL de la solución precipitación de proteínas mezclándolo con ayuda de un vortex durante 1 minuto, posteriormente se incubó por 5 minutos en hielo. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 3 minutos, después el sobrenadante se transfirió en un tubo Eppendorf limpio que contenía 600 µL de Isopropanol.

Se centrifugó a 13 000 rpm durante 2 minutos y se decantó el sobrenadante, posteriormente se le adicionó 600 µL de etanol al 70%. Después se volvió a centrifugar durante 2 minutos a 13 000 rpm vaciando el sobrenadante.

Se dejó secar durante un lapso de 15 minutos eliminando cualquier resto de etanol, tomando en cuenta esto, se tomó 100 µL de la solución de rehidratación de ADN para poder disolver los pellets, posteriormente las muestras se incubaron a 4°C.

Para la purificación de DNA a partir de geles de agarosa se utilizó un kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Se determinó el peso del fragmento cortado, posteriormente se agregó 10 µL de Membrane Binding Solution por cada 10 mg de gel de agarosa mezclándolo con ayuda del vortex durante 1 minuto. Para luego colocarlo en baño María durante 10 minutos a 50°C-65°C hasta que se disuelva el gel utilizando de nuevo el vortex durante 5 minutos.

El sobrenadante se vació en una microcolumna SV ensamblada a un tubo colector incubándolo durante 1 minuto a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 1 minuto y se decantó el sobrenadante que se encontraba dentro del tubo colector.

Posteriormente se le adicionaron 700 µL de membrana Wash Solution para volver a centrifugar a 13,000 rpm por 1 minuto retirando el contenido dentro del tubo colector. Se realizó otro lavado con 500 µL de membrana Wash Solution centrifugando a 13 000 rpm durante 5 minutos.

Por último, la microcolumna se retiró cuidadosamente del tubo colector transfiriéndolo a un tubo Eppendorf limpio, se le agregó 50 µL de agua libre de nucleasas incubándolo durante 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 13 000 rpm por 1 minuto.

Las microcolumnas se desecharon y los tubos Eppendorf que contenían las muestras de DNA diluido se conservaron a 4°C, posteriormente se mandaron a secuenciar.

Para la detección del gen *spa*, se realizó una reacción en cadena de polimerasa (PCR) del DNA de las cepas identificadas como *S. aureus*. En la Tabla 1 se muestra los primers o iniciadores que se utilizaron para llevar a cabo dicha reacción de acuerdo al manual de Random bioinformatics.

Tabla 1. Secuencia de iniciadores para la amplificación del gen *spa*.

No.	Iniciadores.	Secuencias.	Tamaño del amplificado.
1	<i>spa</i> -1113F	5'-TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC-3'	
2	<i>spa</i> -1514R	5'-CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT-3'	300 a 600 pb

Se utilizaron como control positivo la cepa de *S. aureus* ATTC 43300 y agua como control de reacción.

Los amplicones obtenidos se mandaron secuenciar a MacroGen Corea.

Para la interpretación de las secuencias de *spa*, se utilizó el la página web de SPA Typing (<http://seqtools.com/>) para alinear las secuencias y determinar qué tipo de *spa* se trata. También se utilizó la página web de Ridom Spa Server (<http://spa.ridom.de/>) que es una base de datos que se utilizó para recopilar y armonizar los datos de varias regiones geográficas, así como para identificar las secuencias de *spa* de repetición así como el tipo.

La secuencia debe de cumplir con las siguientes características: Contar con un extremo 5', tener las series repetidas y tener una secuencia 3'.

Al tener estas tres características, el programa da la tipificación del gen *spa* del cual se nombra con letra *t* seguida del número que corresponde.

La caracterización de la clonalidad genotípica de las cepas de *Staphylococcus aureus*, se realizó por medio de la electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE), utilizando la cepa NCTC 8325 como control. Se utilizó la metodología descrita por (McDougal, et al. 2003). Se inoculó una sola colonia de *S. aureus* aislada en agar sal manitol en 3 ml de caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) y se incubaron a 37°C durante 24 h. Posteriormente, se ajustaron las suspensiones a 4.0 Mc Farland, de ahí se tomaron 1000 µL de células y se colocaron en tubos Eppendorf centrifugándose a 13 000 rpm durante 4 minutos. Luego se retiró el sobrenadante y se lavó el pellet obtenido con 200 µL de buffer TE1X (TE 10X: 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) centrifugándolo durante 2 minutos quitando todo el buffer, se re suspendió el pellet con 150 µL de buffer TE1X y se colocaron los tubos a 37°C por 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 5 µL de lisostafina (SIGMA L7386-5MG: 1mg/ml en acetato de sodio 20 mM pH 4.5), dejándolo reaccionar durante 20 minutos.

Para el gel de agarosa, se pesó 0.09 g de agarosa SeaKem Gold Agarose (Lonza Cat. 50152) diluido en 5 ml del buffer TE1X para una concentración final al 1.8%, manteniéndola a una temperatura de 60 a 70°C, guardándolo en un tubo Falcon estéril 50 µL. Después se tomaron 150 µL de esta agarosa y se mezcló por pipeteo con las células para ser colocadas en moldes (previamente esterilizados con luz UV durante 10 minutos) y estos se refrigeraron por 10 minutos. Transcurrido el tiempo, los cubos de agarosa (plugs) se retiraron de los moldes y se colocaron en tubos estériles con rosca, la cual contenían 3 ml de buffer de lisis EC (6 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 1 M NaCl, 0.5% Brij-58, 0.2% Deoxicolato de sodio, 0.5% Laurilsarcosil de sodio pH 8.0) y se incubaron a 37°C por 4 horas (también se pueden dejar toda la noche a temperatura ambiente). Luego se decantó el buffer de lisis EC y se lavaron los plugs cuatro veces con 4 ml de buffer TE1X con agitación de 15 minutos en un equipo Ultra Rocker Rocking Platform (BioRad). Después se cortó uno de los plugs de cada muestra y se colocaron en tubos Eppendorf estériles de 2 ml y se realizó un último lavado con 300 µL de buffer J1X (Buffer J10X: 100 mM Tris-HCl, 70 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl, 10 mM DTT (1-4 Ditiotreitól) pH 7.5). La otra parte de los plugs se dejaron en los tubos estériles con 2 ml de buffer TE 1X manteniéndolos en refrigeración.

Al plug del tubo Eppendorf se le realizó la digestión enzimática adicionando 200 µL de la mezcla: enzima de restricción *Sma* I 25 U/tubo (1.25 µl New England, N01-R0141L), agua estéril y buffer J 10X, dejándolos a temperatura ambiente durante 4 horas en constante movimiento.

Mientras tanto se preparó 100 ml de agarosa para PFGE (Pulsed Field Certified Agarose, Ultra Pure DNA Grade Agarose, BioRad Cat. 162-0138) al 0.8% en 100 ml de TBE 0.5X (TBE 5X 450 mM Tris base, 450 mM ácido bórico, 10 mM EDTA pH 8.0).

Una vez solidificado el gel, se le incorporó los plugs en los pozos y se aplicó una capa de agarosa al 1% como sellador. Se utilizó un marcador de peso molecular Lambda Ladder PFG Marker de New England (N01-N0340S).

La electroforesis se realizó en un equipo de electroforesis con campos pulsantes CHEF-RD® II de BioRad. El buffer de la corrida fue de TBE 0.5X preparado con 2 litros de agua destilada estéril. Se utilizaron las siguientes condiciones de corrida: 6 volts, cambio de orientación inicial 5 s, final 45 s, durante 21 h. Transcurrido este tiempo se tiñó el gel con una solución de bromuro de etidio (0.5 mg/ml concentración final), durante 20 minutos y se observó en un transiluminador Gel Doc XR de BioRad, usando el software Quantity One con la que se capturó la imagen.

El análisis de los patrones de PFGE se utilizó un patrón de la cepa de *S. aureus* NCTC 8325, para la normalización de los patrones de las cepas estudiadas. Los patrones de la PFGE se analizaron con el software Gene Tools versión 3.07 y el software Gene Directory versión 1.02 de Syngene, utilizando el coeficiente de similitud de Dice y para el dendrograma el método de medias aritméticas por pares no ponderados (Unweighted Pair Group Method of Averages; UPGMA) con un límite de tolerancia del 1.25%.

Para el análisis de los perfiles obtenidos, se realizó 3 cortes (cutoff) con respecto al porcentaje de similitud de los patrones de bandas de PFGE: si el porcentaje era <65% se consideraban cepas diferentes, del 65% al 80% son cepas posiblemente relacionadas; del 80% al 95% son consideradas cepas genéticamente relacionadas y del 95% al 100% las cepas se consideran idénticas (Tenover, 1995).

## RESULTADOS

Para la tipificación del gen *spa*, se utilizaron 10 muestras de *S. aureus* que algunas dieron varios amplicones (Tabla 2).

Tabla 2. Cepas de MRSA utilizadas para la tipificación del gen *spa*.

No.	Cepas	Amplificación.
1	637F	1 banda.
2	637N	1 banda.
3	677N	1 banda.
4	677F	1 banda.
5	680N	3 bandas.
6	680F	1 banda
7	689N	3 bandas
8	689F	4 bandas
9	978N	4 bandas
10	978F	1 banda

Los resultados obtenidos para la identificación del gen *spa* se muestran en las figuras 2, 3 y 4, donde se observan los amplicones obtenidos en todas las cepas, la mayoría con un PM de alrededor de 500pb.

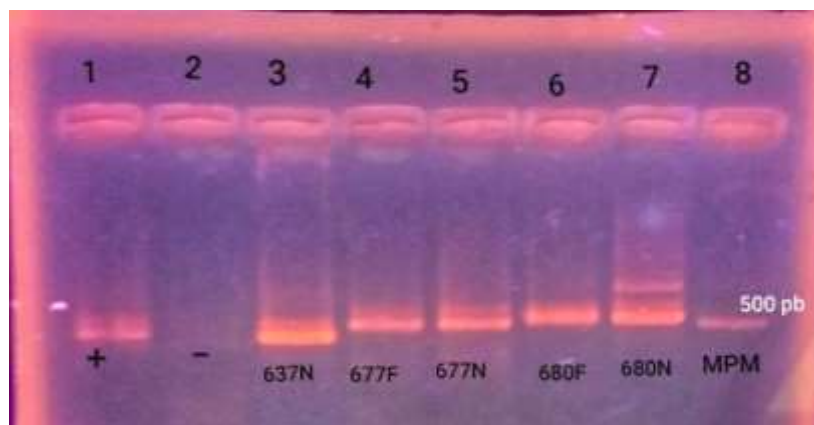


Figura 2. Amplificación del gen *spa*. Electroforesis en gel agarosa al 1.5%. Carril 1: Control positivo, carril 2: Control de reacción, carril 3: *S. aureus* 637N, carril 4: 677F, carril 5: *S. aureus* 677F, carril 6: *S. aureus* 680F, carril 7: *S. aureus* 680N y en el carril 8: Marcador de peso molecular (Promega).

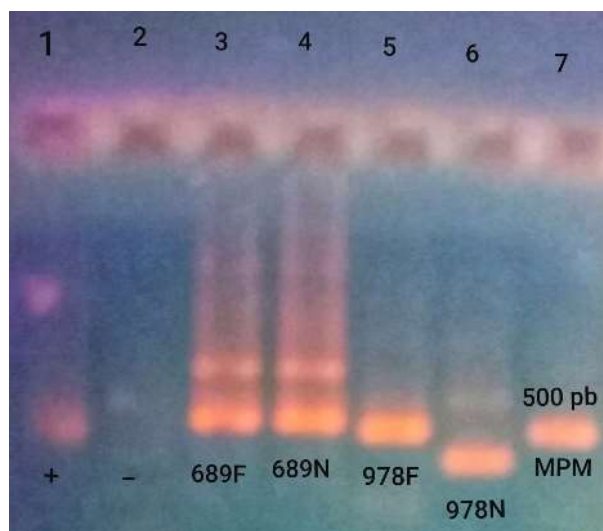


Figura 3. Amplificación del gen *spa*. Electroforesis en gel agarosa al 1.5%. Carril 1: Control positivo, carril 2: Control de reacción, carril 3: *S. aureus* 689F, carril 4: 689N, carril 5: *S. aureus* 978F, carril 6: *S. aureus* 978N, carril 7: Marcador de peso molecular (Promega).

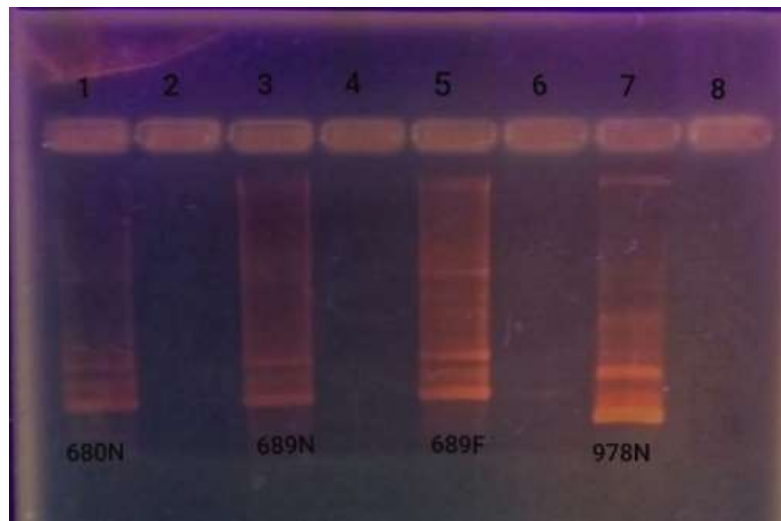


Figura 4. Amplificación del gen *spa*. Electroforesis en gel agarosa al 1.5%. Carril 1: *S. aureus* 680N, carril 2: vacío, carril 3: *S. aureus* 689N, carril 4: vacío, carril 5: *S. aureus* 689F, carril 6: vacío, carril 7: *S. aureus* 978N, carril 8: vacío.

Los amplicones se mandaron secuenciar y se obtuvieron electroferogramas, un ejemplo es el electroferograma de la muestra de *S. aureus* 637F (Figura 5).

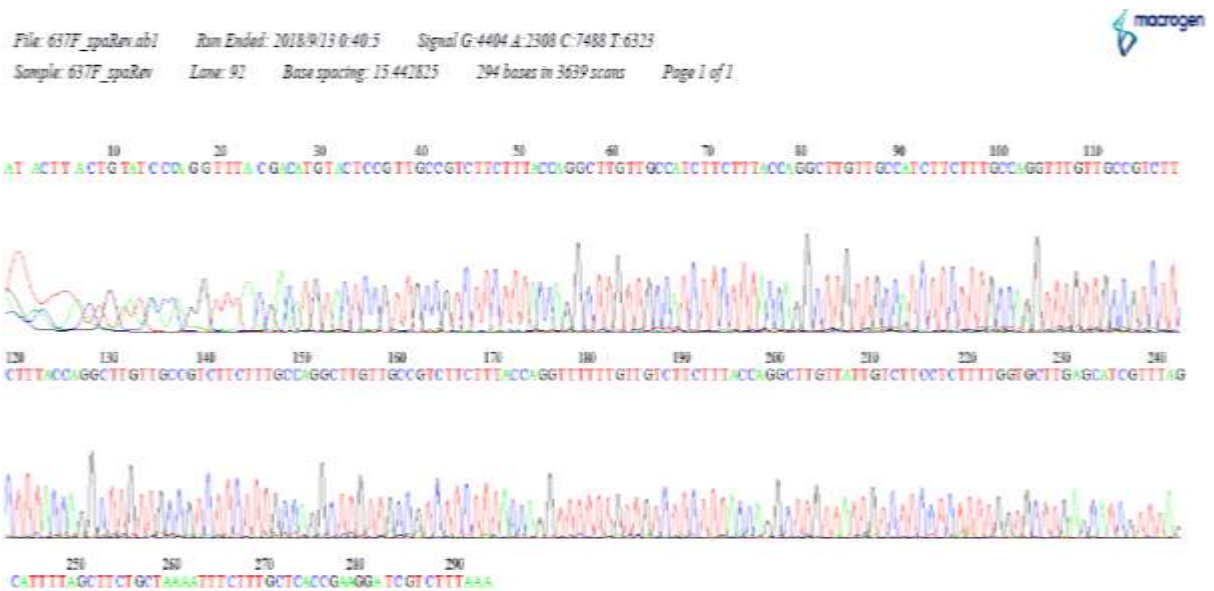


Figura 5. Electroferograma de la muestra *S. aureus* 637F.

Después de analizar las secuencias en la página de SeqTools se obtuvieron los *spa*-tipos correspondientes. Los cuáles se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Muestras de *S. aureus* a las que se determinó el tipo de *spa*

No.	Cepa de <i>S. aureus</i>	Patrón de repeticiones	Tipo de <i>spa</i>
1	637F	04-34-22-17-23-24-24	t1406
2	637N	04-34-22-17-23-24-24	t1406
3	677F	04-17-25-16-23-34-50-50-17	t1710
4	677N	04-17-25-16-23-34-50-50-17	t1710
5	680F	11-10-21-17-34-24-34-22-25-25	t701
6	680N	11-10-21-17-34-24-34-22-25-25	t701
7	689F	07-23-21-16-33-13	t922
8	689N	11-10-21-17-34-24-34-22-25-25	t701
9	978F	15-12-16-02-16-0225-17-24	t021
10	978N	11-19-12-34-22-25	t723

Tomando en cuenta los resultados obtenidos, se logró identificar seis *spa*-tipos en las diez cepas que se mandaron a secuenciar. En las cepas 637F y 637N comparten el mismo *spa*-tipo t1406; existe un total de 25 registros de este tipo de MRSA en los países de Alemania, Holanda e Italia desde el año 2006 al 2017.

Mientras que en las cepas 677F y 677N comparten el mismo tipo de *spa* t1710, existen 3 registros de MRSA en el país de Francia desde el año 2006 al 2008.

En el caso de las cepas 680F y 680N cuentan con el mismo *spa*-tipo t701, el cuál cuenta con un total de 1084 registros de MRSA en los países como Suecia, Islandia, Irlanda, India, Estados Unidos, Alemania, Austria, China, Italia, Sudáfrica, Rumania entre otros, desde el año 2003 hasta al 2019.

Las cepas 689F y 689N difirieron en el *spa*-tipo; en la cepa 689F se determinó que el tipo de *spa* es t922, teniendo un total de 461 registros de MRSA en los países de Alemania, Sudáfrica, Suecia, Irlanda, Noruega, Holanda, entre otros, desde el año 2005 hasta el 2019. Mientras que la cepa 689N comparte el mismo tipo de *spa* con las cepas 680F y 680N, el t701.

Las cepas 978F y 978N difirieron del *spa*-tipo; en la cepa 978F se determinó que el *spa*-tipo es t021, contiene un total de 4523 registros de MRSA en los países de Alemania, Sudáfrica, Suecia, Islandia, India entre otros, desde el año 2000 hasta el 2019.

Por último, la cepa 978N tiene el *spa*-tipo t723, abarcando un total de 128 registros de MRSA en países como Alemania, Estados Unidos, Islandia, Emiratos Árabes Unidos, España, Holanda, Israel, Inglaterra, Noruega y por último Bélgica en los años 2003 hasta el 2018.

Para el proceso de tipificación en electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE), se utilizaron 11 muestras como se indica en la tabla 4.

Tabla 4. Lista de muestras de *S. aureus* utilizadas para la tipificación clonal a través de la técnica PFGE.

No.	Muestras de <i>S. aureus</i> .	Amplificación
1	17Nb	9 bandas
2	213F	8 bandas
3	264F	12 bandas
4	408F	2 bandas
5	463F	4 bandas
6	511N	10 bandas
7	628N	9 bandas
8	638N	11 bandas
9	1236N	1 banda
10	1518N	10 bandas
11	NCTC8325	



El patrón de bandas obtenidos en la electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) se muestran en la figuras 6 y 7.

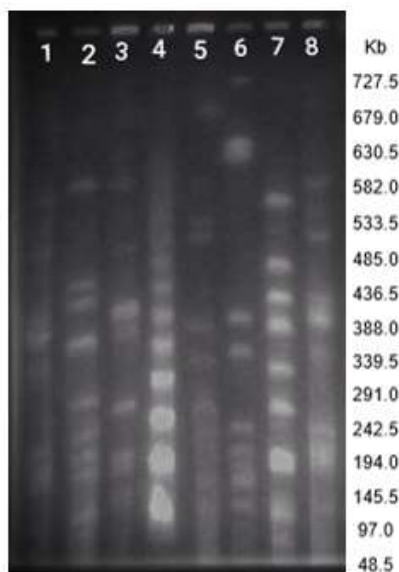


Figura 6. Patrón de bandas de PFGE. Gel de agarosa al 0.8%. Carril 1: *S. aureus* NCTC 8325, carril 2: *S. aureus* 17Nb, carril 3: *S. aureus* 213F, carril 4: Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs N0340S), carril 5: *S. aureus* 264F, carril 6: *S. aureus* 638N; carril 7: *S. aureus* 1518N; carril 8: *S. aureus* NCTC 8325.

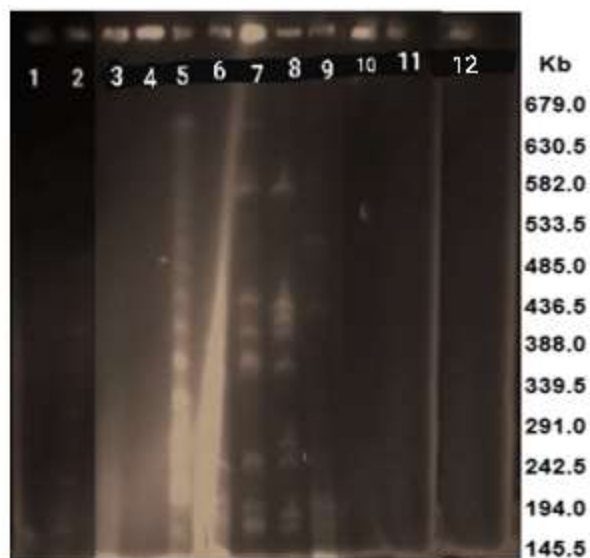


Figura 7. Patrón de bandas de PFGE. Gel de agarosa al 0.8%. Carril 1: *S. aureus* NCTC 8325, carril 2: *S. aureus* 17Nb, carril 3: *S. aureus* 213F, carril 4: *S. aureus* 264F, carril 5: *S. aureus* 408F, carril 6: Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs N0340S), carril 7: *S. aureus* 463F, carril 8: *S. aureus* 511N, carril 9: *S. aureus* 628N, carril 10: *S. aureus* 638N, carril 11: *S. aureus* 1236N y carril 12: *S. aureus* NCTC 8325.



Con ayuda del programa Gene Tools se determinó la similitud que existe entre las cepas utilizadas.

En base al patrón de bandas se generó un dendrograma (Figura 8) en el cual se observa la similitud que existe entre las cepas, así como los grupos que hay entre las clonas.

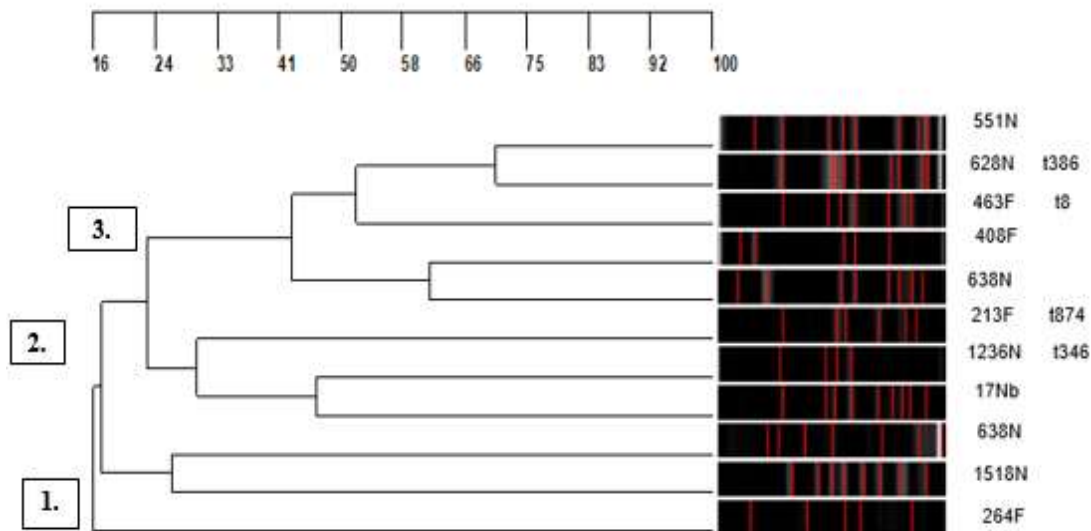


Figura 8. Dendrograma de homología en cepas de *S. aureus* indican su similitud y el tipo de *spa* que poseen.

El dendrograma nos muestra 3 grupos, no existe una clona predominante, la cepa *S. aureus* 264F presente en el grupo 1. En el caso del grupo 2 se encuentra la cepa *S. aureus* 1518N y *S. aureus* 638N.

En el grupo 3 existen 2 subgrupos, en el primer subgrupo se encuentran las cepas *S. aureus* 17Nb, *S. aureus* 1236N, *S. aureus* 213F y una clona predominante *S. aureus* 213F.

En el segundo subgrupo se encuentra las cepas *S. aureus* 638N, *S. aureus* 408F, *S. aureus* 463F, *S. aureus* 628N y por último *S. aureus* 511N.

## CONCLUSIONES

Podemos concluir que la tipificación de las cepas de *S. aureus* puede llevarse a cabo por los dos métodos, sin embargo el método de tipificación por el gen *spa* tiene más ventajas ya que la metodología es más sencilla y no se requiere de un equipo tan especial como el equipo de campos pulsados.

## BIBLIOGRAFÍA

1. L. G. Harris, S.J. Foster, R.G. Richards. 2002. An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relations to adhesion to biomaterials: Revista Eur Cells Mater. 4:2 39-60.
2. W.E. Kloss, K.H. Schleir, F. Goirtz. 1992. The genus *Staphylococcus*. In: Balows A, Truper HG, Dwoekin M, eds. The Prokaryotes, 2nd Ed. New York, Spring-Verlag.
3. M. Kuroda M, T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba. 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet. 357 (9264) 1225-1240.
4. L.K. McDougal, C.D. Steward, G.E. Killgore, J.M. Chaitram, S.K. McAllister, F.C. Tenover. 2003. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a National Database. Journal Clinical Microbiology. 41:11 5113-5120.

5. L. M. Schouls, E.C. Spablog, M. van Lut, X.W. Hijsdens, G.N. Pluister. 2009. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis of *Staphylococcus aureus*: comparison with Pulsed-Field Gel Electrophoresis and spa-Typing. PLoS ONE. 4:e5082
6. J. Sheagren, D. Schabe. "Staphylococci". In: Infectious Diseases. Gorbach, Barlett and Blacklow. Ed WB Saunders. 1998. pp.1697-1703.
7. F.C. Tenover, [R.D. Arbeit](#), R.V. Goering, [P.A. Mickelsen](#), [B.E. Murray](#), [D.H. Persing](#), [B. Swaminathan](#). 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. 33:9 2233:2239
8. L. R. Thurlow, G.S. Joshi, A.R. Richardson. 2012. Virulence strategies of the dominant USA300 lineage of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). FEMS Immunology Medical Microbiology. 65:1 5-22.
9. M.A. Vivoni, M.B. Meurer. 2005. Application of molecular techniques in the study of *Staphylococcus aureus* clonal evolution -A review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 100:7 693-98.
10. S. Young Hwang, Y. Kyung Park, H. Cheong Koo, P. Yong Ho. 2010. Spa typing and enterotoxin gene profile of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk in Korea. Journal of Veterinary Science. 11:2 125-131.
11. G. S. Zendejas Manzo, H. Avalos-Flores, M.Y. Soto-Padilla. 2014. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. Revista Biomédica 25:3

## SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE TiO<sub>2</sub> PARA LA FOTO-DEGRADACIÓN DE CONTAMINANTES ATMOSFÉRICOS

Mayret Aylin Trejo Martínez, Maribel Santiago Teodoro, Luis Rey Rodríguez López  
José Armando García López, Agustín Alfredo Torres Rodríguez

Tecnológico Nacional de México campus Atitalaquia.  
maribel.st@atitalaquia.tecnm.mx.

### RESUMEN

Las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> se han convertido en materiales de gran interés debido a la capacidad que tienen de atrapar moléculas de óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>), por lo que pueden aplicarse a superficies diversas con fines de degradación de este tipo de partículas presentes en el aire. Al respecto existen diferentes reportes que refieren la capacidad del óxido de titanio nano-estructurado, en remover por fotocatalisis las moléculas de NO<sub>x</sub>. En este trabajo se realizó la síntesis de TiO<sub>2</sub> mediante el acondicionamiento de la metodología sol-gel propuesta por Hernández<sup>1</sup>. Para la obtención del sol estable se realizó a través de las reacciones de hidrólisis y policondensación del butóxido de titanio (BT). Se empleo etanol como disolvente, el cual fue adicionado al BT. La solución fue agitada por 30 minutos a 1500 rpm y posteriormente se adicionó a una segunda solución constituida de agua desionizada, ácido cítrico y etanol. La mezcla se mantuvo en agitación por otros 30 minutos más para favorecer la formación de las nanopartículas. Después se envejeció el gel y se secó por 25 h para finalmente ser calcinado a 600°C por 3 h. El resultado fue un polvo cerámico blanco, que fue caracterizado por espectroscopía de infrarrojo (FTIR) y Difracción de rayos X (DRX) para conocer los enlaces entre átomos y la identificación estructural respectivamente. Mediante el espectro de Infrarrojo se observaron bandas en 1000, 400 y 466 cm<sup>-1</sup> las cuales son atribuibles a los enlaces de Ti-O y las bandas alrededor de los 515 y 715 cm<sup>-1</sup> correspondientes a los enlaces de Ti-O-Ti, mismos que son característicos de la fase anatasa del TiO<sub>2</sub>. En el difractograma de DRX se observaron los picos particulares del TiO<sub>2</sub>, los cuales confirmaron la presencia de la fase anatasa en las nanopartículas del dióxido de titanio.

### INTRODUCCIÓN

El TiO<sub>2</sub> es uno de los óxidos más estudiados, por ser resistente a la corrosión, no ser particularmente tóxico, y ser barato de producir. En su forma nano-particulada muestra propiedades foto-catalíticas sobre los óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>) presentes en el aire, por lo que se ha vislumbrado su potencial para la fotodegradación de estos compuestos (Fujishima et al., 2000).

Existen gran variedad de técnicas para obtener TiO<sub>2</sub> en forma nano-particulada, dentro de estos métodos se encuentran las técnicas de sol-gel en fase líquida (Ouzzine, 2014), que han demostrado un buen desempeño para producir al TiO<sub>2</sub> en forma de nano-partículas fase anatasa, que a su vez es la fase que muestra mejores propiedades foto oxidativas. La explicación se debe a que la nanoestructura de *anatasa* incrementa la banda de valencia máxima a niveles más altos, aumentando la oxidación y facilitando la transferencia de electrones del TiO<sub>2</sub>, permitiendo una mayor fotodegradación. De este modo, la metodología sol-gel permite obtener nanopartículas de un orden menor a 10 nm, que pueden activarse con la luz UV dentro de un rango de 387 a 410 nm, además de ser por lo general procesos fáciles de implementar y económicos.

En la metodología sol-gel intervienen 2 fases: la fase "sol" que corresponde a una suspensión de partículas sólidas en un líquido, y la fase "gel" que consiste de polímeros que contienen al líquido. De modo que durante el proceso de formación de ambas fases, se va conformando una red de partículas o polímeros (Brinker, 1990). Las condiciones experimentales resultan vitales para la obtención de nano-partículas con las propiedades adecuadas, y que adquieran propiedades foto-oxidativas fuertes. En este sentido se han realizado numerosas investigaciones que caracterizan los diversos parámetros que inciden en la síntesis del compuesto, tales como: los precursores, el porcentaje de solventes, el porcentaje de agua, la temperatura, los tiempos de secado, etc.

## JUSTIFICACIÓN

Hoy día uno de los problemas más apremiantes es la contaminación del medio ambiente, en el caso del aire se tiene la presencia de compuestos tales como: monóxido y dióxido de carbono, óxidos de nitrógeno (NOx), compuestos orgánicos volátiles (COV's) como algunos de los contaminantes químicos con mayores efectos nocivos en la salud humana, y en general sobre los seres vivos. Los óxidos de nitrógeno (NOx), junto con algunos hidrocarburos volátiles y el ozono, conforman el denominado smog fotoquímico,

Los óxidos de nitrógeno son producidos por vehículos de motor, procesos de combustión en general, además de los procesos microbianos ocurridos en los suelos de uso agrícola intensivo. Los NOx son responsables de importantes efectos, tales como problemas respiratorios, daño pulmonar, afectaciones en pulmones y bronquios, daño celular y tisular, mayor susceptibilidad a infecciones, daño ocular y afectaciones a las mucosas (Montaño y Sandoval, 2007). El NO<sub>2</sub> por ejemplo, puede reaccionar con la humedad atmosférica y formar ácido nítrico, que puede causar corrosión en superficies metálicas y detener el crecimiento de las plantas. Es por ello que, en este trabajo se estudia la síntesis del TiO<sub>2</sub> para ser aplicado para la degradación de contaminantes.

## TEORÍA

Los nanomateriales se definen como un grupo de sustancias con una dimensión máxima de 100 nm, y se han acrecentado las investigaciones en torno a su obtención y caracterización, en virtud de sus múltiples aplicaciones, en áreas tan diversas como óptica, electricidad y magnetismo, electrónica, medicina e incluso la protección al medio ambiente.

A nanoescala, varias de las propiedades físicas y químicas de los materiales difieren enormemente de las de sus pares fabricados tradicionalmente. Ejemplos de estas diferencias son la aparición de efectos cuánticos, o una mayor fuerza o resistencia de las nanoestructuras. En cuanto a otras propiedades físicas, por ejemplo, los cristales nanométricos pueden tener puntos de fusión muy bajos.

Los nanomateriales resultan más efectivos que los catalizadores normales por 2 razones: su tamaño pequeño (entre 5 y 100 nm), que le proporciona una mayor reactividad, debida a su vez a una mayor superficie activa, factor asociado a una mayor proporción área-volumen (Chaturvedy et al. 2012; Dhand et al. 2015).

En el caso de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>, su función foto-catalítica está relacionada con un proceso de oxidación avanzado donde ocurre la aceleración de una fotorreacción, donde el TiO<sub>2</sub> es activado por efecto de la radiación solar, acelerando el proceso de degradación de la sustancia contaminante, a través de un estado excitado y mediante la aparición de pares de electrón-hueco, con el objeto de formar radicales hidroxilos, que a su vez tiene un efecto oxidante sobre el compuesto químico. En la figura 1, se muestra un esquema general de los pasos que ocurren en este proceso, alrededor de la partícula de TiO<sub>2</sub>:

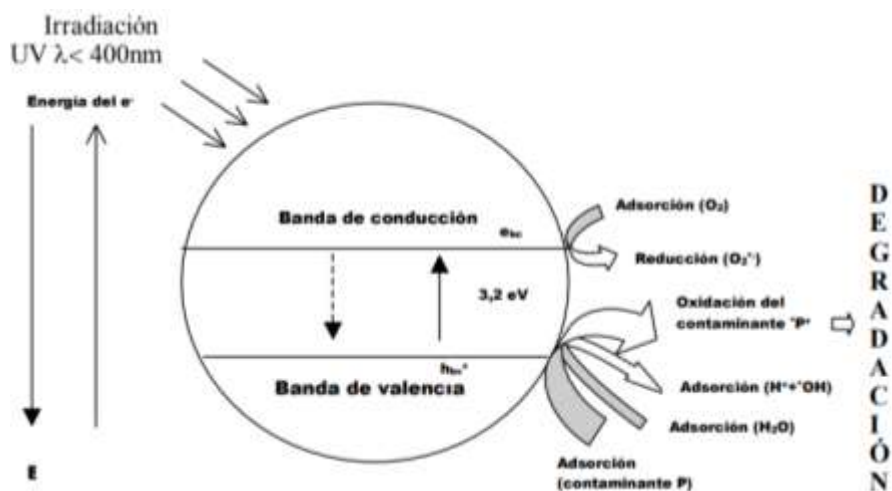


Figura.1 Diagrama de la banda de energía de una partícula esférica de  $\text{TiO}_2$ . (Herrmann, 2001).

Como se muestra en la figura 1, en presencia de la radiación UV, las reacciones que suceden en su superficie generan 2 especies reactivas, los electrones (-) y los huecos (+), que a su vez provocan reacciones de oxidación y reducción en el medio circundante.

Para la obtención de nanopartículas en general, existen diferentes metodologías de naturaleza física, química o biológica. La síntesis química en fase líquida es más utilizada y el principio se basa en el crecimiento de nanopartículas en un medio líquido y en presencia de diversos reactantes. Este crecimiento de las partículas de escala nanométrica, involucra la precipitación de fases sólidas dentro de una solución, para la formación de los nanocristales (Altavilla y Ciliberto, 2011). Un elemento clave del proceso es el uso de moléculas específicas que actúan como agentes estabilizadores, que aseguran un crecimiento lento de los nanocristales, previniendo la aglomeración y proporcionando estabilidad.

De los métodos en fase líquida existentes, los de tipo sol-gel resultan ser lo más versátiles, reproducibles y fáciles de controlar, y debido a ello, se han desarrollado diferentes técnicas basadas en esta tipología (Ouzzine, 2014). En términos generales, ocurren primero una hidrólisis seguida de una condensación, que conduce finalmente a la formación de las nanopartículas, durante la hidrólisis el agua desintegra los enlaces del precursor de titanio, y posteriormente la condensación conlleva a la formación de los cristales. Como paso adicional, se requiere una fase de secado y calcinado para retirar el exceso de agua y acondicionar el producto obtenido.

### PARTE EXPERIMENTAL

El método sol-gel es un proceso versátil para hacer diversos tipos de materiales cerámicos a temperaturas relativamente bajas, e involucra la suspensión coloidal de partículas donde un precursor para la síntesis de  $\text{TiO}_2$  es una sal de titanio. La metodología incluye 4 etapas características: hidrólisis, policondensación, secado y descomposición térmica (Gupta y Tripathi, 2012). Algunas ventajas de los procesos sol-gel es que se pueden realizar a bajas temperaturas, y además se puede obtener un nanomaterial con las propiedades estructurales requeridas. En la figura 2 se muestra un esquema general del proceso que utilizamos en este trabajo, basado en la propuesta de Hernández (2017) y Mosquera et al. (2017).

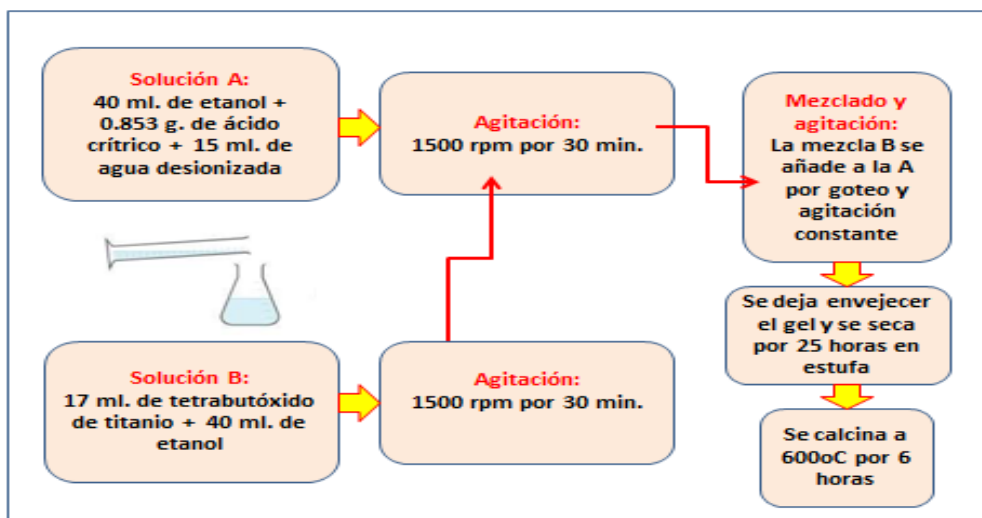


Figura.2 Esquema general del procedimiento empleado para la obtención de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  (basado en Hernández, 2017).

En nuestro caso, la obtención de nanopartículas estables de  $\text{TiO}_2$  se realizó a través de las reacciones de hidrólisis y condensación del precursor, que en este caso fue el butóxido de titanio (BT), se le agregó etanol como disolvente, teniendo precaución de que éste reactivo no se hidrolizara, la solución se agitó durante 30 minutos, y finalmente se adicionó a la segunda solución que contenía agua desionizada, ácido cítrico y etanol, manteniendo la agitación otros 30 minutos (ver figura 2, figura 3a), para obtener una condición básica en la solución y favorecer la formación de pequeñas partículas nanométricas en el sistema (figura 3b).



a)



b)

Figura 3 (a y b). Proceso sol-gel para la obtención de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ .

Durante la primera fase del proceso, denominada hidrólisis, el ion hidroxilo se une con el átomo metálico, y como alcóxido reacciona con el agua, fase favorecida por bajos valores de pH. En la segunda fase, denominada condensación, se conforma un polímero inorgánico, que engloba a todo el solvente originalmente presente, o generado durante la hidrólisis. Este polímero inorgánico oxídico es el que posteriormente formará el gel (Hernández, 2017). En la tercera etapa, llamada gelación, el

“sol” se va convirtiendo gradualmente en “gel” debido a los cambios estructurales que se van presentando, también ocurre el llamado envejecimiento, que es el cambio estructural y de propiedades que va sufriendo el gel, e implican condensaciones, disoluciones y precipitaciones, que implican cambios de fases en el seno de las fases sólidas o líquidas. Por último, el secado y la calcinación, tienen como propósito la remoción de restos de solventes, en general en el secado ocurren tres procesos: evaporación, contracción y transporte de líquidos a través de los poros. La temperatura de calcinación puede ir desde los 200 hasta los 1000 grados Celsius, logrando la deshidroxilación del gel, removiendo restos de compuestos unidos todavía al óxido metálico (Hernández, 2017).

## RESULTADOS

Se desarrolló e implementó el proceso descrito en la figura 2, como primera etapa se realizó la calibración de los equipos empleados para el secado y la calcinación, que respectivamente consistieron en una estufa MTI modelo EQ-DHG-9040, y una mufla MTI modelo KSL-100X, que permitieron mantener las condiciones de reacción requeridas. Para los procesos de formación del sol-gel y su envejecimiento, utilizamos una parrilla de calentamiento con agitación magnética, modelo Topline, con un rango de hasta 2500 rpm.

Una vez que se obtuvo el sol-gel, se vertió en un crisol, y se cubrió con papel aluminio, permitiendo su envejecimiento durante 48 horas. Posteriormente al retirar el aluminio, se observó la formación del gel y se procedió a calentarlo en la estufa durante 25 horas a 100° C. Posteriormente se introdujo a la mufla para su calcinación a 600° C por 3 horas (figuras 4a y 4b).



a)



b)

Figura 4a y 4b. Secado y calcinación de la muestra respectivamente.

En la figura 4, se observa el producto obtenido de la calcinación, el cual es sometido a una molienda mediante un mortero para homogeneizar las partículas. En esta figura se muestra el polvo cerámico homogéneo de color blanco característico del dióxido de Titanio.



Figura 4. Polvo cerámico de  $\text{TiO}_2$ .

#### Caracterización de la muestra

Con la finalidad de determinar los grupos funcionales y las fases cristalinas presentes en el compuesto cerámico sintetizado se utilizó la espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier y Difracción de Rayos X, respectivamente. En la figura 5, se da a conocer el espectro de Infrarrojo de la muestra sintetizada y tratada a  $600^\circ\text{C}$  en un rango de 400 a  $4000\text{ cm}^{-1}$ .

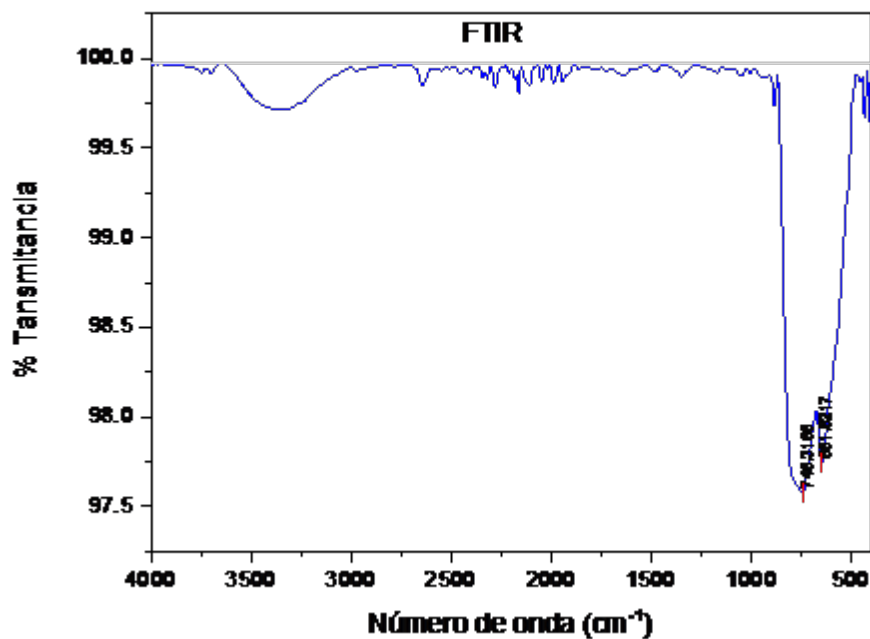


Figura 5. Espectro FTIR de  $\text{TiO}_2$

La region del espectro entre  $1000$  y  $400\text{ cm}^{-1}$  representan los enlaces metal-oxígeno. En esta región se aprecian dos bandas sobresalientes, en  $746.31$  y  $651.82\text{ cm}^{-1}$  atribuidas a los enlaces de Ti-O. De acuerdo a referencias las bandas en alrededor de  $485$  y  $732\text{ cm}^{-1}$ , representan los enlaces de Ti-O-Ti característicos de la fase anatasa. La banda ancha entre  $3000$  y  $3500\text{ cm}^{-1}$  representa al grupo



OH, en el espectro se muestra muy pequeña por lo que se atribuye a pequeñas trazas de etanol adsorbida sobre la superficie. (Bagueri, 2013)

Por otro lado, en la figura 6, se muestra el difractograma para el compuesto sólido sintetizado y calcinado a 600°C. En este difractograma se observa una estructura cristalina bien definida y como principal componente el TiO<sub>2</sub> en fase anatasa.

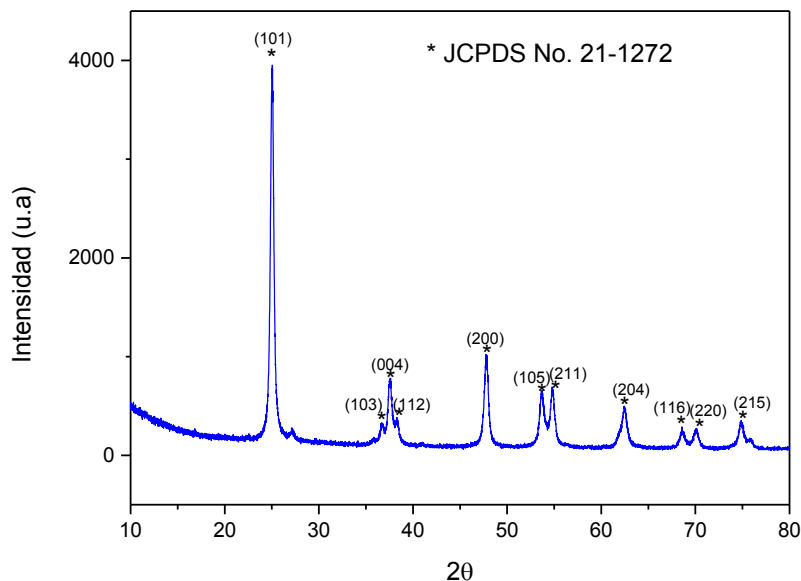


Figura 5. Difractograma de DRX TiO<sub>2</sub>

Los picos que se presentan a  $2\theta$  son 25.05, 36.85, 37.61, 38.12, 47.75, 53.73, 54.78, 62.46, 68.56, 69.98 y 74.86, los cuales fueron asignados a los planos 101, 103, 004, 112, 200, 105, 211, 204, 116, 220 y 215 correspondientes a los picos característicos de la estructura cristalina del TiO<sub>2</sub> en fase anatasa. (JCPDS No. 21-1272). (Yoshitake, 2009)

## CONCLUSIONES

Se logró sintetizar nanopartículas de TiO<sub>2</sub> en fase anatasa mediante el método de sol-gel, utilizando butóxido de Titanio (IV) (97%) como precursor. Las condiciones de síntesis incluyeron temperaturas de 100 °C para el secado y 600 °C con tiempo de 180 minutos para la calcinación.

Mediante la caracterización se pudo conocer que la metodología empleada fue satisfactoria, ya que en el difractograma se observaron los picos característicos del TiO<sub>2</sub> en fase anatasa.

Con la metodología empleada de sol-gel se obtuvo un compuesto cerámico de alta eficiencia que no generó residuos en su desarrollo, por lo que se considera un método adecuado para la síntesis.

## BIBLIOGRAFÍA

1. A. Fujishima, T.N. Rao, D.A. Tryk, "Titanium Dioxide Photocatalysis". *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 1, 2000, pp. 1-21.
2. C. Altavilla, E. Ciliberto, Eds., "Inorganic Nanoparticles: Synthesis, Applications, and Perspectives", Boca Ratón, USA, CRC Press, 2011, pp. 1-8.
3. C.J. Brinker, G.W. Scherer, "Sol-Gel science. The physics and chemistry of sol-gel processing". Academic Press. United States of America, 1990.
4. C. Dhand, N. Dwivedi, X.J. Loh, A. Ng Jie Ying, N. Kumar, R. Beuerman, R. Lakshminarayanan & S. Ramakrishna, "Methods and Strategies for the Synthesis of Diverse

- Nanoparticles and Their Applications: A Comprehensive Overview". Royal Society of Chemistry Adv., Vol. 127, 2015, pp.1-76.
5. E. Mosquera, N. Rosas, A. Debut, V.H. Guerrero, "Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de Dióxido de Titanio obtenidas por el Método de Sol-Gel", Revista Politécnica, Vol.36, No.3, 2015, pp. 1-7.
  6. Herrmann, J. M (2001). Destrucción de contaminantes orgánicos por fotocatalisis heterogénea. Recuperado de: [https://www.psa.es/es/projects/solarsafewater/documents/libro/10\\_Capitulo\\_10.pdf](https://www.psa.es/es/projects/solarsafewater/documents/libro/10_Capitulo_10.pdf)
  7. S. Bagheri, S. Kamyar & S.B. Abdt, "Synthesis and Characterization of Anatase Titanium Dioxide Nanoparticles using Egg White Solution via Sol-Gel method", Journal of Chemistry, Vol. 2013, pp. 1-5, DOI:10.1155/2013/848205.
  8. S. Chaturvedi, PN Dave & NK, Shah. "Applications of nano-catalyst in new era". J Saudi Chem Soc, vol.16 (3), 2012, pp.307-25.
  9. S. Gupta y M. Tripathi. "A review on the synthesis of TiO<sub>2</sub> nanoparticles by solution route". Central European Journal of Chemistry, vol. 10, no. 2, 2012, pp. 279-294.
  10. M.J. Hernández, "Eliminación de NO<sub>x</sub> mediante catálisis heterogénea". Tesis doctoral. Universidad de las Palmas de Gran Canaria, 2017.
  11. N.M. Montaña y A.L. Sandoval, "Contaminación atmosférica y salud". Revista Elementos: ciencia y cultura, vol. 4, No.65, 2007, pp. 29-33.
  12. M. Ouzzine "Materiales basados en nanopartículas de TiO<sub>2</sub> para la oxidación fotocatalítica de propeno en fase gas a baja concentración". Tesis doctoral, universidad de Alicante, 2014.
  13. Yoshitake & KATO, Kazumi, "Synthesis and Phase Transformation of TiO<sub>2</sub> Nano-Crystals in Aqueous Solutions". Journal of The Ceramic Society of Japan - J Ceramic Soc JPN. 117, 2009, pp. 373-376. DOI: 10.2109/jcersj2.117.373.

**DISPOSITIVOS ELECTROQUÍMICOS PARA LA DETECCIÓN DE RESÍDUOS DE POLVORA.**

Svetlana Kashina<sup>1</sup>, Paola Monserrat de la Rosa Hernández<sup>2</sup>, José Marco Balleza-Ordaz<sup>1</sup>, Rosalba Fuentes-Ramírez<sup>1</sup>, Rosario Galindo<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Universidad de Guanajuato, <sup>2</sup>Colegio Libre de Estudios Universitarios, <sup>3</sup>Catedra CONACyT adscrita a Universidad de Guanajuato.  
E-mail: ersinia@msn.com

**RESUMEN**

En la actualidad hay un incremento considerable en el índice de delitos donde es utilizada un arma de fuego, según cifras del reporte anual de incidencia delictiva, del 100% de los homicidios dolosos, en el 83% de estos se usó un arma de fuego. Mientras que, en la taza de feminicidios, de los 21 cometidos, en 7 de ellos se utilizó un arma de fuego. Lo que significa una correspondiente investigación que busque dar respuesta a la incógnita: ¿Quién llevo a cabo la autoría de un disparo? El análisis de residuos de disparo arma de fuego sirve como indicio orientativo, para evaluar si una persona ha efectuado un disparo. Al disparar un arma de fuego se producen gases en la combustión que arrastran partículas de pólvora (combustionada parcial o casi totalmente), y que se deposita en las superficies cercanas al lugar del disparo. Dichos residuos pueden ser detectados mediante diferentes técnicas analíticas, que tienen sus ventajas y limitaciones. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la efectividad de un sensor electroquímico para determinar la presencia de los residuos de pólvora. Para llevar a cabo el análisis se utilizó una celda electroquímica convencional de tres electrodos. Se utilizo un electrodo de carbón vítreo modificado con las nanoesferas de carbono, se utilizaron alambre de platino y electrodo saturado de Calomel como contra electrodo y de referencia, respectivamente. Las muestras fueron disueltas en el electrolito soporte y analizadas mediante la técnica de voltametría de onda cuadrada. Los resultados fueron aceptables para la detección de metales presentes en los residuos de arma de fuego, las señales de oxidación son muy claras para metales como cobre, plomo, estaño y bario, cada uno muestra un potencial de oxidación característico y muy separados entre si, lo cual facilita la identificación aun en muestras reales, donde se encuentran los metales de manera simultánea. Observamos una clara correlación entre la concentración y los cambios en intensidad de corriente, lo que permite el estudio y cuantificación de los metales en un amplio intervalo. Se concluye, que es posible detectar los residuos de pólvora con los sensores electroquímicos propuestos en este trabajo.

**INTRODUCCIÓN**

Es evidente que, en la actualidad, el índice de delitos donde es utilizada un arma de fuego se incrementó de manera considerable. De acuerdo con los datos proporcionados en el reporte anual de incidencia delictiva (Observatorio Ciudadano de León [OCL], 2018), del 100% de los homicidios dolosos (3,290 víctimas), 83% se realizaron con un arma de fuego. Mientras que, en la taza de feminicidios, de los 21 cometidos, en 7 de ellos se utilizó un arma de fuego (OCL, 2018).

Como parte de la investigación criminalística, es necesario, cuando es posible, confirmar la autoría del disparo, incluso cuando es evidente.

En un principio, un perito puede basarse en información que no requiere estudios de laboratorio, ya que la pólvora deflagrada depositada en las prendas del presunto autor o en el cuerpo de este, podía ser detectada de manera visual y olfativa: hallando un ahumamiento (falso tatuaje) y partículas resultantes de la misma deflagración (verdadero tatuaje); olfativamente, el perito puede detectar olor característico de pólvora combustionada. Sin embargo, dichas pruebas no cumplen con los criterios de veracidad y reproducibilidad, ya que sólo se trata de una prueba presuntiva y lo que se busca son las pruebas sólidas, comprobables y reproducibles.

En actualidad, los métodos analíticos para determinar los residuos de pólvora son espectroscopia de absorción atómica (AAS) y espectroscopia de absorción atómica sin alama (FAAS). Ambas técnicas analíticas se basan en la absorción de la luz con una longitud de onda determinada y permiten identificar y cuantificar el bario, el antimonio, el cobre y el plomo que hubieran maculado la mano de quien hizo el disparo. La ventaja de estos métodos es la posibilidad de detectar dichos metales en cantidades tan bajas como ppm. (Moreno, 2011j).

En este sentido, lo que distingue a estas técnicas es su elevada sensibilidad y, acorde con ello, su baja incidencia de "falsas positivas". Sin embargo, tienen la desventaja de que, si se aplican algunas

horas después de haber disparado el arma de fuego, la incidencia de “falsas negativas” es muy elevada, llegado esto al máximo después de las ocho horas.

## PARTE EXPERIMENTAL

Para lograr el objetivo, se propuso la siguiente metodología que se resume en la figura 1.

### *Preparación de las muestras para análisis.*

Tres personas distintas realizaron 1, 2 y 3 disparos de un arma de fuego. Previamente, se les realizó un lavado de mandos con agua destilada para eliminar los metales que pudieran estar en la piel.

Una gasa de tela de algodón libre de apresto de aproximadamente 2.5 x 2.5 cm fue impregnada con ácido nítrico al 3% y se realizó el frotis de ambas manos de las personas que ejecutaron los disparos, mismo que abarcaba la región palmar y dorsal interdigital. Se tomaron 5 muestras por individuo (15 en total), 2 correspondientes a las palmas de mano derecha e izquierda, 2 a los dorsos más 1 muestra de tela impregnada solo con ácido nítrico al 3% (blanco). Cada tela se froto uniforme y enérgicamente sobre las regiones referidas, comenzando del dorso de la mano hacia el extremo distal, con intención de comenzar el frotis en el área posiblemente menos contaminada para terminar en donde hay mayor acumulación de dichos residuos.

Una vez que se realizó la toma de muestras al sujeto en estudio se colocó cada gasa por separado en un tubo de ensaye y se añadió 5 ml de ácido nítrico al 3%. Se etiquetaron los tubos con las iniciales de acuerdo con las siguientes características: región= palmar (P), dorsal (D); lado= derecha (D), izquierda (I) y número de disparo (1, 2, y 3, respectivamente). Los tubos se agitaron en vórtex durante 15 minutos.

### *Preparación de los estándares de los metales para las curvas de calibración.*

En base a los reportes previos sobre la concentración de los metales en los residuos de pólvora, se prepararon por separado las soluciones de Cu (II), Pb (II), Ba (II) y Sb (II) a 100 ppm en KNO<sub>3</sub> 0.1M en agua destilada.

### *Análisis electroquímico.*

Todas las pruebas electroquímicas se llevaron a cabo en la celda convencional de tres electrodos. El electrodo de trabajo (de carbón vítreo) fue modificado con una tinta electroactiva que fue preparada con las nanoesferas de carbono, isopropanol y Nafion. El electrodo saturado de calomel y un alambre de platino fueron utilizados como contraelectrodo y electrodo de soporte, respectivamente. Se utilizó voltametría de onda cuadrada, que permite distinguir la corriente coulombica y faradica, que aumenta la resolución de la prueba.

En un experimento típico, a 10 mL de KNO<sub>3</sub> 0.1M se añadieron entre 1 a 10 alícuotas de 1 mL de las soluciones estándar de los metales y de 1 a 5 alícuotas de 1 mL de las muestras por separado y con agitación constante.

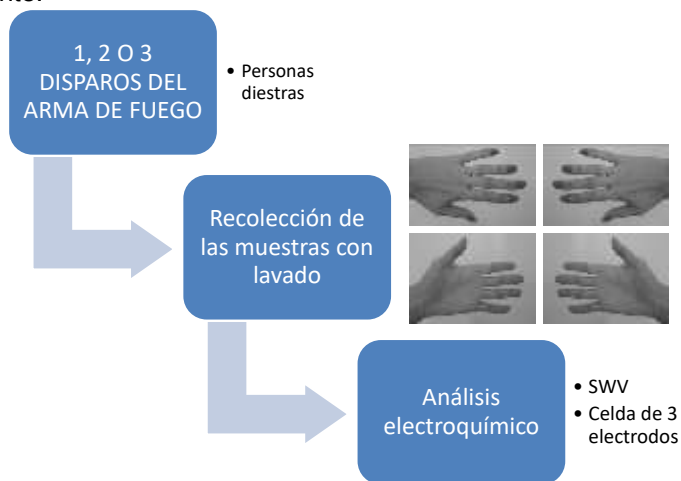


Figura 1. Esquema general de la metodología.

## RESULTADOS

Como primera etapa, se obtuvieron las curvas de calibración para cada metal por separado. Se observó que los cuatro metales presentaron los picos de oxidación muy definidos y separados entre sí: Cu (II) – 0.1 V, Pb (II) presentó dos picos, con el más prominente a -0.55 V, Ba (II) a -2.1 V y Sb a -0.02 V. Diez puntos fueron obtenidos para cada curva de calibración para cada metal por separado. Todas las curvas ajustaron a una recta con  $R^2$  mayor a 0.97. Los datos están resumidos en la tabla 1.

Tabla 1. Picos de oxidación obtenidos para los metales

Metal	Voltaje de oxidación (vs SCE)	$R^2$ de la línea de calibración
Cu	+ 0.1 V	0.9841
Pb	- 0.55 V	0.9938
Ba	- 2.4 V	0.9732
Sb	- 0.02 V	0.9898

Posteriormente, se realizó la determinación de los 4 metales simultáneamente y se observó que los picos seguían siendo claramente visibles, separados entre sí y a los voltajes que se habían determinado previamente.

Las muestras reales se procesaron de igual manera que los estándares. La figura 2 muestra voltamperogramas típicas obtenidas para la parte palmar de la mano derecha. Se pueden observar varias señales correspondientes a los metales. Los picos adicionales pueden corresponder a los componentes orgánicos de la pólvora, que no se analizaron en presente estudio.

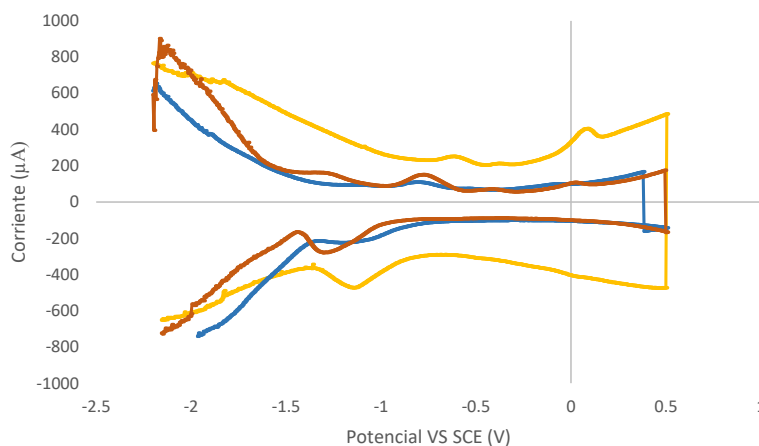


Figura 2. Voltamperograma típica obtenida

## CONCLUSIONES

La técnica de análisis electroquímico muestra resultados aceptables para la detección de metales presentes en los residuos de arma de fuego. Las señales son muy claras para cobre, plomo, estaño y bario, cada uno muestra un potencial de oxidación característico y muy separado entre sí lo cual facilita la identificación aun en muestras donde se encuentran los metales de manera simultánea.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Acosta, A. (2018). Pruebas Químicas en Balística Forense. Obtenido de <http://criminologiacienciaforense.blogspot.com/2015/06/pruebas-quimicas-en-balistica-forense.html>
2. Álvarez, F. (2005). Diccionario de Criminalística (2nd ed.). Barcelona: Planeta
3. Baeza, A. (2011). Principios de Electroquímica Analítica (1st ed.). México: UNAM
4. Cibrián, O. (2007). Balística Técnica y Forense (1st ed.). Buenos Aires: Ediciones La Rocca
5. Observatorio Ciudadano de León. (2019). Reporte Anual de Incidencia Delictiva. León: Observatorio Ciudadano de León. Retrieved from [http://www.ocl.org.mx/web/wp-content/uploads/2019/04/190404-OCL-REPORTE-ANUAL-DE-INCIDENCIA-DELICTIVA-2018-VF.pdf?fbclid=IwAR0fgrnAosu1qQyEqyWwuYKG6RJQ2ID\\_zKRBS4TNkAGRGoFhD\\_21JhMU8Y](http://www.ocl.org.mx/web/wp-content/uploads/2019/04/190404-OCL-REPORTE-ANUAL-DE-INCIDENCIA-DELICTIVA-2018-VF.pdf?fbclid=IwAR0fgrnAosu1qQyEqyWwuYKG6RJQ2ID_zKRBS4TNkAGRGoFhD_21JhMU8Y)
6. Rincón, S., & Pérez, J. (2003). Potenciometría con Volúmenes a Nivel de Microescala en Educación. Educación Química, (4088). Retrieved from <http://revistas.unam.mx/index.php/req/article/view/66242/58153>

## ESTUDIOS DE LOS EFECTOS DEL FITOQUÍMICO DATS SOBRE LOS GENES RELACIONADOS CON FACTORES DE VIRULENCIA Y QUORUM SENSING EN EL PATÓGENO BRUCELLA MELITENSIS

Karen Jazmin Santamaria Gonzaga<sup>1</sup>, Elsa Iracena Castañeda Roldán<sup>2</sup>, Lesset del Consuelo Ramos Ramírez<sup>3</sup> y Laura Morales Lara<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Químicas-Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, <sup>2</sup> Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas-ICUAP-BUAP, <sup>3</sup> Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas y Farmacéuticas-Universidad Autónoma de Nayarit, santamariagonzagakaren@gmail.com

### RESUMEN

*Brucella melitensis* es una de las especies más virulentas del género *Brucella*, su poder patógeno es activado en respuesta a la expresión organizada y coordinada de factores de virulencia que participan en el encendido del Quorum Sensing (QS) [1], esta modulación es fundamental para establecer el proceso infeccioso. Actualmente, se está explorando la capacidad de fitoquímicos como el dialiltrisulfuro (DATS) para modular este proceso mediante diversas estrategias entre las que destaca la modificación de la expresión de factores de virulencia. El compuesto bioactivo DATS, predominante en el ajo ha mostrado actividad anti virulenta en *Pseudomonas aeruginosa* mediante la modulación de factores de virulencia relacionados con el sistema QS [2] por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antimicrobiano de DATS e identificar los cambios inducidos en los patrones de expresión de *vjbR*, *virB2* y *fliC* en contra de la cepa de referencia *B. melitensis* 16M y un aislamiento clínico de *Brucella melitensis* (H18). El estudio de sensibilidad antimicrobiana se realizó mediante el método de difusión en disco, para los perfiles de expresión genética se establecieron curvas de crecimiento (37°C/150 rpm/20 h) sin y en presencia de DATS (0.1 µM, 1.0 µM y 10 µM), se recolectaron alícuotas en la fase exponencial (13 h). Se evaluaron los perfiles de expresión de los genes de interés mediante RT-PCR, electroforesis en gel de agarosa al 2.5% y densitometría (normalizada con RNAm BMEI0861). Los resultados mostraron que el crecimiento de *Brucella* no fue inhibido en presencia de DATS en los ensayos de sensibilidad antimicrobiana, sin embargo, DATS 10 µM disminuye la expresión de ARNm de *vjbR*, *fliC* y *virB2* en ambas cepas. El fitoquímico DATS no inhibió el crecimiento microbiano de *B. melitensis* 16M y H18, en cambio, a mayor concentración DATS puede estar modulando eficazmente la expresión de factores de virulencia, debido a que disminuye fuertemente la expresión de *vjbR*, *fliC* y *virB2* mismos que se han descrito como genes necesarios para la persistencia y cronicidad de la brucelosis, además de ser importantes factores de activación durante el desarrollo del QS.

### INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una zoonosis de distribución mundial causada por bacterias del género *Brucella*, son patógenos intracelulares inmóviles, anaerobios facultativos, de crecimiento lento, no poseen cápsulas ni forman esporas. Los humanos generalmente contraen la enfermedad por contacto directo con animales, al consumo de productos lácteos sin pasteurizar principalmente quesos frescos de origen caprino o por inhalar aerosoles infecciosos [3].

Las vías de entrada más frecuentes hacia su hospedero son la vía digestiva, tracto respiratorio o por lesiones en la piel, es capaz de interactuar con células epiteliales de la mucosa por lo que utiliza estrategias para penetrar en las células del hospedero, alterar y modular el tráfico intracelular para evadir los mecanismos de defensa [4].

Debido a que carece de los factores de virulencia clásicos ha desarrollado una estrategia para lograr con éxito la infección ocultando, modificando o reduciendo la expresión de sus patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) para evitar su reconocimiento por el sistema inmune innato, y diseminarse a otros tejidos [5].

En células como macrófagos, células dendríticas y trofoblastos placentarios se ha demostrado que su supervivencia y replicación depende de la maduración de las vacuolas denominadas BCV's (Vacuola que Contiene *Brucella*), las cuales evitan eficientemente que sean degradadas, para alcanzar establecerse en su un nicho replicativo. La acidificación vacuolar se identifica como un factor clave para activar la expresión de varios factores virulencia de *Brucella* spp. [6], como el

sistema de secreción tipo IV (T4SS) codificado por el operón *virB* que consta de 12 genes (*virB1-12*) ubicados en el cromosoma II, el cual secreta moléculas efectoras que mantienen las interacciones de la BCV con el RE, favoreciendo el establecimiento de su vida intracelular [7].

El Quorum sensing (QS) es un proceso de comunicación bacteriano regulado por la secreción y detección de señales químicas de moléculas pequeñas llamadas moduladores de detección de quorum (QSM) o moléculas autoinducidas [8]. Los QSM prevalentes para bacterias Gram-negativas incluyen N -acil homoserina lactonas (AHL), y son sintetizados por AHL-sintasas de tipo LuxI. Cuando alcanzan un umbral de concentración se unen al regulador transcripcional de tipo LuxR para modular la expresión de diferentes genes [9, 10].

La molécula autoinducida para *Brucella* es la N -dodecanoil-homoserina lactona (C12-HSL), y se caracteriza por encontrarse a una concentración muy inferior a la de moléculas autoinducidas de otras bacterias que activan el QS. Esto se ha atribuido a la localización intravacuolar de *Brucella* spp. en la célula hospedera, su activación no depende de la densidad poblacional, por lo que se le conoce como un sistema QS no canónico, el cual es modulado por *Brucella* para responder finamente a las condiciones estresantes del entorno, mediante la expresión, por ejemplo, del sistema de secreción tipo IV codificado por el operon *virB*, lo que contribuye al éxito del establecimiento de la infección intracelular. *Brucella* expresa 2 reguladores transcripcionales de tipo LuxR importantes para la expresión de factores de virulencia y respuesta al estrés, VjbR y BabR. VjbR participa en la modulación de la expresión del operón *virB* y otros genes asociados con la virulencia de *Brucella* como los componentes flagelares *fliF* y *fliC* para el establecimiento de la infección crónica [11, 12]. Por otro lado, el incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos ha despertado interés en buscar alternativas terapéuticas que coadyuven a los tratamientos antibióticos, disminuyendo tiempo y concentración, con eficiencia antimicrobiana, identificándose que diferentes fitoquímicos moduladores del QS están siendo estudiados por su papel en la regulación de factores de virulencia [13, 14, 15].

## TEORÍA

Actualmente, se ha reportado que algunos compuestos bioactivos como los sulfuros de ajo derivados del ajo poseen actividad anti virulenta en patógenos oportunistas alterando el sistema de comunicación QS, contribuyendo a la atenuación de su virulencia sin inhibir el crecimiento microbiano, disminuyendo así la posibilidad de desarrollar resistencia [2,16,17]. Barbier et al., en el 2018 mostraron que el dialil disulfuro (DADS) inhibe los factores de virulencia al inactivar la transcripción de genes clave de tres sistemas de detección del QS en *Pseudomonas aeruginosa* (*las*, *rhl* y *pqs*), además de disminuir la movilidad bacteriana y quimiotaxis [19]. Sin embargo, se continúa investigando los mecanismos que regulan estas funciones. Por ello es importante evaluar los efectos antimicrobianos del Dialil Trisulfuro (DATS) en la expresión genética de *Brucella melitensis*.

## PARTE EXPERIMENTAL

Conservación y mantenimiento de las cepas de *Brucella melitensis*

Las bacterias aisladas a partir del proceso de reactivación en el modelo murino se conservaron en caldo TSA con glicerol al 30% y se almacenaron a -70°C hasta su identificación microbiológica y molecular.

Ensayos de sensibilidad antimicrobiana

Las cepas de *B. melitensis* 16M y H18 (cepa aislada de humano) se cultivaron en medio Agar Soja Tripticasa (TSA) a 37°C/48 h con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, posteriormente a partir del cultivo en placa se obtuvo el cultivo en caldo TSA, incubado a 37°C/150 rpm/13h, para obtener una suspensión bacteriana de 1x10<sup>7</sup> UFC en PBS estéril, pH 7.4.

A partir de la obtención del inóculo se realizó un cultivo microbiológico a 37°C/48 h con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% en medio TSA para obtener una suspensión bacteriana a estándar 0.5 de MacFarland que se ocupó para realizar un sembrado masivo, se utilizaron dos placas por cepa y se colocaron 7 sensidiscos de 100 mm de diámetro por placa, a continuación, cada concentración de DATS se colocó por duplicado (0.1 µM, 1µM, 10 µM, 100 µM, 1 mM y 10 mM) en volumen de 10 µl por sensidisco, además del vehículo (DMSO), incubando a 37°C/24 h y 48 h, finalmente se realizó el reporte del halo de inhibición.



### Estudios de expresión genética

A partir de una suspensión bacteriana de  $1 \times 10^7$  UFC en SSI (Absorbancia de 0.01 a  $\lambda = 600$  nm) se inició el cultivo vegetativo, recolectándose alicuotas bacterianas después de 13 h de incubación (fase logarítmica tardía, en la que *Brucella melitensis* presenta mayor capacidad de virulencia) a 150 rpm/37°C (por triplicado), en los siguientes grupos de estudio: *B. melitensis* 16M y *B. melitensis* H18 en medio TSA (control), medio de cultivo TSA/DMSO 5% (vehículo) y medio de cultivo TSA/DMSO 5%/DADS 10  $\mu$ M. Estas alicuotas se centrifugaron a 5000 rpm/50 min/4 °C y se conservaron en RNA later. Posteriormente, se realizó la extracción de RNA de cada muestra mediante el método TRIzol, y se conservó a -70°C para su posterior análisis, después se realizó la retrotranscripción. La mezcla de reacción para PCR punto final se realizó con GoTaq® Green Master Mix, utilizando una concentración de 12.5 pmol/ $\mu$ L de cada primer y 250 ng de cDNA.

Los productos de PCR se visualizarán por electroforesis en gel de agarosa al 2.5%. Los resultados de cada RNA amplificado se normalizaron con *g1dh*. El análisis de expresión relativa se realizó mediante densitometría, estableciendo una relación entre las densitometrías obtenidas entre el grupo de estudio y el grupo control.

### RESULTADOS

El crecimiento de *Brucella melitensis* 16M y *Brucella melitensis* H18 no fue inhibido en presencia de ninguna de las concentraciones evaluadas de DATS (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM y 10 mM). Para evaluar los efectos de DATS sobre los genes relacionados al quorum sensing en *Brucella melitensis* primero se realizó el registro de una curva de crecimiento de *B. melitensis* 16M y *B. melitensis* H18 durante 20 horas evaluando la densidad óptica a 600 nm cada hora mediante espectrofotometría, así como las unidades formadoras de colonias (UFC) por mL para identificar las fases del crecimiento bacteriano: fase exponencial, estacionaria y muerte. De esta manera se identificó la fase tardía de crecimiento exponencial (Fig 1), la cual se caracteriza porque la bacteria presentar mayor poder virulento y está relacionada con la producción de C12HSL cuya concentración se incrementa hacia la fase estacionaria, al mismo tiempo que el QS se va apagando, así como la virulencia va disminuyendo [19].

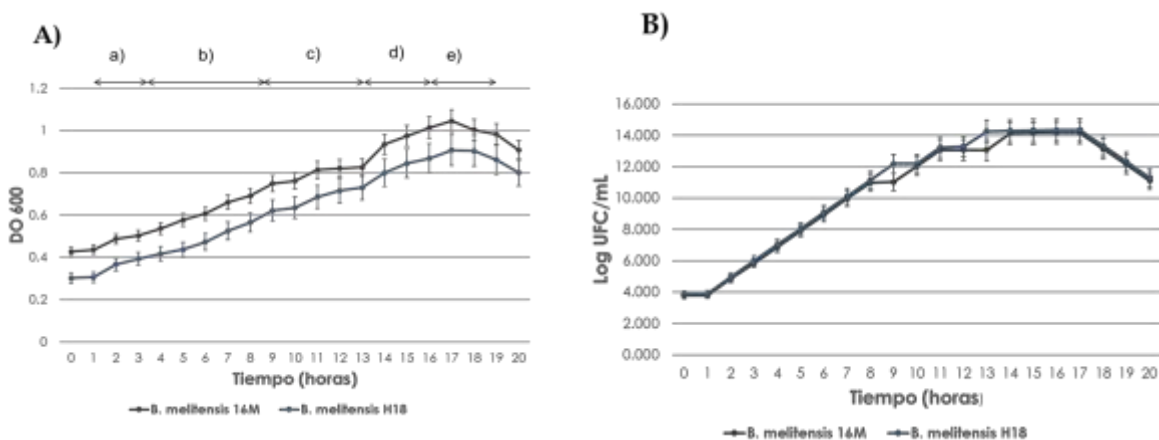


Fig. 1. Curva de crecimiento de cultivos vegetativos de cepas de *B. melitensis* 16M y H18 (aislamiento clínico). Las cepas fueron cultivadas en caldo TSA, 150 rpm a 37°C. A) Desarrollo del crecimiento microbiano durante 20 horas. B) Curva de crecimiento en UFC/mL a lo largo de 20 h.

En los gráficos se muestra la fase exponencial (a-c), estacionaria (d) y de muerte (e). En ambos casos cada punto corresponde a la media de tres repeticiones independientes, las barras de error corresponden al error estándar.

De acuerdo con los resultados observados, el medio de cultivo adicionado con DATS induce un cambio en la expresión de los genes evaluados (*VjbR*, *virB2* y *fliC*) ya que muestran una disminución respecto a la expresión de los genes del grupo control en ambas cepas. Destaca que la expresión de los 3 genes evaluados es mayor en el aislamiento clínico de *B. melitensis*, en comparación con

la cepa de referencia, posiblemente se deba a las diferencias relacionadas con el estrés ambiental al que estas 2 cepas se han sometido, destacando también el papel de DATS al disminuir aún más la expresión de *vjbR* y *fliC* en el aislamiento clínico que en la cepa de referencia *B. melitensis* 16M (Fig 2 A, B y C). La disminución en la expresión relativa de estos genes podría estar relacionada con la modulación del sistema de comunicación QS, cuyo papel destaca primordialmente durante la fase logarítmica.

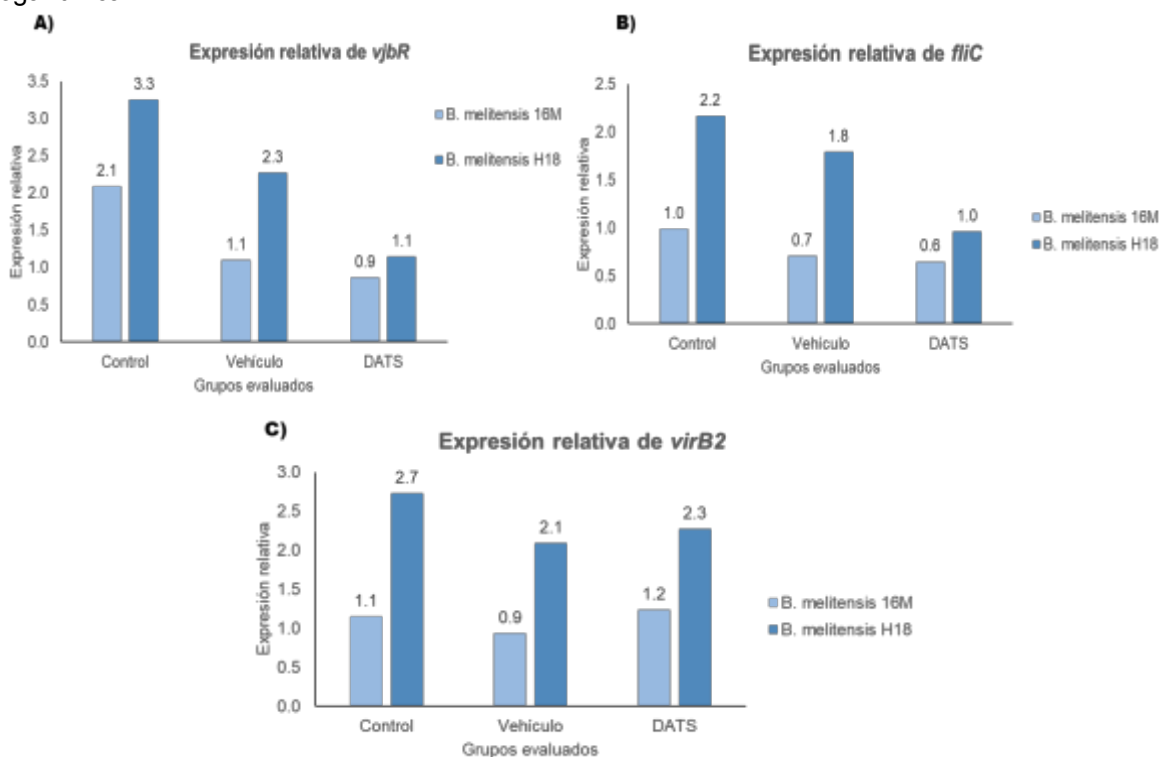


Figura 2. Evaluación de la expresión relativa de genes relacionados con factores de virulencia en *B. melitensis*. A) *vjbR*, B) *virB2*, C) *fliC* en *Brucella melitensis* 16M y H18. Se comparó la expresión relativa de los genes de interés del grupo tratado con DATS 10  $\mu$ M contra el grupo control y el grupo vehículo.

## CONCLUSIONES

El fitoquímico DATS disminuye la expresión de los genes relacionados con factores de virulencia y quorum sensing *vjbR* y *fliC* en *B. melitensis* durante la fase exponencial del cultivo vegetativo, será necesario evaluar más adelante esta expresión mediante qRT-PCR, sin embargo, resultó interesante identificar el efecto de este fitoquímico en cepas de *B. melitensis*, tanto en la cepa de referencia como en el aislamiento clínico, lo que sugiere que DATS podría tener un papel en la modulación de estos factores de virulencia, los cuales son regulados por el sistema QS, en donde la producción de molécula C12-HSL, juega un papel inhibitorio conforme se incrementa su concentración hacia la fase exponencial de la curva de crecimiento bacteriano, disminuyendo el poder virulento de la bacteria. Si bien, no se identificó que DATS provoque un efecto antimicrobiano, llama la atención su papel en la modulación de la expresión genética de importantes factores de virulencia, estudios futuros pudieran encaminarse hacia la identificación de tratamientos combinados con fitoquímicos como DATS, que inhiban el establecimiento del proceso infeccioso, sin provocar o al menos disminuir la resistencia a antibióticos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. M. Suárez-Esquivel, "Brucella Genomics: Macro and Micro Evolution", International journal of molecular sciences, 2020, 21(20), 7749.

2. Li, W. R., Ma, Y. K., Shi, Q. S., Xie, X. B., Sun, T. L., Peng, H., & Huang, X. M. (2018). Diallyl disulfide from garlic oil inhibits *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors by inactivating key quorum sensing genes. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(17), 7555–7564.
3. Franc, K. A., Krecek, R. C., Häsler, B. N., & Arenas-Gamboa, A. M. (2018). Brucellosis remains a neglected disease in the developing world: a call for interdisciplinary action. *BMC public health*, 18(1), 1-9.
4. Moreno, E., & Barquero-Calvo, E. (2020). The Role of Neutrophils in Brucellosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(4).
5. Figueiredo, P., Ficht, T. A., Rice-Ficht, A., Rossetti, C. A., & Adams, L. G. (2015). Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of *Brucella*–Host Interactions. *The American journal of pathology*, 185(6), 1505-1517.
6. Ahmed, W., Zheng, K., & Liu, Z. F. (2016). Establishment of chronic infection: *Brucella*'s stealth strategy. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, 30.
7. Liu, Y., Zhu, P., Wang, Y., Wei, Z., Tao, L., Zhu, Z., ... & Lu, Y. (2015). Antimetastatic therapies of the polysulfide diallyl trisulfide against triple-negative breast cancer (TNBC) via suppressing MMP2/9 by blocking NF- $\kappa$ B and ERK/MAPK signaling pathways. *PloS one*, 10(4), e0123781.
8. Jin, T., Patel, S. J., & Van Lehn, R. C. (2021). Molecular simulations of lipid membrane partitioning and translocation by bacterial quorum sensing modulators. *Plos one*, 16(2), e0246187.
9. Whiteley, M., Diggle, S. P., & Greenberg, E. P. (2017). Bacterial quorum sensing: the progress and promise of an emerging research area. *Nature*, 551(7680), 313.
10. Terwagne, M., Mirabella, A., Lemaire, J., Deschamps, C., De Bolle, X., & Letesson, J. J. (2013). Quorum sensing and self-quorum quenching in the intracellular pathogen *Brucellamelitensis*. *PloS one*, 8(12), e82514. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082514>
11. Kleinman, C. L., Sycz, G., Bonomi, H. R., Rodríguez, R. M., Zorreguieta, A., & Sieira, R. (2017). ChIP-seq analysis of the LuxR-type regulator VjbR reveals novel insights into the *Brucella* virulence gene expression network. *Nucleic acids research*, 45(10), 5757–5769.
12. Barbier, T., Zúñiga-Ripa, A., Moussa, S., Plovier, H., Sternon, J. F., Lázaro-Antón, L., Conde-Álvarez, R., De Bolle, X., Iriarte, M., Moriyón, I., & Letesson, J. J. (2018). *Brucella* central carbon metabolism: an update. *Critical reviews in microbiology*, 44(2), 182–211.
13. Kalia, V. C., Patel, S. K., Kang, Y. C., & Lee, J. K. (2019). Quorum sensing inhibitors as antipathogens: biotechnological applications. *Biotechnology advances*, 37(1), 68-90.
14. Brambila-Tapia, A. J., & Pérez-Rueda, E. (2014). A functional and phylogenetic comparison of quorum sensing related genes in *Brucella melitensis* 16M. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 52(8), 709–715.
15. Santhakumari, S., & Ravi, A. V. (2019). Targeting quorum sensing mechanism: an alternative anti-virulent strategy for the treatment of bacterial infections. *South African Journal of Botany*, 120, 81-86.
16. Feng, S., Eucker, T. P., Holly, M. K., Konkel, M. E., Lu, X., & Wang, S. (2014). Investigating the responses of *Cronobacter sakazakii* to garlic-derived organosulfur compounds: a systematic study of pathogenic-bacterium injury by use of high-throughput whole-transcriptome sequencing and confocal micro-Raman spectroscopy. *Applied and environmental microbiology*, 80(3), 959-971.
17. Wu, D., Huang, W., Duan, Q., Li, F., & Cheng, H. (2014). Sodium houltuyfonate affects production of N-acyl homoserine lactone and quorum sensing-regulated genes expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in microbiology*, 5, 635.
18. Li, W. R., Ma, Y. K., Xie, X. B., Shi, Q. S., Wen, X., Sun, T. L., & Peng, H. (2019). Diallyl Disulfide From Garlic Oil Inhibits *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Systems and Corresponding Virulence Factors. *Frontiers in microbiology*, 9, 3222.
19. Barbier, T., Zúñiga-Ripa, A., Moussa, S., Plovier, H., Sternon, J. F., Lázaro-Antón, L., Conde-Álvarez, R., De Bolle, X., Iriarte, M., Moriyón, I., & Letesson, J. J. (2018). *Brucella* central carbon metabolism: an update. *Critical reviews in microbiology*, 44(2), 182–211.

20. Rambow, A. A., Rajashekara, G., Petersen, E., and Splitter, G. (2008). Putative Quorum-Sensing Regulator BlxR of *Brucella melitensis* Regulates Virulence Factors Including the Type IV Secretion System and Flagella. *Journal of Bacteriology*, 190 (9), 3274–3282.
21. Uzureau, S., Godefroid, M., Deschamps, C., Lemaire, J., De Bolle, X., and Letesson, J. J. (2007). Mutations of the Quorum Sensing-Dependent Regulator VjbR Lead to Drastic Surface Modifications in *Brucella melitensis*. *Journal of Bacteriology*, 189 (16), 6035–6047.
22. Uzureau, S., Lemaire, J., Delaive, E., Dieu, M., Gaigneaux, A., Raes, M., Letesson, J. J. (2010). Global Analysis of Quorum Sensing Targets in the Intracellular Pathogen *Brucella melitensis* 16 M. *Journal of Proteome Research*, 9 (6), 3200–3217.
23. Brambila, A.J.L. and Pérez, R. E. (2014). A Functional and Phylogenetic Comparison of Quorum Sensing Related Genes in *Brucella melitensis* 16. *Journal of Microbiology*, 52 (8), 709– 715.
24. Delrue, R. M., Deschamps, C., Léonard, S., Nijskens, C., Danese, I., Schaus, J. M., Bonnot, S., Ferooz, J., Tibor, A., De Bolle, X., & Letesson, J. J. (2005). A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*. *Cellular microbiology*, 7(8), 1151–1161.

## DESEMPEÑO FOTO-OXIDATIVO EN LA DEGRADACIÓN DE AZUL DE METILENO Y DIBENZOTIOFENO EN PRESENCIA DE FOTOCATALIZADOR A BASE DE $\text{TiO}_2/\text{MgO} - \text{Ni}/\text{Mo}$ Y LUZ UV

Carlos Arturo Flores Claros<sup>1</sup>, Ángel de Jesús Morales Ramírez<sup>2</sup>, Rosario Ruiz Guerrero<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación e Innovación Tecnológica - Instituto Politécnico Nacional,

<sup>2</sup>Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas- Instituto Tecnológico Nacional  
arturo.flores1988@gmail.com

### RESUMEN

En décadas recientes se han desarrollado diversos tipos de catalizadores heterogéneos con el objetivo de eliminar componentes orgánicos contaminantes presentes en diversos medios, tales como aguas contaminadas o corrientes de productos industriales. Los compuestos de azufre dentro de la gasolina o el diésel, tales como los tiofenos, presentan una gran amenaza para el medio ambiente, debido a que su combustión en vehículos libera compuestos  $\text{SO}_x$  que, en presencia de agua, precipita en forma de lluvia ácida, alterando el pH de los suelos y el agua y así dañando el equilibrio ecológico. Los procesos de Hidrodesulfuración (HDS) han sido recurrentes en la industria petroquímica para la remoción de tales compuestos azufrados; sin embargo, debido a que sus condiciones requieren altas temperaturas, altas presiones, e hidrógeno gas, además de catalizadores, se han buscado alternativas a este proceso por sus altos costos. El Óxido de Titanio ( $\text{TiO}_2$ ), por ser el precursor para la elaboración de catalizadores soportados, ha sido altamente utilizado por ser de bajo costo y estable en altas temperaturas. El Molibdeno (Mo), por su alta actividad y soportado en el  $\text{TiO}_2$ , ha demostrado gran actividad catalítica, sin embargo, presenta inestabilidad cuando se encuentra en ausencia de otros cationes. En este trabajo se presentan los resultados donde el Mo en presencia de Níquel (Ni) soportados en mezclas de  $\text{TiO}_2$  y óxido de magnesio (MgO) muestra una alta efectividad en la degradación de Azul de Metileno (ADM), y de Dibenzotiofeno (DBT) con un proceso fotocatalítico usando rayos UV. Se evaluaron catalizadores sintetizados por el método sol-gel a partir de los soles de MgO y  $\text{TiO}_2$ , utilizando como precursores el Butóxido de Titanio y el Acetato de Magnesio Tetrahidratado para obtener fases inter-metálicas cuyas relaciones molares son:  $\text{MgO}/\text{TiO}_2 = 2$ ,  $\text{MgO}/\text{TiO}_2 = 1$ , y  $\text{MgO}/\text{TiO}_2 = 0.5$ . Las fases obtenidas fueron impregnadas con una solución acuosa de precursor metálico de Níquel-Molibdeno (Ni-Mo). Los resultados de las pruebas de fotocatalisis muestran en las soluciones de ADM y DBT con el catalizador con mezcla de  $\text{MgO}/\text{TiO}_2 = 0.5$  una degradación de 93% y 68% respectivamente. En este trabajo, la degradación de ADM por parte del catalizador de mezcla  $\text{MgO}/\text{TiO}_2 = 0.5$  muestra que una gran eficiencia (mayor al 90%), mientras que en el DBT se sugiere mayor investigación y experimentación para alcanzar mayor porcentaje de degradación.

### INTRODUCCIÓN

La fotocatalisis se considera un proceso de descontaminación propio de la naturaleza, en el que existe una reacción que convierte la energía solar en energía química, a partir de la absorción de luz por medio de un catalizador, aumentando la velocidad mediante proceso de oxidación [1]. Por ello, la fotocatalisis heterogénea ha sido una buena alternativa para diferentes tratamientos del agua y el aire por lo que se considera un método amigable con el ambiente.

En la actualidad el problema ambiental de México es cada vez más crítico debido al creciente uso de combustibles y materiales contaminantes en los efluentes industriales, por lo que la necesidad de preservar el medio ambiente ha motivado la búsqueda y el desarrollo de métodos nuevos para la reducción de niveles de contaminación generada por la industria petrolera, la industria papelera, minera, farmacéutica, entre otras. Éstas requieren grandes cantidades de agua y fuentes de energía, que generalmente provienen de origen fósil como el petróleo o carbón, y a su vez producen grandes cantidades de aguas y aires contaminados. Sin el tratamiento adecuado, liberar esas aguas y aires contaminados al entorno directamente implica daños al medio ambiente y la salud humana.

El Azul de Metileno (ADM) es compuesto orgánico que contiene azufre muy utilizado en las diferentes industrias con varias aplicaciones que representa un gran problema con respecto a la contaminación

del agua, de allí la razón por la que se usa como molécula modelo en los métodos de descontaminación de agua [2].

De forma similar, el dibenzotiofeno (DBS) es otro de tantos compuestos azufrados que se encuentra en cantidades significativas en los derivados del petróleo, como en el diésel o la gasolina [3]. Cuando estos compuestos son directamente combustionados sin ningún tipo de tratamiento de remoción de compuestos de azufre, se liberan grandes cantidades de productos gaseosos residuales como los dióxidos de azufre (SO<sub>x</sub>). De igual manera ocurre cuando se combustionan compuestos orgánicos nitrogenados que se encuentran en los derivados de petróleo, liberando óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>). Estos óxidos son altamente contaminantes por producir lluvia ácida, daño a la salud humana al respirarlos, entre otros.

En la actual industria petroquímica, el proceso de Hidrodesulfuración (HDS), que consiste en mezclar en reactores continuos hidrógeno gas (H<sub>2</sub>) a altas presiones (mayores de 20 atm) y temperaturas (mayores de 300°C) que contienen catalizadores principalmente de Níquel (Ni), Cobalto (Co) o Molibdeno (Mo), remueve los compuestos azufrados de los derivados de petróleo dando como resultado un producto casi libre de azufre (aproximadamente 10 ppm). Estos catalizadores requieren soportes que sean estables a altas temperaturas y poco reactivos. El proceso de HDS demanda gran cantidad de recursos energéticos debido a las condiciones requeridas [4].

Por esa razón se han hecho esfuerzos para desarrollar mejores tecnologías para el tratamiento y descontaminación de aguas y de productos de petróleo buscando el compromiso de ofrecer eficiencia y disminuir costos. Este artículo se enfoca las propiedades fotocatalíticas del sistema de Óxido de Magnesio (MgO) / Óxido de Titanio (TiO<sub>2</sub>) y como fase activa los metales de transición Níquel (Ni) y Molibdeno (Mo) realizando el estudio en la reacción de dos moléculas modelo: ADM y DBT.

## TEORÍA

### Catálisis

La catálisis se define como el aumento en la velocidad de una reacción química debido a presencia de una o unas sustancias externas llamadas catalizadores sin alterar el equilibrio de la reacción. Una reacción catalizada ocurre mediante la formación de enlaces entre el catalizador y los reactivos y simultáneamente se reduce la energía de activación de la reacción. Existen varios tipos de catálisis, como por ejemplo, la catálisis homogénea, en la que generalmente las reacciones ocurren en fase gas o en disolución y donde el catalizador y el sistema de reacción forman un sistema homogéneo de una sola fase; la catálisis enzimática, que es una reacción bioquímica donde participan compuestos proteicos complejos llamados enzimas que también tienen carácter homogéneo; y la catálisis heterogénea, donde los fenómenos fisicoquímicos o reacciones ocurren en la región superficial de un catalizador, y que se presentan más de una fase, como por ejemplo, sólido-líquido, o líquido-líquido. Ésta última es de gran importancia en la industria química enfocada a la protección del medio ambiente, ayudando a la reducción del impacto de las emisiones contaminantes. [5] Las características principales de un catalizador son:

- Sitio Activo: Es el área superficial del soporte donde se lleva a cabo la reacción.
- Fase Activa: Es el compuesto, agente activo o fase cristalográfica en el soporte que proporciona las propiedades catalíticas. Se refiere a la sustancia catalítica que, siendo generalmente metales, se deposita en la superficie del soporte que acelera la reacción química.
- Área Activa del Catalizador: Se comprende como la dispersión de la fase activa en los poros o superficie del soporte.

### Fotocatálisis

La fotocatalisis es un fenómeno catalítico donde forma parte la absorción de luz por parte de un sustrato o un catalizador. Se puede definir como la aceleración de una reacción por efecto de la luz utilizando un catalizador y que depende de la capacidad del catalizador para generar pares electrón-

huevo. En este proceso se generan radicales libres, que pueden sufrir una reacción secundaria, como, por ejemplo, el radical hidroxilo que descompone compuestos orgánicos y algunos inorgánicos. Cuando la degradación se realiza en medio acuoso se logra la mineralización y la oxidación del contaminante orgánico, es decir, los compuestos orgánicos se transforman en compuestos más inocuos, como  $N_2$  o  $CO_2$  [6].

### Sol-gel

El método de Sol-Gel adquirió relevancia al ser utilizado en varios ámbitos para preparar óxidos inorgánicos de diferentes tipos donde los precursores característicos son alcóxidos y cloruros metálicos. Un Sol es una suspensión coloidal de partículas sólidas más densas que el líquido circundante; estas partículas deben ser lo suficientemente pequeñas para que las fuerzas responsables de la dispersión sean mayores a las de la gravedad. Un Gel es una red porosa tridimensionalmente interconectada que se expande de manera estable en todo medio líquido y solo está limitada por el tamaño del recipiente que lo contiene. La síntesis se inicia con una suspensión coloidal Sol, que posteriormente se gelificará formando una red en una fase líquida continua llamada Gel, mismo que es secado o se deja reposar a temperatura ambiente, llamándole a esta etapa "envejecimiento", donde el agua y solvente residual se elimina y se forma un Xerogel. Después de dar un tratamiento térmico para crear una mayor policondensación y así mejorar la estabilidad estructural y las propiedades mecánicas. Este método se utiliza mayormente en la fabricación de nanomateriales de óxidos metálicos, partiendo de una solución que actúa como precursor de una red integrada de partículas discretas o poliméricas [7].

### Óxido de Magnesio (MgO)

El MgO es de fácil obtención y de bajo costo. Tiene una estabilidad térmica, químicamente muy activo, se combina con la mayoría de los no metales y con casi todos los ácidos, no reacciona con sustancias orgánicas como hidrocarburos y aldehídos, como catalizador es utilizado como promotor de reacciones orgánicas de deshalogenación, reducción entre otras [8].

### Dióxido de Titanio ( $TiO_2$ )

El  $TiO_2$  es de las sustancias más utilizadas como catalizador, debido a sus excelentes propiedades eléctricas, es insoluble, no es tóxico, por su selectividad en el espectro de absorción, químicamente es muy estable, es un óxido de tipo anfótero, refleja la mayoría de la radiación electromagnética, absorbe luz UV, y principalmente su bajo costo. Para el  $TiO_2$ , existen tres estructuras cristalinas, la fase broquita, la fase anatasa y la fase rutilo [9].

### Sistema Binario MgO/ $TiO_2$

Un sistema binario está formado por moléculas con dos elementos diferentes. Un óxido metálico se forma con la combinación de un metal con el oxígeno. La mezcla de dos óxidos es el resultado de la unión de 2 óxidos metálicos. Los óxidos mixtos de metales de transición poseen propiedades físicas, estructurales, ácidas y básicas diferentes a las propiedades de los óxidos metálicos simple de los que provienen. En el caso del sistema MgO/ $TiO_2$ , su comportamiento es básico, pero en este caso no es por el contenido de MgO si no por la sustitución de los iones de Ti por los iones de Mg lo que provoca que la estructura cristalina se deforme. En la Figura 1 [10] se muestra el diagrama de fases obtenido por reacción al estado sólido de la mezcla, cabe resaltar que, al ser realizado en un proceso que se lleva a cabo en equilibrio termodinámico, no permite la extrapolación de las condiciones de síntesis reales, como en el caso del sol-gel, pero sí permite la predicción de las fases que existen cuando se dan los procesos de tratamiento térmico. Se observa que existe la presencia de tres productos intermetálicos en equilibrio:  $Mg_2TiO_4$ ,  $MgTiO_3$  y  $MgTi_2O_5$ ; sin embargo, es incierta la relación estequiométrica de las

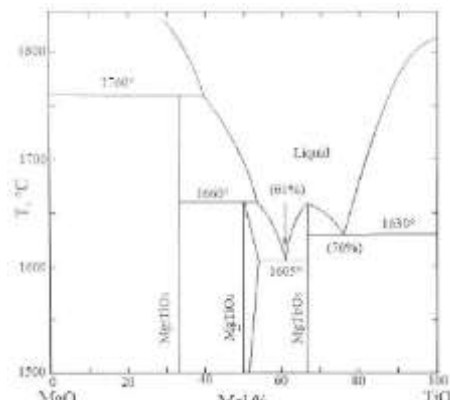


Figura 1. Diagrama del estado - líquido - sólido entre MgO y  $TiO_2$

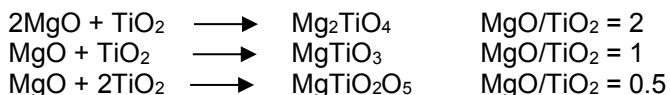
fases en este sistema cuando se ha trabajado en sistemas fuera del equilibrio, como, por ejemplo, en procesos de reacción del estado sólido. Alain C. Pierre [11] menciona que dos de las diferencias principales que existen entre los procesos llevados en equilibrio termodinámico y los sol-gel es que, debido a que en la fase del gel existe una estructura en la que se encuentran los componentes presentes de las fases ya enlazados. Esto permite la reducción de energía necesaria para la cristalización del sistema, razón por la que es común que las temperaturas de obtención sean menores en las rutas sol-gel.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Síntesis de fases

La formación de compuestos químicos de MgO-TiO<sub>2</sub> se llevó a cabo por el método sol-gel utilizando como precursores Butóxido de Titanio (97% Sigma Aldrich), y Acetato de Magnesio Tetrahidratado (99% Sigma Aldrich). Partiendo de estos precursores, se sintetiza el Sol 1 de Ti y el Sol 2 de Mg respectivamente de manera individual en agitación constante a temperatura ambiente. Para la preparación de un mol de sol 1 se utilizan 0.45 mol de Butóxido de Titanio y 2.68 mol de Ácido Acético Glacial, en agitación constante se adicionan 2.25ml de Isoporpanol y 0.22 mol de Tritón X-100. Para obtener el sol 2, se prepara una solución con 0.66 mol de Acetato de Magnesio en agitación constante se adicional 1ml de Ácido Oxálico a 1 M. Tomando como referencia la Figura 1., se definen las fases propuestas a elaborar (Mg<sub>2</sub>TiO<sub>4</sub>, MgTiO<sub>3</sub> y MgTi<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) y las reacciones molares necesarias de cada óxido (MgO/TiO<sub>2</sub> = 2, 1 y 0.5) estos se extrapolan a un sistema sol-gel para sintetizar cada fase conforme a la figura 2.

Las reacciones químicas propuestas que se llevan a cabo en las calcinaciones se presentan a continuación:



Se obtienen un total de 5 muestras: MgO, TiO<sub>2</sub>, Mg<sub>2</sub>TiO<sub>4</sub>, MgTiO<sub>3</sub>, MgTi<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Las muestras fueron divididas en 4 o 5 porciones y cada una tratada térmicamente a diferentes temperaturas: 500°C, 700°C, 900°C y 1100°C (solo en el caso para las muestras Mg<sub>2</sub>TiO<sub>4</sub> y MgTi<sub>2</sub>O<sub>5</sub> se trataron unas muestras extra de 1400°C) obteniendo un comparativo estructural, y analizar el efecto de la temperatura. El análisis estructural de los polvos obtenidos en esta parte de la experimentación se realiza mediante Difracción de Rayos X (RDX) y por Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) para el análisis morfológico.

### Impregnación de soporte con metales

La impregnación de un catalizador es un proceso que ocurre en 3 etapas:

- Impregnación: Esta etapa permite el contacto del soporte con la solución acuosa de precursores metálicos de Ni y Mo; los precursores utilizados son Nitrato de Níquel Hexahidratado y de Heptamolibdato de Amonio en relación 1:1 molar de Ni y Mo disueltos en agua.
- Secado: la etapa de secado a 100°C por 24 horas para eliminar el agua residual de la superficie y del interior de los poros del soporte.
- Activación: La activación de los metales se hace mediante la calcinación de los soportes secos a 400°C por 3 horas para llevarlos en forma de óxidos (NiMoO<sub>3</sub>) los cuales son la forma activa de los metales.

Una vez impregnados los soportes se analizan por DRX para corroborar la presencia de metales en forma de óxidos (Figuras no mostradas).



Figura 2. Diagrama de Flujo para mezcla de los elementos óxidos de los catalizadores



### Pruebas Fotocatalíticas

Para realizar las pruebas de fotocatalisis se utiliza moléculas modelo ADM y DBT. La primera molécula se expuso a la luz UV a 365 nm por 1 hora en 20ml de solución acuosa de ADM con una concentración de 20 ppm, utilizando 100mg de catalizador impregnado Ni/Mo = 1, tomando alícuotas a diferentes tiempos para analizarlas en el espectrofotómetro UV-vis. La segunda se expuso a la luz por 3 horas 10 ml de solución de DBT con una concentración de 1500 ppm disueltas en n-hexano utilizando nuevamente 100mg de catalizador impregnado Ni/Mo = 1 y finalmente las muestras líquidas de la reacción se analizan en el cromatógrafo de gases.

### Modificación de contenido de metales en el soporte (impregnación)

Posterior a las pruebas fotocatalíticas y una vez evaluada la capacidad fotocatalítica de cada fase, se selecciona el catalizador con mejores resultados y se modifica la relación de fase activa, con el objetivo de definir si la relación sobre la superficie influye en la capacidad catalítica. Durante esta etapa, el proceso de impregnación se modifica de la siguiente manera:

- Impregnación: Partiendo de los precursores nitrato de níquel hexahidratado y heptamolibdato de amonio tetrahidratado las relaciones molares de Ni y Mo cambian a 1.25 y 0.75
- Secado: 100°C por 24 horas
- Activación 400°C por 3 horas

Una vez impregnados los soportes se procede a realizar las pruebas fotocatalíticas con las moléculas modelo ADM y DBT con las mismas condiciones con las pruebas anteriores para asegurar la repetitividad en la experimentación. De igual manera, los catalizadores impregnados se caracterizaron con un DRX (Figuras no mostradas).

## RESULTADOS

Los gráficos y datos obtenidos durante la experimentación fueron reportados, interpretados y analizados describiendo las observaciones los resultados más significativos. En la Figura 3, se observa el procedimiento general de experimentación.

Figura 3. Procedimiento general de la experimentación.

Síntesis	MgO y TiO <sub>2</sub>	MgO/TiO <sub>2</sub> =2 Mg <sub>2</sub> TiO <sub>4</sub>	MgO/TiO <sub>2</sub> =1 MgTiO <sub>3</sub>	MgO/TiO <sub>2</sub> =0,5 MgTi <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Tratamiento térmico. Caracterización: DRX	500 °C, 700 °C, 900 °C, 1100 °C	500 °C, 700 °C, 900 °C, 1100 °C, 1400° C	500 °C, 700 °C, 900 °C, 1100 °C	500 °C, 700 °C, 900 °C, 1100 °C, 1400 °C
Impregnación. Caracterización: DRX	N/A	Ni/Mo=1	Ni/Mo=1	Ni/Mo=1
Fotocatalisis. Caracterización: UV-vis y CG	N/A	Pruebas en: • AM por 1 hora • DBT por 3 horas	Pruebas en: • AM por 1 hora • DBT por 3 horas	Pruebas en: • AM por 1 hora • DBT por 3 horas
Impregnación	N/A	Relación • Ni/Mo=0,75 • Ni/Mo=1,25	Relación • Ni/Mo=0,75 • Ni/Mo=1,25	Relación • Ni/Mo=0,75 • Ni/Mo=1,25
Fotocatalisis. Caracterización: UV-vis y CG	N/A	Pruebas en • AM por 1 hora • DBT por 3 horas	Pruebas en • AM por 1 hora • DBT por 3 horas	Pruebas en • AM por 1 hora • DBT por 3 horas

De acuerdo con los datos obtenidos tanto del MgO como del TiO<sub>2</sub>, se obtuvieron para el primero, fase periclasa, estructura cúbica, y para el segundo, anatasa y rutilo con estructuras tetragonales, para corroborar que efectivamente los soportes de catalizadores correspondan a los compuestos que componen los productos (gráficas y tablas no mostradas). De acuerdo a Tabla 1, los 2 últimos experimentos poseen una fase pura de Mg<sub>2</sub>TiO<sub>4</sub>. En el caso de la Tabla 2, la composición los dos compuestos permanecen constantes (MgTiO<sub>3</sub> al 83% y Mg<sub>2</sub>TiO<sub>4</sub> al 17%). En cuanto a la tabla 3, se percibe un aumento de composición de forma Ortorrómbica conforme la temperatura aumenta. Finalmente, en la tabla 4 son las tres estructuras de soportes seleccionadas para contener el catalizador Ni/Mo.

Tabla 1. Tabla de fases presentes en función del tratamiento térmico MgO/TiO<sub>2</sub> = 2.

Mg <sub>2</sub> TiO <sub>4</sub>			
T (°C)	Fase(s) Presente(s)	Estructura	Composición (%)
500	-	-	-
700	Mg <sub>2</sub> TiO <sub>4</sub> MgTiO <sub>3</sub>	Cúbica Romboédrica	78 22
900	Mg <sub>2</sub> TiO <sub>4</sub> MgTiO <sub>3</sub>	Cúbica Romboédrica	49 51
1100	Mg <sub>2</sub> TiO <sub>4</sub>	Cúbica	100
1400	Mg <sub>2</sub> TiO <sub>4</sub>	Cúbica	100

Tabla 2. Tabla de fases presentes en función del tratamiento térmico MgO/TiO<sub>2</sub> = 1.

MgTiO <sub>3</sub>			
T (°C)	Fase(s) Presente(s)	Estructura	Composición (%)
500	-	-	-
700	MgTiO <sub>3</sub> Mg <sub>2</sub> TiO <sub>4</sub>	Romboédrica Cúbica	83 17
900	MgTiO <sub>3</sub> Mg <sub>2</sub> TiO <sub>4</sub>	Romboédrica Cúbica	83 17
1100	MgTiO <sub>3</sub> Mg <sub>2</sub> TiO <sub>4</sub>	Romboédrica Cúbica	83 17

Tabla 3. Tabla de fases presentes en función del tratamiento térmico MgO/TiO<sub>2</sub> = 0.5

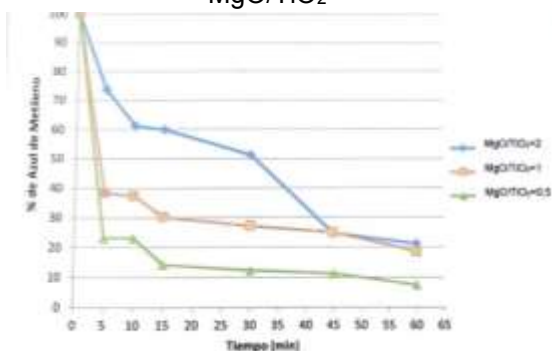
MgTi <sub>2</sub> O <sub>5</sub>			
T (°C)	Fase(s)	Estructura	Composición (%)
500	MgTi <sub>2</sub> O <sub>5</sub> Mg <sub>2</sub> TiO <sub>4</sub>	Ortorrómbica Cúbica	9 7
700	MgTi <sub>2</sub> O <sub>5</sub> Mg <sub>2</sub> TiO <sub>4</sub> MgTiO <sub>3</sub>	Ortorrómbica Cúbica Romboédrica	29 15 57
900	MgTi <sub>2</sub> O <sub>5</sub> Mg <sub>2</sub> TiO <sub>4</sub> MgTiO <sub>3</sub>	Ortorrómbica Cúbica Romboédrica	52 13 35
1100	MgTi <sub>2</sub> O <sub>5</sub> Mg <sub>2</sub> TiO <sub>4</sub> MgTiO <sub>3</sub>	Ortorrómbica Cúbica Romboédrica	56 14 30
1400	MgTi <sub>2</sub> O <sub>5</sub> Mg <sub>2</sub> TiO <sub>4</sub> MgTiO <sub>3</sub>	Ortorrómbica Cúbica Romboédrica	64 6 30

Tabla 4. Tabla de tratamiento térmico de MgO/TiO<sub>2</sub> para soporte de catalizador Ni/Mo.

Sistema molar	Contenido		T (°C)	Fase con mayor presencia
	MgO (%)	TiO <sub>2</sub> (%)		
MgO/TiO <sub>2</sub> =2	66	34	1100	Mg <sub>2</sub> TiO <sub>4</sub>
MgO/TiO <sub>2</sub> =1	50	50	900	MgTiO <sub>3</sub>
MgO/TiO <sub>2</sub> =0.5	34	66	1400	MgTi <sub>2</sub> O <sub>5</sub>

Una vez obtenido los sistemas binarios con fase de mayor presencia, se procedió a impregnar cada a Ni/Mo 1:1 y medir su efecto catalizador en presencia de rayos UV a 365 nm. Como se observa en la Gráfica 1, el sistema Mg/TiO<sub>2</sub> = 0.5 calcinado a 1400°C posee la mayor conversión de reacción de ADM de los 3 sistemas. En cuanto a la Gráfica 2, se observa que aumentando la concentración de los elementos catalíticos impregnados (Ni/Mo a 1.25) aumenta aún más conversión de reacción hasta un 93%. Por otro lado, como se observa en la gráfica 3, el mismo sistema Mg/TiO<sub>2</sub> = 0.5 calcinado a 1400°C se usó para medir la conversión del DBT y se puede ver que la concentración de elementos catalíticos impregnados más eficientes fue el de Ni/Mo 1:1 aunque su conversión no fue la misma a la alcanzada con el ADM después de 3 horas (aproximadamente 67%).

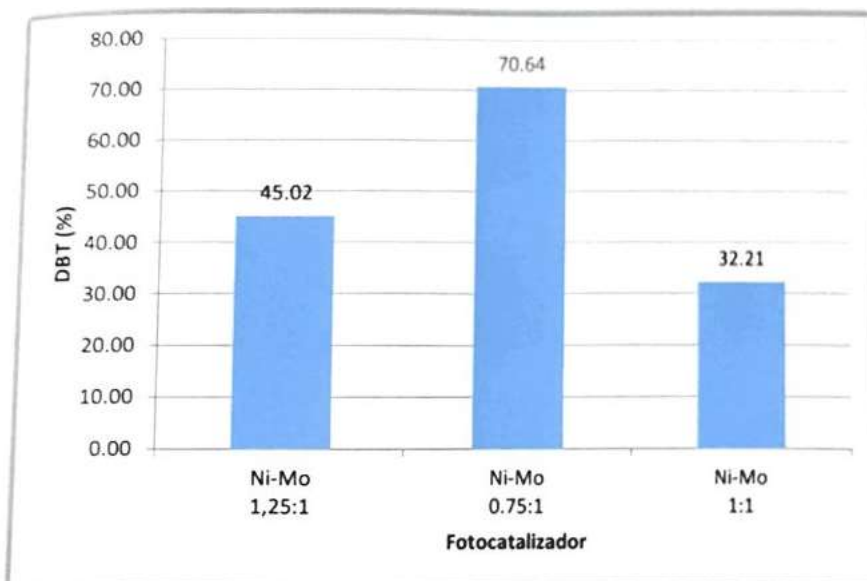
Gráfica 1. Porcentaje de conversión del ADM sobre tiempo usando los 3 sistemas binarios MgO/TiO<sub>2</sub>



Gráfica 2. Porcentaje de conversión del ADM sobre tiempo usando las 3 concentraciones distintas de Ni/Mo usando como soporte MgO/TiO<sub>2</sub> = 0.5



Gráfica 3. Porcentaje de conversión del DBT después de 3 horas usando las 3 concentraciones distintas de Ni/Mo usando como soporte MgO/TiO<sub>2</sub> = 0.5



## CONCLUSIONES

Los resultados de las pruebas de fotocatalisis con el sistema binario MgO/TiO<sub>2</sub> = 0.5 muestran en las soluciones de ADM y DBT una degradación de 93% y 68% respectivamente. Este posiblemente se debe a que la estructura Ortorrónica ofrece una mayor área de contacto con los reactivos y así aumentar la velocidad de conversión. En este trabajo, la degradación de ADM por parte del catalizador de mezcla MgO/TiO<sub>2</sub> = 0.5 muestra que una gran eficiencia (mayor al 90%), mientras que en el DBT se sugiere mayor investigación y experimentación para alcanzar mayor porcentaje de degradación que probablemente se debe a su forma de anillos doble que no permite ser muy reactivos con catalizadores.

## BIBLIOGRAFÍA

1. L. M. C. Suárez, "Introducción a la Catálisis Heterogénea", Bogotá, "pp. 34-35, 2002.

2. Zhu C., Feng, Q., Ma, H., Wu, M., Wang, ..., and Wang Z. (2018) . "Effect of methylene blue on the properties and microbial community of anaerobic granular sludge", *BioRes.* 13(3),6033-6046
3. S. A. Ali. "Development of improved catalysts for deep HDS of diesel fuels", *Appl Petrochem Res*, vol. 4 pp 404 – 415, 2014.
4. N.S. El-Gendy, J.G. Speight,"Handbook of Refinery Desulfurization" (CRC Press, Estados Unidos de América, 2016 pp. 213-218 2016
5. C. Adán, "Fotocatalizadores nanoestructurados de TiO<sub>2</sub> y Fe-TiO<sub>2</sub> para la degradación de compuestos aromáticos en medio acuoso empleando luz solar", Instituto de Catálisis y Petroquímica, Universidad Autónoma de Madrid, 2008.
6. J. Rodríguez, "El Fotocatalizador: síntesis, propiedades y limitaciones, Plataforma Solar de Almería, 2005 pp. 135- 152.
7. E. I. KO, "Preparing Catalytic Materials by Sol-Gel Method", *Ing. Eng. Chem. Res*, vol. 34, pp. 421 – 433. 1995.
8. N.M. Julkapli., S. Bangheri. "Magnesium oxide as a heterogeneous catalyst support". *Reviews in organic chemistry*, 36(1), 1-41
9. Nervárez-Martinez, M. Espinoza-Montero, P.J., Quiroz-Chávez, F.J. y Ohtani, B. "Fotocatálisis: inicio, actualidad y perspectivas a través del TiO<sub>2</sub>", *Avances en química*, p45-59, 2017.
10. I. Shindo," Determination of the phase diagram by the slow cooling float zone method: The system MgO-TiO<sub>2</sub>", *Journal of Crystal Growth*, vol. 50,4 pp. 839-851, 1980.
11. A. C. Pierre, *Introduction to Sol-Gel Processing*", New York, Springer, 2002.

## IMPORTANCIA ETNOBOTÁNICA, FITOQUÍMICA Y FARMACOLÓGICA DE *HYPTIS SUAVEOLENS* L. POIT

Oscar Antonio Sánchez-Aguirre<sup>1</sup>, Marina Guevara-Valencia<sup>2</sup>, Leticia Margarita Cano-Asseleih<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Biomédicas, <sup>2</sup>Facultad de Ciencias Químicas-Orizaba, <sup>3</sup>Centro de Investigaciones Tropicales. Universidad Veracruzana.  
oskar.aguirre92@gmail.com

### RESUMEN

*Hyptis suaveolens* L. Poit (*Lamiaceae*) es conocida en México como chia, chia cimarrona, chían, hierba del burro o salvia cimarrona. Es una planta aromática que mide hasta 2 m de altura, originaria de América y suele encontrarse en climas cálido, semicálido y templado entre los 50 y 1000 msnm. De acuerdo con el "Códice Florentino" de mediados del siglo XVI, esta planta se usaba para "carencia de cámaras" (diarrea) y se utilizaba la semilla cruda y molida tanto en pasta como en zumo. Usos medicinales que se indican en esa época, incluían casos de mujeres que no podían parir y las personas que escupían sangre con tos y para este último padecimiento se indicaba la raíz. Actualmente en la medicina tradicional mexicana, esta especie se indica para el tratamiento de diarrea y padecimientos gastrointestinales como disentería, dolores estomacales y latido. También destaca su uso alimenticio en la preparación de licores y como insecticida. Los estudios científicos de la especie reportan que en la raíz y en los aceites esenciales de las partes aéreas se han identificado monoterpenos como borneol, canfeno, alcanfor, 1-8-cineol, *p*-cimeno, felandreno, limoneno, linalol, fenol, eucaliptol, terpinoleno, sabineno y tujano, los sesquiterpenos  $\beta$ -cariofileno, alo-aromadendreno, bicilgermacreno, (Z)-trans- $\alpha$ -bergamotol. También se ha detectado la presencia de los triterpenos  $\beta$ -amirina,  $\beta$ -sitosterol, ácido oleanólico, ácido ursólico y lupeol entre otros componentes. La variedad de metabolitos secundarios identificados en *H. suaveolens* seguramente tiene relación con su diversa actividad farmacológica. Tal es el caso del efecto antioxidante por la presencia de compuestos polifenólicos y flavonoides que le han conferido la propiedad de proteger del estrés oxidativo a los componentes no polares de la membrana celular. Se ha reportado una acción anticancerígena del extracto etanólico el cual activa el proceso de apoptosis por inhibición de la proteína anti-apoptótica Bcl2 frente a líneas celulares de cáncer. Se ha confirmado una actividad antibacteriana y antifúngica importante, más pronunciada en bacterias Gram (+) y en hongos como *Aspergillus* spp., debido a sus componentes fenólicos y flavonoides presentes en el aceite esencial. Se ha demostrado que el extracto etanol-agua 50:50 ejerce una acción anti-hiperglicémica en la que se ha visto el mejoramiento del transporte y secreción vesicular de insulina. También se ha reportado un efecto hepatoprotector y anti-inflamatorio de los metabolitos suaveolol y suaveolato de metilo en modelos *in vivo*.

### INTRODUCCIÓN

El uso de plantas aromáticas y medicinales ha sido parte de nuestra historia y costumbres. Las propiedades especiales de estas plantas son utilizadas como remedio para combatir todo tipo de enfermedades desde tiempos prehistóricos [1]. Su aprovechamiento comenzó con la constante experimentación de diversos materiales vegetales, que de acuerdo a sus características únicas ofrecían agradables aromas, sabores en los alimentos, alivio del dolor y cura de enfermedades [2]. Actualmente, el mercado de hierbas aromáticas y medicinales se considera un negocio de nichos o especialidades [3], destaca la albahaca como la principal hierba aromática que se produce en México para exportación. No obstante, no se dispone de un diagnóstico básico de la situación de las hierbas aromáticas en nuestro país.

El potencial de las plantas para curar la enfermedad es conocido desde siempre en todas las sociedades. El desarrollo de la química permitió el aislamiento de algunos de los elementos activos de las plantas y, en la mayoría de los casos, se pudo reproducir la actividad de los extractos crudos con la dosis equivalente del principio activo aislado. Luego, se logró sintetizar estos principios activos o moléculas bioactivas estructuralmente relacionadas a él [4].

*Hyptis suaveolens* (L.) Poit es una planta con un uso potencial en la industria farmacéutica y alimentaria que se desarrolla en las zonas tropicales. Se utiliza para la elaboración de bebidas. En

estudios realizados sobre su valor nutrimental se encontró que en su forma silvestre es muy pobre, pero las formas domesticadas son excelentes aportadores nutricionales.

Tradicionalmente *H. suaveolens* es usado como agente para combatir indigestión, dolor de estómago, náusea, flatulencias, cólico, así como infecciones de la piel, este caso es común en los trópicos de América.

La mayoría de los estudios farmacológicos de *H. suaveolens* se han realizado en la India, así como en Sudamérica y se ha demostrado que el aceite esencial presenta una fuerte actividad inhibitoria del crecimiento de hongos, bacterias y patógenos [5]. Por esta razón, en el presente trabajo se discutirá la importancia etnobotánica, fitoquímica y farmacológica de *H. suaveolens*.

### ***Hyptis suaveolens* (L.) Poit.**

*H. suaveolens*, conocida en México con los nombres comunes chía, chía cimarrona, chían, confitura, hierba del burro, salvia cimarrona, pertenece a la familia *Lamiaceae*. En esta familia se incluyen especies comerciales importantes, alimenticias y medicinales como la albahaca (*Ocimum basilicum*), menta (*Mentha piperita*), orégano (*Origanum vulgare*), romero (*Rosmarinus officinalis*) y tomillo (*Thymus vulgare*) [6,7]. *H. suaveolens*. Originaria de México y Sudamérica, se encuentra ampliamente distribuida en México, a lo largo de zonas montañosas y en el eje Neovolcánico transversal en los estados de Campeche, Chiapas, Chihuahua, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Quintana Roo, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Veracruz y Yucatán (Figura 1).



Figura 1. Distribución geográfica de *H. suaveolens* en México.

Con base en la descripción de A. Pool, *H. suaveolens* es una hierba o arbusto pequeño, toscó, aromático o con olor fétido, muy ramificado que llega a medir hasta 2 m de alto. El tallo es cuadrangular, erecto, piloso (con pelos) hasta velutino (aterciopelado). Sus hojas pueden ser opuestas, ovadas (con forma de huevo) o lanceoladas (con forma de lanza), oblongas (más largo que ancho) o elípticas, de 2.5 a 10 cm de largo por 1.3 a 6.5 cm de ancho. Tiene inflorescencias en las cimas (inflorescencia de aspecto ancho y redondeado) axilares y pseudoterminales de 0.5 a 1 cm de largo por 0.7 a 1.5 cm de ancho. Posee de 4 a 8 flores que son en forma de cáliz de 4.2 a 6 mm de largo, externamente veloso (pelos suaves y largos) con glándulas, internamente glabro (sin pelos) con densos tricomas (pelos), dientes espiniformes (en forma de espina), erectos-patentes (dirigido hacia arriba con un ángulo de divergencia de 46 a 75°), desde 1.2 y más común de 2 a 2.5 mm de largo; corola azul, purpúrea, blanca o purpúrea con manchas blancas, tubo de 5 a 7 mm de largo, limbo (lámina) de 1.8 a 3 mm de largo. Su fruto es un cáliz fructífero de 8 a 13 mm de largo por 4 a 7 mm de ancho, dientes de 1.7 a 3 mm de largo; su fruto es una nuececilla de 3 a 4 mm de



largo, generalmente solo dos, glabra [8] (Figura 2). Tanto las plantas enteras como las flores pueden variar conspicuamente en su coloración, incluso en la misma población [9].



Figura 2. *Hyptis suaveolens* (L.) Poit

#### Etnobotánica de *H. suaveolens*

En el Código Florentino de mediados del siglo XVI, se indica que la semilla cruda y molida de *H. suaveolens* se utilizaba para las “carencias de cámaras” (diarrea), tanto en pasta como en zumo, además que se utilizaba para mujeres que no podían parir, para lo cual se tomaba la semilla molida en agua, y superaban así su deficiencia. También se menciona que la raíz molida se recomendaba para los que padecían de tos y escupían sangre. No obstante, a inicios del siglo XVIII Juan de Esteyneffer menciona que esta especie también era usada como refrescante para los enfermos de calenturas [10].

Actualmente, de acuerdo con reportes de esta especie, el uso más común que se indica es para el tratamiento de la diarrea, empleando las hojas para preparar un té. En el estado de Oaxaca esta especie se utiliza como antiséptico. En el estado de Veracruz se utiliza como antiespasmódica, para la disentería, para el dolor de estómago y como antipirético pediátrico. En general sus usos son más enfocados a problemas gastrointestinales [11].

Destaca el uso de esta especie como alimento en la preparación de una bebida refrescante, endulzada con piloncillo la cual es conocida como “bate”. También se consume como agua fresca. De igual forma, se utiliza como alimento para adelgazar y la harina de la semilla es mezclada con sorgo o harina de trigo y es usada para elaborar pastelillos y galletas horneadas [12].

#### Fitoquímica de *H. suaveolens*

Muchas de las propiedades terapéuticas que se les atribuyen a las plantas provienen principalmente de los metabolitos secundarios que son compuestos químicos derivados del metabolismo secundario de la biosíntesis, transformación y degradación de procesos de diferenciación, clasificándose de acuerdo a su significado biológico y función en la planta. Ejemplo de estos compuestos son los flavonoides, quinonas, taninos, cumarinas, terpenoides y alcaloides, entre otros [13].

Estos compuestos cumplen diferentes funciones relacionadas con mecanismos de defensa frente a animales y/o insectos; como atrayentes de polinizadores; brindan protección frente a estrés por factores abióticos como temperatura, humedad y presión, entre otros; mantienen la integridad estructural de la planta; regulan el crecimiento y desarrollo, entre otros [14]. En ciertos casos, estos

compuestos actúan en las relaciones de competencia entre plantas, es decir, con propiedades alelopáticas y contra la invasión de microorganismos como hongos, bacterias y virus.

Muchos de los fármacos utilizados actualmente son producidos con sustancias que se extraen de las plantas, o productos derivados de ellas. Esto se sustenta en el hecho de que el 85% de los compuestos biológicamente activos son de origen natural y el 15% restante se obtienen en el laboratorio con diferentes procesos de síntesis química, siendo casi el 30% de ambas estructuras de origen vegetal [15].

*H. suaveolens* es una hierba aromática que posee una gran variedad de metabolitos secundarios entre los que destacan en su aceite esencial los mono y sesquiterpenos y en sus extractos los terpenos (di y triterpenos) y flavonoides que son los principales grupos de metabolitos que se encuentran en esta especie, como se indica a continuación (tabla 1).

Tabla 1. Metabolitos secundarios identificados en *H. suaveolens*.

Estructura	Compuesto	Grupo de metabolito	Parte de la planta	Referencia
1	Felandreno	Monoterpenos	Hojas	[16]
2	Limoneno		Hojas	[16]
3	1,8-cineol		Hojas	[16]
4	Fenchona		Hojas	[16]
5	E-cariofileno		Hojas	[16]
6	Germacreno		Hojas	[16]
7	Sabineno		Hojas	[17]
8	$\gamma$ -terpineno		Hojas	[17]
9	Fenchol		Hojas	[17]
10	Eucaliptol		Hojas	[18]
11	$\alpha$ -pineno		Hojas	[19]
12	<i>p</i> -cimeno		Hojas	[19]
13	Terpinen-4-ol		Hojas	[19]
14	Terpinoleno		Hojas	[19]
15	5-caranol		Hojas	[20]
16	$\alpha$ -humuleno		Hojas	[20]
17	Cis-sabinol		Hojas	[20]
18	Alcanfor		Hojas	[20]
19	6-hidroxicarvotanacetona		Hojas	[21]
20	Terpinen-4-ol		Hojas	[21]
21	3-ciclohexen-1-carboxaldehido		Partes aéreas	[22]
22	Tujano	Partes aéreas	[22]	
23	$\beta$ -cariofileno	Sesquiterpeno	Hojas	[17]
24	Alo-aromadendreno		Hojas	[20]
25	Trans- $\alpha$ -bergamoteno		Hojas	[21]
26	Óxido de cariofileno		Hojas	[21]
27	Biciclogermacreno		Hojas	[21]
28	(Z)-trans- $\alpha$ -bergamotol		Hojas	[21]
29	4,11,11-trimetil-8-metilenobicyclo[7.2.0]undec-4-eno		Partes aéreas	[22]
30	Suaveolol	Diterpeno	Hojas	[23]
31	Suaveolato de metilo		Hojas	[23]



32	Ácido suaveólico		Hojas	[23]
33	Ácido 8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -epoxisuaveólico		PC	[24]
34	Ácido isosuaveólico		PC	[24]
35	Ácido 14-O-metilsuaveólico		PC	[24]
36	Ácido 3 $\beta$ -hidroxilup-20(29)-en-27-oico		Raíz	[25]
37	Ácido oleanólico		PC	[24]
38	Ácido ursólico		PC	[24]
39	$\beta$ -sitosterol	Triterpeno	PC	[24]
40	$\beta$ -sitosterol glucósido		PC	[24]
41	Ácido hiptadiénico		PC	[24]
42	Lupeol		Hojas	[26]
43	$\beta$ -amirina		Semillas	[27]
44	Quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosido		Partes aéreas	[28]
45	Apigenina		Partes aéreas	[28]
46	Sorbifolina		Partes aéreas	[28]
47	Quercetina	Flavonoide	Partes aéreas	[28]
48	Kaempferol		Partes aéreas	[28]
49	Genkwanina		Partes aéreas	[28]
50	Rutina		PC	[29]
51	Ácido rosmarínico		Hojas	[28]
52	Rosmarinato de metilo	Polifenol	Hojas	[28]
53	Ácido gálico		PC	[29]
54	Podofilotoxina	Lignano	Raíz	[28]
55	Picropodofilotoxina		Raíz	[28]

PC= Planta completa

Estudios del aceite esencial, señalan que los componentes mayoritario de este son eucaliptol,  $\alpha$ -pineno, sabineno, *p*-cimeno, 1,8-cineol, fenchona,  $\beta$ -cariofileno y 4,11,11-trimetil-8-metilenobicyclo[7.2.0]undec-4-eno [16,17,18,19,22].

#### Farmacología de *H. suaveolens*

Un amplio número de artículos en este tema han sido publicados hasta el momento. Las investigaciones farmacológicas demostraron una gran diversidad de efectos biológicos ejercidos por extractos o compuestos aislados de *H. suaveolens*, en modelos *in vitro* e *in vivo*. Entre las principales actividades investigadas, destacan la antioxidante, antibacteriana, citotóxica, antiproliferativa, antiinflamatoria y hepatoprotectora. Las investigaciones biológicas confirmadas de *H. suaveolens* se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Farmacología de *H. suaveolens*

Parte de la planta	Extracto, fracción o compuesto aislado	Modelo experimental	Dosis o concentración	Actividad farmacológica	Referencia
Hojas	Etanólico		5 mg/mL		[30]
Partes áreas	Hexano Acetato de etilo Metanol		ND		[31]
Completa	Etanol		20-200 µg/mL		[32]
Hojas	Metanol		100-1.5 µg/mL		[33]
Partes áreas	Aceite esencial	<i>In vitro</i>	1 mg/mL	Antioxidante	[34]
Partes áreas	Aceite esencial		ND		[35]
Hojas	Cloformo Eter etílico Etanol Metanol Agua		1 mg/mL		[36]
Partes aereas	Agua		0.1-1%		[37]
Hojas	Etanólico		1 mg/mL		[30]
Hojas	Etanólico		0.5-0.022 mg/mL		[30]
Partes áreas	Aceite esencial		ND		[34]
Partes áreas	Aceite esencial		200-0.391 µg/mL		[35]
Partes aereas	Aceite esencial		10-600µg/mL		[38]
Hojas	Aceite esencial	<i>In vitro</i>	Dilución en 10% con DMSO	Antibacteriana	[39]
Hojas	Eter de petróleo Etanol		Dilución en 10% con DMSO		[40]
Completa	Hexano Cloformo Eter de petróleo Etanol Agua		200µg/mL		[41]
Hojas	Aceite esencial	<i>In vitro</i>	20,40 y 80 µg/mL	Antifúngica	[23]
Completa	Metanólico	<i>In vivo</i>	100 y 50 mL/Kg	Hepatoprotector	[42]
Hojas	Suaveolol		0.1-1 µmol/cm <sup>2</sup>		[43]
Hojas	Suaveolato de metilo	<i>In vivo</i>	0.1-1 µmol/cm <sup>2</sup>	Anti-inflamatoria	[43]
Hojas	Mentol	<i>In vitro</i>	300-18.75 µg/mL	Citotóxica	[44]

<b>Hojas</b>	Linalool		300-18.75 µg/mL		[44]
<b>Hojas</b>	Aceite esencial		300-18.75 µg/mL		[45]
<b>Hojas</b>	Etanol- Agua 50:50	<i>In vivo</i>	250 y 500 mg/kg	Anti- hiperglicémica	[46]

ND= No Descrito.

De acuerdo a lo reportado en la literatura, los flavonoides y compuestos fenólicos presentes en los extractos de *H. suaveolens* son los responsables de su fuerte actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Pseudomona aeruginosa*, *Lactobacillus plantarum*, *Escherichia coli*, *Vibrio vulnificus*, *Enterococcus fecalis* y *Streptococcus fecalis* [47]. Sin embargo, esta actividad ha mostrado ser más marcada en bacterias Gram positivas debido a que estas poseen una membrana externa hidrofílica. Por otro lado, los compuestos suaveolol y suaveolato de metilo inhiben la formación de edemas en modelos animales [47]. Lo anterior, respalda su uso tradicional para el tratamiento de problemas gastrointestinales, como la diarrea, disentería y el dolor de estómago, relacionados con infecciones causadas por bacterias como la *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, y *Enterococcus fecalis* y *Streptococcus fecalis*. El uso de *H. suaveolens* en el tratamiento de la diarrea es referido desde la época prehispánica en fuentes históricas del siglo XVI, prevaleciendo hasta nuestros días. Esto da una fuerte indicación de su efectividad, la cual ha sido confirmada por los estudios farmacológicos de sus extractos y componentes aislados.

## CONCLUSION

*H. suaveolens* tradicionalmente conocida como hierba del burro es una planta aromática con una amplia distribución en los estados del centro y sur de México. Siendo utilizada con frecuencia desde la época prehispánica para problemas gastrointestinales, particularmente en el tratamiento de diarrea y disentería, su efectividad ha sido confirmada mediante la investigación científica por su efecto antimicrobiano contra las bacterias que la provocan: *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, y *Enterococcus fecalis* y *Streptococcus fecalis*.

## BIBLIOGRAFÍA

1. E. Masarovičová, K. Král'ová. Medicinal plants: Past, Nowadays, future. *Acta Hort.* 2007; 49: 19-27.
2. L. Cracker. Medicinal and aromatic plants: future opportunities. In: Issues in new crops and new uses. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 2007; 1: 248-257.
3. T. Henkel, R. Brunne, F. Reichel. Statistical investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compounds. *Angew. Chem.* 1999; 38: 647-649.
4. P. Shengi-Pi. Ethnobotanical approaches of traditional medicine studies: some experiences from Asia. *Pharm. Bio.* 2001; 39(1): 74-79.
5. M. Vergara-Santana, S. Lemus-Juárez, R. Bayardo-Parra. Efecto de la selección artificial en el "Chan" (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit) sobre su morfología floral y la floración. *Av. Investig. Agropecu.* 2005; 9(3): 19-31.
6. P. Cantino, M. Harley, S. Wagstaff. Genera of Labiatae: status and classification. *R. Bot. Gar. Kew.* 1992: 511-522.
7. W. Judds, C. Campbell, E. Kellogg, P. Stevens, M. Donoghue. Plant Systematics: A phylogenetic approach. 3<sup>rd</sup> edition, Sinauer. 2007.
8. A. Pool. Hyptis. Origen y distribución geográfica. Flora de Nicaragua. 2009. Consultado en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/lamiaceae/hyptis-suaveolens/fichas/ficha.htm>
9. P. Standley, L. Williams. Flora de Guatemala. *Fieldiana Bot.* 1995; 24: 1-274.
10. Biblioteca digital de la medicina tradicional Mexicana. Consultado en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t=hyptis-suaveolens>

11. L. M. Cano Asseleih. Flora Medicinal de Veracruz: inventario etnobotánico. *Universidad Veracruzana*. 1997.
12. M. Vergara-Santana, L. Madrigal, L. Lemus. Obtención de harina de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit con alto nivel nutritivo y máximo desprendimiento de mucílago y su utilización en la elaboración de productos alimenticios. Patente No. 264267. Instituto Mexicano de la Propiedad Intelectual. 2008.
13. I. Daciana, I. Băra. Plant products as antimicrobial agent. *Genet. Biol. Mol.* 2007; 8:151-156.
14. D. García. Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y forrajes*. 2004; 27(1): 1-12.
15. T. Cecchini, B. Ticli. El libro de las hierbas medicinales. Barcelona: De vicchi. 2007. Pp349.
16. G. Tafurt-García, A. Muñoz-Acevedo, A. Calvo, L. Jiménez, W. Delgado. Componentes volátiles de *Eriope crassipes*, *Hyptis conferta*, *H. dilatata*, *H. brachiata*, *S. suaveolens* y *H. mutabilis* (Lamiaceae). *B. Latinoam. Caribe. Pl.* 2014; 13(3): 254-269.
17. P. Grassi, M. Nuñez, T. Urías, C. Franz. Chemical variation in the essential oil composition of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae). *Nat. Prod. Commun.* 2008; 3(7): 1137-1140.
18. A. Pessoa, E. Oliveira, P. Wanderley, E. Santos, E. Leite. Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. *Braz. J. Microbiol.* 2010; 41(1): 28-33.
19. A. Eshilokun, A. Kasali, A. Giwa-Ajeniya. Chemical composition of essential oil of two *Hyptis suaveolens* (L.) Poit leaves from Nigeria. *Flavour Fragr. J.* 2005; 20: 528-530.
20. B. Joy, M. Omanakutty, M. Mathew. Antibacterial effects and chemical composition of the essential oil of *hyptis suaveolens* Poit leaves. 2008; 11(4): 384-390.
21. C. Kossouh, V. Adjakidje, J. Chalchat, G. Figuéredo. A comparative study of the chemical composition of the leaves and fruits deriving the essential oil of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit from Benin. *J. Essent. Oil Res.* 2010; 22: 507-509.
22. M. Iwu, C. Ezeugwu, C. Okunji. Antimicrobial Activity and Terpenoids of the Essential Oil of *Hyptis suaveolens*. *Int. J. Crude Drug Res.* 1990; 28: 73-76.
23. P. Manchand. Structures of Suaveolic Acid and Suaveolol. *J. Org. Chem.* 1974; 39(15): 2306-2308.
24. S. Prawatsri, A. Suksamrarn, A. Chindaduang, T. Rukachaisirikul. Abietane Diterpenes from *Hyptis suaveolens*. *Chem. Biodivers.* 2013; 10: 1494-1500.
25. T. Misra, R. Singh, J. Upaghyay. A Natural Triterpene Acid from *Hyptis suaveolens*. *Phytochemistry*. 1983; 22(11): 2557-2558.
26. A. Saluja, D. Santani. Chemical studies of *Hyptis suaveolens* Poit. *Indian Drugs*. 1984; 21: 423-424.
27. R. Rao, V. Rao, L. Prakasa. An A-ring contracted triterpenoid from *Hyptis suaveolens*. *Phytochemistry*. 1990; 29: 1326-1329.
28. G. Tang, X. Liu, X. Gong, X. Lin, X. Lai, D. Wang, S. Ji. Studies on the chemical compositions of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. *J. Serb. Chem. Soc.* 2019; 84(3): 245-252.
29. D. Asha, L. Mathew, K. Rishad. Evaluation of HPTLC Fingerprints of Flavonoids and Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plants of Lamiaceae Family. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.* 2015; 7(2): 240-245.
30. O. Sánchez-Aguirre, A. Cruz-Navarro, M. Guevara-Valencia, E. Reginfo-Salgado, G. Vargas-Arana. Phytochemical screening, antioxidant activity and *in vitro* biological evaluation of leaf extracts of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. *S. Afr. J. Bot.* 2020; 128: 62-66.
31. H. Ghaffari, B. Ghassam, S. Nakaya, K. Kini, H. Prakash. Antioxidant and Neuroprotective Activities of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit Against Oxidative Stress-Induced Neurotoxicity. *Cell Mol. Neurobiol.* 2014; 34: 323-331.
32. K. Agarwal, R. Varma. Antioxidant Activity and Phytochemical analysis of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. *J. Adv. Pharm. Educ. Res.* 2013; 3(4): 541-549.
33. U. Gavani, P. Paarakh. Antioxidant Activity of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. *Int. J. Pharmacol.* 2008; 4(3): 227-229.
34. W. Nantitanon, S. Chowwanapoonpohn. Antioxidant and Antibacterial Activities of *Hyptis suaveolens* Essential Oil. *Sci. Pharm.* 2007; 75: 35-46.

35. D. Xu, Y. Huang, D. Jiang, K. Yuan. The essential oils chemical compositions and antimicrobial, antioxidant activities and toxicity of three *Hyptis* species. *Pharm. Biol.* 2013; 5(19):1125-1130.
36. P. Mozhiyarasi, R. Anuradha. A Study on Antioxidant Activity of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2018; 7(6): 376-382.
37. A. Sharma, A. Sharma, D. Batish. Comparative Antioxidant Activity of *Hyptis suaveolens* before and after hydrodistillation. *Int. J. Adv. Sci. Res.* 2017; 6(9): 1312-1322.
38. N. Tech, R. Márquez, X. Mendoza, L. Rojas, J. Velasco, T. Díaz, F. Mora, C. Yañez, P. Melendez. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (*Lamiaceae*) de los Llanos Venezolanos. *Rev. Peru. Biol.* 2015; 22(1): 103-107.
39. O. Taiwo, O. Ekundayo, B. Adeniyi. Antimicrobial Activity of the essential oil of *Hyptis suaveolens* leaves. *Fitoterapia.* 1999; 70: 440-442.
40. S. Mandal, K. Mondal, B. Pati. Antimicrobial Activity of the Leaf Extracts of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. *Indian J. Pharm. Sci.* 2007; 69(4): 568-569.
41. K. Sharma, K. Dabhadker. Antimicrobial Activity and Phytochemical Screening of *Hyptis suaveolens*. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2020; 11(1): 438-444.
42. H. Ghaffari, B. Jalali, H. Prakash. Hepatoprotective and Cytoprotective properties of *Hyptis suaveolens* against oxidative stress -induced damage by CCl<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 2012; 5(11): 868-874.
43. P. Grassi, T. Urías, S. Sosa, A. Tubaro, O. Hofer, K. Zitterl-Eglseer. Anti-inflammatory Activity of Two Diterpenes of *Hyptis suaveolens* from El Salvador. *Z. Naturforsch C. J. Biosci.* 2006; 61(3-4): 165-170.
44. S. Priyadarshini, V. Sujatha. Antioxidant and cytotoxic studies on two known compounds isolated from *Hyptis suaveolens* leaves. *Int. J. Phar. Pharm. Sci.* 2013; 5(4): 283-290.
45. K. Poonkodi, J. KarthikaV. Tamilselvi, R. Anitha, S. Vasanthamani. Chemical composition of essential oil of *Hyptis suaveolens* (L.) POIT and its *in vitro* anticancer activity. *J. Pharm. Res.* 2017; 11(5): 410-413.
46. S. Mishra, A. Verma, A. Murkerjee, M. Vijayakumar. Anti-hyperglycemic activity of leaves extract of *Hyptis suaveolens* L. Poit in streptozotocin induced diabetic rats. *Asian. Pac. J. Trop. Med.* 2011; 4(9): 689-693.
47. P. Mishra, S. Sohrab, S. Mishra. A review on the phytochemical and pharmacological properties of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. *Future J. Pharm. Sci.* 2021; 7(6): 1-11.

## REVISIÓN HISTÓRICA DE LOS DATOS DE COLECTA DE LA TORTUGA GOLFINA *LEPIDOCHELYS OLIVACEA* (ESCHSCHOLTZ, 1829) EN MÉXICO

Alondra Pérez Téllez<sup>1</sup>, Claudia Ballesteros-Barrera<sup>1\*</sup>, Rocío Zárate- Hernández<sup>1</sup>, Bárbara Vargas-Miranda<sup>1</sup>, Selene Ortiz Burgos<sup>2</sup> y Angélica Martínez Bernal<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Av. San Rafael Atlixco Núm. 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, 09340 Ciudad de México, México. <sup>2</sup> Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, CP 09230 Ciudad de México, México.

\*[bbc7@xanum.uam.mx](mailto:bbc7@xanum.uam.mx)

### RESUMEN

México es un país que cuenta con una gran biodiversidad de tortugas marinas. Las playas de México son sitio de anidación de seis de las siete especies de tortugas marinas reconocidas a nivel mundial, en el caso de la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) se han registrado áreas de anidación en el Pacífico. Sin embargo, en las últimas décadas se está presentando un declive de esta especie y de su ecosistema, debido al saqueo de sus huevos y a la destrucción de las playas donde anida, lo cual ha colocado a esta tortuga en la categoría de Vulnerable según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) y en Peligro de Extinción según la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Un tema importante para proponer cuestiones de la protección, recuperación y manejo de las poblaciones de las tortugas es conocer los lugares en donde anida. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue actualizar y analizar cómo se ha ido generando la información de los registros de anidación a través del tiempo en nuestro país, en qué colecciones científicas se encuentra dicha información y en qué estados y Áreas Naturales Protegidas están. Para ello se obtuvieron datos de presencia de la especie provenientes de la literatura y de colecciones científicas a través de portales digitales. La base de datos que se compiló fue depurada eliminando datos. Se analizaron los registros obtenidos para obtener un breve recuento histórico del inventario de las colectas realizadas por año y colección y se realizó una curva de acumulación de registros en intervalos de 10 años. Por medio de un Sistema de Información Geográfica se intersecaron las localidades con los polígonos de las ANP's y de los estados de la República y se calculó el número de registros que se encuentran dentro de ellos. Como resultados se obtuvo un total de 465 registros que abarcan más de 100 años de historia de colecta de datos de la especie, los cuales se encuentran depositados en 7 colecciones nacionales y 9 extranjeras, siendo la colección BITMAR, del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Unidad Académica Mazatlán, de la UNAM la que tiene el mayor número (UNAM- DGCS, 2018). De acuerdo con el recuento histórico de los registros se puede observar que a partir de finales del siglo XIX existió una tendencia constante registrar a la especie, la cual se incrementó en la década de 1990 y posteriormente decreció hasta 2019. Los registros abarcan 9 estados de México, en donde Oaxaca y Chiapas son en donde se tiene el mayor número de localidades. Con respecto a las ANP's, algunos sitios de anidación están dentro de 3 Reservas de la Biosfera, 3 Parques Naturales, 3 Áreas de Protección de Flora y Fauna y 10 Santuarios. Estos resultados sirven como base para señalar los sitios de la República en donde se requieren más monitoreos y búsqueda de lugares de anidación, en donde sería deseable implementar ANP e incrementar programas de protección en los sitios de anidación, además de los ya establecidos.

### INTRODUCCIÓN

Las tortugas marinas son unos de los vertebrados con mayor distribución alrededor del planeta, este grupo de reptiles se clasifica en dos familias con siete especies. La familia Cheloniidae cuenta con seis especies: la caguama (*Caretta caretta*), la kikila (*Natator depressus*), la tortuga Carey (*Eretmochelys imbricata*), la golfina (*Lepidochelys olivacea*), la lora (*L. kempii*), la tortuga verde (*Chelonia mydas*) y la familia Dermochelyidae con una sola especie, la tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*). Todas las especies se distribuyen en los mares tropicales y subtropicales del mundo, las playas de México son sitio de anidación de siete de las ocho especies de tortugas marinas (Abreu-Grobois, 2000; Bárcenas, 2009).

Las tortugas del género *Lepidochelys* son las más pequeñas de las tortugas marinas que existen actualmente, y es la especie de quelonio marino más abundante en las costas del Pacífico oriental (SEMARNAT, 2018). De acuerdo con Colín (2015) la tortuga golfina es una especie pantropical que habita principalmente el hemisferio Norte, con límites de distribución en las isoterma de 20°C. Durante las migraciones su dieta incluye organismos pelágicos como son las langostillas rojas (*Pleuroncodes sp.*), medusas, tunicados, huevos de peces, etc. (Márquez *et al.*, 1976). Tiene sus mayores poblaciones reproductoras en Costa Rica, México y la India (SEMARNAT, 2018). Para México la distribución potencial se observa en los estados de Colima, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca y Sinaloa (Ochoa *et al.*, 2006). Angulo (2019) menciona que los principales lugares de anidación de tortuga golfina en México se localizan en Oaxaca, Jalisco, Colima, Michoacán y Guerrero, destacando las playas de “Morro Ayuta” y “La Escobilla” en Oaxaca, así como “Ixtapilla” en Michoacán.

Si bien los trabajos de investigación sobre la tortuga golfina se han desarrollado principalmente sobre los sitios de anidación y el desarrollo embrionario, en las últimas décadas se está presentando un declive de esta especie y de su ecosistema. En México las principales amenazas para la tortuga golfina son la extracción de huevos en playa, la pesca ilegal para aprovechar su carne y caparazón, la captura incidental por artes de pesca destinadas a otros recursos marinos, la contaminación y degradación del hábitat de anidación principalmente por desmonte y cambio de uso del suelo, entre otras cosas hacer construcciones de desarrollos turísticos (Abreu-Grobois, 1999). Los niveles de impacto real no se han evaluado con precisión en la mayor parte de sus áreas de distribución (Maldonado, 2021). Debido a esto, la legislación vigente ha colocado a esta tortuga en la categoría de Vulnerable según la Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) y en Peligro de Extinción según la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2019).

Un tema importante para proponer cuestiones de la protección, recuperación y manejo de las poblaciones de las tortugas es conocer cómo se ha generado el conocimiento de la distribución de la especie y conocer dónde están los lugares en donde anida. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue analizar cómo se generando la información de los registros de anidación a través del tiempo en nuestro país, en qué colecciones científicas se encuentra dicha información, en qué estados y Áreas Naturales Protegidas están.

## MÉTODOS

Se obtuvieron los datos de las localidades de presencia *Lepidochelys olivacea* en México de los portales digitales públicos: Sistema Nacional de Información sobre Biodiversidad de México (SNIB, <https://www.snib.mx/>) y The Global Biodiversity Information Facility (GBIF; <http://www.gbif.org/>). La base de datos que se compiló con los registros fue depurada, en primera instancia se eliminaron datos duplicados y sin información correspondiente a la localidad y sin coordenadas; en caso de contar con las coordenadas, estas fueron verificadas y corregidas de ser necesario por medio de Google Earth (<https://www.google.com/intl/es-419/earth/>); además estas localidades fueron comparadas con los mapas de distribución conocida de la especie publicados en distintas fuentes de literatura (Silva, 1986; Pérez, 1998; Abreu-Grobois, 2000; Valadez *et al.*, 2000; Corte 2004; Ochoa *et al.*, 2006; Arzola, 2007; Sandoval, 2008; Bárcenas, 2009; Sandoval, 2012; Rojas *et al.*, 2014; Colín, 2015; Fonseca *et al.*, 2016; Vejar, 2016; Vega, 2016; Cervantes *et al.*, 2017; Monter y Durán, 2017; Cabrera *et al.*, 2018; Malanco-García y Cuevas, 2019; Arzola *et al.*, 2019).

Con la base de datos generada se analizó la temporalidad de los registros de las colecciones científicas para obtener un breve recuento histórico del inventario de las recolectas. Se analizó el comportamiento histórico de las recolectas en las colecciones biológicas, se cuantificaron los registros por año y por colección (Tablas 1 y 2), y se realizó una curva de los valores acumulados de registros vs. los períodos de tiempo en intervalos de 10 años.

Para conocer en qué estados de la república se han registrado los sitios de anidación, por medio de un Sistema de Información Geográfica (SIG, ArcGis10.3) se intersecaron las localidades obtenidas con una cobertura digital de los estados de la República Mexicana (INEGI, 2021) y se cuantificaron los registros por estado (Tabla 3). Finalmente, para conocer las áreas que protegen a la especie, las localidades se intersecaron con los polígonos de las Áreas Naturales Protegidas de México Federales (SEMARNAT-CONANP, 2020).

**RESULTADOS**

Las colecciones científicas son un acervo de información de la biodiversidad de suma importancia, cada ejemplar recolectado representa información biológica y geográfica valiosa, la información de la localidad asociada al ejemplar permite conocer su distribución geográfica e identificar patrones que pueden ser evaluados y analizados para interpretar sus relaciones con su entorno e influir en decisiones sobre su conservación (Cervantes-Reza, 2016). En este sentido analizar cómo se ha generado el conocimiento de los lugares donde anida de *Lepidochelys olivacea* en México es un primer paso para proponer sitios de conservación. En este trabajo se obtuvieron un total de 465 registros que abarcan más de 100 años de historia de colecta de datos de la especie, los cuales se encuentran depositados en 7 colecciones nacionales y 9 extranjeras, y existen más registros en total en las colecciones nacionales (Tabla 1), siendo el Banco de Información sobre Tortugas Marinas (BITMAR), del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Unidad Académica Mazatlán de la UNAM la que tiene el mayor número de registros de (426), mientras que las demás colecciones cuentan con menos de 6 registros

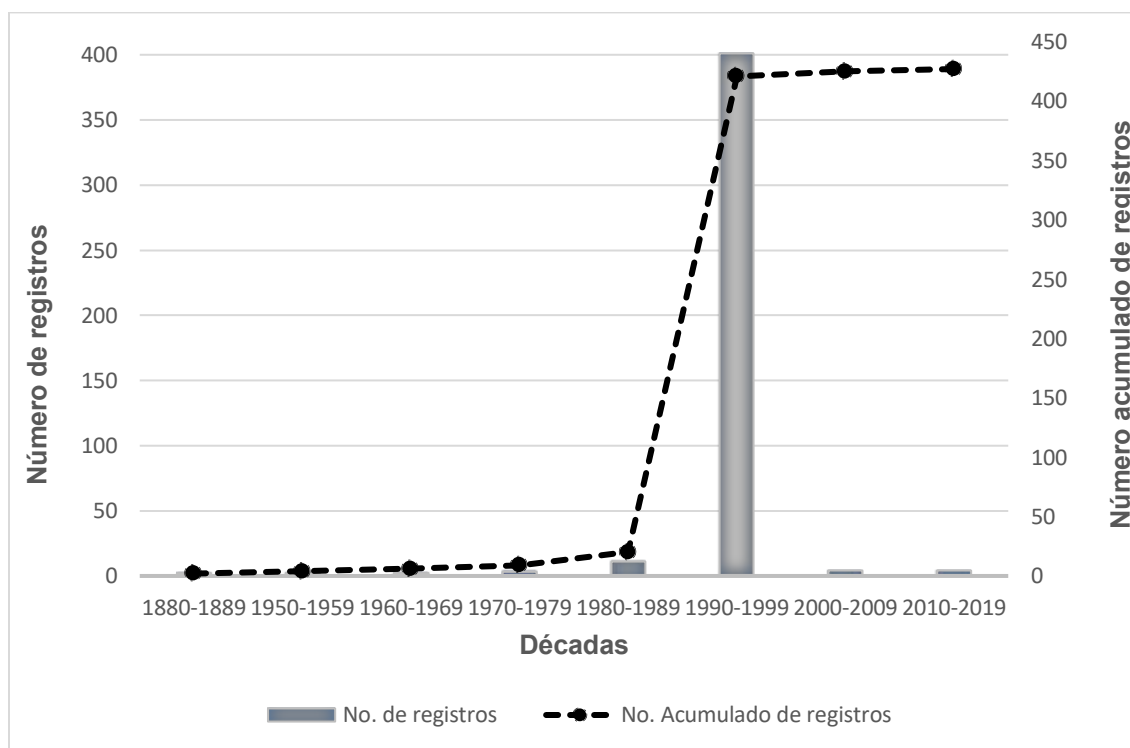


Figura 1. Número de registros y curva de acumulación de registros de *Lepidochelys olivacea*.



Tabla 1. Número de ejemplares de *Lepidochelys olivacea* depositados en colecciones científicas nacionales y extranjeras (\*).

INSTITUCIÓN	COLECCIÓN	REGISTROS
<b>ICMyL-UNAM</b> Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Unidad Académica Mazatlán. UNAM	BITMAR Colección accesoria de tejidos de Tortugas	426
<b>IBUNAM</b> Instituto de Biología, UNAM	CNAR Colección Nacional de Anfibios y Reptiles	6
<b>ECOSUR</b> El Colegio de la Frontera Sur. Unidad San Cristóbal de las Casas	ECO-SC-H Colección Herpetológica del Sureste de México	2
<b>ENCB-IPN</b> Escuela Nacional de Ciencias Biológicas	ENCB Colección Herpetológica	2
<b>MHN-UABCS</b> Museo de Historia Natural. Universidad Autónoma de Baja California Sur	MHN-UABCS Colección de Referencia para Zoología. Arqueozoología y Paleontología	2
<b>IHNE</b> Instituto de Historia Natural y Ecología	CZRHE Colección Zoológica Regional (Amphibia y Reptilia)	1
<b>FC-UNAM</b> Facultad de Ciencias. UNAM	FC-UNAM Colección accesoria de tejidos de Tortugas	1
<b>CONABIO</b> Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad	SNIB	1
<b>*CAS</b> California Academy of Sciences	CAS-HERP Herpetology Collection	6
<b>*NMNH-SI</b> National Museum of Natural History. Smithsonian Institution	USNM National Collection of Amphibians and Reptiles	6
<b>*NHM</b> Natural History Museum. Los Angeles County	LACM Herpetology Collection	3
<b>*MCZ-HU</b> Museum of Comparative Zoology. Harvard University	MCZ Herpetology Collection	3
<b>*NHM-UIO</b> Natural History Museum. The University of Oslo	NHM Herpetology Collection	2
<b>*AMNH</b> American Museum of Natural History	AMNH Herpetology Collection	1
<b>*UPS</b> Slater Museum of Natural History. University of Puget Sound	PSM Amphibians & Reptiles Collection	1
<b>*UMMZ</b> University of Michigan. Museum of Zoology	UMMZ Amphibians & Reptiles Collection	1
<b>*FMNH</b> Natural History Museum. London	FMNH Amphibians and Reptiles Collection	1

En cuanto al recuento histórico de los registros de la especie se puede observar (Figura 1, Tabla 2) que a finales del siglo XIX comienza la recolecta de ejemplares, siendo The Natural History Museum, Los Angeles County, en donde se encuentra el ejemplar más antiguo. Después de este registro y hasta mediados de la década de los años 50 no se hallan más colectas, posiblemente debido a distintos conflictos bélicos como la Revolución Mexicana y la Primera Guerra Mundial que hicieron que el trabajo científico estuviera disminuido. Más tarde, en 1954 el Natural History Museum, London tiene un ejemplar más. De 1954 a 1964 no hay recolecta de la especie, quizá porque la tortuga golfina sufrió una baja poblacional considerable en las décadas de los 60 y 70, debido a la pesquería indiscriminada que llegó a extraer millones de animales ya que hacia 1959 se comenzó a utilizar la piel de la tortuga golfina para la industria peletera, lo que la llevó al borde de la extinción (Peralta y Luna, 2016). Los primeros esfuerzos del estado mexicano por el estudio de la especie comenzaron en 1967 en la playa de Escobilla, Oaxaca, y es a partir de 1973 que se cuenta con una serie de registros ininterrumpida hasta la fecha (Peralta y Luna, 2016). En 1975 se reporta el primer ejemplar en una colección nacional, la Colección Nacional de Anfibios y Reptiles (CNAR), que se ubica en el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Tabla 2. Años de colecta de los ejemplares de *Lepidochelys olivacea*, colección donde están depositados los ejemplares y los estados donde se colectaron. Colecciones científicas extranjeras (\*) y colecciones científicas nacionales (\*\*).

AÑO	COLECCIÓN	NÚMERO DE REGISTROS	ESTADOS
1881	NHM*	1	SINALOA
1954	FMNH*	1	CHIAPAS
1956	PSM*	1	NAYARIT
1964	LACM*	2	COLIMA
1975	CNAR**	1	JALISCO
1977	CNAR**	1	COLIMA
1980	CNAR**	2	OAXACA, GUERRERO
1981	CNAR**	2	MICHOÁCAN
1988	BITMAR**	5	COLIMA
1989	ECO-SC-H**	1	CHIAPAS
1993	BITMAR**	64	CHIAPAS
1994	BITMAR**	37	OAXACA
1995	BITMAR**	114	CHIAPAS
1996	BITMAR**	77	OAXACA
1997	BITMAR**	108	OAXACA
2003	MHN-UABCS**	1	BAJA CALIFORNIA SUR
2004	MHN-UABCS**	1	BAJA CALIFORNIA SUR
2010	ENCB**	1	BAJA CALIFORNIA SUR
2012	ENCB**	1	OAXACA

Si bien la CNAR tuvo sus orígenes en 1915, es a partir de 1979 que el número de anfibios y reptiles de la colección se incrementó considerablemente. En 1990, México declaró su veda permanente; a la fecha su población se enriquece y ya es abundante en el Pacífico y en muchas partes del mundo (UNAM- DGCS, 2018). Después de iniciarse esta veda, empezó a observarse la recuperación de algunas poblaciones de tortuga golfina (Márquez y Garduño, 2014) y ha incrementarse los registros de la especie por instituciones mexicanas como BITMAR, que es una base de información que ha funcionado desde 1989 a la fecha y se construye mediante el intercambio informativo con otros grupos interesados en la protección de las tortugas marinas y sus ambientes en territorio mexicano (Briseño *et al.*, 2009) y por instituciones como el ECOSUR, El Colegio de la Frontera Sur. Unidad San Cristóbal de las Casas; ENCB-IPN, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas y MHN-UABCS, Museo de Historia Natural. Universidad Autónoma de Baja California Sur. El incremento del número de nidos registrados en playas de anidación, comenzaron después al decreto de veda total del año

1990 sobre la captura de tortugas marinas en México. Para el año 2003, el número de anidaciones de Tortuga Golfina en México había incrementado de forma acentuada (SEMARNAT, 2018). Respecto al número de localidades registradas en las playas de México, se tiene un total de 104 sitios, estos se encuentran en 9 estados de la república, teniendo así los estados de Guerrero (28), Baja California Sur (24), Jalisco (17) y Oaxaca (14) con el mayor número de localidades, en contraste con Chiapas el cual presentó solo una localidad (Figura 2, Tabla 3). Estos datos no necesariamente reflejan el hecho de que hay estados en donde arriban más las tortugas, también podría ser un efecto de sesgo, debido a que los gobiernos de algunas entidades o bien instituciones de investigación prefieren realizar trabajos con mayor intensidad en ciertas zonas o estados. Dos de los principales sitios de anidación masiva se encuentran en el estado de Oaxaca: El Santuario Playa de Escobilla y la playa de Morro Ayuta; y una tercera playa de anidación masiva es la de Ixtapilla en el estado de Michoacán (Miller, 1999). A la par, hay playas de anidación solitaria, de las más importantes en cuanto a número de registro son la Playa de El Verde Camacho en Sinaloa, la Gloria en Jalisco, Chupadero en Colima y Mexiquillo en Michoacán (Peralta y Luna, 2016)



Figura 2. Localidades de anidación de *Lepidochelys olivacea* en costas del Pacífico mexicano (Foto de *L. olivacea* tomada del Banco de imágenes de CONABIO <http://bdi.conabio.gob.mx/> Autor: Miguel Ángel Sicilia Manzo).

Tabla 3. Números de localidades de registros de *Lepidochelys olivacea* en los estados de México

ESTADOS	NÚMERO DE LOCALIDADES
Guerrero	28
Baja California Sur	24
Jalisco	17
Oaxaca	14
Colima	7
Sinaloa	6
Michoacán de Ocampo	4
Nayarit	3
Chiapas	1
TOTAL	104

Aunque la conservación de tortugas marinas en nuestro país tiene sus orígenes en los años sesenta, el incremento de las amenazas antrópicas, han colocado a la tortuga golfina como una especie prioritaria para la conservación. Por este motivo está incluida en la lista roja de especies amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), en el Apéndice I de la Convención Internacional sobre el Tráfico de Especies Amenazadas (CITES), en el Apéndice I de la Convención sobre Especies Migratorias (CEM) como especie en peligro, y a nivel regional, en el Apéndice II del Protocolo Relativo a Áreas Especialmente Protegidas de Flora y Fauna Silvestres del Convenio de Cartagena (SPAW, Perera-Valderrama, *et al.*, 2020).

Tabla 4. Áreas Naturales Protegidas (ANP) con presencia de *Lepidochelys olivacea*. APF y F: Áreas de Protección de Flora y Fauna, RB: Reservas de la Biosfera, PN: Parques Nacionales y S: Santuario.

ANP	CATEGORÍA DE MANEJO	ESTADOS
Cabo San Lucas	APF y F	Baja California Sur
Islas del Golfo de California	APF y F	Baja California Sur
Meseta de Cacaxtla	APF y F	Sinaloa
Cabo Pulmo	PN	Baja California Sur
Huatulco	PN	Oaxaca
Lagunas de Chacahua	PN	Oaxaca
Islas del Pacífico de la Península de Baja California	RB	Baja California Sur
La Encrucijada	RB	Chiapas
Chamela-Cuixmala	RB	Jalisco
Playa Puerto Arista	S	Chiapas
Playa Piedra de Tlacoyunque	S	Guerrero
Playa Tierra Colorada	S	Guerrero
Playa de Mosmaloya	S	Jalisco
Playa El Tecuán	S	Jalisco
Playa Mexiquillo	S	Michoacán
Playa Maruata y Colola	S	Michoacán
Playa de la Bahía de Chacahua	S	Oaxaca
Playa Escobilla	S	Oaxaca
Playa Ceuta	S	Sinaloa

Por ello el Programa Nacional de Conservación de Tortugas Marinas (PNCTM) que se encuentra a cargo de la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) desde 2005, tiene como objetivo lograr la recuperación de las especies de tortugas marinas que se distribuyen en el país monitoreando las playas de anidación, con la protección de nidos y crías, así como con el impulso a actividades productivas alternativas, educación ambiental e involucramiento de las comunidades locales en el programa de conservación (Peñaflores y Márquez, 2016). El PNCTM, mediante la instalación de campamentos tortugueros, varios de estos sitios están dentro de una Área Natural Protegida (ANP). La Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA) establece seis categorías de ANP, las cuales están sujetas a regímenes especiales de protección, conservación, restauración y desarrollo, por lo que se restringe en las ANP's el acceso y uso de flora, fauna y otros recursos, con el fin de asegurar el equilibrio y la continuidad de los procesos evolutivos y ecológicos (SEMARNAT, 2021). De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, las localidades de sitios de anidación obtenidas de las colecciones científicas están dentro de 3 Áreas de Protección de Flora y Fauna, 3 Parques Nacionales, 3 Reservas de la Biosfera y 10 Santuarios (Tabla 4). Los estados de Baja California Sur y Oaxaca son los que más cuentan con ANP's, mientras que estados como Nayarit que tiene arribos de tortuga golfina, no cuenta con alguna ANP.

## CONCLUSIONES

La disminución rápida de *Lepidochelys olivacea* ha propiciado que en México se encuentre como especie en Peligro de Extinción (NOM-059-SEMARNAT-2010) y Vulnerable según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), y de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo se considera que la tortuga golfina requiere más estudios sobre sus sitios de anidación en estados como Nayarit y Sinaloa, así como dada la vulnerabilidad actual de esta especie y de su hábitat, es necesaria la identificación y establecimiento de más Áreas Naturales Protegidas para su conservación y con el fin de contrarrestar las actividades antropogénicas que ha impactado en la disminución de las poblaciones de esta especie de tortuga marina, sobre todo en entidades donde son pocas o no existen. Los resultados sirven como base para señalar los sitios de la república en donde se requieren más monitoreos y búsqueda de lugares de anidación la especie *Lepidochelys olivacea*, en donde sería deseable implementar ANP's e incrementar programas de protección en los sitios de anidación.

## BIBLIOGRAFÍA

1. F. A. Abreu-Grobois, "Genética poblacional y filogeografía de las tortugas marinas golfina (*Lepidochelys olivacea*) y laúd (*Dermochelys coriacea*) en el Pacífico mexicano", Informe final SNIBCONABIO proyecto No. G007,2000, pp. 1-54.
2. D.E. R. Angulo, "Análisis al proceso técnico de monitoreo de actividades de la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) en la playa las Palmas, Provincia de Esmeraldas", Tesis de Licenciatura., Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador, 2019, pp. 1-66.
3. J. F. Arzola, "Humedad y temperatura en nidos naturales y artificiales de la tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829)", Revista de Biología Marina y Oceanográfica., Vol. 42,3. 2007, pp. 377-383.
4. J. F. Arzola, J. H. Barrón, Y. R. Gutiérrez, y D. Voltolina, J.S. Ramírez, "Anidación e incubación artificial de huevos de tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* (Testudines: Cheloniidae)", Ecosist. Recur. Agropec., Vol. 6,18, 2019, pp. 595-599.
5. I. A. Bárcenas, "Diferenciación genética de las colonias anidantes de la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) en el Pacífico Mexicano con base en el análisis mitocondrial", Tesis de Maestría., CICESE, 2009, pp. 1- 70.
6. R. Briseño, C. Juárez, y A. González, "Se acaban las caguamas", 2009, Disponible en: [http://www.unamiradaalaciencia.unam.mx/download/pdf\\_prensa/unamirada\\_186.pdf](http://www.unamiradaalaciencia.unam.mx/download/pdf_prensa/unamirada_186.pdf)
7. M. A. Cabrera, A. Carranza, y E. Quintero, "Influencia del aporte sedimentario del río Cozoaltepec en la anidación de tortugas en la playa La Escobilla en Oaxaca, en el Pacífico mexicano", Hidrobiológica., Vol. 28,1,2018, pp. 71-81.
8. P. Cervantes-Reza, E. Pérez, y M.A. Gómez, "Arribada y explotación de la tortuga golfina en la Playa Escobilla, Oaxaca, México", Rev. Mar. Cost., Vol. 9,1, 2017, pp. 91-107.
9. F. A. Cervantes, "Uso y mantenimiento de Colecciones Biológicas, IB, UNAM", Revista Digital Universitaria., Vol. 17, 12, 2016. pp. 1-12.
10. A. A. G Colin, "Anidación y conservación de la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) en dos playas de la costa occidental de Baja California Sur, México: 1995-2013.", Tesis de Maestría. CICESE, 2015 pp. 1- 121.
11. A. Y. Corte, "Evaluación de la población de la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) y su producción de crías en la Playa "La Escobilla", Oaxaca. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM, 2004, pp. 1-190.
12. D. Miller, Determining Clutch Size and Hatching Success. En: Eckert, K., K.A. Bjorndal, F. A. Abreu-Grobois, M. Donnelly (Editors). 1999. Research and Management. Techniques for the Conservation of Sea Turtles. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4. Pág. 124.
13. A. E. Fonseca, J. E. López, y N. Pachón, "Frecuencia de anidación *Lepidochelys olivacea* en dos playas de Cabo San Lucas, México", Conexión Agropecuaria., Vol. 6,2, 2016. pp. 73-85.
14. Y. X. Malanco-García y Cuevas, E. Estado actual de la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*). En Cuevas, F. E.A., Guzmán, H. V. y Guerra S. J.J. Rivas, H. G. A. (Eds.), El Uso del Conocimiento de las Tortugas Marinas como herramienta para la restauración de sus

- poblaciones y hábitats asociados México. Universidad Autónoma del Carmen, 2019, pp. 73-82.
15. A. Maldonado, A. Bárcenas, y C. E. Hart, "Tortugas marinas", En: *La biodiversidad del estado de Nayarit. Estudio de Estado*. México, CONABIO., Vol. II, 2021, pp. 226-229.
  16. M. R. Márquez, A. Villanueva, y F. C. Peña, "Sinopsis de datos biológicos sobre la Tortuga Golfina (*Lepidochelys olivacea*) (Eschscholtz, 1829)", FAO-INP Sinopsis sobre la pesca., Vol. 2, 1976. pp.1-67.
  17. M. R. Márquez, y D. M. Garduño, "Tortugas marinas", Instituto Nacional de Pesca", México, D.F, Primera edición. 2014, pp. 1-94.
  18. E.C. Monter, y C. E. Durán, "The relationship between the massive nesting of the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*) and the local physical environment at La Escobilla, Oaxaca, Mexico, during 2005", *Hidrobiológica*.Vol., 27, 2, 2017, pp. 201-209.
  19. L. O. Ochoa, O. Flores, U. García, V.M. Corre, C.M. y M. L. Canseco, "Lepidochelys olivacea (tortuga golfina). Distribución potencial, escala 1: 1000000", Museo de Zoología, Facultad de Ciencias, UNAM, 2006, pp.1.
  20. E. Peralta, y T. Luna, "Tortuga Golfina", En: O. Gaona, y A. Barragán, Las tortugas marinas en México: Logros y perspectivas para su conservación. Soluciones Ambientales ITZENI (Ed.), Ciudad de México, 2016, pp. 1-240.
  21. S. V. Perera, R. Herrera, I. Zamora, S. Cerdeira, R. Martell, L.O. Rosique de la Cruz, H. Caballero, J.C. Alva, V. F. Ramos, R. Ressler, "Tortugas marinas", En: Perera-Valderrama, S., S. Cerdeira-Estrada, R. Martell-Dubois, L.O. Rosique de la Cruz, H. Caballero-Aragón, R. Ressler (coords.). Protocolos de monitoreo de la biodiversidad marina en áreas naturales protegidas del Caribe mexicano. (Conabio. México, 2020), Capítulo V, pp. 123-140.
  22. C. Peñaflores, y R. Márquez," El Programa Nacional para la Conservación de las Tortugas Marinas: 50 años de historia", En: Gaona, O. y Barragán, A. (Coord.). Las tortugas marinas en México: Logros y perspectivas para su conservación. Soluciones Ambientales ITZENI (Ed.).( Ciudad de México, 2016), pp.1- 240.
  23. A. R. Pérez, "Análisis del porcentaje de avivamiento y depredación de nidos de la tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz,1829) durante la temporada de anidación de 1998, en la Playa Morro Ayuta, Oaxaca" Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM, 1998, pp. 1-70.
  24. C. Á. P. Rojas, S. S. Sánchez, y N. O. Chassin, " Evaluación de la diversidad genética de *Lepidochelys olivacea* en la colonia de anidación Ixtapilla, Michoacán". *Biológicas.*, Vol. 16, 2, 2014,pp. 31-35.
  25. E. S. Sandoval, "Pronóstico de la temperatura de los nidos de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) en función de la temperatura ambiente, la profundidad y el calor metabólico", Tesis de Maestría, CICESE, 2008, pp. 1-71.
  26. E. S Sandoval, "Proporción sexual en crías de tortuga *Lepidochelys olivacea* en corrales de incubación del Pacífico Mexicano. Tesis de Doctorado. CICIMAR-IPN, 2012, pp. 1-138.
  27. SEMARNAT, (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales),"Programa de Acción para la Conservación de la Especie Tortuga Golfina (*Lepidochelys olivacea*)" SEMARNAT/ CONANP, México, 2018 pp. 1-64.
  28. SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales),"Modificación del anexo normativo III, Lista de especies en riesgo de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo", Diario Oficial de la Federación, México, 2019, pp. 1-78.
  29. SEMARNAT-CONANP (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales y Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas) "Áreas Naturales Protegidas Federales de México",Ciudad de México, México, 2020, 1-69.
  30. B. F. A. Silva, "Temperaturas Pivote para la Diferenciación Sexual en la *Lepidochelys olivacea* Tortuga Marina y sus Implicaciones en las Prácticas de Conservación", Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara, Guadalajara, 1986, pp.1-49.
  31. UNAM- DGCS, "Carismáticas e inofensivas, las tortugas marinas son víctimas de desmedida explotación", 2018, pp. 1.

32. G. C. Valadez, Silva, B. F. A y V. S. Hernández, "Proporción sexual en crías de la tortuga marina tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* producida en corral de incubación en la Playa de Anidación La Gloria, Jalisco, México", *Biol. Centro Invest. Biol. Vol.*, 34, 3, 2000, pp. 305-313.
33. R. M.R. Vejar, "Ecología trófica de *Lepidochelys olivacea* y *Chelonia mydas agassizzi*, mediante el análisis de isótopos estables en el norte de Sinaloa, México", Tesis de Maestría. IPN, 2016, pp.1-69p.
34. B. J. A. Vega, "Respuesta de la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) con relación a las características ambientales en Baja California Sur y Oaxaca, México" Tesis de Maestría. UABCS., 2016, pp. 1-84.

## CRECIMIENTO DE NANOVARILLAS DE NITRURO DE GALIO EN ZEOLITA ZSM-5 EMPASTILLADA

Katheryne Gabriela Romero Avalos<sup>1</sup>, Víctor M. Soto<sup>1,2</sup>, Pedro Velazquez-Ponce<sup>1</sup>, Karina V. Chavez<sup>1</sup>

1. Laboratorio del Estado Sólido, Departamento de Química, Universidad de Guadalajara,

2. Posgrado en Ciencia de Materiales, Departamento de Ingeniería de proyectos.

Bvd. Marcelino García Barragán # 1421, esq. Calzada Olímpica, C.P. 44430

Guadalajara, Jalisco, México.

[Katy-1596@hotmail.com](mailto:Katy-1596@hotmail.com), [karinachavez7@yahoo.com.mx](mailto:karinachavez7@yahoo.com.mx)

### RESUMEN

Uno de los materiales semiconductores que ha recibido mayor atención en los últimos años es el nitruro de galio (GaN), debido a que este material proporciona la parte del color azul en los LEDs completando de esta manera la gama de los colores primarios<sup>1</sup>. La importancia de obtener GaN de manera nanoestructurada es de gran importancia, debido a las propiedades mejoradas que exhiben este tipo de nanoestructuras. Se han reportado en los últimos años abundantes trabajos acerca de la síntesis de nitruro de galio nanoestructurado, generalmente en forma de nanovarillas. Uno de los métodos de crecimiento más usados es el CVD (Chemical Vapor Deposition), esto debido a su sencillez, y la facilidad que ofrece para controlar sus condiciones de operación<sup>2</sup>. El crecimiento de estas nanoestructuras se ha realizado comúnmente a partir de nanopartículas de oro sembradas en sustratos cristalinos como zafiro, cuarzo o silicio. No obstante en este trabajo se propone la síntesis de nanovarillas de GaN, usando nanopartículas de Níquel como sitios de nucleación y como soporte se propone a la Zeolita ZSM-5 empastillada. Sabemos que existen trabajos en los que se reporta el crecimiento de este tipo de estructuras a partir de nanopartículas de níquel, pero de manera escasa. Y mucho menos hemos encontrado, reporte alguno en el que se haya crecido este tipo de nanoestructuras, en algún otro material que no sea obleas cristalinas como las ya mencionadas. A partir de los resultados de esta investigación, podemos decir que resulta viable el crecimiento de nanovarillas de GaN en soportes diferentes a obleas cristalinas. La caracterización de las nanoestructuras, se hizo mediante microscopia electrónica de barrido, con imagen de electrones retrodispersados<sup>3</sup>.

### INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha dado un gran impulso a la investigación de materiales nanoestructurados con altas posibilidades de aplicación en dispositivos. Entre estas posibilidades destaca de manera prominente la síntesis de nitruro de galio, el cual es un semiconductor que presenta una banda prohibida directa de 3.39 eV a la temperatura ambiente. La magnitud de esta banda prohibida hace que este material sea un gran candidato para ser utilizado como dispositivo optoelectrónico de longitudes de onda cortas, tales como, diodo emisor de luz y diodo láser, con la ventaja de operar a altas temperaturas<sup>4</sup>. También hay un interés real de aplicación como sensor de gases tales como, H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub> entre otros<sup>5</sup>.

Existen diferentes métodos de síntesis, para lograr diferentes tipos de nanoestructuras, estas nanoestructuras pueden ser de diferentes tipos, entre las que encontramos, nanotubos, nanoalambres, nanorods, nanobelts, hablando solo de las llamadas unidimensionales. Entre las técnicas de síntesis usadas encontramos, la de descarga de arco<sup>6</sup>, la de ablación láser<sup>7</sup>, la de reacción confinada en nanotubos de carbono<sup>8</sup> y la de CVD<sup>9</sup>. En este trabajo optamos por usar la técnica CVD, usando como reactor un tubo de cuarzo y un horno tubular horizontal. Esta técnica es muy versátil y de fácil control.

Como se mencionó la técnica CVD permite una gran cantidad de combinaciones de reactantes para lograr la síntesis de las nanoestructuras de nitruro de galio. Generalmente se usa amoníaco gas como uno de los reactantes, nitrógeno y en ocasiones argón como gas de arrastre. La temperatura de reacción varía desde 450°C hasta 1000°C. Pero en cada caso se usan precursores de metal, tales como oro, níquel, GaCl e incluso galio mismo. Estos precursores metálicos se depositan siempre en sustratos de Si (111), Si (100), Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0001), AlN, LiAlO<sub>2</sub> (100) y zafiro<sup>10</sup>. Lo que eleva el costo en la síntesis de este tipo de materiales. Es por eso que en esta investigación, proponemos



como soporte, zeolita con nanopartículas de níquel empastillada, en forma de obleas circulares. De esta manera pretendemos sintetizar nanovarillas de nitruro de galio de forma económica sin hacer uso de soportes cristalinos que suelen ser más costosos.

## TEORÍA

El mecanismo que se ha propuesto, para explicar la síntesis en la técnica CVD, es el conocido como vapor-líquido-sólido (VLS). Éste mecanismo fue sugerido desde hace más de 50 años, en 1964 por Wagner<sup>11</sup>, y consiste básicamente en el proceso mostrado en la figura 1.

Como primer paso se tienen nanopartículas metálicas en un soporte cristalino. Las nanopartículas metálicas, pueden ser sembradas, esto se refiere a que pueden ser colocadas en la superficie cristalina a partir de una suspensión de tales nanopartículas, las cuales se pueden conseguir de diferentes diámetros. Otra manera de generarlas, es colocando una película del metal mediante un depósito del vapor del metal mismo, sobre la superficie del sustrato. Para lograr esto, el sustrato es limpiado, usando solventes como acetona o alcohol etílico, e incluso sonicándolo usando este tipo de solventes. En el número dos de la figura 1, se muestra cómo llegan los vapores de los reactivos y se aproximan al soporte.

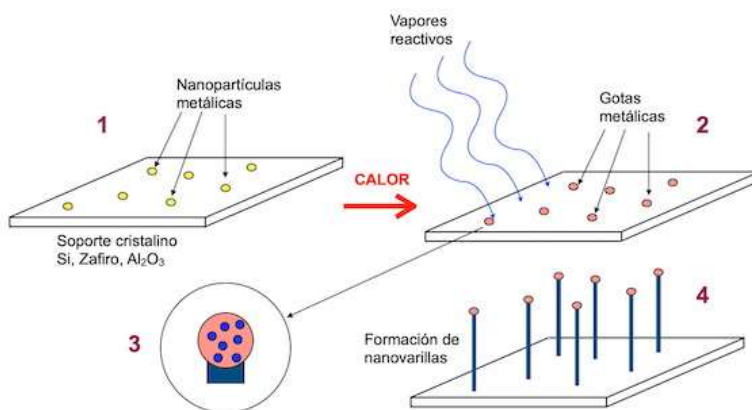


Figura 1. Esquema de la reacción VLS, para la formación de nanovarillas

En este caso con la temperatura del reactor (450°C - 1000°C), las partículas metálicas se han convertido en gotas metálicas, es decir han pasado de la fase sólida a la fase líquida. De esta manera estas gotas metálicas, comienzan a disolver los reactivos que llegan en forma de vapor. Un metal fundido, es un excelente disolvente. Una vez que se satura la gota, como se puede apreciar en el número tres, los reactivos comienzan a asociarse dentro de la gota, para después de haber formado el compuesto correspondiente, pasan a depositarse en la superficie del soporte cristalino. De esta manera la gota nuevamente absorbe vapores reactivos, y continúa depositando el compuesto, ahora en el material previamente depositado. Podemos considerar que la gota hacen las veces de un reactor continuo. Esto ocasiona que la nanovarilla vaya creciendo desde el soporte cristalino hasta la gota de metal. Es por eso que siempre encontramos la partícula metálica en la parte final de la nanovarilla, y el inicio de la nanovarilla, pegado a la superficie del sustrato.

## Sustrato o Soporte

En la bibliografía encontrada, siempre se habla de sustratos cristalinos, orientados a un plano conveniente, por ejemplo, como ya se había mencionado, Si (111), Si (100), Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0001) y zafiro (001) entre otros. El silicio presenta estructura cúbica, mientras que el aluminio y el zafiro presentan estructura hexagonal. Aunque en el caso del silicio cuando se tiene la superficie (111), puede promover la formación de estructuras tipo hexagonal, mientras que cuando exhibe la superficie (100), promueve la formación de estructuras tipo cúbico. Esto nos sugiere que la superficie del sustrato tiene una influencia directa en el tipo de nanoestructura que se pretende generar. Cabe aclarar que

siempre se usa el término sustrato pero también se puede usar el término soporte, esto lo mencionamos porque en la bibliografía se usa uno u otro. Pero lo importante resaltar es que en toda la literatura consultada siempre se habla de soportes cristalinos, y sólo se han hecho estudios de crecimiento de nanovarillas y de nanoestructuras en general, usando sustratos cristalinos en forma de obleas, generalmente de dimensiones de  $1 \times 1$  cm.

Al parecer la síntesis de las nanoestructuras está ligada forzosamente al uso de soportes cristalinos.

### **Catalizadores, Precursor ó Sitios de nucleación**

Como se mencionó anteriormente las gotas metálicas procedentes de las nanopartículas metálicas, hacen las veces de un reactor químico continuo. Por lo que podemos pensar que el papel de estas nano-gotas de metal fundido, es el más importante para la síntesis de las nanoestructuras. Para producir las nanopartículas inicialmente, a veces se recurre al depósito de una capa fina de metal en el sustrato<sup>10,11</sup>. Posteriormente con el proceso del calentamiento se logra la fundición de dicha capa, la cual en estado líquido presenta coalescencia formando gotas individuales. Otra manera de depositar nanopartículas en la superficie, es sembrándolas, utilizando una suspensión de nanopartículas metálicas ya formada. El proceso sólo consiste en depositar una pequeña gota de la suspensión en el soporte cristalino, después se deja evaporar el solvente, y de esta manera se procede a usar el soporte con las partículas depositadas. Independientemente del método usado, las nanopartículas formadas, se convertirán en las gotas reactivas. Según los resultados reportados en la literatura, el tamaño se encuentra relacionado de manera directa con el grosor de las nanovarillas sintetizadas<sup>12</sup>. A estas nanopartículas metálicas se les denomina como, catalizadores, precursores o sitios de nucleación, los tres nombres se refieren a que promueven la formación de las nanovarillas sin ser parte de su estructura, así como definen el sitio de crecimiento de las mismas. Es fácil apreciar que estas reacciones se llevan a cabo a temperaturas inferiores a la temperatura de fundición de los metales que forman las nanopartículas. Esto no representa dificultad alguna ya que se ha comprobado que a tamaños nanométricos los metales presentan una temperatura de fundición muy por abajo de la que presentan los mismos en forma macroscópica. Éste fenómeno ha sido estudiado de manera teórica y experimental. A continuación presentamos una ecuación empírica para el cálculo de la temperatura de fundición según el tamaño y la forma del metal propuesta por K. Nanda et al en el año 2002<sup>12</sup>.

$$T_m = T_{Bulk} \left( 1 - \frac{c}{zr} \right)$$

Donde:  $T_m$  y  $T_{Bulk}$ , son las temperaturas de la nanoestructura y el material macroscópico respectivamente.  $c$ , es una constante específica del metal.  $r$ , es el radio de la nanopartícula, el radio de la nanovarilla, o el grosor de la película según sea el caso.  $z$ , toma los valores de 1, 1.5 y 3, para esferas, varillas o películas respectivamente. Éste tipo de ecuaciones nos permiten tener una idea del valor de la temperatura de reacción que podemos usar en nuestro reactor. Esto es lo que se conoce en lo que respecta, al crecimiento de nanoestructuras, usando la técnica CVD.

### **PARTE EXPERIMENTAL**

Esta parte consta de dos secciones, la primera sección se refiere a la síntesis de nanopartículas de níquel soportadas en la zeolita ZSM-5 con relación silicio/aluminio = 15. La segunda sección consiste en el uso de la zeolita con nanopartículas soportadas, como blanco para el crecimiento de nanoestructuras de GaN, en el reactor CVD.

#### **Síntesis de nanopartículas de níquel soportadas en la zeolita.**

Para lograr la síntesis de las nanopartículas de níquel, se utiliza el método de intercambio iónico. La zeolita a usar es la denominada, ZSM-5, la cual es una zeolita sintética de la compañía Zeolyst International, cuya fórmula de composición química es:  $[(NH_4)_6Al_6Si_{90}O_{192}] \cdot 16H_2O$ , fácilmente podemos comprobar en esta fórmula que por cada 15 átomos de silicio, existe un átomo de aluminio.

El método de intercambio iónico consiste en sumergir lo equivalente a un gramo de zeolita, en 80 mL de solución  $6.089 \times 10^{-3}$  M, en nitrato de níquel hexahidratado. Esta concentración proporcionaría los iones de níquel que intercambiarían a todos los cationes de  $\text{NH}_4^+$  que se encuentran en la zeolita. El sistema se deja reposar durante tres días, tiempo para que se lleve a cabo el intercambio. Después de este periodo de tiempo, se separa la Zeolita de la solución intercambiadora, se somete a lavados continuos y se deja secando, para de esta manera obtener la Zeolita intercambiada con cationes de níquel. Esta zeolita intercambiada, se lleva a reducir. Todo el proceso de intercambio se vuelve a reproducir, pero ahora con una solución,  $2.436 \times 10^{-2}$  M, en nitrato de níquel hexahidratado. De esta manera estamos proporcionando cuatro veces más cationes de níquel que los posibles para intercambiarlos en la zeolita. Se pretende ver si hay algún efecto significativo en el resultado final. El proceso de reducción consiste en hacer pasar un flujo de hidrógeno gas, a razón de 1 mL/s a través de la Zeolita, utilizando un tubo-reactor en "U", a la temperatura de 200 °C. Esto lo podemos apreciar de manera esquemática en la figura 2.

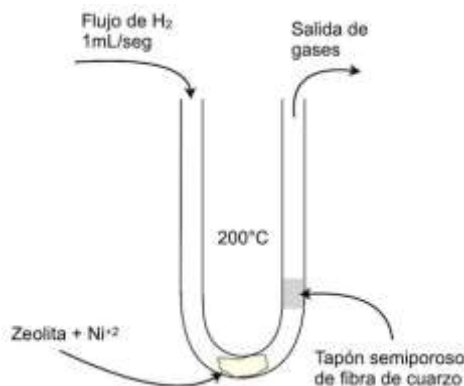


Figura 2. Esquema del proceso de reducción de la zeolita intercambiada.

Una vez reducida la zeolita, se convierte en un material que contiene nanopartículas de níquel. De esta manera se procede a empastillar este compuesto (zeolita + nanopartículas de níquel), para obtener una oblea redonda de un centímetro y medio de diámetro y de un grosor aproximado de 0.1 mm. Esta pastilla es ahora el soporte o sustrato que se usa para crecer las nanovarillas de GaN, en el reactor CVD.

### Crecimiento de nanoestructuras de GaN

Para el crecimiento de las nanovarillas de nitruro de galio, es necesario acoplar todas las partes del reactor CVD. En la figura 3 podemos apreciar un esquema del reactor.

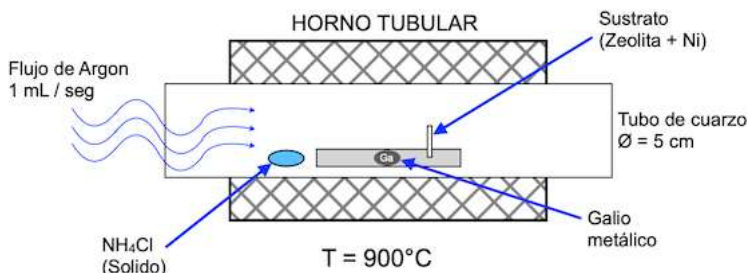


Figura 3. Esquema del reactor CVD

En el esquema podemos observar, que tenemos cloruro de amonio sólido y galio metálico como reactantes. Para el gas de arrastre se usa Argón. El sustrato se coloca en forma vertical. La

temperatura de operación es fijada en 900°C. El tiempo de reacción es de una hora. Una vez terminado el proceso, se desmonta el horno y se analiza el sustrato.

## RESULTADOS

El tamaño de las nanopartículas se corroboró mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido, usando electrones retrodispersados. Esto con el fin de lograr un mayor contraste en la imagen de níquel, en comparación con lo que es silicio y aluminio que forman la matriz zeolítica. En la figura 4, podemos apreciar para el caso del 100% de intercambio iónico ( $6.089 \times 10^{-3}$  M), una nanopartícula y una formación de aglomerado de níquel. La nanopartícula de níquel alcanza un diámetro de 101 nanómetros. Sin embargo alcanzamos a observar una formación de aglomerado de níquel que alcanzan los 150 nanómetros. No sabemos si este tipo de aglomerados puede promover el crecimiento una nanovarilla. Lo que sí sabemos es que la nanopartícula de 101 nanómetros, debe de promover el crecimiento de una nanovarilla.

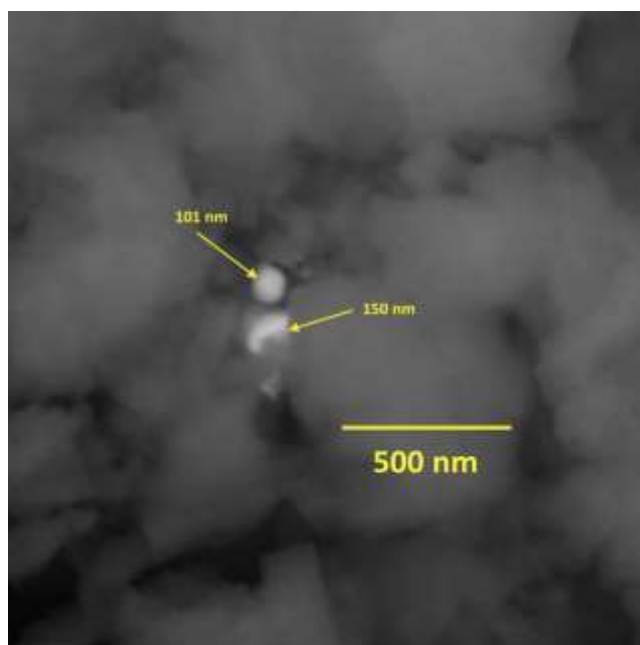


Figura 4. Micrografía de nanopartícula y aglomerado de níquel en la muestra de intercambio catiónico al 100%. Usando la técnica de SEM

En la figura 5, encontramos nanopartículas de níquel como resultado de la reducción de la zeolita que fue intercambiada al 400% ( $2.436 \times 10^{-2}$  M en  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). Es decir cuatro veces más níquel del que se requiere para saturar completamente a la zeolita. Sabemos por estudios previos de este grupo, que la saturación de la Zeolita, no se lleva a cabo. Siempre se presenta un porcentaje de sitios sin intercambiar. En este estudio pretendemos encontrar diferencia entre las dos concentraciones.

En esta figura 5, encontramos la formación de las partículas muy definidas. Sin embargo podemos apreciar claramente que las nanopartículas formadas en general son de menor diámetro (64 nm, 55 nm, 43 nm) que las que presenta la solución preparada calculando un 100% de intercambio.

En principio podríamos considerar encontrar nano partículas de mayor diámetro en la Zeolita que fue intercambiada en la solución preparada calculando un exceso del 400% en intercambio iónico. Sin embargo consideramos importante señalar esta aparente discrepancia, para resaltar el hecho de que la técnica de microscopía electrónica de barrido, no nos proporciona un análisis certero de toda una muestra, sino que más bien, señala pequeños dominios de la muestra. Tomando en cuenta esto,

esta técnica de microscopía, no puede ser considerada para determinar el tamaño de las nanopartículas de toda una muestra.

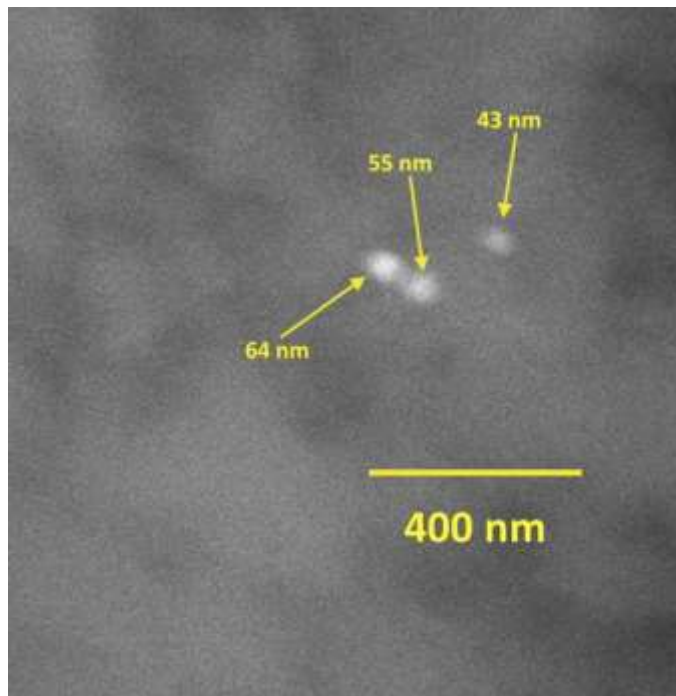


Figura 5. Micrografía de nanopartículas de níquel en la muestra de intercambio catiónico al 400%. Usando la técnica de SEM.

Para la caracterización de las nanovarillas, usamos nuevamente la técnica de SEM, microscopía electrónica de barrido. Comenzaremos mostrando las que se obtuvieron a partir de las nanopartículas sintetizadas con la solución al 400% de los sitios disponibles para intercambio (figura 6). Esto es debido a que, se lograron hacer algunas formaciones como las que aparecen en el artículo de Chuanbao et al, del año 2005, en la figura 1, inciso (b)<sup>13</sup>, del artículo mencionado. En el trabajo de Chuanbao el autor creció nanovarillas, usando un sustrato de Silicio, y propició la formación de nanopartículas de oro, a partir de una película de oro depositada en la superficie de de silicio (111). También encontramos que en el trabajo de Tae Yun Kim et al, del año 2004, en la figura 2, inciso (b)<sup>14</sup>, aparece una imagen muy parecida a la figura 6 de nuestro trabajo. En este último trabajo, el autor, logró crecer nanovarillas de nitruro de galio, sobre un sustrato de silicio (100). En este artículo se usó una película de níquel sobre la superficie del silicio, para generar las nano partículas de níquel.

Podemos considerar entonces, que hemos podido generar nanovarillas de nitro de galio, del mismo tipo que las sintetizadas en soportes de silicio cristalino y orientado. Con la diferencia que nosotros hemos usado zeolita empastillada, lo cual implica que la superficie en la que tenemos las nanopartículas de níquel, es más bien una superficie policristalina. Creemos entonces que las nanovarillas de nitruro de galio, crecen de manera adecuada, en cuanto están en un dominio cristalino, aunque aparentemente sea muy pequeño.

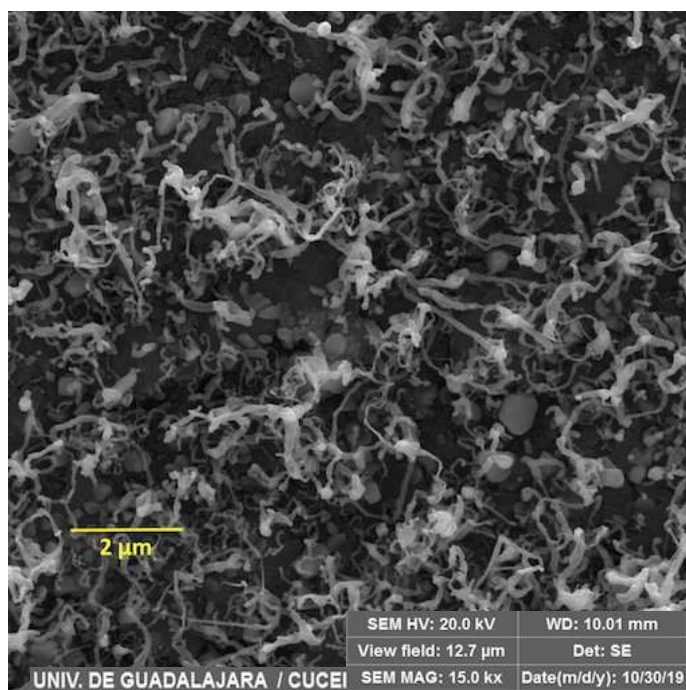


Figura 6. Micrografía de nanovarillas a partir de la muestra de intercambio catiónico al 400%. Usando la técnica de SEM.

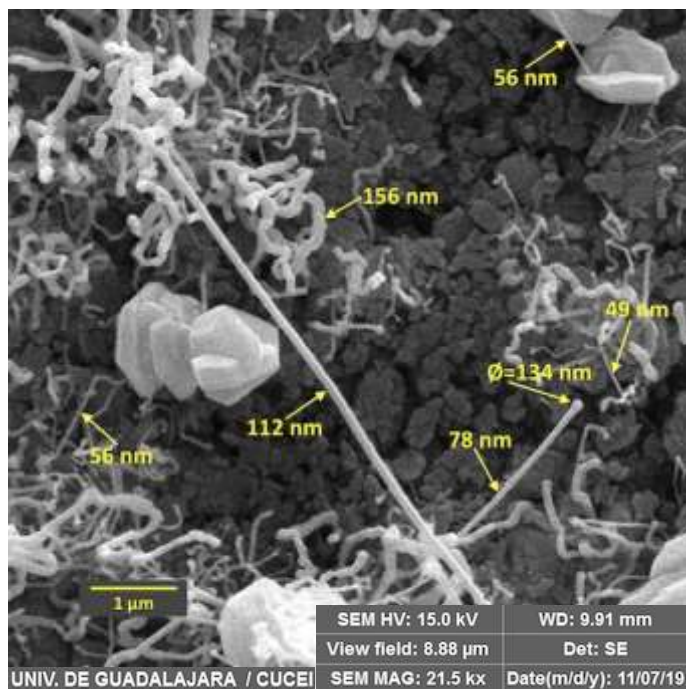


Figura 7. Micrografía de nanovarillas a partir de la muestra de intercambio catiónico al 100%. Usando la técnica de SEM



Ahora presentaremos los resultados de síntesis de nanovarillas en las muestras de Zeolita con nanopartículas sintetizadas a partir del intercambio al 100%.

En la figura 7, podemos apreciar con más claridad formaciones de nanovarillas con diferentes diámetros. Estos varían desde los 49 nanómetros hasta los 156 nanómetros. Sin embargo las más gruesas como la de 156 nanómetros, deja de ser alargada y recta, para convertirse en una especie de formación retorcida. En cambio las delgadas siempre muestran un perfil alargado. Incluso si observamos la nanovarilla de 78 nanómetros de diámetro, podemos apreciar que en su extremo, hay una esfera de 134 nanómetros de diámetro. Esta esfera se suele considerar que es la nanopartícula de níquel que generó la nanovarilla de nitrato de galio.

Con esta idea reforzamos la creencia de que las nanovarillas, exhibirán un grosor directamente relacionado al tamaño de la nanopartícula que las generó.

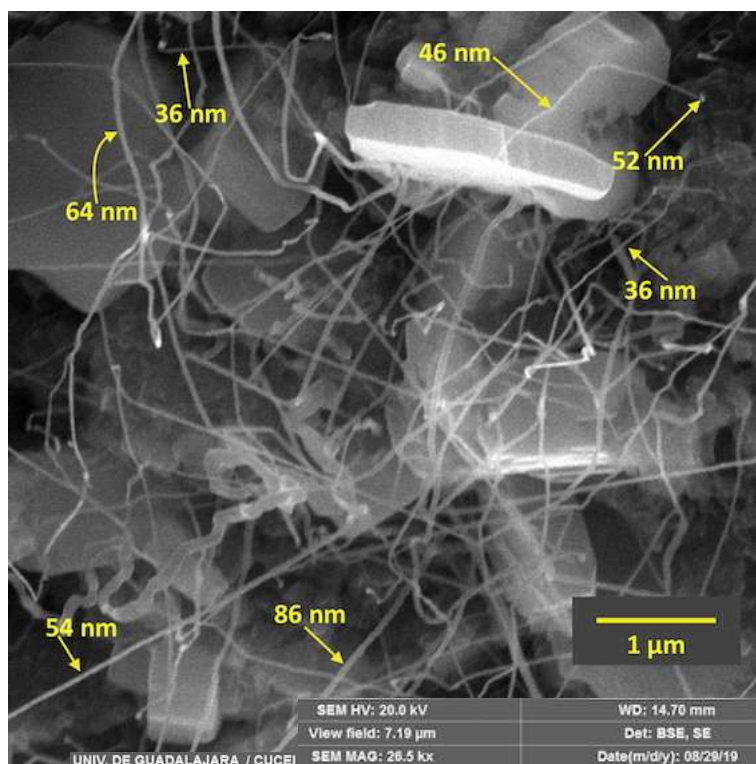


Figura 8. Micrografía de nanovarillas a partir de la muestra de intercambio catiónico al 100%. Usando la técnica de SEM

En la figura 8, se muestra una micrografía de nanovarillas obtenidas nuevamente, a partir del intercambio catiónico al 100%. Podemos apreciar de manera clara que en este caso prácticamente todas son nanovarillas alargadas. En general todas son más delgadas que las obtenidas en la figura 7. Es muy claro apreciar, que cuando las nanovarillas son delgadas tienden a formar ese alargamiento, sin presentar retorcimiento. Lo cual nos hace pensar que cuando la población de las nanopartículas de níquel, es de diámetro pequeño, esto es entre 40 y 90 nanómetros, se obtienen nanovarillas alargadas y finas.

Es claro que las nanovarillas que aparecen en la figura 8, fueron tomadas en una zona muy diferente a las que aparecen en la figura 7. Como habíamos comentado al principio, es muy difícil que a partir del análisis de micrografías obtenidas con un microscopio electrónico, se pueda tener una idea de la muestra en su totalidad. Sin embargo tenemos una alternativa para poder analizar una muestra en general. En este caso analizamos mediante la técnica UV-vis, de reflectancia difusa, las nanopartículas de níquel obtenidas, de la reducción de la muestra de zeolita intercambiada con la solución al 100%, de sitios posibles, esto es la de concentración  $6.089 \times 10^{-3}$  M, en nitrato de níquel

hexahidratado. La técnica de reflectancia difusa, se usa para materiales sólidos o superficies sólidas. En esta técnica se mide la absorbancia de una superficie al medir la intensidad del reflejo de la radiación ultravioleta- visible con respecto a la incidente.

En el caso de nanopartículas, podemos obtener la señal de absorción y relacionarla con el tamaño del diámetro de dichas nanopartículas. A mayor longitud de onda absorbida, implica una partícula de tamaño grande. A menor longitud de onda, implica mayor energía, y por lo tanto un tamaño menor de partícula. Las partículas muy grandes, presentan señal a longitudes de onda muy grandes, lo que se conoce como señal de plasmones. Esto quiere decir que sólo presentan una gran señal dispersa. En la figura 9, presentamos el espectro UV-vis de reflectancia difusa, para la muestra obtenida en el intercambio  $6.089 \times 10^{-3}$  M. Una vez reducida se sometió a esta técnica. Podemos observar el espectro, con las curvas Gaussianas que lo componen.

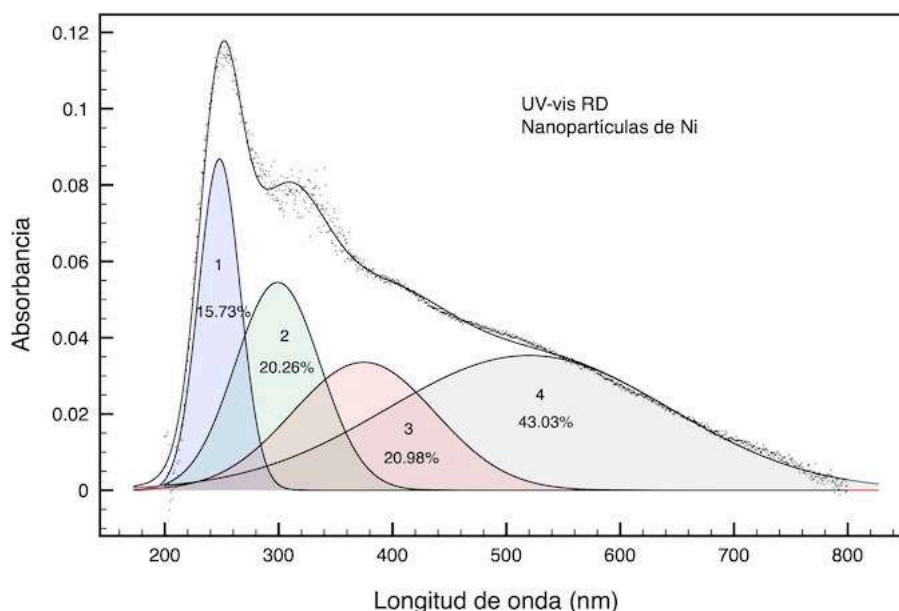


Figura 9. Espectro UV-vis de reflectancia difusa para nanopartículas de níquel soportadas en zeolita ZSM-5, (Si/Al=15).

En este caso presentamos el espectro refinado, es decir presentamos las curvas Gaussianas que combinadas generan el espectro total. La suma de las Gaussianas es la línea negra continua que se observa en la parte superior, la cual coincide con los puntos que representan los datos experimentales. Éste espectro sólo nos provee una idea de la distribución de población de las partículas según su tamaño. La curva azul representa las nanopartículas de menor tamaño. Con un 15.73% de abundancia. La curva verde representa, las nanopartículas medianas, con una población del 20.26%. La curva rosada, nos muestra las nanopartículas grandes, con una población del 20.98%. Finalmente, la curva gris, nos muestra las partículas de níquel muy grandes. Las que presentan la zona de plasmones.

Es claro que tenemos la menor presencia poblacional de nanopartículas pequeñas. Con lo que la posibilidad de tener nanovarillas alargadas, se ve disminuida. Sin embargo en la figura 7 hemos visto la presencia de nanovarillas medianas, y formaciones gruesas. Y en la figura 8, la gran mayoría presenta diámetros de menos de 80 nanómetros. En ambos casos, las nanovarillas están bien formadas en general y las únicas que presentan retorcimiento son las de diámetro mayor a 150 nm. Entonces la recomendación es generar nanopartículas con diámetros menores a 90 nanómetros para poder obtener nanovarillas alargadas. Para lograr esto debemos de focalizar nuestro esfuerzo



en el proceso de reducción. Al parecer la temperatura de reducción está directamente relacionada, con el tamaño final de las nanopartículas.

### CONCLUSIONES

Es muy clara la mayor aportación de este trabajo, que consiste en demostrar que es posible sintetizar nanovarillas de nitruro de galio, usando un soporte no cristalino de zeolita empastillada, contrario a los soportes tradicionalmente usados de silicio, zafiro y alúmina con orientaciones específicas.

Las nanopartículas de tamaños menores a los 90 nanómetros, propician el desarrollo de nanovarillas alargadas, incluso las nanopartículas de tamaños mayores, hasta 120 nanómetros. Partículas de mayor tamaño, forman estructuras alargadas pero retorcidas.

Se debe de poner mayor atención en la primera parte del proceso, es decir en la generación de las nanopartículas de níquel. Para el caso del soporte de zeolita, proponemos bajar la temperatura de reducción, para generar partículas de menor tamaño. Para el caso de los que usan una película de metal, en el sustrato de silicio, se recomienda disminuir el grosor de la película metálica.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Shi, F. y Xue, C. (2011). "Influence of reaction time on growth of GaN nanowire fabricated by CVD method". *J. Mater Sci: Mater Electron*, 370-374.
2. Choy, K. L. (2003). "Chemical Vapour Deposition of Coatings". *Progress in Materials Science*, 2: 27-170.
3. Chávez, C. A., Castañares, R., Cardoso, O. O., y Campos, R. P. (2001). "La microscopia electrónica en la caracterización química y estructural de los materiales cristalinos". *Ciencia Ergo Sum*, 8(2):205-210.
4. S. M. Kang, T. J. Shin, D. V. Dhin, J. H. Yang, S. W. Kim, D. H. Yoon. (2009). "Synthesis of GaN nanowires and nanorods via self-growth mode control". *Microelectron. J.* 40(2): 373-376.
5. J. S. Wright, W. Lim, D. P. Norton, S. J. Pearton, F. Ren, J. L. Johnson, A. Ural. (2010). "Nitride and oxide semiconductor nanostructure hydrogen gas sensors". *Semicond. Sci. Technol.* 25(2): 024002.
6. W. E. Han, P. Redlich, F. Ernst, M. Ruhle. (2000) "Synthesis of GaN-carbon composite nanotubes and GaN nanorods by arc discharge in nitrogen atmosphere". *Appl. Phys. Lett.* 76(5): 652-654.
7. X. Duan y C. M. Lieber. (2000). "Laser-assisted catalytic growth of single crystal GaN nanowires". *J. Am. Chem. Soc.* 122(1): 188-189.
8. W. Han. (1997) "Synthesis of gallium nitride nanorods through a carbon nanotube-confined reaction". *Science.* 277(5330): 1287-1289.
9. X. H. Chen, J. Xu, R. M. Wang, D. P. Yu. (2004). "High-quality ultra-fine GaN nanowires synthesized via chemical vapor deposition". *Adv. Mater.* 15(5):419-421.
10. T. Kente y S. D. Mhlanga. (2016). "Gallium nitride nanostructures: Synthesis, characterization and applications". *J. Cryst. Growth.* 444: 55-72
11. Heon - Ji Choi, "Vapor - Liquid- Solid Growth of Semiconductor Nanowires". *Semiconductor Nanostructures for Optoelectronic Devices* (Springer - Verlag Berlin Heidelberg, 2012) Capítulo 1, pp. 1-36.
12. K. K. Nanda, S. N. Sahu y S. N. Behera. (2002). "Liquid-drop model for the size-dependent melting of low-dimensional systems". *Phys. Rev. A.* 66, 013208
13. Chuanbao Cao, Xu Xiang y Hesun Zhu (2005). "High-density, uniform gallium nitride nanorods grown on Au-coated silicon substrate". *Journal of Crystal Growth.* 273: 375 - 380.
14. Tae Yun Kim, Sang Hyun Lee, Young Han Mo, Hyun Wook Shim, Kee Suk Nahm, Eun-Kyung Suh y Gyung Soo Park. (2004) "Growth of GaN Nanowires on Si Substrate Using Ni Catalyst in Vertical Chemical Vapor Deposition Reactor". *Korean J. Chem. Eng.* 21(1): 257 - 261.

## EFFECTO DE PROCEDIMIENTOS GINECOLÓGICOS SOBRE LA CONDUCTA LOCOMOTORA DE LA RATA

Daniel Germán Hernández Torres<sup>1</sup>, Diana Isabel Uscanga Martínez<sup>1</sup>, Mónica Flores Muñoz<sup>2</sup>, Tania Molina Jiménez<sup>3</sup>, Claudia J. Juárez Portilla<sup>4</sup>, Rossana C. Zepeda Hernández<sup>4</sup>, Gabriel Roldán Roldán<sup>5</sup>, Albertina Cortés Sol<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Biología-Xalapa, Universidad Veracruzana; <sup>2</sup>Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Veracruzana; <sup>3</sup>Facultad de Química Farmacéutica Biológica, Universidad Veracruzana; <sup>4</sup>Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Veracruzana; <sup>5</sup>Facultad de Medicina, UNAM. dagger21.dght@gmail.com

### RESUMEN

La histerectomía y la ooforectomía son dos procedimientos quirúrgicos que se realizan con mayor frecuencia para el tratamiento de diversos trastornos ginecológicos en condiciones benignas y neoplásicas. Los cuadros clínicos representan un cambio en la calidad de vida de las pacientes, afectando a un porcentaje importante de la población sometida a esta cirugía. Entre las manifestaciones clínicas posteriores a esta intervención se reportan cuadros de depresión o ansiedad en distintas frecuencias; sin embargo, existen pocos estudios que analicen de forma objetiva esta interrogante. Por esta razón, la presente investigación tiene como objetivo evaluar la conducta locomotora (como un indicador de ansiedad) en un modelo de histerectomía con y sin conservación ovárica, con el fin de identificar efectos colaterales en el desarrollo de trastornos emocionales que esta manipulación quirúrgica pueda desencadenar a corto plazo. Para ello, se utilizaron ratas hembra juveniles vírgenes con un peso entre 200 y 250 g, las cuales fueron mantenidas en condiciones de bioterio (fotoperiodo 12:12), temperatura ambiental  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , agua y alimento *ad libitum* durante dos semanas. Pasado este tiempo, las hembras fueron distribuidas al azar y divididas en cinco grupos de seis individuos cada uno, con las siguientes características: 1) INT ratas intactas, 2) SHM ratas con manipulación quirúrgica simulada, 3) OVX ratas ovariectomizadas, 4) HTX ratas con histerectomía parcial (con conservación de ovarios) y 5) HTX+OVX ratas con histerectomía radical (sin conservación de ovarios). En el día 30 posterior a la cirugía se evaluó la conducta locomotora en todos los grupos experimentales a través de la prueba de cuadros cruzados, en donde se registró el número de cuadros por los que transitaba la rata, la frecuencia de las conductas de exploración (posición vertical y *rearing*), frecuencia de inmovilidad y acicalamiento, entre otros datos. Los resultados obtenidos (Media $\pm$ DSM) muestran que los grupos INT y SHM ( $78.33 \pm 11.87$  y  $75.16 \pm 12.54$  respectivamente) presentan un menor número de cuadros cruzados en comparación con los grupos HTX, OVX y HTX+OVX. En cuanto a las conductas de exploración, el grupo HTX presentó una mayor frecuencia de la conducta vertical y *rearing* con valores de  $27.16 \pm 7.48$  y  $12.5 \pm 5.82$  respectivamente. En contraste, el grupo OVX mostró una mayor frecuencia de inmovilidad y acicalamiento en comparación con los demás grupos experimentales. Estos resultados muestran que la histerectomía con y sin conservación de ovarios, así como la ovariectomía modifican la conducta locomotora y de exploración, confirmando el efecto protector de las hormonas gonadales ante el despliegue de la conducta de ansiedad de la rata hembra.

### INTRODUCCIÓN

A nivel mundial la histerectomía y la ooforectomía son de las dos cirugías ginecológicas más realizadas en la población femenina como consecuencia de neoplasias benignas o malignas en órganos reproductivos. El tipo de procedimiento ginecológico se decide dependiendo del daño y órganos pélvicos comprometidos, de esta manera la histerectomía puede realizarse con conservación de ovarios (histerectomía total y parcial) o sin conservación ovárica (histerectomía radical), mientras que en el caso de la ooforectomía u ovariectomía se lleva a cabo únicamente la remoción ovárica.

Varios estudios han sugerido que la práctica de la remoción uterina desencadena un desajuste en la percepción física y de identidad en mujeres. Independientemente de la causa de la cirugía en mujeres jóvenes la interpretación y sensación de pérdida física o mutilación desencadena episodios de ansiedad, principalmente de tipo depresivo. Al respecto, se desconocen las modificaciones de los

neurotransmisores en el sistema nervioso central, así como los niveles periféricos de las hormonas sexuales a corto y largo plazo.

Es bien sabido que las hormonas esteroides tienen un efecto neuroprotector en mujeres postmenopáusicas con sustitución hormonal en donde se ha observado un mejor desempeño ante las pruebas de memoria y de psicometría. Además, la influencia hormonal cumple un papel fundamental en procesos plásticos de áreas cerebrales implicadas en procesos cognitivos y emocionales, por ejemplo, el número de ramificaciones dendríticas y la cantidad de espinas dendríticas en áreas cerebrales del sistema límbico. En este sentido, existe evidencia del efecto protector de las hormonas esteroides ante el desarrollo y/o aparición de desórdenes mentales tales como los trastornos de ansiedad y depresión.

Recientemente se ha sugerido una comunicación neural entre ovario-útero-cerebro proponiendo un rol importante del tracto uterino en mecanismos cerebrales en ratas hembra (Koebele et al., 2018). Sin embargo, los efectos de la histerectomía con y sin conservación ovárica aún no han sido explorados completamente en un contexto experimental sistemático sobre procesos emocionales, por esta razón en este estudio se evalúa metódicamente el efecto de manipulaciones ginecológicas realizadas en ratas hembra jóvenes y el análisis de la conducta de ansiedad y locomoción a través de la prueba de cuadros cruzados, con el fin de comprender cómo podrían afectar estas cirugías el funcionamiento de procesos emocionales en mujeres.

## TEORÍA

### Ansiedad

El término ansiedad proveniente del latín *anxiētas* que significa congoja o aflicción, hace referencia a un estado de agitación, inquietud o zozobra, que se encuentra relacionado con la previsión de peligros futuros o indefinibles (Mora y Salas, 2014), caracterizado por intranquilidad, expectación aprehensiva y aumento de la vigilancia en ausencia de un estímulo desencadenante (Gómez et al., 2002). Generalmente se define a la ansiedad como una emoción cercana al miedo o un subtipo del miedo, donde el miedo es considerado como un sentimiento producido por un peligro inminente o presente, mientras que la ansiedad como ya fue mencionado, es producida por la anticipación de un peligro futuro, indefinible o imprevisible (Casado, 1994).

Las respuestas generadas por el miedo son consideradas esenciales en la protección de un individuo frente a un peligro, permitiendo desarrollar patrones de comportamiento adecuados ante distintas amenazas, convirtiéndolo en un factor esencial para la sobrevivencia, representando una ventaja desde el punto de vista evolutivo (Mora y Salas, 2014). Por el contrario, la ansiedad produce una reacción desproporcionada con relación al estímulo, afectando de forma negativa la calidad de vida de una persona (Hernández, 2015), esta reacción es determinada por una respuesta excesiva o desadaptativa, cuyos síntomas son intensos, generando un grado de incapacidad en el ámbito familiar, social o laboral, por lo cual es clasificado como patológico, constituyendo uno de los padecimientos psiquiátricos más frecuentes (Polanco et al., 2011), registrándose cifras de 14.3% en México y 28.8% en Estados Unidos, consumiendo recursos de salud y siendo un factor de riesgo de trastornos psicoemocionales e incluso cardiovasculares (Martínez y López, 2011).

En el humano, la ansiedad genera tanto síntomas físicos como mentales (Mora y Salas, 2014). Entre los síntomas más frecuentes están las manifestaciones de reacciones autonómicas, como sudoración, taquicardia, tensión muscular, problemas gastrointestinales e insomnio por mencionar algunos ejemplos (Gómez et al., 2002). Con base en los síntomas que se manifiestan y puesto que es considerado un estado patológico, la ansiedad o trastorno de ansiedad (Polanco et al., 2011) puede ser dividido en cuatro tipos: ansiedad generalizada, crisis de angustia, reacciones de estrés y fobias (Hernández, 2015).

### Incidencia en mujeres

La incidencia de la ansiedad es más frecuente en la mujer con respecto al hombre, atribuida principalmente a las fluctuaciones hormonales durante las diferentes etapas de la vida reproductiva de la mujer. Principalmente en el periodo premenstrual, donde se presentan cambios fisiológicos y psicológicos que se caracterizan por episodios de irritabilidad, depresión y ansiedad (Hernández,

2015). De tal manera que la mujer en edad reproductiva se encuentra más vulnerable a desarrollar un trastorno de ansiedad que un hombre, teniendo un factor de riesgo aproximadamente de dos a tres veces mayor. Los índices de ansiedad de la población muestran cifras con un estimado del 17.5% en mujeres y con un 9.5% en hombres (Arenas y Puigcerver, 2009).

Entre los distintos factores identificados que pueden explicar una mayor tendencia en las mujeres de padecer un trastorno de ansiedad, se han descrito factores psicosociales, socioculturales y biológicos, tales como la reactividad endocrina frente al estrés, los sistemas de neurotransmisión, determinantes neuropsicológicos y los niveles de hormonas sexuales (Arenas y Puigcerver, 2009), entre las que se encuentra la progesterona y el estradiol. Puesto que se ha observado una variedad de cambios físicos y emocionales que han sido asociados a fluctuaciones hormonales durante el ciclo menstrual (Gómez-León, 2000), se ha logrado dilucidar la importancia de estas hormonas y su relación con cuadros de ansiedad.

La progesterona posee un amplio espectro de actividad biológica sobre el sistema nervioso central y periférico, influyendo en la regulación de los aspectos conductuales (Gutiérrez-García et al., 2000). Esta hormona esteroide es secretada por los ovarios, siendo las células de la teca-luteínicas las principales productoras durante la segunda mitad del ciclo menstrual en los ciclos ovulatorios (Buitrón-García et al., 2017). En trabajos recientes se ha observado cómo esta hormona se comporta de forma similar a las benzodiacepinas, poseyendo notables efectos ansiolíticos, tomando como ejemplo el estudio del aumento de la ansiedad agregada a la depresión post-parto, que se acompaña de niveles circulantes altos o bajos de progesterona, sugiriendo que dicha hormona junto con otras hormonas sexuales fungen también como moduladores endógenos de la ansiedad (Pérez de la Mora, 2003).

La otra hormona sexual relacionada con la ansiedad, el estradiol, es una hormona de gran abundancia y relevancia fisiológica en las mujeres en edad reproductiva, cuya principal fuente al igual que el resto de los estrógenos son los ovarios (Togno-Peirce y Morales-Montor, 2009). La ausencia de molestias premenstruales como síntomas físicos, así como psicológicos como la depresión, ansiedad, irritabilidad y cambios de humor se han observado en mujeres que muestran niveles significativamente mayores de estradiol en las diferentes fases del ciclo, principalmente en la fase ovulatoria (Gómez-León, 2000) permitiendo apreciar la relación entre concentraciones altos de estradiol con bajos niveles de ansiedad.

### **Histerectomía y ansiedad**

La histerectomía es el procedimiento operatorio por el cual se practica la resección parcial, total o radical del útero (Vásquez y Vides, 1969). Este procedimiento ha ido evolucionando a través del tiempo, producto de diversos factores como los avances en anestesiología, antibioterapia y técnicas quirúrgicas menos invasivas (Carpio y Garnique, 2009). Esta operación es la segunda cirugía ginecológica más frecuente después de la cesárea (Cuevas et al., 2019) y es uno de los procedimientos realizados con mayor frecuencia para el tratamiento de pacientes con enfermedades uterinas benignas como para afecciones ginecológicas malignas (Birsén et al., 2018), realizándose principalmente en el grupo etario de 40 a 60 años (Sardiñas, 2015).

En países desarrollados es la intervención ginecológica más practicada, reportándose hasta 600,000 histerectomías al año en Estados Unidos, constituyendo el segundo tipo de cirugías mayores en mujeres en edad reproductiva (Carpio y Garnique, 2009). Actualmente, a pesar de que el número de histerectomías ha disminuido a partir de los 60 años de edad, estimaciones recientes sugieren que al menos un tercio de la población femenina se ha sometido a una histerectomía antes de los 50 años (Koebele et al., 2019).

La disección quirúrgica dentro de la pelvis puede provocar daño en los nervios pélvicos y estructuras de soporte, llegando a interrumpir la inervación local así como la integridad anatómica y fisiológica de dichos órganos, teniendo implicaciones negativas para la vida social, la sexualidad y la condición psicológica de la paciente (Birsén et al., 2018; Solá et al., 2006). Posterior al proceso quirúrgico, se ha reportado que la mujer experimenta consecuencias en su calidad de vida, donde se presentan cuadros clínicos de dolores crónicos postquirúrgicos reconocidos actualmente con un problema

clínico (Han et al., 2017); así como alteraciones en el estado de ánimo que experimentan algunas mujeres posterior a la cirugía, destacando trastornos depresivos y de ansiedad (Cuevas et al., 2019).

En los últimos años también se ha observado que existe una mayor prevalencia de ansiedad y depresión en mujeres que han sido sometidas a una histerectomía. Por ejemplo, Wilson et al. (2017) en un estudio de tipo longitudinal identificaron que mujeres de mediana edad, con cinco o más años posteriores de haberles sido retirado el útero (con o sin ooforectomía bilateral), tenían un mayor riesgo de presentar síntomas depresivos. Incluso la terapia hormonal no confería un efecto protector, pudiendo acrecentar el riesgo de exhibir los síntomas y afectar negativamente su calidad de vida.

Los trabajos de Chou et al. (2015) también revelaron que en Taiwán, las mujeres a las que se les había retirado el útero tenían un riesgo más alto de desarrollar depresión. Así mismo, Laughlin-Tommaso et al. (2019) proporcionaron evidencia del posible efecto directo de la ausencia del útero sobre la función cerebral, puesto que mujeres que habían sido sometidas a una histerectomía con conservación de ovarios presentaron una mayor prevalencia de depresión y ansiedad. Además, el riesgo de padecer depresión aumentaba cuando la histerectomía se llevaba a cabo a una edad menor, mientras que con la ansiedad no hubo una interacción estadísticamente significativa.

### **Estudio de la ansiedad en modelos animales**

En el campo de la neurociencia existen modelos animales para el estudio de distintos estados y padecimientos como dolor, depresión, ansiedad, trastornos psicóticos, entre otros (Coronel y Pacheco, 2018), siendo una herramienta clave en la investigación, además de permitir esclarecer procesos: fisiológicos, bioquímicos, conductuales y demás, que se asemejan a los procesos respectivos en el ser humano (Mora y Salas, 2014). Para el estudio de la ansiedad, la identificación y clasificación del repertorio conductual de varias especies animales ha permitido el desarrollo de una serie de paradigmas conductuales utilizados en varios laboratorios experimentales en el mundo (Gómez et al., 2002).

De tal manera que actualmente existen distintos modelos animales para el estudio de la depresión y la ansiedad, no obstante, la mayoría se enfoca en el estudio del comportamiento desde el punto de vista evolutivo; sin embargo, desde hace algunos años también se analizan aspectos fisiológicos, neurobiológicos y farmacológicos (Mora y Salas, 2014). Los estudios enfocados en el comportamiento pueden evaluarse tomando como base dos modelos, los condicionados y los no condicionados, donde estos últimos revelan más variabilidad en los valores conductuales basales, teniendo un nivel más alto de validez neurobiológica, al no requerir de entrenamiento previo y siendo menos susceptibles a la interferencia de procesos mnemónicos o motivacionales (Gómez et al., 2002). Entre los modelos de respuesta no condicionada más empleados para el estudio de la depresión o la ansiedad se encuentra el laberinto de cruz elevado, la prueba de campo abierto y el test de cuadros cruzados, donde en cada uno se evalúan distintos parámetros conductuales que serán relacionados con un aspecto neurobiológico.

## **PARTE EXPERIMENTAL**

### **Sujetos experimentales**

Se utilizaron 30 ratas hembra vírgenes jóvenes de la cepa Wistar obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina UNAM, con tres meses de edad y un peso aproximado de 200 a 220 g al inicio de los experimentos. Todas las ratas se mantuvieron en cajas de acrílico translúcidas (44 x 33 x 25 cm) en el bioterio del Instituto de Investigaciones Psicológicas UV, bajo condiciones de temperatura entre (22±1°C), humedad (60%) con agua y alimento (*ad libitum*) con un ciclo de luz/oscuridad 12:12 (on 6:00h/off 18:00h) durante todo el estudio y mantenidos durante dos semanas sin manipulación para su adecuación a las condiciones de bioterio. Todos los sujetos de experimentación fueron manipulados de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-200-1999) tomando las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, conforme a los lineamientos éticos internacionales basados en la Guía de Manejo y Cuidado de Animales de laboratorio (2008).

### Procedimientos quirúrgicos

Después de dos semanas de adaptación a las condiciones de bioterio las ratas se seleccionaron aleatoriamente y se organizaron en grupos de seis individuos para cada tratamiento: 1) intacto INT, 2) cirugía simulada SHM, 3) histerectomía con preservación de ovarios HTX, 4) ovariectomía OVX, 5) histerectomía sin preservación de ovarios HTX-OVX. Todas las cirugías se realizaron en el laboratorio de medicina traslacional del Instituto de Ciencias de la Salud-UV. Las ratas fueron anestesiadas con un inhalador de Isoflurano de 10 mg mediante un equipo de anestesia con vaporizador de isoflurano. Para ello las ratas fueron expuestas en la caja de inhalación a 5 mg del anestésico hasta quedar completamente insensibilizadas, posteriormente se colocó la mascarilla inhalatoria a una concentración de 2.5 mg durante toda la cirugía, revisando que la respiración y el ritmo cardíaco fueran adecuados. El material quirúrgico fue mantenido en solución Benzal (10%) diluido en agua con antiséptico y desinfectante. En principio, se afeitó la región abdominal ventral con una máquina de afeitar para realizar una incisión en la línea media ventral aproximadamente de 2 cm sobre la piel y el músculo abdominal. Posterior a ello, se localizaron los órganos del aparato reproductor femenino, se colocó un campo de cirugía de (6 x 6 cm) y se procedió a extraer y ligar el tejido (cérvix, cuernos uterinos y ovarios) correspondiente al tratamiento quirúrgico ginecológico para cada grupo experimental. Al finalizar, la incisión fue limpiada con solución salina (0.9%) y se procedió a suturar el músculo con hilo vycril 5.0 mm en forma de cruz y la piel con hilo de seda de 3.0 mm en forma de "U", en donde se aplicó tópicamente isodine 1% y furacin. Finalmente, se administró antibiótico (0.25 ml de Penicilina) y analgésico (0.20 ml de Metamizol Sódico) por vía intramuscular y los sujetos fueron colocados durante 30 min en la caja de recuperación a 33°C. Pasado este tiempo los individuos fueron regresados a su caja acrílica y permanecieron en observación durante 48 h con el fin de evitar que se retiraran los puntos de sutura o complicaciones postoperatorias.

### Prueba conductual

La evaluación conductual fue realizada a través del instrumento validado previamente prueba de cuadros cruzados, con el fin de analizar la conducta locomotora y diferentes tipos de conducta de ansiedad en la rata Wistar, como se describe a continuación.

Para la prueba de cuadros cruzados se utilizó una caja plexiglás con dimensiones 44 X 33 X 40 cm con paredes opacas y base cuadrículada, con un área de cuadros de 11 X 11 cm. En la parte superior del campo fue colocada una cámara web (Logitech 1200) para filmar la conducta de cada sujeto experimental en sesiones de 5 minutos. Dentro del repertorio conductual se registraron los parámetros: número de cuadros cruzados, rearing, posición vertical, inmovilidad y acicalamiento, número de bolos y orina. Al finalizar la prueba conductual de cada individuo, la caja fue limpiada meticulosamente con una solución de etanol al 30%.

Para el registro de esta prueba se evaluaron las siguientes variables:

- a) Número de cuadros cruzados
- b) Posición vertical (frecuencia)
- c) Rearing (frecuencia)
- d) Acicalamiento (frecuencia)
- e) Inmovilidad (frecuencia)
- f) Número de bolos
- g) Orina

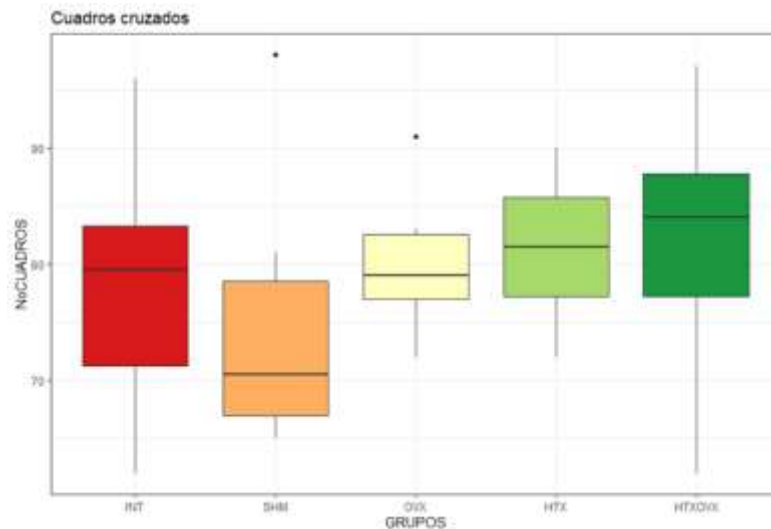
### Análisis estadístico

Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y se optó por una prueba de Kruskal Wallis y ANOVA de una vía dependiendo de la naturaleza de los datos.

### RESULTADOS

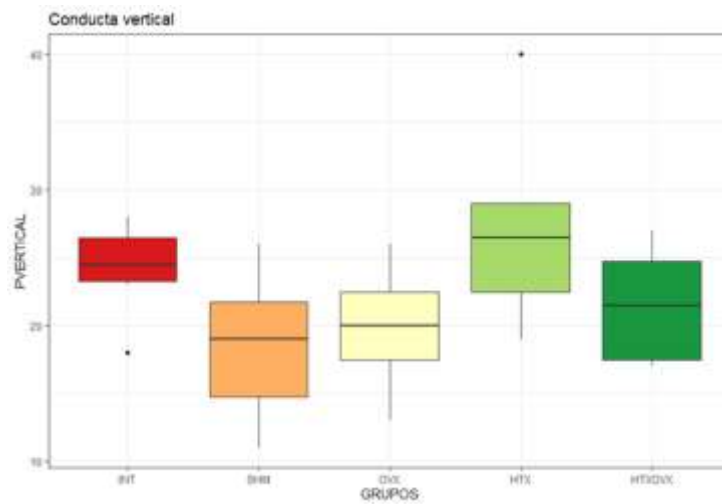
Los resultados indican que el número de cuadros cruzados es similar en todos los grupos experimentales a excepción del grupo sham, el cual mostró una tendencia a presentar un número significativamente bajo en comparación con los demás tratamientos quirúrgicos; el análisis de

varianza de una vía y la prueba post-hoc no mostraron diferencias significativas (gráfica 1) sin embargo, las medidas de tendencia (media±DSM) de los grupos INT y SHM (78.33±11.87 y 75.16±12.54 respectivamente) mostraron un menor número de cuadros cruzados.



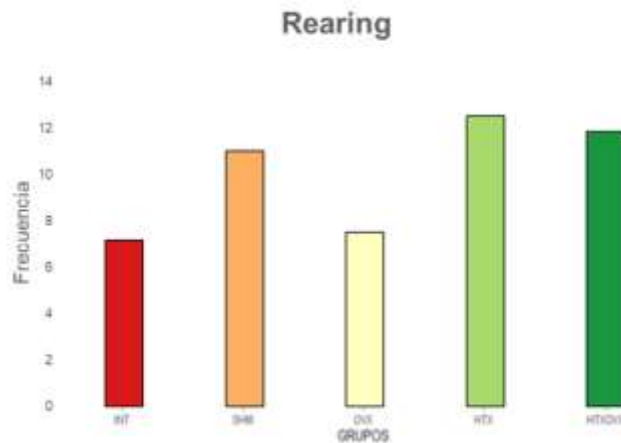
Gráfica 1. Graficación en cajas y alambres del parámetro de cuadros cruzados de los tratamientos ginecológicos evaluados.

En cuanto a las conductas de exploración analizadas, el grupo HTX (con conservación de ovarios) presentó una diferencia en la frecuencia de la exploración en posición erguida en comparación con los demás grupos experimentales (gráfica 2); mientras que en los grupos OVX y HTX+OVX la frecuencia para presentar esta conducta fue menor en comparación con el grupo intacto; lo cual podría estar estrechamente relacionado con la ausencia de una fuente productora de hormonas sexuales. Sumado a este resultado se puede mencionar que las medidas de tendencia (media±DSM) del grupo HTX presentó una mayor frecuencia de la conducta vertical y *rearing* con valores de 27.16±7.48 y 12.5±5.82, respectivamente (gráficas 2 y 3).



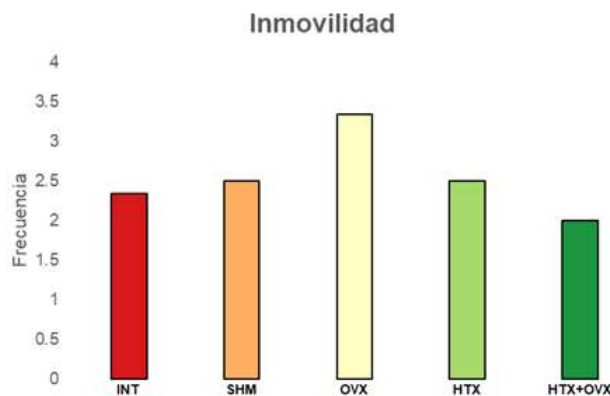
Gráfica 2. Gráfica de cajas y alambres de la conducta vertical en los grupos experimentales.

De forma interesante, pero complementaria a los resultados de otros parámetros analizados, fue que en el grupo Sham, la posición erguida presentó la tendencia a una menor frecuencia de esta conducta en comparación con el grupo HTX (gráfica 2), en donde los valores del ANOVA de una vía fueron de  $F(4,25) = 2.62$ ,  $P > 0.05$ . La evaluación de la conducta de exploración erguido en los cuartos traseros o *rearing* no mostró diferencias estadísticas  $F(4,25) = 2.035$ ,  $P > 0.05$ ; sin embargo, el promedio en el histograma de frecuencias muestra la tendencia a ser menor en el grupo OVX en comparación con los demás grupos experimentales (gráfica 3).



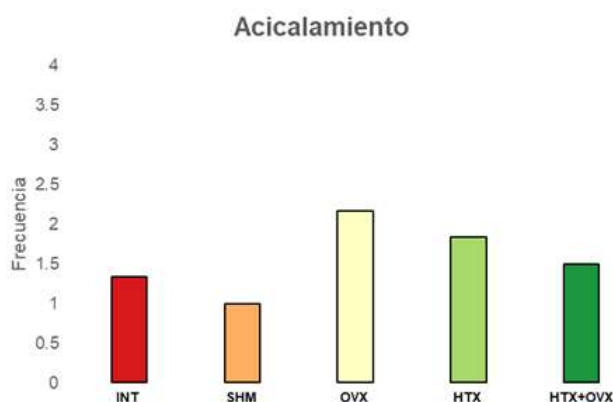
Gráfica 3. Histograma de frecuencias de la conducta *rearing* (erguido en los cuartos traseros) registrada en todos los grupos experimentales.

La prueba de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas tanto en la conducta de inmovilidad ( $P = 0.8307 > 0.05$ ) como en la de acicalamiento ( $P = 0.7825 > 0.05$ ). Tampoco se encontraron diferencias estadísticas al comparar las medidas de tendencia; sin embargo, nuevamente se observó la tendencia a presentar una mayor frecuencia en ambos parámetros en el grupo OVX como se muestra en la gráfica 4 y 5. Además, la conducta de inmovilidad en los grupos de INT, SHM y HTX mostraron frecuencias similares, habiendo diferencia únicamente en los grupos de OVX y HTX+OVX, donde este último mostró la menor frecuencia de todas (gráfica 4).



Gráfica 4. Histograma de frecuencias de la conducta de inmovilidad observada en los diferentes grupos experimentales.





Gráfica 5. Histograma de frecuencias de la conducta de acicalamiento observada en los diferentes grupos experimentales.

### CONCLUSIONES

En conjunto, los resultados obtenidos de la evaluación de los parámetros de la prueba de cuadros cruzados muestran que la histerectomía con y sin conservación de ovarios, así como la ovariectomía modifican la conducta locomotora y la conducta de exploración en la rata hembra. Este efecto puede deberse a la ausencia de una fuente productora de hormonas gonadales en el caso de los grupos con la cirugía ginecológica de histerectomía radical (HTX+OVX) y en el grupo con remoción ovárica/ovariectomía (OVX), sugiriendo un impacto negativo de la remoción de tejidos reproductivos sobre el despliegue de conductas de ansiedad, con un efecto potencial en el desarrollo de trastornos emocionales en la rata hembra. Aunque estos resultados suman evidencias del efecto protector de las hormonas gonadales ante el despliegue de la conducta de ansiedad en ratas hembra, se requieren más estudios y pruebas que confirmen este hecho de forma contundente.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arenas, M. C. y Puigcerver, A. 2009. Diferencias entre hombres y mujeres en los trastornos de ansiedad: una aproximación psicobiológica. *Escritos de Psicología*, 3 (1): 20-29.
2. Birsan, O., Ozban, A. S., Ozban, M. y Kuzu, M. A. 2018. Effects of abdominal and vaginal hysterectomy on anorectal functions along with quality of life of the patient. *African Health Sciences*, 18 (3): 612-622.
3. Buitrón-García, F. R., Bailón-Uriza, R., Santoyo-Haro, S. y Díaz-Sánchez, V. 2017. Evidencias e indicaciones de la progesterona. *Ginecol Obstet Mex*, 85 (8): 489-497.
4. Carpio, L. y Garnique, M. A. 2009. Histerectomía abdominal: estudio comparativo entre la técnica simplificada y la técnica de Richardson. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetrica*, 55 (1): 266-272.
5. Casado, M. I. 1994. Ansiedad, stress y transtornospsicofisiológicos. [Tesis, Universidad Complutense de Madrid]. E-Prints Complutense.
6. Chou, P. et al. 2015. Risk of depressive disorders in women undergoing hysterectomy: A population-based follow-up study. *Journal of Psychiatric Research*, 68: 186-191
7. Coronel, C. M. y Pacheco, R. 2018. Ontogeny of rats behavior on a battery of behavioral tests. *Salus*, 22 (1): 18-25.
8. Cuevas, V., Díaz, L., Espinoza, F., Garrido, C. 2019. Depresión y ansiedad en mujeres histerectomizadas no oncológicas posterior a la cirugía. *Rev. Chil. Obstet. Ginecol.*, 84 (3): 245-256.
9. Gómez, C., Saldívas-González, A. y Rodríguez, R. 2002. Modelos animales para el estudio de la ansiedad. Una aproximación crítica. *Salud Mental*, 25 (1): 14-25.
10. Gómez-León, M. I. 2000. Efectos fisiológicos, emocionales y cognitivos del estradiol. [Tesis, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Psicología]. E-Prints Complutense.

11. Gutiérrez-García, A. G., Contreras, C. M. y Díaz-Meza, J. L. 2000. Cómo actúa la progesterona sobre el sistema nervioso central. *Salud Mental*, 23 (2): 42-48.
12. Han, C., Ge, Z., Jiang, W., Zhao, H. y Ma, T. 2017. Incidence and risk factors of chronic pain following hysterectomy among Southern Jiangsu Chinese Women. *BMC Anesthesiology*, 17 (103): 1-11.
13. Hernández, F. 2015. *Participación del hipocampo dorsal en el efecto ansiolítico del flavonoide crisina: Interacción con el ciclo estral*. [Tesis de Doctorado, Universidad Veracruzana, Instituto de Neuroetología].
14. Koebele, S. V., Palmer, J. M., Hadder, B., Melikian, R., Fox, C., Strouse, I. M., DeNardo, D. F., George, C., Daunis, E., Nimer, A., Mayer, L. P., Dyer, C. A. y Bimonte-Nelson, H. A. 2019. Hysterectomy Uniquely Impacts Spatial Memory in a Rat Model: A Role for the Nonpregnant Uterus in Cognitive Processes. *Endocrinology*, 60(1): 1-19.
15. Laughlin-Tommaso, S. K. et al. 2019. Long-term risk of de novo mental health conditions after hysterectomy with ovarian conservation: a cohort study. *Menopause: The Journal of The North American Menopause Society*, 27(1): 33-42
16. Martínez, M. y López, D. N. 2011. Trastornos de ansiedad. *Revista Neurología, Neurocirugía y Psiquiatría*, 44 (3): 101-107.
17. Medina-Mora, M. E. et al. 2007. Psychiatric disorders in Mexico: lifetime prevalence in a nationally representative sample. *The British Journal of Psychiatry*, 190: 521-528
18. Mora A. y Salas, S. 2014. Modelos animales de miedo y ansiedad: descripciones neuroconductuales. *Actualidades en Psicología*, 28 (117): 1-12.
19. Pérez de la Mora, M. 2003. Dónde y cómo se produce la ansiedad: sus bases biológicas. *Ciencia*, 54 (2): 16-28.
20. Polanco, L. A., Vargas-Irwin, C. y Góngora, M. E. 2011. Modelos animales: una revisión desde tres pruebas utilizadas en ansiedad. *Suma Psicológica*, 18(2): 141-148.
21. Sardiñas, R. 2015. La histerectomía laparoscópica y sus aspectos fundamentales. *Revista Cubana de Cirugía*, 54 (1): 82-95.
22. Solà, V., Ricci, Pardo, J. y Guiloff, E. 2006. Histerectomía: una mirada desde el suelo pélvico. *Rev. Chil. Obstet. Ginecol*, 71 (5): 364-372.
23. Togno-Peirce, C. y Morales-Montor, J. 2009. Esteroides sexuales e inmunidad: el papel del estradiol sobre las células dendríticas. *Revista de Investigación Clínica*, 61 (6): 521-532.
24. Vásquez, J. A. y Vides, M. 1969. Histerectomía Abdominal Total Técnica Subfacial: Revisión de 100 casos. Hospital Vicente D'Antoni. *Rev Med Hondur*, 37 (1): 50-58.
25. Wilson, L. et al. 2017. Hysterectomy and incidence of depressive symptoms in midlife women: the Australian Longitudinal Study on Women's Health. *Epidemiology and Psychiatric Sciences*, Pp. 1-12

**RELACIÓN PESO-LONGITUD Y FACTOR DE CONDICIÓN DEL PARGO RAYADO (*LUTJANUS SYNAGRIS*) EN LA RESERVA DE LA BIÓSFERA LOS PETENES, CAMPECHE**

Daniela Carreño-Loaiza, Karina Yunuen García-Cardoso, Esmeralda Concepción Mendoza-Solís, Luis Amado Ayala-Pérez y Brenda Iliana Vega-Rodríguez

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Departamento El Hombre y su Ambiente. Laboratorio de Ecología Aplicada. Calz. Del Hueso 1100, Col. Villaquietud, Coyoacan, CDMX.

[kariyuugc@gmail.com](mailto:kariyuugc@gmail.com); [luayala@correo.xoc.uam.mx](mailto:luayala@correo.xoc.uam.mx)

**RESUMEN**

El pargo rayado (*Lutjanus synagris*) es una especie dominante en la Reserva de la Biósfera Los Petenes (RBLP), por lo tanto, desempeña una función esencial en la dinámica energética del ecosistema. Tiene alto valor económico para la pesca artesanal, sin embargo, actualmente enfrenta un riesgo de sobreexplotación. Para mejorar las estrategias de su manejo, es necesario contar con información sobre su dinámica poblacional. Por lo tanto, en este trabajo se analizó la relación peso-longitud y el factor de condición de *L. synagris* en la RBLP. Para el análisis se utilizó la base de datos del proyecto "Estudio de la comunidad neotónica marina para el aprovechamiento de especies con potencial ecoturístico en la Reserva de la Biósfera Los Petenes (Fomix Campeche-Conacyt clave CAMP- 2008-C01-95731)". Las recolectas experimentales fueron realizadas en 24 sitios ubicados en la porción marina de la RBLP entre mayo de 2009 a abril de 2010. Con base en un modelo potencial, se calculó mensualmente la relación peso-longitud, el factor de condición relativo<sup>2</sup> y el coeficiente de alometría. Se aplicó la prueba t de Student para evaluar si los coeficientes de alometría eran significativamente diferentes a 3. El factor de condición relativo fue comparado entre meses mediante la prueba de Kruskal-Wallis en el programa Statistica para determinar homogeneidad. El número total de individuos analizados fue de 157, con un peso total de 3,366.49 g, un peso promedio de  $21.4 \pm 29.1$  g y una longitud estándar promedio de  $8.2 \pm 2.4$  cm. El coeficiente de alometría osciló entre 2.3892 en julio y 3.2518 en septiembre, sin embargo, fue estadísticamente igual a 3 en todos los meses. El factor de condición relativo fue ligeramente mayor a uno en todos los meses. La prueba de Kruskal-Wallis demostró que el factor de condición relativo mensual fue homogéneo ( $H = 3.90$ ,  $p=0.9726$ ). El análisis de los datos indicó que los peces incrementan en peso en forma proporcional a la longitud. Cabe precisar que la zona de estudio es considerada como un área de crianza y que la mayoría de los ejemplares examinados son juveniles, por lo cual, se considera que la zona es utilizada para fines de alimentación, crecimiento y maduración.

**INTRODUCCIÓN**

El pargo rayado *Lutjanus synagris* (Linnaeus, 1758) es una especie demersal, estenohalina, carnívora generalista y oportunista de hábitos nocturnos que se caracteriza por formar agregaciones de desove (Luckhurst *et al.*, 2000). Se distribuye desde Carolina del Norte hasta el sureste de Brasil, con una población importante en las costas del Golfo de México (Allen, 1985; Claro *et al.*, 2004). Su creciente demanda y valor comercial la han convertido en una valiosa fuente de ingresos para las pesquerías regionales de países como Bermuda, Cuba, Puerto Rico, Brasil, Venezuela, Colombia y, desde el año 2006, *L. synagris* adquirió una mayor importancia en las capturas comerciales del sureste del Golfo de México por la alta calidad de su carne (Brulé *et al.*, 2004; Landínez-García *et al.*, 2009).

En el estado de Campeche, específicamente en la Reserva de la Biósfera Los Petenes (RBLP), el pargo rayado que ha destacado como especie dominante y desempeña una función importante en la red trófica, enfrenta problemas de sobreexplotación derivados de una intensa actividad pesquera, uso de artes inadecuadas e incumplimiento a vedas y a tallas mínimas de captura (Rivera, 1990; CONANP, 2006; Ayala-Pérez *et al.*, 2014; Toro-Ramírez *et al.*, 2017). Es importante mencionar que, en el año 2015, la especie fue catalogada como casi amenazada en la lista roja de especies (Lindeman *et al.*, 2016).

Debido a lo anterior, es necesario tomar medidas adecuadas para la conservación de *L. synagris*, por ello es de suma importancia comprender su dinámica poblacional a través de métodos que nos permitan conocer su crecimiento (Cifuentes *et al.*, 2012). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio es analizar la relación peso-longitud y el factor de condición relativo de *L. synagris* en la Reserva de la Biósfera Los Petenes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La RBLP es una franja costera larga y estrecha, con porciones terrestre y marina. Se localiza entre los 20°51'30" y 19°49'00" de latitud Norte y los 90°45'15" y 90°20'00" de longitud Oeste, en la costa norte del estado de Campeche (CONANP, 2006) (Fig. 1).

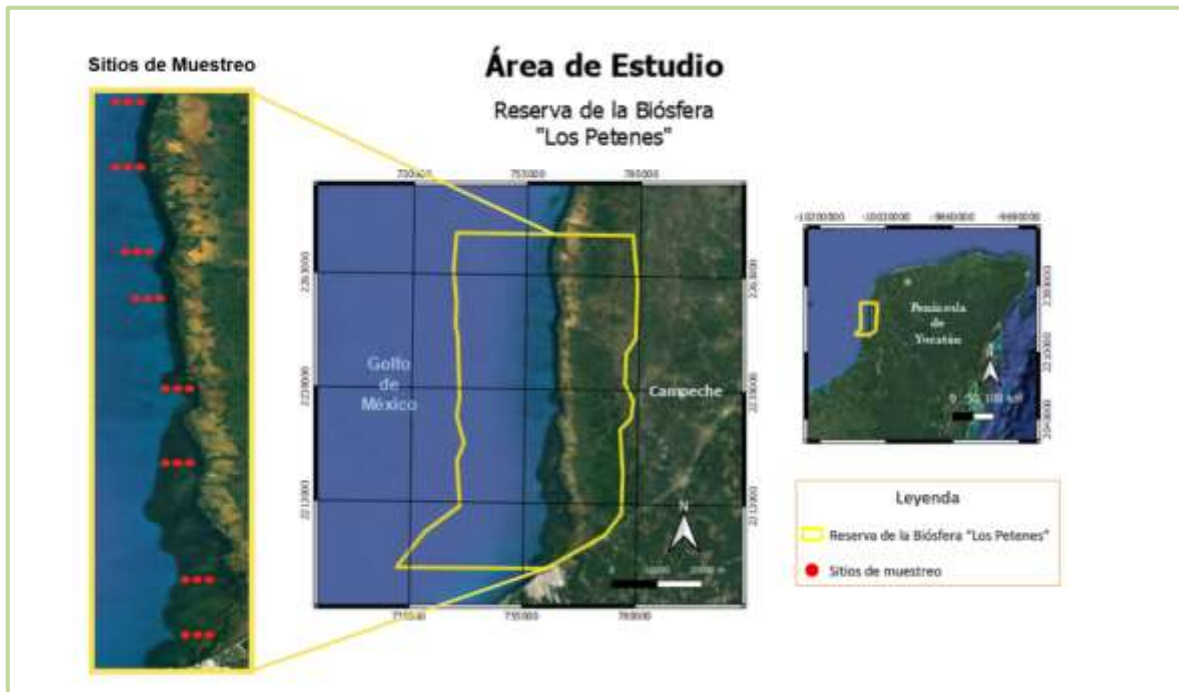


Figura 1. Ubicación de la RBLP y los sitios de muestreo. Realizado con el Sistema de Información Geográfica QGIS 3.6.0 (QGIS Software Inc., 2019).

Para realizar este estudio se utilizó la base de datos del proyecto “Estudio de la comunidad nectónica marina para el aprovechamiento de especies con potencial ecoturístico en la Reserva de la Biósfera Los Petenes” con financiamiento Fomix Campeche-Conacyt clave CAMP-2008-C01-95731, la cual fue proporcionada por el Laboratorio de Ecología Aplicada. Las recolectas se realizaron entre mayo 2009 a abril 2010 en 24 sitios (Muñoz-Rojas *et al.*, 2013) (Fig. 1).

Se analizó mensualmente la relación peso-longitud mediante la regresión potencial:

$$W = aL^b \quad (1)$$

Donde,  $W$  es el peso total en gramos,  $L$  es la longitud total en cm,  $a$  es la ordenada al origen y  $b$  la pendiente que representa el tipo de crecimiento. Si  $b = 3$ , entonces el crecimiento es considerado isométrico, y cuando  $b \neq 3$ , se considera alométrico. Esto puede ser negativo ( $b < 3$ ) cuando los peces crecen más en longitud, o positivo ( $b > 3$ ) cuando los peces crecen más en peso (Froese, 2006).

Para evaluar si los coeficientes de alometría fueron significativamente diferentes de 3, se aplicó la prueba t de Student con el siguiente estadístico (Zar, 2014):

$$t = \frac{b - \beta_0}{s_b}$$

Donde  $t$  es de  $t$  de Student,  $b$  es el coeficiente de alometría,  $\beta_0$  es la pendiente de referencia ( $=3$ ) y  $S_b$  el error estándar. La hipótesis a probar fue  $H_0: b=3$  (crecimiento isométrico) y  $H_a: b \neq 3$  (crecimiento alométrico).

El factor de condición relativo ( $Kn$ ) se calculó de acuerdo a Le Cren (1951):

$$Kn = \frac{W}{a \times L^b} \quad (3)$$

Donde  $W$  es el peso,  $L$  la longitud,  $a$  es la ordenada al origen y  $b$  es el tipo de crecimiento.

Posteriormente el factor de condición relativo fue comparado entre meses mediante la prueba de Kruskal-Wallis en el programa Statistica para determinar homogeneidad.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se registró un total de 157 individuos, con un peso total de 3,366.49 g, un peso promedio de  $21.4 \pm 29.1$  g y una longitud estándar promedio de  $8.2 \pm 2.4$  cm. La talla puede ser un indicador de la madurez sexual, pero esta puede variar dependiendo de la región geográfica, las condiciones climáticas, la edad y de la variación genética de la población (Ribeiro *et al.*, 2017). Debe precisarse que para la zona no hay registros de la talla de madurez sexual para esta especie, sin embargo, en un estudio realizado por Sandoval (1999) en un ecosistema cercano, se estableció que es de 21.35 cm LT. Fundamentado en lo anterior, se asume que la población analizada en este estudio se encuentra representada en su mayoría por organismos juveniles, lo cual, puede ser un indicador de que se están llevando a cabo funciones de crecimiento, alimentación y resguardo en la zona litoral de la RBLP (Rosas-Valdez *et al.*, 2019).

En la tabla 1 se encuentra el resultado del coeficiente de alometría que, de acuerdo a la prueba  $t$ , se determinó que el valor de  $b$  es estadísticamente igual a 3 en todos los meses. Esto significa que su crecimiento es de tipo isométrico, el peso incrementa en forma proporcional a la longitud. Dicho resultado coincide con lo reportado por Gómez (2002) en tres sectores del Caribe Colombiano con valores de  $b$  entre 2.9868 a 3.0346.

Tabla 1. Parámetros de la relación peso-longitud calculados mensualmente. Ordenada al origen (*a*), coeficiente de alometría (*b*) y prueba estadística *t* de Student (*t*).

<i>Mes</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>t</i>
<i>Mayo</i>	0.0373	2.9362	-0.3284917
<i>Junio</i>	0.0328	2.9935	-0.0114922
<i>Julio</i>	0.1095	2.3892	-0.5329684
<i>Agosto</i>	0.0616	2.677	-0.3352866
<i>Septiembre</i>	0.0208	3.2518	0.62659437
<i>Octubre</i>	0.0359	2.8812	-1.252341
<i>Noviembre</i>	0.0678	2.6179	-0.7807188
<i>Diciembre</i>	0.1119	2.3944	-0.662797
<i>Enero</i>	0.0396	2.8693	-0.2047975
<i>Febrero</i>	0.0213	3.17	0.13856868
<i>Marzo</i>	0.0264	2.9856	-0.0091949
<i>Abril</i>	0.1119	2.436	-0.2339605

La prueba de Kruskal-Wallis demostró que el factor de condición relativo fue homogéneo en todos los meses ( $H = 3.90$ ,  $p=0.9726$ ). El valor de  $K_n$  en todos los meses fue ligeramente mayor a 1 (Fig. 2). Estos resultados podrían indicar que el crecimiento y desarrollo de los individuos no se ve afectado por alguna condición en su hábitat y que la población se encuentra en condiciones saludables dentro del ecosistema (Leyton *et al.*, 2015; Valdez-Zenil *et al.*, 2015). La RBLP presenta un hábitat de maglares y de pastos marinos que son importantes para el desarrollo de especies marinas en etapas juveniles (CONANP, 2006; Rosas-Valdez *et al.*, 2019). Por un lado, el manglar ofrece protección a las especies por medio de sus raíces y asegura la disponibilidad de alimento por el aporte de nutrientes durante la degradación de hojarasca (Vega-Cendejas, 2004). Por otro lado, los pastos marinos de la RBLP albergan múltiples organismos, muchos de ellos crustáceos de las familias Squillidae y Sicyoniidae, que son las presas preferibles de *L. synagris* (Doncel y Páramo, 2010; Herrera-Pérez, 2019; Sotelo, 2019).

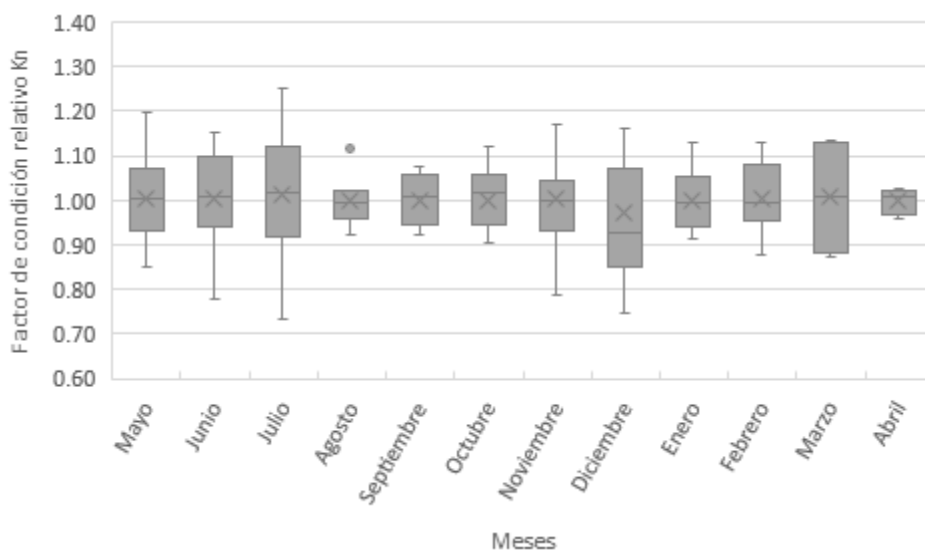


Figura 2. Representación del factor de condición relativo mensual mediante gráficos de caja y bigote.

## CONCLUSIONES

Se determinó que la población de *L. synagris* durante el ciclo anual 2009- 2010 se encontró en etapa juvenil, la cual se caracterizó por un crecimiento de tipo isométrico y un factor de condición cercano a 1. Los resultados mostraron que la población del pargo rayado no presenta alteraciones en su crecimiento y desarrollo durante el ciclo estudiado a pesar de la explotación pesquera de la zona. Es recomendable hacer monitoreos de la zona para proponer estrategias de conservación que ayuden a mantener constantes sus poblaciones, permitiendo el reclutamiento de juveniles.

## BIBLIOGRAFÍA

1. E. Rivera, "Ecología trófica de dos poblaciones de peces tropicales costeros (*Polydactylus octonemus* y *Lutjanus synagris*) del sur del Golfo de México". Tesis Profesional, Facultad de Ciencias, UNAM, México, 1990, p. 59.
2. F. Ribeiro, N. B. Santos, R. N. Carvalho & Z. de Silva, "Aspectos reprodutivos do peixe *Lutjanus synagris* (Perciformes, Lutjanidae) capturado na costa nordeste do Brasil", *Rev. Bras. Eng. Pesca*, Vol. 10, 1, 2017, pp. 106-120.
3. M. Rosas-Valdez, L. A. Ayala-Pérez, M. G. Figueroa-Torres & I. E. Roldán-Aragón, "Seagrass and Fish in Los Petenes Biosphere Reserve, Campeche, México: Spatial and Temporal Biomass Patterns", *Int. J. Mar. Sci.*, Vol. 35, 2019, pp. 577-586.
4. Toro-Ramírez, A. Sosa-López, L. A. Ayala-Pérez, D. Pech, D. Hinojosa-Garro & R. Del Río-Rodríguez, "Abundancia y diversidad de la ictiofauna en la Reserva de la Biósfera Los Petenes, Campeche, México: asociaciones con los ciclos nictimerales y las épocas climáticas", *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, Vol. 45, 2, 2017, pp. 311-321.
5. E. Luckhurst, J. M. Dean & M. Reichert, "Age, growth and reproduction of the lane snapper *Lutjanus synagris* (Pisces: Lutjanidae) at Bermuda", *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, Vol. 203, 2000, pp. 255-261.
6. D. Le Cren, "The Length-Weight Relationship and Seasonal Cycle in Gonad Weight and Condition in Perch, *Perca fluviatilis*", *J. Anim. Ecol.*, Vol. 20, 1951, pp. 201-219.
7. Gómez, "Identificación de stocks de pargo rayado, *Lutjanus synagris* (Linnaeus, 1788) en el área norte del Caribe Colombiano", Trabajo de grado en Biología Marina, Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Facultad de Biología marina, Colombia, 2002, p. 111.
8. CONANP (Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas), "Programa de Conservación y Manejo Reserva de la Biosfera los Petenes", México, D. F., 2006, p. 203.

9. Sotelo, "Pastos Marinos", In *Tópicos de Agenda para la Sostenibilidad de Costas y Mares Mexicanos* (Rivera-Arriaga, E., P. Sánchez-Gil & J. Gutiérrez, UAC, 2019, pp. 87-100.
10. R. Allen, "FAO species catalogue, Snappers of the World. An annotated and illustrated catalogue of lutjanid species known to date", *FAO Fisheries Synopsis*, Vol. 125, 6, 1985, p. 208.
11. M. Herrera-Pérez, "Variabilidad temporal de la macrofauna epibentónica de la zona costera de La Reserva de la Biosfera Los Petenes, Campeche, México", Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma, Perú, 2019, p. 71.
12. J. Valdez-Zenil, R. Rodiles-Hernández, A. F. Gonzáles-Acosta, E. Barba-Macías & M. Mendoza-Carranza, "Abundancia relativa, estructura de tallas y relación longitud-peso de la mojarra mexicana *Eugerres mexicanus*", *Ecosist. Recur. Agropec.*, Vol. 2, 6, 2015, pp. 349-356.
13. J. Zar, "Biostatistical Analysis" Pearson, Estados Unidos de América, 2014, p. 756.
14. K. Lindeman, W. Anderson, K. E. Carlander, R. Claro, J. Cowan, B. Padovani-Ferreira, L. A. Rocha, G. Sedberry & M. Zapp-Sluis, "*Lutjanus synagris*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016, 2016, En <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T194344A2317059>.
15. L. A. Ayala-Pérez, O. Vasco-Villa & A. Sosa-López, "Evaluación de las asociaciones de peces dominantes influenciadas por el ciclo nictemeral y la variación temporal de la Reserva de la Biósfera Los Petenes, Campeche, México", *CienciaUAT*, Vol. 9, 1, 2014, pp. 33-43.
16. M. E. Vega-Cendejas, "Ictiofauna de la Reserva de la Biosfera Celestún, Yucatán: una contribución al conocimiento de su biodiversidad", *Serie Zoología. Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México, Bot.*, Vol. 75, 1, 2004, pp. 193-206.
17. N. Sandoval, "Análisis reproductivo y de fecundidad de dos especies demersales *Lutjanus synagris* y *Lutjanus analis* en el Golfo de Salamanca, Caribe colombiano", Tesis de Grado Ingeniería Pesquera. Facultad de Ingeniería Pesquera, Universidad del Magdalena, Santa Marta, 1999, p. 100.
18. O. Doncel & J. Paramo, "Hábitos alimenticios del pargo rayado, *Lutjanus synagris* (Perciformes: Lutjanidae), en la zona norte del Caribe colombiano", *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, Vol. 38, 3, 2010, pp. 413-426.
19. QGIS Software Inc, Sistema de información geográfica, Versión 3.6.0, A free and open source geographic information System, 2019, <http://qgis.org>.
20. R. Claro, "Ecología y ciclo de vida de la biajaiba, *Lutjanus synagris* (Linnaeus), en la plataforma cubana. IV. Reproducción", *Biol. Pesq. Acad. Cienc. Cuba*, Vol. 5, 1982, pp. 1-37.
21. R. Cifuentes, J. González, G. Montoya, A. Jara, N. Ortiz, P. Piedra & E. Habit, "Relación longitud-peso y factor de condición de los peces nativos del río San Pedro (cuenca del río Valdivia, Chile)". *Gayana Especial*, 2012, pp. 101-110.
22. R. Froese, "Cube law, condition factor and weight-length relationships: history, meta-analysis and recommendations", *J. Appl. Ichthyol.*, Vol. 22, 2006, pp. 241-253.
23. R. Landínez-García, S. Ospina-Guerrero, D. Rodríguez-Castro, R. Arango, y E. Márquez, "Análisis genético de *Lutjanus synagris* en poblaciones del Caribe Colombiano", *CM*, Vol. 35, 4, 2009, 321-331.
24. S. Leyton, E. Muñoz, M. Gordillo, G. C. Sánchez, L. A. Muñoz & A. Soto, "Estimation of Fulton's condition factor (K) and the length-weight relationship of three fish species present in a sector subjected to environmental stress factors in high Cauca river basin", *Revista ACCB*, Vol. 27, 2015, pp. 21-28.
25. S. Muñoz-Rojas, L. A. Ayala-Pérez & G. J. Villalobos-Zapata, "Distribución y abundancia de la comunidad de peces en la porción litoral de la Reserva de la Biósfera Los Petenes, Campeche, México", *Rev. Biol. Trop.*, Vol. 61, 1, 2013, pp. 213-227.
26. T. Brulé, M. T. Colás, D. E. Pérez & C. Déniel. "Biología, explotación y gestión de los meros (Serranidae, Epinephelinae, Epinephelini) y pargos (Lutjanidae, Lutjaninae, Lutjanus) del golfo de México", en *Diagnóstico ambiental del Golfo de México. Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales* (Caso, M., I. Pisanty & E. Ezcurra, Instituto Nacional de Ecología, 2004), pp. 245-300.



## EFFECTO DE LA BIOACUMULACIÓN DE CADMIO EN EL DESARROLLO DE *PHASEOLUS VULGARIS* VARIEDAD PINTO SALTILLO

Damara Benazir Damas Solano, Juan Antonio Valencia Hernández, Areli Rodríguez Ontiveros, Víctor Pérez Moreno, Juan Campos Guillén, Miguel Ángel Rico Rodríguez.

Universidad Autónoma de Querétaro.  
benadamas@gmail.com

### RESUMEN

La contaminación por cadmio (Cd) proveniente de jales resultado de actividades mineras contamina los suelos debido a su toxicidad, persistencia y alta movilidad. Al entrar en contacto con las plantas reduce la absorción y translocación de nutrientes y agua, altera el metabolismo e inhibe su morfología y fisiología. Las fabáceas como el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) tienen la capacidad de bioacumularlo en sus partes comestibles y como consecuencia se da un proceso de biomagnificación en la cadena trófica, viabilizando su acceso para los seres humanos y animales. *P. vulgaris* variedad pinto Saltillo es una leguminosa que se siembra en zonas agrícolas de la región minera del estado de Querétaro. El objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad de bioacumulación de Cd y su efecto en el desarrollo de *P. vulgaris* pinto Saltillo. Se realizó análisis fisicoquímico de dos suelos, el primero siendo arena de río y el segundo colectado de una parcela de la comunidad de Maconí, Cadereyta de Montes. En planta se determinaron parámetros morfofisiológicos (grosor de tallo y altura) y las concentraciones de Cd en hoja, suelo y el índice de bioacumulación por espectrofotometría de adsorción atómica de flama, previa digestión ácida, todo lo anterior durante 3 etapas fenológicas. Se colocaron plántulas en macetas con arena de río dopada con 50 y 100 mg Cd kg<sup>-1</sup> de suelo (T150 y T2100 respectivamente) más un testigo, y sin dopar en el suelo de Maconí (Maconí). Se encontró que la arena presenta textura arenosa y el suelo de Maconí franco arenosa, el contenido de materia orgánica en ambos suelos es bajo y tienen pH superior a 7, los valores de densidad real indicaron que no existen problemas de compactación. Se observó crecimiento retardado y el estudio de elongación mostró que a mayor concentración de Cd aumenta la altura de las plantas. El grosor del tallo es más ancho en las plantas sembradas en Maconí. Para los resultados en suelo la concentración de Cd disminuyó desde 102.4 mgkg<sup>-1</sup> en el muestreo 1, 85.5 mgkg<sup>-1</sup> muestreo 2 y 80.1 mgkg<sup>-1</sup> muestreo 3 para el suelo de Maconí, para los tratamientos con arena durante el muestreo 3 la concentración fue en T150 de 151.7 mgkg<sup>-1</sup> muestreo 1, 116.4 mgkg<sup>-1</sup> en el muestreo 2 y 92.20 mgkg<sup>-1</sup> en el muestreo 3. En T2100 los resultados obtenidos en orden decreciente fueron de 182.7 mgkg<sup>-1</sup> para el muestreo 1, 157.4 mgkg<sup>-1</sup> para el muestreo 2 y para el muestreo 3. El índice de bioacumulación ocurre en la siguiente secuencia T2100>T150>Maconí>Testigo para el muestreo 1 y el 2, para el muestreo 3 es T2100>Maconí>T150>Testigo. Este estudio permitió determinar que el Cd sí afecta en el desarrollo de *P. vulgaris* además que la variedad pinto Saltillo es capaz de remover Cd del suelo y almacenarlo en sus hojas.

### INTRODUCCIÓN

La contaminación del suelo por metales pesados puede originarse por diversas fuentes naturales o por actividades antropogénicas, se acumulan en la superficie del suelo entrando en contacto con organismos y microorganismos que habitan en el medio (Roqueme *et al.*, 2015, Jiménez, 2017). En México se ha reportado la presencia de metales pesados distribuidos en ríos, lagos, partículas en el aire y en suelo (Martorell, 2010).

La presencia de especies metálicas en suelo ha aumentado principalmente por actividades mineras y el inadecuado manejo y disposición de sus residuos dando paso a la creación de "Jales mineros"; estados como San Luis Potosí, Guerrero, Zacatecas y Sonora presentan severos daños por esta misma causa (Mireles *et al.*, 2012, Cortés *et al.*, 2013).

Dentro de este grupo de metales el cadmio (Cd), puede movilizarse a través del aire o escorrentías llegando a zonas agrícolas, haciendo contacto con cultivos que pueden absorberlo y almacenarlo como el frijol (Jiang *et al.*, 2015). Esto lo vuelve accesible al ser humano a través de la cadena trófica y debido volviéndose peligroso pues la toxicidad del Cd afecta diferentes órganos y el sistema óseo

(Sarwar *et al.*, 2016) La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido que el nivel máximo de tolerancia de Cd en seres humanos es de  $7 \mu\text{gkg}^{-1}$  de peso corporal, sin embargo este puede persistir y acumularse en el cuerpo hasta 30 años (Roberts, 2014, Zia-ur-Rehman *et al.*, 2015). Por lo anterior que el presente trabajo, tiene como objetivo evaluar la capacidad de bioacumulación de Cd y su efecto en el desarrollo de *Phaseolus vulgaris* variedad pinto Saltillo.

## TEORÍA

### El suelo

El suelo se forma a partir de la desintegración de rocas superficiales por acción del agua, viento y cambios de temperatura; está compuesto por minerales, materia orgánica, organismos vegetales, animales y microbianos, etc. siendo importante para el desarrollo de la vida (FAO, 2019). Cumple diversas funciones entre ellas la producción de alimentos, capacidad de retención del agua, regular los gases de efecto invernadero, alojar gran biodiversidad, etc. (Jiménez, 2017).

Las propiedades del suelo van modificándose por causas naturales o por actividades antropogénicas, éstas últimas, son las que en mayor medida provocan disminución en la calidad y rendimiento del suelo. Es por ello se deben de buscar acciones que devuelvan el suelo afectado lo más parecido posible a su estado natural (Navarro, 2014).

### Situación del suelo en México

En México, la degradación del suelo ha afectado cerca del 50 % de la superficie del país principalmente derivado de actividades antropogénicas (Bolaños *et al.*, 2016). Ocupando el primer lugar la degradación química (34.04 millones de hectáreas, 18 % del territorio nacional), seguida por erosión hídrica (22.72 millones de hectáreas, 12 %), erosión eólica (18.12 millones de hectáreas, 10 %) y, al final, la degradación física (10.84 millones de hectáreas, 6 %) (SEMARNAT, 2015).

En México la minería representa un gran aporte económico, sin embargo, la falta de control en la actividad ocasiona contaminación con metales pesados en el suelo además de un grave daño general al medio ambiente. El suelo cercano a las zonas mineras sufre alteraciones al aumentar las concentraciones de los metales ya presentes (Natal-da-Luz *et al.*, 2011).

### Metales pesados

Algunos metales como el cobre (Cu), zinc (Zn), níquel (Ni) y manganeso (Mn) son micronutrientes esenciales para las plantas, mientras que otros como el cadmio (Cd) y el plomo (Pb) no tienen una función conocida. El exceso de estos metales se bioacumulan y se biomagnifican en la cadena trófica (Pirzadah *et al.*, 2015).

De acuerdo con Reyes- Navarrete *et al.* (2010) los metales pesados son un grupo de metales o metaloides asociados con contaminación y toxicidad potencial. Las actividades industriales favorecen la generación de residuos por metales pesados, su presencia en el medio ambiente es una gran amenaza para el ser humano (Zhang *et al.*, 2012).

Poseen alta densidad (mayor a  $4 \text{gcm}^{-3}$ ), masa y peso atómico por encima de 20, y son tóxicos en bajas concentraciones. Los metales son persistentes por lo cual no pueden degradarse mediante procesos biológicos ni químicos (Martorell, 2010).

La constante exposición del medio ambiente a los metales pesados y el exceso de estos resulta en la alteración molecular en todos los niveles de organización biológica, en plantas implica un peligro por lo que minimizar la entrada de estos contaminantes a la cadena alimentaria es una tarea imperativa para el desarrollo sostenible (Galante *et al.*, 2013, Pirzadah *et al.*, 2015).

### Contaminación de suelo por cadmio

Los metales pesados que provienen de actividades antropogénicas se originan principalmente del sector industrial, la minería y la industria agrícola, algunas veces también en los residuos sólidos urbanos (Huertos y Baena, 2008). Sin embargo los desechos que se generan son descargados directamente o arrastrados por escorrentías siendo depositados en los suelos (Fuentes *et al.*, 2010).

El cadmio es parte de la composición natural de algunas rocas y suelos asociado a otros metales como el sulfuro (sulfato o sulfuro de cadmio) siendo este el único mineral del cadmio a partir del cual se liberan al medio ambiente una cantidad cercana a 25,000 toneladas (Minaya, 2014).

El cadmio que ingresa por vía respiratoria o por vía oral, se transporta a la sangre y se concentra en el hígado y el riñón provocando daños irreversibles aún para concentraciones reducidas, se ha reportado niveles elevados de cadmio en sangre, así como arsénico en orina de niños (Trejo *et al.* 2009).

También es reconocido por presentar mayor tendencia a acumularse en las plantas, provocando severos desequilibrios en los procesos de nutrición y transporte de agua en las plantas, sin embargo este proceso de bioacumulación es lo que vuelve a algunos tipos de plantas como potenciales bioacumuladoras de cadmio en sitios contaminados (Singh y Tewari, 2003).

La movilidad y biodisponibilidad del cadmio en agua y suelos depende de la forma química que este adopte, variando en función variables como el pH y la presencia de cationes y aniones orgánicos e inorgánicos que estén presentes en el suelo. (Cullen y Maldonado, 2013).

Chang *et al.* (2018) encontraron exposición de lantano (La) y Cd tanto en forma individual y combinada tiene efectos negativos sobre el crecimiento en maíz disminuyendo en un 15.3 %.

La principal vía de exposición al Cd es en los alimentos (Chaney 2012). Un ejemplo es un estudio realizado en cultivares de arroz en China, los cultivos presentaban concentraciones de Cd que provocó ablandamiento de los huesos e insuficiencia renal en los afectados (Li *et al.* 2011).

### Bioacumulación

La bioacumulación se entiende como la reducción de diversos compuestos tóxicos a partir de procesos bioquímicos realizados por las plantas y microorganismos asociados a ellas (Li *et al.*, 2015).

Se han identificado una amplia diversidad de especies que se emplean para este fin. En la Figura 1 se puede apreciar cómo responden las plantas ante los metales pesados, actualmente se conocen alrededor de 400 especies de plantas bioacumuladoras (Ali *et al.*, 2013).

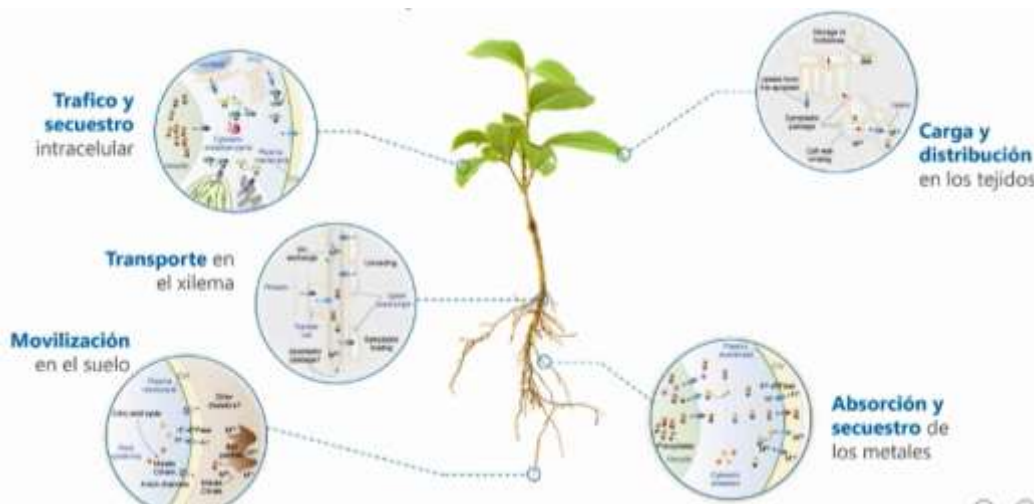


Figura 1. Respuesta de las plantas ante la presencia de metales pesados en suelo.

Los mecanismos de tolerancia varían entre las distintas especies de plantas y están determinados por el tipo de metal, eficiencia de absorción, traslocación y secuestro.

## Frijol

*Phaseolus vulgaris* o frijol pertenece al Reino Plantae, Subreino Traqueobionta, Superdivisión Sermayophyta, División Magnoliophyta, Clase Magnoliopsida, subclase Rosidae, 23 Orden Fabales y Familia Fabacea. Es nativa del continente americano, distribuida principalmente en los trópicos en pedregales y matorrales, puede presentarse en selva baja caducifolia o en bosques de pino-encino. En México se cultiva en 17 estados incluyendo Querétaro. Este cultivo en específico tiende a acumular cationes tóxicos en raíces, no pudiendo detectarse en el fruto agrícola (Portuondo, 2011)

El frijol es parte importante en la economía de los mexicanos desde tiempos prehispánicos, formando parte de la cultura gastronómica de México, existe una gran variación en su hábito de crecimiento entre otras características morfológicas y se pueden consumir todas sus partes: flores, semillas y ejotes; ya sean tiernas o maduras (FAO, 2018). Actualmente se conocen más de 150 variedades de frijoles, de las cuales sólo una tercera parte se encuentran en México; por ejemplo el frijol blanco (alubia), negro, flor de mayo, morado, pinto, canario, y ayocote (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2019).

Frijol Pinto Saltillo proviene de una cruce entre las variedades Hidalgo 77, MAM 30, Michoacán 91A, BAT 76, BAT 93 y G5653, con la finalidad de obtener variedades resistentes a enfermedades como: Antracnosis, roya, tizón común, tizón de halo y pudriciones de la raíz; y que sea tolerante a sequía (Sánchez, 2001).

El crecimiento y los rasgos fisiológicos de los genotipos del frijol pueden afectarse por un tratamiento de cadmio a corto plazo (Bahmani *et al.*, 2014). Por tanto, es de gran interés estudiar la respuesta de diferentes genotipos de frijol a la toxicidad del Cd.

Bahmani *et al.*, 2020 estudiaron la ocurrencia de variación genotípica para la tolerancia al cadmio en 3 genotipos de frijol (Emerson, Taylor y G-11867) y concluyeron que a niveles bajos de acumulación de Cd y estrés oxidativo existe mayor tolerancia así como a menores efectos sobre las hormonas vegetales y el contenido de clorofila.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Caracterización fisicoquímica de suelos

#### Obtención de suelo

En la localidad de Maconí, Cadereyta de Montes, Querétaro en una zona próxima a un jal minero, se realizó un muestreo en zigzag de un suelo de 60 m de largo y 10 m de ancho a una profundidad de 30 cm. Se empleó el método de cuarteo para obtener una muestra compuesta y realizar los análisis fisicoquímicos seleccionados de la NOM-021-SEMARNAT-2000 que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis.

#### Cuantificación de la concentración de Cd en suelo mediante absorción atómica de flama

Para la determinación de Cd en el suelo de Maconí y en arena las muestras se digirieron en un microondas (Microwave reaction system, Aanton Para). Se empleo un control de agua destilada con HNO<sub>3</sub> al 10 % y un estándar de Cd. La lectura de determinación se realizó en un espectrofotómetro de absorción atómica por la técnica de flama (EAA-FID) Perkin Elmer.

#### Extracción del metal del suelo

Por triplicado se realizó la digestión de la muestra de suelo siguiendo lo descrito por la el método 3051 de la Agencia de Protección Ambiental (EPA por sus siglas en inglés): Digestión ácida de lodos, sedimentos, suelos y aceites asistidos por microondas, para posterior análisis por espectrometría de masas. Las muestras fueron secadas a 60 ° durante 48 h, molida, pasada por un tamiz de 2 mm y almacenada en un sitio libre de humedad. Para la extracción se colocaron 0.5 g de suelo en vaso de teflón, se adicionaron 5 mL de HNO<sub>3</sub> J.T. Baker concentrado. Posteriormente se filtraron las muestras con papel Whatman No. 40 y se aforo a 10 mL con agua destilada.

#### Bioensayos

Las semillas de frijol variedad Pinto Saltillo se sembró en el suelo obtenido de la localidad de Maconí y en arena, bajo condiciones controladas en invernadero. En macetas se colocó suelo de Maconí. En las de arena se emplearon 2 tratamientos con Cd a partir de la sal CdCl<sub>2</sub> mostrados en el Tabla

1, la selección de las concentraciones de las soluciones sintéticas metálicas utilizadas para el dopaje del suelo se establecieron con base a la NOM-147- SEMARNAT/SSA1-2004, para la remediación de suelos agrícolas.

Tabla 2. Diseño experimental

Tratamiento	
Identificación	CdCl <sub>2</sub>
Testigo	0
T150	50
T2100	100
Maconí	0

Donde

- Control: Planta + Arena
- T1-50: Planta + Arena con una concentración de CdCl<sub>2</sub> de 50 mgkg<sup>-1</sup>
- T2-100: Planta + Arena con una concentración de CdCl<sub>2</sub> de 100 mgkg<sup>-1</sup>
- T3-Maconí: Planta + Suelo de Maconí

Cultivo de semilla de frijol

Las semillas de frijol variedad pinto Saltillo fueron adquiridas del Instituto Nacional de investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Para germinación de las semillas se colocaron en almácigos con arena durante 6 días. A los 14 días se realizó el trasplante a macetas de 20 x 20 utilizando dos sustratos, el primero fue el suelo colectado de Maconí y para el segundo sustrato se empleó arena. Por cada maceta se colocaron 1.3 kg de suelo, se fijó el riego entre 2 y 3 días.

Estudio de elongación de tallo y altura

Se realizaron 3 muestreos a los 20, 60 y 90 días después de la siembra donde se midieron la longitud del tallo y alturas de las plantas para determinar el efecto de Cd en suelo. Posteriormente se colectaron muestras de suelo y hojas y se almacenaron en refrigeración.

Cuantificación de Cd en hoja y suelo

Para los análisis se utilizaron porciones de suelo y hojas colectadas en cada muestreo. La cuantificación se realizó mediante espectrometría de absorción atómica por la técnica de flama detallada anteriormente.

## RESULTADOS

Caracterización fisicoquímica de los suelos

Los resultados se interpretaron según los lineamientos de la NOM-021-SEMARNAT-2000 que se pueden observar en la Tabla 2, se encontró que el suelo de Maconí presenta una textura franco arenosa con un 81 % de partículas de arena. Los resultados de densidad real muestran valores promedios de 2.4 g ml<sup>-1</sup> para la arena. Los datos obtenidos para el suelo de Maconí 2.7 ml<sup>-1</sup> presentan similitud con los hallados por Moreno (2017), quien reportó valores de 2.00 g ml<sup>-1</sup> de densidad real. Estos valores indican que los suelos no presentan problemas de compactación por lo que el agua y el aire circulan libremente, no hay acumulación de sólidos ni deficiencias en la filtración de agua ni de nutrientes en las raíces.

El pH alcalino es común en zonas semiáridas como las del estado de Querétaro, el suelo de Maconí tiene un pH de 7.7 lo que se considera medianamente alcalino. Este resultado coincide con lo reportado por Santos-Jallath *et al.*, 2013 quienes encontraron pH alcalinos para 4 sitios muestreados en Maconí. Por otra parte la arena de río arrojó un valor de 8.5 que de acuerdo a la normatividad se considera fuertemente alcalino. Los suelos alcalinos son adecuados para la agricultura pues la absorción de iones metálicos al suelo es más fuerte debido a la formación de hidróxidos metálicos (Daldoul, 2015).

El porcentaje de materia orgánica encontrado en ambos suelos se considera de clase baja, es decir con que no tiene la cantidad de suficiente de nutrientes. Además la conocer la cantidad de materia orgánica da una idea de las interacciones que ocurren en el mismo que puedan afectar la absorción de los metales con la planta, como la formación de complejos con los iones (Li, 2007)

Tabla 3. Caracterización fisicoquímica de ambos suelos

Suelo/ Propiedad	pH	MO (%)	Densidad real (g ml <sup>-1</sup> )	Densidad aparente (g ml <sup>-1</sup> )	Capacidad de campo %	Conductividad eléctrica dS m <sup>-1</sup>	Partículas del suelo (%)			Textura
							Arena	Arcilla	Limo	
Suelo Maconí	7.7	1.306 ±0.085	2.701 ±0.000	1.809 ±0.408	36.715 ± 0.068	0.207 ±0	81 ±1.000	1 ±0.000	18 ±1.000	Ca
Bajo										
Arena de río	8.5	0.939 ±1.073	2.4991 ±0.022	1.717 ±0.102	37.087 ± 0.106	0.147 ±0.000	91 ±1.000	3.2 ±0.200	5.8 ±1.200	A
Bajo										

#### Bioensayo

##### Efecto en el crecimiento y desarrollo de la planta

Las plantas del grupo testigo que alcanzaron una talla (25 cm) en comparación con el tratamiento Arena-Cd (30 cm) y en las del suelo de Maconí (18 cm). En las plantas con Cd se observó clorosis y crecimiento anormal del tallo, en las plantas del suelo de Maconí se observó crecimiento retardado.

Chambi *et al.* (2012) realizaron estudios en cebada y papa, encontraron que como consecuencia de la fitotoxicidad en los órganos de la planta se producen bajos rendimientos e inhibición de la formación de los granos y tubérculo, afectando en la capacidad productiva como también en la calidad de los productos alimenticios.

##### Estudios de elongación de tallo y altura

Durante cada muestreo se midió la altura de la planta y el grosor del tallo. Los resultados de la altura se muestran en la Tabla 3, se puede observar que los testigos fueron los que presentaron mayores alturas en comparación con las plantas de Maconí que fueron las que presentaron menores alturas. De acuerdo a Monteiro *et al.*, en 2009 donde se indica que la inhibición del crecimiento es un efecto muy común de toxicidad de Cd en plantas que crecen en lugares contaminados; como se puede observar en los resultados la inhibición del crecimiento ocurre durante el muestreo 3 lo cual concuerda con lo mencionado por el autor.

De acuerdo al análisis estadístico si existen diferencias significativas entre los tratamientos, más no entre tiempos de muestreo.

Tabla 4. Alturas durante los 3 muestreos realizados durante la experimentación. M1=Muestreo 1 (20 días), M2= Muestreo 2 (60 días) y M3= Muestreo 3 (90 días).

Altura (cm)	Testigo	T1-50 mg Cd	T2-100 mg Cd	Maconí
Muestreo 1	12.9673±.484 <sup>ab</sup>	16.431±4.305 <sup>ab</sup>	16.815±5.011 <sup>a</sup>	13.328±2.361 <sup>b</sup>
Muestreo 2	26.075±15.274 <sup>ab</sup>	20.662±4.632 <sup>ab</sup>	21.269±6.541 <sup>ab</sup>	16.392±2.297 <sup>b</sup>
Muestreo 3	22.125±13.021 <sup>ab</sup>	27.300±11.804 <sup>ab</sup>	30.4441±14.553 <sup>a</sup>	18.806±3.304 <sup>b</sup>

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativa según prueba de comparación de medias Tukey ( $p < 0.05$ )

El grosor del tallo Tabla 4 fue más grande en las plantas de T2100 en comparación con los testigos que fueron los que presentaron menor grosor, las plantas con el suelo de Maconí presentaron mayor grosor que las de T150 y los testigos. Esto puede deberse como consecuencia de la concentración del metal presente en el suelo, de acuerdo a Núñez *et al.* (2014) el aumento del tallo del frijol aumenta ante la presencia de algún estimulante externo. Maqueda (2015) estudio el efecto del Cd en el desarrollo del tallo de acelga y maíz ante la presencia de Cd, reportó que en concentraciones de menores 1 mg de CdCl<sub>2</sub> el grosor del tallo disminuye, mientras que en concentraciones de 5 mg el grosor del tallo aumenta.

Tabla 5. Grosor de tallo durante los 3 muestreos realizados durante la experimentación. M1=Muestreo 1 (20 días), M2= Muestreo 2 (60 días) y M3= Muestreo 3 (90 días).

Grosor tallo (cm)	Testigo	T1-50 mg Cd	T2-100 mg Cd	Maconí
Muestreo 1	1.878±.387 <sup>ab</sup>	2.330±0.330 <sup>ab</sup>	2.398±0.483 <sup>a</sup>	2.438±0.517 <sup>b</sup>
Muestreo 2	2.822±0.439 <sup>ab</sup>	20.662±4.632 <sup>ab</sup>	3.013±0.0441 <sup>ab</sup>	2.968±0.735 <sup>b</sup>
Muestreo 3	2.499±0.241 <sup>ab</sup>	2.338±0.524 <sup>ab</sup>	2.656±0.367 <sup>a</sup>	4.000±0- 0004 <sup>b</sup>

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativa según prueba de comparación de medias Tukey ( $p < 0.05$ )

#### Cuantificación de Cd en suelo.

La cuantificación de Cd obtenida mediante espectroscopía de absorción atómica por la técnica de flama para la determinación en suelos se presentan en la Figura 3, se observó una disminución en la concentración de Cd desde 102.4 mgkg<sup>-1</sup> en el muestreo 1, 85.5 mgkg<sup>-1</sup> muestreo 2 y 80.1 mgkg<sup>-1</sup> muestreo 3 para el suelo de Maconí, estos resultados entran dentro del rango reportado por Moreno *et al.* (2012) para un jal minero que van desde 31 hasta 1750 mgkg<sup>-1</sup>. La presencia de concentración es menores a las de Moreno *et al.* (2012) puede deberse a la elevada movilidad del Cd y por consiguiente al punto de colecta de la muestra de suelo. Para los tratamientos con 100 durante el muestreo 3 la concentración aumentó, en T150 de 151.7 mgkg<sup>-1</sup> muestreo 1, 92.20 mgkg<sup>-1</sup> los valores fueron de 138,366 mgkg<sup>-1</sup> en el muestreo 1, 72.350 en muestreo 2 y 21.806 7 mgkg<sup>-1</sup> en muestreo 3. En T150 los resultados obtenidos en orden decreciente fueron de 116.198 mgkg<sup>-1</sup> para el muestreo 1, 73.718 mgkg<sup>-1</sup> para el muestreo 2 y 30.804 mgkg<sup>-1</sup> para el muestreo 3. El testigo se

mantuvo sin cambios significativos. El análisis estadístico muestra que existen diferencias significativas.

Tabla 6. Concentración de Cd en suelo durante los 3 muestreos realizados durante la experimentación. M1=Muestreo 1 (20 días), M2= Muestreo 2 (60 días) y M3= Muestreo 3 (90 días).

Tiempo	Testigo	T1-50 mgCd	T2-100 mgCd	Maconí
M1	0.002±0.000 <sup>c</sup>	116.198±4.068 <sup>b</sup>	138.366±2.271 <sup>a</sup>	102.496±1.274 <sup>b</sup>
M2	0.022±0.002 <sup>c</sup>	73.718±5.052 <sup>b</sup>	72.350±5.398 <sup>b</sup>	85.504±2.907 <sup>a</sup>
M3	0.269±0.005 <sup>c</sup>	30.804±2.817 <sup>a</sup>	21.806±0.8702 <sup>a</sup>	80.248±1.417 <sup>b</sup>

#### Cuantificación de Cd en hoja

Los resultados de la cuantificación de Cd en el tejido vegetal se muestran en la Figura 4. Se observan variaciones entre los 3 muestreos realizados. En la hoja testigo la concentración de Cd aumenta en los muestreos, de 0.211 mg kg<sup>-1</sup> a 0.287 mgkg<sup>-1</sup>, por el contrario en T150 la concentración del metal aumentó entre los muestreos 2 y 3 de 0.528 mgkg<sup>-1</sup> a 0.545 mgkg<sup>-1</sup> con el paso del tiempo, en T2100 la concentración de Cd aumentó entre el muestreo 1 0.568 mgkg<sup>-1</sup> y el muestreo 2 0.548 mgkg<sup>-1</sup>. Estos últimos resultados coinciden con los estudios de Contreras y Zapata (2014) del efecto del Cu en frijol, encontraron que a mayor concentración del metal este se bioacumula más en otras partes de la planta, proponiendo como causa la bioquímica de asimilación que depende de la concentración del metal en el suelo. Esta puede ser una explicación del comportamiento entre el frijol y el Cd.

Tabla 7. Concentración de Cd en hojas de los muestreos realizados durante la experimentación. M1=Muestreo 1 (20 días), M2= Muestreo 2 (60 días) y M3= Muestreo 3 (90 días).

Tiempo	Testigo	T1-50 mgCd	T2-100 mgCd	Maconí
M1	0.211±0.001 <sup>b</sup>	0.528±0.025 <sup>ab</sup>	0.568±0.056 <sup>a</sup>	0.608±0.026 <sup>a</sup>
M2	0.231±0.003 <sup>b</sup>	0.545±0.005 <sup>a</sup>	0.548±0.032 <sup>a</sup>	0.503±0.056 <sup>a</sup>
M3	0.287±0.031 <sup>c</sup>	0.539±0.017 <sup>a</sup>	0.535±0.007 <sup>a</sup>	0.367±0.018

#### Índice de bioacumulación de Cd

La cuantificación de Cd en suelo y en tejido vegetal se muestra en el cuadro 4. El mayor porcentaje de bioacumulación ocurre en la siguiente secuencia T2100>T150>Maconí>Testigo para el muestreo 1 y el 2, para el muestreo 3 es T2100>Maconí>T150>Testigo.

Estos resultados tienen semejanza con los reportados por Contreras y Zapata (2014) que en frijol canario reportaron un porcentaje de bioacumulación de 161.92 mgkg<sup>-1</sup>, datos similares a los encontrados en el presente estudio.

#### CONCLUSIONES

*Phaseolus vulgaris* pinto saltillo es capaz de absorber Cd del suelo y almacenarlo en sus hojas. además de que al aumentar la concentración de cadmio las plantas se estimulaban más reflejándolo en el crecimiento y desarrollo. El índice de bioacumulación de t2100> t150 >



maconí>testigo. como consecuencia de la fitotoxicidad, en los órganos de la planta se producen bajos rendimientos e inhibición del desarrollo.

## 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. Ali H., Khan E., Sajad M. (2013). *Phytoremediation of heavy metals – Concepts and applications*. Chemosphere, 91 (2), 869-881.
4. Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades. (2016). Disponible en [https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es\\_tfacts5.html](https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts5.html) (Accesed 14 agosto 2020).
5. Bahmani R., Bihamta M., Habibi D., Forozesh P. (2014). *Biochemical changes and growth responses induced by cadmium in bean seedlings (phaseolus vulgaris L.)*. J. Solid Waste Technol. Manag. 40, 126–135.
6. Chambi, Lourdes J., Orsag, Vladimir, Niura, Amalia EVALUACION DE LA PRESENCIA DE METALES PESADOS Y ARSÉNICO EN SUELOS AGRICOLAS Y CULTIVOS EN TRES MICRO-CUENCAS DEL MUNICIPIO DE POOPÓ. *Revista Boliviana de Química*
7. Chaney R. (2012). *Chapter two—food safety issues for mineral and organic fertilizers*. In : Donald L. Sparks (ed) *Adv Agron. Academic*, pp 51–116
8. Chang Q., Diao Q., Wang L., Pan Z., Dang Guo W. (2018). *Effects of arbuscular mycorrhizal symbiosis on growth, nutrient and metal uptake by maize seedlings (Zea mays L.) grown in soils spiked with Lanthanum and Cadmium*. Environ. Pollut. 241: 607-615.
9. Cortés E., Mugica V., González M., Carrillo R., Martínez M., Vaca M. (2013). *Natural revegetation of alkaline tailing heaps at Taxco, Guerrero, Mexico*. Int. J. Phytoremediat. 15, 127-141.
10. Cullen J., Maldonado T. (2013). *Cadmium: from toxicity to essentiality, metal ions in life sciences*. vol. 11. Springer Science and Business Media.
11. Dary M., Chamber M., Palomares A., Pajuelo E. (2010). *In situ phytostabilisation of heavy metal polluted soils using Lupinus luteus inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria*. Journal of Hazardous Materials 177: 323-330.
12. FAO (2019). *El suelo en Organización de las naciones unidas para la alimentación*. [En línea] Disponible en: <http://www.fao.org/3/w1309s/w1309s04.htm> (Accesed 05 Julio 2021).
13. Fuentes M., Astudillo L., Díaz A., Martínez G. (2010). *Distribución de metales pesados en los sedimentos superficiales del Saco del Golfo de Cariaco, Sucre, Venezuela*. Rev. Biol. Trop. 58: 129-140.
14. Galante P., Sánchez E., Valverde M., Castillo E. (2013). *Biomarkers of exposure for assessing environmental metal pollution: from molecules to ecosystems*. Rev. Int. Contam. Ambie. 29: 117-140.
15. Huertos E. y Baena a. (2008). *Contaminación de Suelos por Metales Pesados*. Mancla revista de la sociedad española de mineralogía 10: 48- 60.
16. Jiménez, R. (2017). *Introducción a la contaminación de suelos*. Mundi-Prensa Libros. pp. 497
17. Li T., Tao Q., Shohag M.J., Yang X., Sparks D., Liang Y. (2015). *Root cell wall polysaccharides are involved in cadmium hyperaccumulation in Sedum alfredii*. Plant and Soil 389, 387–399.
18. Li X., Zhou Q., Wei S., Ren W., Sun X. (2011). *Adsorption and desorption of carbendazim and cadmium in typical soils in northeastern China as affected by temperature*. Geoderma 160:347–354
19. Martorell J. (2010). *Biodisponibilidad de metales pesados en dos ecosistemas acuáticos de la costa Suratlántica andaluza afectados por Contaminación difusa*. Tesis Doctoral Universidad de Cádiz.
20. Minaya J. (2014). *Importancia de los minerales en la tecnología e industria y su impacto ambiental*.

21. Mireles F., Dávila J., Pinedo J, Reyes E., Speakman R.J., Glascock M. (2012). *Assessing urban soil pollution in the cities of Zacatecas and Guadalupe, Mexico by instrumental neutron activation analysis*. Microchem. J. 103, 158-164.
22. Moreno M., Cervantes V., Gallegos J., González R, Estrella I., García T., Herrera E., Díaz J., Rocha N. (2014). *Phenolic composition changes of processed common beans: their antioxidant and anti-inflammatory effects in intestinal cancer cells*. Food Research International 76: 79-85
23. Navarro G., Navarro S. (2014). *Fertilizantes química y acción* .Ediciones Paraninfo, S.A., pp 195-196.
24. Noguez A., López A., Carrillo R., González M. (2017). *Uso de leguminosas (fabaceae) en fitorremediación use of legumes (fabaceae) for phytoremediation*. Agroproductividad: Vol. 10, Núm. 4, pp 57-62.
25. Nuñez Lopez, R., Meas Vong, Y., Ortega Borges, R., & Olguin, E. (Modificado 28 de Julio de 2016). Fitorremediacion: Fundamentos y aplicaciones. 69 - 82.
26. Padmavathamma P., Li L. (2007). *Phytoremediation Technology: Hyperaccumulation Metals in Plants*. Water, Air, & Soil Pollution, 184:105-126.
27. Paz Ferreiro J., Lu H., Fu S., Méndez A., Gascó G. (2014). *Use of phytoremediation and biochar to remediate heavy metal polluted soils: a review*. Solid Earth, 5:65-75.
28. Sánchez V. (2001). INIFAP. *Fundación Produce Coahuila A.C. Pinto Saltillo nueva variedad de frijol para el Sureste del Estado de Coahuila*. Tríptico de información. Desplegable Técnica No. 8.
29. Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. (2019). *La importancia del frijol en México*. Disponible en <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/la-importancia-del-frijol-en-mexico?idiom=es> (Accesed 15 septiembre 2020).
30. SEMARNAT. (2015). *Tipos de degradación*" en *Atlas digital geográfico*. [En línea] disponible en <http://ideinfoteca.semarnat.gob.mx/esdig/atlascontenido.html> (Accesed 20 Julio 2020).
31. Trejo A., Díaz F., Carrizales L., Domínguez G., Costilla R., Ize-Lema I., Yarto M., Gavilán A., Mejía J., Pérez I. (2009). *Exposure assessment of persistent organic pollutants and metals in Mexican Children*. Chemosphere 74, 974-980.
32. U.S. EPA. 2007. Method 3051A (SW-846): *Microwave Assisted Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Oils. Revision 1*. Washington, DC
33. Zhang C., Appel E., Qiao Q. (2012). *Heavy metal pollution in farmland irrigated with river water neara steel plant-magnetic and geochemical signature*. Geophys. J. Int 192: 963-974

## CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS HETERÓTROFAS DEL RÍO BLANCO (MIXTEQUILLA, VERACRUZ) EN MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS

Erick Uriel Quezada Cabrera<sup>1</sup>, María Teresa Núñez-Cardona<sup>1\*</sup>, Beatriz González Hidalgo<sup>1</sup>, Juan Francisco Palacios Espinosa<sup>1</sup>, Raúl Venancio Díaz-Godoy<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, <sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares

mtnunez@correo.xoc.uam.mx\*

### RESUMEN

Las bacterias heterótrofas son clave para el reciclaje y transformación de materiales orgánicos, tanto en ambientes terrestres como acuáticos además, son indicadores de su calidad; se conocen grupos fisiológicos bacterianos que cumplen esta función, dentro de ellas se encuentran las coliformes fecales y enterococos, relacionados a desechos de origen fecal y otros tipos de materia orgánica; algunas son de interés médico por las enfermedades causan a los humanos y a otros organismos vivos, aunque también las hay benéficas, como las asociadas a la rizósfera de plantas que contribuyen al crecimiento vegetal e intervienen en la remoción de contaminantes orgánicos (los utilizan como fuente carbono y energía) e inorgánicos (Ej. metales pesados). El río Blanco (Mixtequilla, Veracruz), específicamente en la zona conocida como El Camarón, se ha visto impactada por actividades agropecuarias e industriales (Ejs. petrolera y azucarera). *P. aquatica* es un habitante típico en este río y es de interés ecológico por los servicios ambientales y ecológicos que este árbol ofrece. El presente estudio tuvo por objetivo evaluar la calidad bacteriológica del agua del Río Blanco mediante la cuantificación de bacterias Gram negativas y estafilococos en medios de cultivo específicos. Para ello, en noviembre de 2019, fueron colectadas muestras de agua circundante a cinco ejemplares de *P. aquatica* (P1, P2, P3, P4 y P5). Con las muestras, *in situ*, se hicieron diluciones y fueron inoculadas (0.1 mL) en cajas Petri conteniendo agares TCBS (específico para *Vibrio*), MacConkey (útil para detectar bacilos Gram negativos y entéricos) y Sal Manitol (específico para estafilococos). Las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) con características de *Vibrio cholera* se presentaron en los ejemplares: P2 (8 UFC), P3 (3 UFC) y P5 (19 UFC), las de *V. parahaemolyticus* en P2 (8 UFC) y P5 (52 UFC) y las de *V. mimicus* en P2 (4 UFC) y P3 (6 UFC), además de *Escherichia coli* en P4 (7 UFC). En agar Sal y Manitol, crecieron colonias con características de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y *Proteus mirabilis* (enterobacteria). La primera se presentó en todos los ejemplares (de 2 a 51 UFC), P2 contó con el mayor número. Las UFC de *S. epidermidis* fueron mayores en P3 (73 UFC), seguido de P2 (37 UFC) y P4 (11 UFC); en P1 (49 UFC) y P3 (13 UFC) se detectó a *P. mirabilis*. Con el agar MacConkey, *E. coli* se hizo evidente en P2 (23 UFC), P3 y P5 (3 colonias, en ambos); *Aerobacter aerogenes* en P3, P4 y P5 (20 y mayor a 250 en las dos últimas); *Enterococcus* sp. y *Pseudomonas aeruginosa* en P1 (16 y 20 UFC, respectivamente); en P5 a *Proteus mirabilis* (111 UFC). El mayor número de UFC en medios selectivos se presentó en P2, P3 y P5, La presencia de *Aerobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus* denota baja calidad del agua del Río Blanco la cual es utilizada en la vida diaria por los habitantes de El Camarón.

### INTRODUCCIÓN

El agua es vital en el planeta, sin embargo, al estar contaminada es uno de los principales transmisores de enfermedades microbianas, la Organización Mundial de la Salud (OMS) establece que para consumo humano no deben estar presentes bacterias patógenas entéricas y parásitos intestinales; su calidad determina el uso que se le puede dar ya sea agrícola, doméstico, industrial, etc.[1].

Las bacterias heterótrofas son abundantes en los cuerpos de agua, algunas toleran condiciones anóxicas que les permite reproducirse y permanecer más tiempo en el agua[2]; en general las bacterias son clave para el reciclaje y transformación de materiales orgánicos e inorgánicos, tanto en ambientes terrestres como acuáticos, también son indicadores de su calidad. Se conocen grupos fisiológicos bacterianos que cumplen esta función, dentro de ellas se encuentran las coliformes fecales y enterococos, relacionados a desechos de origen fecal y otros tipos de materia orgánica[3]; algunas son de interés médico por las enfermedades que causan a humanos y a otros organismos

vivos, aunque también las hay benéficas, como las asociadas a las rizósferas de plantas, estas contribuyen a su crecimiento e intervienen en la remoción de contaminantes orgánicos (los utilizan como fuente carbono y energía) e inorgánicos (Ej. metales pesados)[4]. El Río Blanco (Mixtequilla, Veracruz), específicamente en la zona conocida como El Camarón, se ha visto impactado por actividades agropecuarias e industriales (Ejs. petrolera y azucarera) y *Pachira aquatica* es un habitante típico en este río; esta especie vegetal es de interés por los servicios ambientales que ofrece. El presente estudio tuvo por objetivo evaluar la calidad bacteriológica del agua del río Blanco, circundante a *P. aquatica*, mediante la cuantificación de bacterias Gram negativas y estafilococos en medios de cultivo selectivos.

## TEORÍA

Los ríos son cuerpos de agua fundamentales en las actividades domésticas, agropecuarias e industriales (Ej. industria eléctrica), por lo que reciben constantemente descargas de aguas residuales por estas actividades que, además de contaminarlos, indudablemente han alterado la diversidad de los organismos vivos que habitan estos cuerpos de agua[5].

Uno de los procesos naturales de los ambientes acuáticos es la eutrofización, que es el enriquecimiento de los cuerpos de agua por nutrientes. En los últimos años las actividades humanas han acelerado este proceso debido al aumento de cargas inorgánicas y orgánicas, generando el crecimiento masivo de microorganismos como las bacterias[6], algunas de ellas con capacidad de producir enfermedades en humanos como en otros animales e inclusive vegetales. Estos microorganismos son responsables de enfermedades como la fiebre tifoidea, disentería, hepatitis, salmonelosis, cólera, entre otros[7]. Se considera que la contaminación microbiológica del agua es responsable de más del 90 % de las intoxicaciones y enfermedades transmisibles en humanos [8].

Dentro de las bacterias Gram negativas, además de las Enterobacterias (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus* y *Edwardsiella*), que son utilizadas como bioindicadoras de la calidad de agua para consumo humano y animal, están especies de los géneros: *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Campylobacter*, *Gallionella*, *Bordatella*, *Flavobacterium*, *Neisseria*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Moraxella*, *Bacteroides* y *Acinetobacter* y de las Gram positivas están miembros de los géneros: *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Clostridium* y *Sarcina*[9].

Las bacterias heterótrofas son capaces de degradar tanto productos naturales como sintéticos, lo que las hace muy importantes en procesos de biorremediación; las formas aerobias al catabolizar compuestos orgánicos, producen biomasa, agua y CO<sub>2</sub>, además de amonio; pueden realizar hidrólisis microbiana con ayuda de enzimas extracelulares (amilasa, lipasa y proteasa), transformando macromoléculas a oligómeros y monómeros, por ello, la hidrólisis es un paso fundamental en las plantas de tratamiento de agua[10].

Por otro lado, las bacterias rizosféricas además de transformar sustancias orgánicas e inorgánicas, producen hormonas y sideróforos que cambian el entorno de las plantas favoreciendo su crecimiento en condiciones de estrés que pudiera ocasionales la presencia de hidrocarburos, sales, sequías y metales pesados dentro de estas bacterias se encuentran *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *Rhizobium leguminosarum* y *Pseudomonas fluorescens*[11].

Una de las tareas en el área biológica es el aislamiento y la identificación, así como conocer el número de Unidades Formadora de Colonias (UFC) presentes en distintos tipos de muestras (agua, aire, suelo, alimentos), que son comparadas con estándares establecidos en normatividades[12].

Una de las técnicas para cuantificar las UFC presentes en un mililitro o gramo de alguna muestra se basa en que una célula dará origen a una colonia y cuantificar colonias de forma directa; para ello, a partir de la muestra se realizan diluciones seriadas y un volumen conocido (generalmente 0.1mL) es sembrado en medios de cultivo sólidos. Los cultivos son incubados a la temperatura que les corresponde así, para las bacterias de origen entérico la incubación debe ser a 38°C y para las mesófilas a 28 °C, generalmente el tiempo de incubación es de 24-48 horas (puede ser mayor), dependiendo del origen de la muestra y el tipo de medio de cultivo que se utiliza.

En la actualidad se comercializan medios de cultivo (sólidos y líquidos) para detectar diferentes grupos fisiológicos bacterianos, con estos se favorece el crecimiento de un grupo determinado e inhibe a otros. Así, en agar Mac Conkey crecen bacterias Gram negativas como las enterobacterias (Ej. *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, etc.), *Aeromonas*, *Pseudomonas*, entre otras

Proteobacteria, también crecen bacterias fermentadoras de lactosa que se distinguen por ser colonias de color rosa debido a que cuenta con rojo de fenol como indicador de pH. El agar TCBS (Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa) contiene bilis de buey, que inhibe a una gran diversidad de bacterias (tanto Firmicutes como Proteobacteria) y favorece el desarrollo de integrantes del género *Vibrio*, aunque es posible que crezcan otras Proteobacteria como *E. coli*.

El agar Sal Manitol está diseñado para el crecimiento de estafilococos y la diferenciación de los coagulasa positiva como *Staphylococcus aureus*; este medio de cultivo contiene peptonas, extractos de carne bovina que les aporta nutrientes, además de cloruro de sodio al 7.5% que es el inhibidor de otros organismos diferentes a estafilococos, contiene rojo de fenol que facilita la diferenciación de estos cocos.

Con los agares TCBS, Mac Conkey y Agar Sal Manitol, es posible cuantificar las UFC y conocer de manera rápida la posible identidad de algunas especies bacterianas considerando su forma celular, el tamaño y color de las colonias, aunque el aislamiento, la obtención de cultivos puros y la identificación molecular de estos, son indispensables para determinar la identidad de las bacterias.

### PARTE EXPERIMENTAL

El área de estudio se ubica en la Mixtequilla (Veracruz), en la zona conocida como El Camarón por donde fluye el Río Blanco, los puntos de muestreo fueron elegidos considerando la presencia de *P. aquatica* (apompo), así con botellas estériles de 100 mL de capacidad fueron colectadas cuatro muestras de agua circundante a *P. aquatica* que se encontraban en la zona ribereña del río Blanco (P1, P2, P3, y P5) y una más fuera de este (P4) (figura 1).



Figura 1.- Ubicación de los sitios de colecta de las muestras de agua (Google Earth, 2020).

Con las muestras de agua se realizaron diluciones seriadas 1/10 en solución salina al 0.9%, y 0.1mL de estas fueron utilizadas para inocular cajas Petri conteniendo agar TCBS (específico para *Vibrio*), Mac Conkey (útil para detectar bacilos Gram negativos y entéricos) y Sal Manitol (específico para estafilococos). Los cultivos fueron incubados a 28°C durante 48-72 horas, para posteriormente cuantificar las UFC bacterianas (figura 2). La cuantificación de las especies se realizó considerando las instrucciones indicadas para estos medios de cultivo, para ello se hicieron registros de la forma, tamaño y color de las colonias en los tres medios de cultivo.

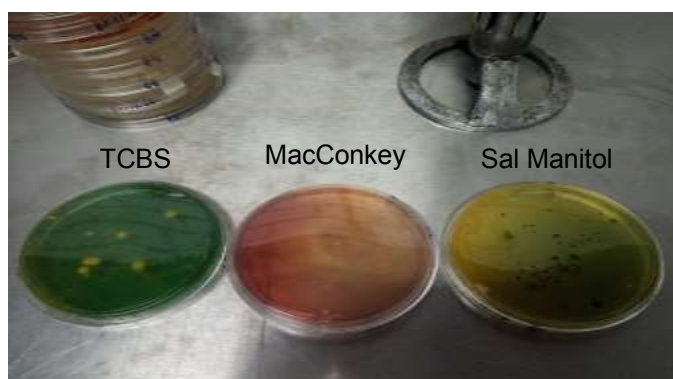


Figura 2. Cultivos bacterianos en agares: TCBS, Mac Conkey y Sal Manitol

## RESULTADOS

Las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) con características de *Vibrio cholerae* (tabla 1) se presentaron en los ejemplares: P2 (8 UFC), P3 (3 UFC) y P5 (19 UFC), las de *V. parahaemolyticus* en P2 (8 UFC) y P5 (52 UFC) y las de *V. mimicus* en P2 (4 UFC) y P3 (6 UFC), además de *Escherichia coli* en P4 (7 UFC). Se encontró la presencia de *V. cholerae* causante del cólera, la cual su vía de ingestión es por alimentos de origen marino y agua, esta especie ha sido aislada de moluscos, crustáceos, y otros invertebrados planctónicos, además de raíces de pastos y lirios acuáticos[13], por otro lado, *V. parahaemolyticus*, son bacterias hemolíticas causantes de gastroenteritis, se les encuentra en alimentos de origen marino como ostiones, peces y camarones [14]. De manera general, las especies del género *Vibrio* son patógenas y se les ha relacionado con enfermedades gastrointestinales en humanos probablemente la que más ha despertado interés en el sector salud es *Vibrio cholerae* debido a que hay cepas toxigénicas (Ejs. O1 y O139), responsables del cólera epidémico, en los siglos XIX y XX (Ej. 1960), registrándose pandemias en las que murieron millones de personas en América, Europa y África[15].

Tabla 1. Número de UFC crecidas en agar TCBS (específico para *Vibrio*)

Ejemplar/Sitio	<i>V. cholerae</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>Escherichia coli</i>
P1	0	0	0	0
P2	8	8	4	0
P3	3	0	6	0
P4	0	0	0	7
P5	19	52	0	0

En agar Sal y Manitol, crecieron colonias con características de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y *Proteus mirabilis* (enterobacteria) (tabla 2). La primera se presentó en todos los ejemplares (de 2 a 51 UFC), P2 contó con el mayor número. Las UFC de *S. epidermidis* fueron mayores en P3 (73 UFC), seguido de P2 (37 UFC) y P4 (11 UFC); en P1 (49 UFC) y P3 (13 UFC) se detectó a *P. mirabilis*.

Es de interés el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (colonias amarillas rodeadas de un halo amarillo) debido a que es coagulasa positiva, es la especie más patógena por su alto rango de infecciones en la piel, huesos, mucosas y puede llegar a causar infecciones como endocarditis y bacteriemias[16], también *Staphylococcus epidermidis* (coagulasa negativo), aunque forma parte de la microbiota de la piel, es frecuente en nosocomios, y de especial importancia en personas inmunodeprimidas; su resistencia a meticilina está ocasionando problemas en todo el mundo[17].



Tabla 2. Número de UFC crecidas en Agar Sal Manitol

Ejemplar	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
P1	2	3	49
P2	51	37	0
P3	6	73	13
P4	13	11	0
P5	35	7	0

Con el agar Mac Conkey, *E. coli* se hizo evidente en P2 (23 UFC), P3 y P5 (3 colonias, en ambos); *Aerobacter aerogenes* en P3, P4 y P5 (20 y mayor a 250 en las dos últimas); *Enterococcus* sp. y *Pseudomonas aeruginosa* en P1 (16 y 20 UFC, respectivamente); en P5 a *Proteus mirabilis* (111 UFC) (tabla 3). Se encontró un alto crecimiento de *Aerobacter aerogenes* bacteria causante de enfermedades nosocomiales, endocarditis e infecciones urinarias [18] y de *Proteus mirabilis* que es comensal del tracto gastrointestinal de humanos y animales además de estar relacionada con enfermedades del trato urinario [19].

Tabla 3. Número de UFC crecidas en agar Mac Conkey

*Ejem.	<i>E. coli</i>	<i>Aerobacter aerogenes</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
P1	0	0	16	20	0	0
P2	23	0	0	0	0	42
P3	3	20	0	0	0	0
P4	0	> 250	0	0	0	0
P5	3	> 250	0	0	111	0

\*Ejemplar

En humedales aledaños al Río Blanco (Ej. potreros) se ha reportado la presencia de *Escherichia coli*, *Shigella* sp., *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas* sp. y *Serratia marcescens*[20], algunas de ellas coinciden con las detectadas en el presente trabajo y podrían formar parte de la rizósfera de *P. aquatica*.

## CONCLUSIONES

Con los medios de cultivo selectivos utilizados (TCBS, Mac Conkey y agar Sal Manitol), fue posible detectar, de forma relativamente rápida, a bacterias de interés sanitario. La presencia de *A. aerogenes*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae*, denotan la mala calidad del agua del Río Blanco, la cual es utilizada en la vida diaria por los habitantes de El Camarón, debido a que no cuentan con servicio de agua potable.

## AGRADECIMIENTOS

A los habitantes de la Mixtequilla, especialmente a la Señora Yadira Reyes y a los Señores Gaspar Yépez y Luis Yépez por su valioso apoyo en el trabajo de campo.

A la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco por el apoyo otorgado al proyecto F125 (Responsable: Dr. F- Palacios Espinosa).

## BIBLIOGRAFÍA

1. A. Herrera, P. Suárez, "Indicadores bacterianos como herramientas para medir la calidad ambiental del agua costera". InterCiencia., Vol. 30, 3, 2005, pp. 171-176.

2. I. Salgado-Bernal, C. Duran-Domínguez, M. Cruz-Arias, M.E. Carballo-Valdés, A. Martínez-Sardiñas, "Bacterias rizosféricas con potencialidades fisiológicas para eliminar materia orgánica de aguas residuales". *Rev. Int. Contam. Ambient.*, Vol. 28, 1, 2012, pp. 17-26.
3. L. Muñoz-Silva, P. Olivera-Gonzales, T. M. Santillán, C. Tamariz-Ángeles, "Microorganismos tolerantes a metales pesados del pasivo minero Santa Rosa, Jangas (Perú)". *Rev. Peru. de Biol.*, Vol. 26, 1, 2019, pp. 109-118.
4. J. Marrero-Coto, I. Amores-Sánchez, O. Coto-Pérez, "Fitorremediación, una tecnología que involucra a plantas y microorganismos en el saneamiento ambiental". *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, Vol. 46,3, 2012, pp. 52-61.
5. A. L. Bautista Olivas, J. L. Tovar Salinas, O. R. Mancilla Villa, H. Magdaleno-Flores, C. Ramírez-Ayala, R. Arteaga-Ramírez, M. A. Vázquez-Peña, "Calidad microbiológica del agua obtenida por condensación de la atmósfera en Tlaxcala, Hidalgo y Ciudad de México". *Rev. Int. Contam. Ambient.*, Vol. 29, 2, 2013. pp. 167-175.
6. M. D. P. A. Pulido, S. L. A. de Navia, S. M. E. Torres, A. C. G. Prieto, "Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua". *Nova*, Vol. 3, 4, 2005. pp. 69-79.
7. A. Corral-Lugo, Y. E. Morales-García, L. A. Pazos-Rojas, A. Ramírez-Valverde, R. D. Martínez-Contreras, J. Muñoz-Rojas, "Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de" Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo". *Rev. Colomb. Biotecnol.*, Vol. 14, 2, 2010. pp.147-156.
8. M. R. Pullés, "Microorganismos indicadores de la calidad del agua potable en Cuba". *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, Vol. 45,1, 2014. pp. 25-36.
9. M. C. Apella, P. Z. Araujo, "Microbiología del agua. Conceptos básicos". *in Tecnologías solares para la desinfección y descontaminación del agua.*, Buenos Aires, 2005, Capítulo 2, pp. 33-50.
10. S. Ríos-Tobón, R. M. Agudelo-Cadavid, L. A. Gutiérrez-Builes, "Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano". *Rev. Fac. Nac. Salud Pública.*, Vol. 35, 2, 2017, pp. 236-247.
11. I. Salgado-Bernal, C. Duran-Domínguez, M. Cruz-Arias, M. E. Carballo-Valdés, A. Martínez-Sardiñas, "Bacterias rizosféricas con potencialidades fisiológicas para eliminar materia orgánica de aguas residuales". *Rev. Int. Contam. Ambient.*, Vol. 28, 1, 2012, pp. 17-26.
12. E. P. Sánchez, D. Núñez, R. O. Cruz, M. A. Torres, E. V. Herrera, "Simulación y conteo de unidades formadoras de colonias". *ReCIBE.*, Vol. 6, 1, 2017, pp. 97-111.
13. R. N. E. Rojas, Z. G. Muñoz, V. L. Gárate, M. D. V. González, G. M. F. Del Pozo, "Aislamiento microbiológico de *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* en muestras de camarón coctelero en la ciudad de Puebla". *Enferm. Infec. Microbiol.*, Vol. 33, 4, 2013, pp.147-151.
14. P. D. Zamora, C. Quiróz, E. I. Quiñonez, "Un enemigo marino silencioso: *Vibrio parahaemolyticus*". *Rev. Dig. Univ*, Vol. 6, 2005, pp. 1-9.
15. V. L. Castillo, Y. P. Peña, M. E. Hernández, G. P. Lamela, N. P. López, P. L. Morejón, O. Roble, "Especies patógenas de *Vibrio* aisladas en alimentos de origen marino". *Rev. Cubana Aliment. Nutr.*, Vol. 23,1, 2013, pp.31-43.
16. S. Ríos-Tobón, R. M. Agudelo-Cadavid, L. A. Gutiérrez-Builes, "Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano". *Rev. Fac. Nac. Salud Pública.*, Vol. 35, 2, 2017, pp. 236-247.
17. R. Castro-Orozco, L. Villafañe-Ferrer, J. Rocha-Jiménez, N. Alvis-Guzmán, "Resistencia antimicrobiana en *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*: tendencia temporal (2010-2016) y fenotipos de multiresistencia, Cartagena (Colombia)". *Biosalud*, Vol. 17, 2, 2018, pp. 25-36.
18. L. Y. Moreno-Rovira, M. T. Tamayo-Quintero, N. Amariles-Tamayo, E. F. Garrido-Zea, "Infecciones por *Enterobacter* y *Enterococcus* resistentes asociadas a la atención en salud en Hispanoamérica 2002-2017". *Medicina & Laboratorio*, Vol. 24, 3, 2020, pp. 221-232.
19. C. E. Armbruster, H. L. T. Mobley, M. M. Pearson, "Pathogenesis of *Proteus mirabilis* infection". *EcoSal Plus*, Vol. 8, 1, 2018, pp. 1-123.
20. A. B. Correa, M. T. Núñez-Cardona, J. García-Mena, A. H. Esquivel, "Capacidad para crecer en alcoholes y compuestos aromáticos de bacterias metilotróficas aisladas del humedal La Mixtequilla, Veracruz". *Soc. Rural. Producción Medio Ambiente*, Vol. 23, 2014, pp. 161-178.



## USO DE TIERRA DE DIATOMEAS Y HUMUS DE LOMBRIZ EN LA EMERGENCIA DE SEMILLAS Y CRECIMIENTO DE RÁBANO (*RAPHANUS SATIVUS*) EN UN HUERTO URBANO (CIUDAD DE MÉXICO)

Virginia Mishell Robredo-Ortiz, Brandon Lara-Barrera, Gabriela Morales-González, Yoali Rosas-Garduño, María Teresa Núñez-Cardona

Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento de El Hombre y su Ambiente. Licenciatura en Biología  
mtnunez@correo.xoc.uam.mx

### RESUMEN

El rábano (*Raphanus sativus* L.), hortaliza de la familia Brassiceae (Crucíferas)[1], es de gran importancia por sus propiedades nutricionales debidas, entre otros aspectos, a su contenido alto en vitaminas (A, B1, B2, C) y minerales[2] además de hidratos de carbono, fibra y agua. En las últimas décadas ha aumentado el interés por producir alimentos sanos, libres de plaguicidas y agroquímicos por ello, en el presente trabajo se utilizó al rábano como modelo para determinar la influencia de la tierra de diatomeas y el humus de lombriz en la emergencia de sus semillas y crecimiento de plántulas en un huerto urbano (Ciudad de México). Para ello, se hicieron germinar semillas de rábano de la marca Vita utilizando tierra negra (TN) a la cual se le adicionó humus de lombriz (HL) y tierra de diatomeas de la siguiente forma: el experimental 1 correspondió a TN (25 g para emergencia y 200 g para crecimiento) y HL (10 g para emergencia y 50 g para crecimiento); en el experimental 2 a TNHL se le agregó TD[3] (0.057 g para emergencia y 0.4 g para crecimiento); como testigo se utilizó TN (37 g para emergencia y 250 g para crecimiento). Se utilizaron 150 semillas, se distribuyeron en seis grupos (25 semillas cada uno), dos para el testigo y dos para cada experimental. Para emergencia (germinación) se utilizaron semilleros de plástico negro (5 cm de profundidad) se sembró una semilla por espacio a 2 cm de profundidad, se mantuvieron en ausencia de luz durante tres días y solo se regó la superficie de los sustratos para evitar la saturación. Las plántulas resultantes fueron trasplantadas en bolsas especiales utilizando los mismos sustratos (TN; TNHL; TNTDHL) y el riego se realizó cada tercer día, por absorción. Se hicieron registros diarios del número de semillas para calcular el porcentaje de germinación (emergencia); cada cinco días se hicieron registros de la longitud promedio de la plántula, número de hojas, longitud de la raíz, peso de las plántulas y circunferencia promedio del bulbo. Los resultados mostraron que el porcentaje mayor de emergencia se obtuvo a los tres días de la siembra, en TN este fue del 62% y de más del 90% en TNHL y TNTDHL (94 y 92%, respectivamente). Después de 46 días, el número de hojas promedio fue de cuatro en TN y cinco en TNHL y TNTDHL; la longitud promedio de la raíz fue de 4.71 cm en TN y 6.17 cm y 6.86 cm en TNHL y TNTDHL, el peso promedio de la plántula para TN fue de 1.03 g y para TNHL y TNTDHL de 2.26 g y 2.79 g, respectivamente; las circunferencias de los bulbos en TN fueron de 0.82 cm; en TNHL y TNTDHL de 1.1473 cm y 1.04 cm, respectivamente. El HL y la TD favorecen la germinación de las semillas de rábano así como el desarrollo de hojas (conservaron su color durante su crecimiento), el peso promedio de la plántula y crecimiento raíces y bulbos

### INTRODUCCIÓN

El rábano (*Raphanus sativus* L.) es una es una hortaliza perteneciente a la familia Brassiceae (Crucíferas) de gran importancia por su valor alimenticio, útil en dietas regulatorias de peso, debido a que, contiene gran cantidad de agua, hidratos de carbono y fibra, así como vitamina C, hierro y fósforo[1], importantes para prevención de anemia y formación de huesos

El éxito de la producción de esta hortaliza depende de la fertilización en el manejo agronómico de los cultivos ya que satisface los requerimientos nutricionales en situaciones donde el suelo no puede proveerlos en su totalidad[4]. En la fertilización orgánica se utilizan opciones tecnológicas para producir alimentos sanos, proteger la calidad del ambiente y la salud humana, e intensificar las interacciones y los procesos naturales benéficos[4].

El humus de lombriz (HL) es un abono 100% natural que se obtiene de la transformación de residuos orgánicos a composta por medio del uso de lombrices como por ejemplo, la lombriz roja de California, *Eisenia foetida*[5] mientras que la tierra de diatomeas (TD) o diatomita proviene de una roca sedimentaria compuesta de restos fósiles de diatomeas, que entre otras cualidades, es un insecticida

eficiente[6] y como ha sido señalado, también es importante para el ciclo biogeoquímico del silicio y la fijación del dióxido de carbono[7]; por su alto contenido de silicio tiene efecto protector y promueve la resistencia de los cultivos contra diversos factores ambientales (bióticos y abióticos)[3] y beneficia a la agricultura al incrementar la productividad y calidad de las cosechas, contribuye en la restauración de suelos degradados, además de aumentar el nivel de fertilidad y la mejora en el empleo de biosólidos, entre otros beneficios.

Considerando lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar la influencia del uso de tierra de diatomea con humus de lombriz en la germinación de semillas de rábano (*Raphanus sativus*), en su crecimiento y el de sus órganos.

## TEORÍA

La taxonomía del rábano, *Raphanus sativus* L. es la siguiente: Reino: Plantae, División: Magnoliophyta. Clase: Equisetopsida, Orden: Brassicales, Familia: Brassicaceae Género: *Raphanus*[7]. *Raphanus sativus*, es una planta erecta, ramificada esparcidamente hispida o escabrosa; durante la fase vegetativa su tallo mide entre 80 y 120 cm de altura. Las hojas basales son pecioladas y de forma ovalada con bordes dentados y el ápice muy grande. Las flores son racimos terminales de color blanco, rosado, violeta, en ocasiones amarillo; su fruto es seco, con forma parecida a una vaina silicua indehisciente, de 3-10 cm de longitud, que alberga semillas pequeñas y numerosas (globosas o casi globosas, rosadas o castaño-claras); su raíz puede ser blanca o roja, es carnosa, redonda o fusiforme, tiene un sabor picante según las variedades; su desarrollo radicular es escaso (puede alcanzar entre 5-25 cm de profundidad), pero la raíz principal puede desarrollarse hasta 1.0 m de profundidad[8].

La planta de *Raphanus sativus* es anual o bianual, su crecimiento óptimo se presenta en climas cálidos, es poco exigente por lo que puede sembrarse en cualquier época del año, su ciclo de vida es corto (dura de 25 a 46 días) aunque en ciclos largos se consideran de 100 a 110 días, dependiendo de los factores bióticos y abióticos especialmente del tipo de suelo y clima[8]. Las semillas de rábano germinan entre los siete y diez días (promedio), dependiendo de la variedad y las condiciones de ambientales; los cotiledones tienen forma de corazón. Durante la tercera semana saldrán las hojas verdaderas; mientras que en la cuarta su raíz se desarrollará para dar forma al rábano; entre las semanas cinco y seis, habrá aumento en su desarrollo y maduración. En la etapa de floración, la planta de rábano será grande y tupida, contará con flores blancas; su fruto verde en su etapa inmadura y café en la etapa madura mismo que puede presentarse a partir de la octava semana [9].

La fertilización es parte importante en el manejo agronómico de los cultivos (ciclo productivo) ya que satisface los requerimientos nutricionales en las situaciones donde el suelo no puede proveerlos en su totalidad. En ese sentido la fertilización del suelo puede ser de dos tipos: orgánica (suministro de nutrientes al suelo por medio de materia orgánica) o inorgánica (suministro de abonos o productos químicos)[4], dentro del primer tipo están el humus de lombriz y la tierra de diatomeas.

El HL es un abono 100% natural que se obtiene de la transformación de residuos orgánicos compostados por medio lombrices, la especie más utilizada es *Eisenia foetida* (lombriz roja de California), la composta de HL facilita la absorción de los elementos contenidos en esta, en general su pH es neutro y posee carga bacteriana que producen enzimas, reguladores y hormonas que favorecen el crecimiento de las plantas. El uso de este abono también mejora las características del suelo, tanto en su estructura como en su equilibrio debido a los nutrimentos que aporta, destacan el magnesio, nitrógeno, fósforo y calcio[5]

Por otro lado, la tierra de diatomeas se obtiene de las diatomitas que son rocas sedimentarias compuestas por restos fósiles de diatomeas (algas unicelulares microscópicas) pertenecientes a la Clase Bacillariophyceae. La diatomita cuenta con una estructura única de baja densidad y alta capacidad de absorción[10]. El uso principal de la TD radica en su efecto insecticida que, a diferencia de los pesticidas químicos, el riesgo de desarrollar resistencia es escaso, pues produce daños físicos a los individuos[11]

Dentro del campo de la agricultura la TD, por su contenido alto en silicio, produce efectos de protección y resistencia en los cultivos contra diversos factores ambientales (bióticos y abióticos) se ha practicado, por ejemplo, en cultivos de arroz, caña de azúcar, papa y fresa.

El uso de TD, incrementa la productividad y calidad de las cosechas, es útil en la restauración de suelos degradados y aumenta su fertilidad además de evitar las sequías y la erosión, esta última debida, principalmente, al viento y agua; también neutraliza la toxicidad del aluminio en suelos ácidos y tiene efecto sinérgico con el calcio y el magnesio. Por otro lado, con el uso de la TD en áreas de cultivo, se reduce la lixiviación del fósforo, nitrógeno y potasio, también hay aumento a la resistencia ante plagas y enfermedades debidas a microorganismos (Ej, hongos) e insectos, no es menos importante es su uso en la restauración de áreas contaminadas por metales pesados e hidrocarburos y su efecto antioxidante en raíces de las plantas (Ej. arroz), además de promover la fotosíntesis[3].

## PARTE EXPERIMENTAL

El desarrollo experimental se realizó bajo condiciones controladas dentro de un huerto urbano ubicado en la Alcaldía Benito Juárez de la Ciudad de México, entre los meses de septiembre-noviembre de 2020. Para ello se utilizaron semillas de rábano (*R. sativus*) de la marca VITA proveniente de la empresa "Rancho Los Molinos" considerando para el experimento, aquéllas que no presentaron daño físico y sin variaciones entre ellas (Ej. color y forma).

Se utilizaron germinadores con 72 espacios y 5.0 cm de profundidad, a cada espacio se le agregó tierra negra (TN) a la cual se le adicionó humus de lombriz (HL) y tierra de diatomeas (TD) de la forma siguiente: el experimental 1 correspondió a TN (25 g para emergencia y 200 g para crecimiento) y HL (10 g para emergencia y 50 g para crecimiento); en el experimental 2 a TNHL se le agregó TD (0.057 g para emergencia y 0.4 g para crecimiento); se consideró como testigo a la TN (37 g para emergencia y 250 g para crecimiento). La cantidad de tierra de diatomeas utilizada se calculó de acuerdo con las recomendaciones de Baglione[3]

Para la siembra, se colocó una semilla por espacio a 2.0 cm de profundidad; inicialmente, una vez realizada la siembra, se rociaron con agua únicamente para humedecer la superficie. De acuerdo con las instrucciones del proveedor de las semillas, los germinadores se conservaron en oscuridad durante tres los primeros días (para esperar la germinación). Posteriormente, el riego se realizó por absorción para evitar arrastre de nutrientes y generación de hongos por exceso de humedad.

Tres días después de la siembra, se realizó el conteo y registro de la germinación que se consideró como positiva al observar los cotiledones en la superficie del sustrato, a los cinco días posteriores (ocho días) se realizó nuevamente el conteo de las plántulas.

Las plántulas resultantes fueron trasplantadas en bolsas especiales utilizando los mismos sustratos (TN; TNHL; TNTDHL) y el riego se realizó, por absorción, cada tercer día. Se hicieron registros diarios del número de plántulas para calcular el porcentaje de germinación (emergencia); posteriormente, se hicieron registros (cada cinco días), de la longitud de cada una de las plantas (flexómetro), color y número de hojas (observación directa) y al final del experimento, se midió la longitud de la raíz (flexómetro), peso de las plántulas (balanza digital) y circunferencia promedio del bulbo (Vernier).

Para calcular el porcentaje de germinación, las velocidades de germinación[12] y crecimiento[13], fueron utilizadas las fórmulas siguientes.

**Porcentaje de germinación** (emergencia):  $\%G = (sg/ss) \cdot 100$ , donde sg= total de semillas germinadas, ss=número de semillas sembradas

**Velocidad de germinación:**  $M = \sum(ni/T)$  donde ni= número de semillas germinadas(inicio del experimento) y T= tiempo desde la siembra hasta la germinación de la última semilla

**Velocidad de Crecimiento:**  $V = (S2-S1)/T$ , donde S1=primera medición S2= segunda medición; T=número de días transcurridos entre mediciones

## RESULTADOS

La emergencia se consideró positiva cuando los cotiledones se hicieron visibles lo cual fue evidente a los tres días de la siembra, este resultado coincide con un trabajo, en el que utilizó turba como sustrato para la germinación de *R. sativus*[14] por otro lado, como se muestra en la tabla 1, el porcentaje de germinación fue mayor en los tratamientos TNHL y TNTDHL (94 y 92%, respectivamente) y menor con TN.

Con el HL hay mayor actividad enzimática debida a la presencia de organismos benéficos, esto podría explicar las diferencias (aunque mínimas) en el número de semillas germinadas con el

tratamiento experimental 1 (TNHL) aunque la adición de la tierra de diatomeas a la TN favoreció el desarrollo tanto de la raíz como en el peso de la planta.

Después de 46 días (final del experimento), el número de hojas (promedio de cinco) se conservó en los grupos experimentales (TNHL y TNTDHL), el testigo (TN) únicamente contó con cuatro hojas (promedio), cabe señalar que en el experimental TNTDHL fueron obtenidos ejemplares con 8-9 hojas.

En cuanto al color de este órgano, (hojas), no hubo cambios evidentes, en todos los casos las plantas conservaron el mismo tono de verde (Fig. 2); la longitud promedio de la raíz fue menor con TN y el mayor se obtuvo con TNTDHL; el peso de las plantas también fue mayor con este último tratamiento, aunque el bulbo, que es la que generalmente se consume fue un poco con el tratamiento TNHL.

Tabla 4. Porcentaje y velocidad de germinación de las semillas de *R. sativus*; morfometría de sus plantas con los tratamientos aplicados

Tratamientos	Porcentaje de germinación (promedio)	Velocidad de germinación (No. de semillas germinadas/día)	Velocidad de crecimiento (cm/día)	Crecimiento de las plántulas (promedio) (cm)	Número de hojas (promedio)	Longitud de la raíz (promedio) (cm)	Peso de las planta (promedio) (g)	Diámetro del bulbo (promedio) (cm)
TN	62%	9.666	0.2934	6.1301	4	4.7169	1.0384	0.8216
TNHL	94%	14.3333	0.4955	8.4427	5	6.1726	2.2648	1.1473
TNTDHL	92%	15.4	0.5486	8.3879	5	6.8662	2.7936	1.0486



Fig. 1. Plántulas de rábano



Fig. 2. Plantas del último día del periodo experimental

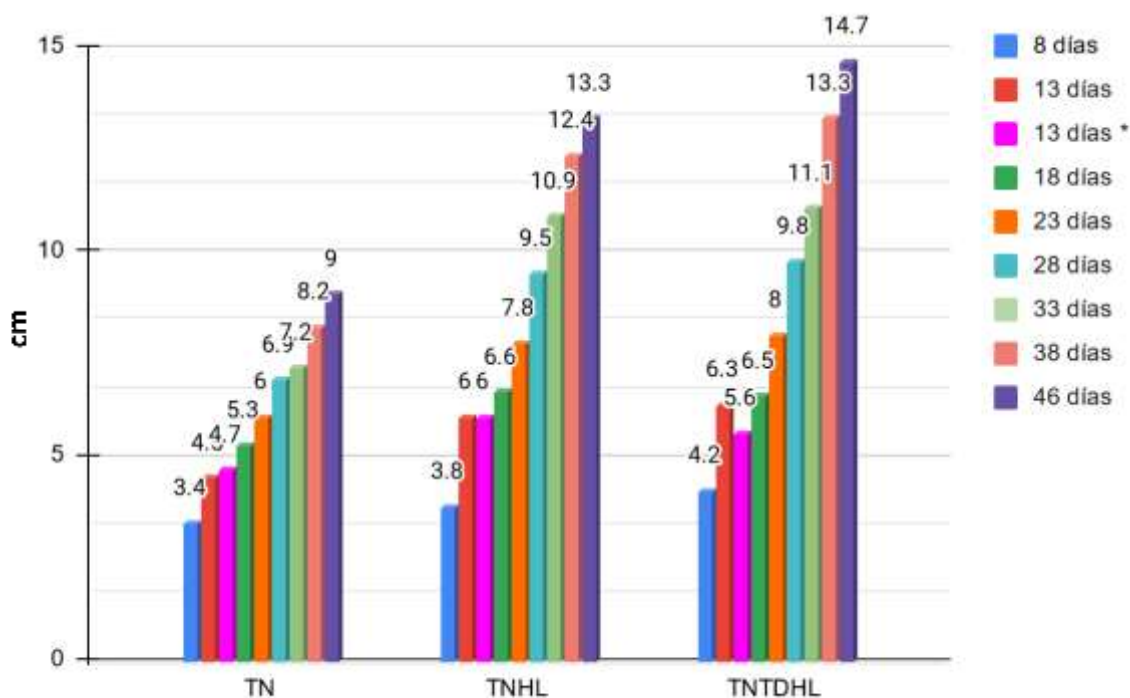


Figura 3. Altura (promedios) de las plantas con los tratamientos aplicados \* Medida registrada después de trasplante (13 días).

De acuerdo con algunos autores [4] la dosis de los productos de humus de lombriz o compost comercial no ofrecen diferencias significativas en relación con el crecimiento y cantidad de hojas que desarrollan las plantas, en cambio, la tierra de diatomeas promueve la fotosíntesis aumentando el crecimiento y desarrollo vegetal[3]. Esto último podría explicar las diferencias (aunque incipientes) en las alturas (promedio) alcanzadas por las plantas a los 46 días con el tratamiento TNTDHL.

## CONCLUSIONES

Con el uso de tierra de diatomeas y el humus de lombriz, en condiciones controladas, fue posible obtener un número mayor de semillas germinadas de *R. sativus* que con el uso de tierra convencional (tierra de humus); se evidenció la influencia de la tierra de diatomeas en el crecimiento de las plantas; ambos productos favorecen el crecimiento de sus órganos (bulbos, hojas y raíces) por lo que la el uso de HL y TD pueden ser una alternativa para obtener rábanos de buena calidad en huertos urbanos y de alguna forma satisfacer necesidades a escala pequeña.

## BIBLIOGRAFÍA

1. B. J. V. Carrera "Respuesta agronómica del cultivo de rábano (*Raphanus sativus*) a la aplicación de abonos orgánicos" (Universidad Técnica de Cotopaxi, EC, 2015) 48 pp.
2. P. K. L. Africano y S. E. H., Pérez. "Comportamiento fisiológico de plantas de rábano (*Raphanus sativus* L.), sometidas a estrés por salinidad". CONEXAGRO JDC4, 2, 2014, pp. 11-22.
3. L. Baglione, "Usos de la tierra diatomea". Rev. Técnicaña, 27, 2011, pp. 31-32.
4. P. I. Gómez "Evaluación del cultivo de rábano (*Raphanus sativus* L.) bajo diferentes condiciones de fertilización orgánica e inorgánica" (Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Coahuila, MEX, 2011), 65 p.
5. M. Candelaria-García, M. G. Navarro-Espinosa, C. N. Velázquez-López, J. Velázquez-López, "Elaboración de abono orgánico a base de la lombriz roja californiana", Estudios Agrarios, 53, 2013, pp. 217-225.

6. V. M. Coria, I. Vázquez, H.J. Muñoz, J. Villa, "Impacto de tierra de diatomeas sobre *Arceuthobium globosum* Hawksworth y *Wiens* Subsp. *grandicaule* en *Pinus pseudostrubus* Lindl", Rev. Mex. Cienc. Forestales, 1(1), 2011, pp. 39-46. Coria 2010)
7. B. S. Radillo, "Crecimiento y rendimiento de rábano (*Raphanus sativus* L.) CV. Champion cultivado en solución nutritiva con tres sustratos inorgánicos y dos densidades de siembra", (Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, MX, 2018) 75 pp.
8. S. L. Ávila, "Dosis de fertilizante con microorganismos benéficos (ferti em) en el cultivo de rabanito (*Raphanus sativus* L.) en la provincia de Lamas", (Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto, PE, 2014), 66 p.
9. C. A. Ttito, "Evaluación de las propiedades del suelo por incorporación de nutrientes y materia orgánica proveniente de los residuos sólidos orgánicos agrícolas del mercado metropolitano –I etapa Andrés Avelino Cáceres y su efecto en el cultivo del *Raphanus sativus* (rabanito)- Majes Pedregal, 2017", (Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa, PE), 2019, 177 p.
10. M. L. Fabila, "Efecto de la diatomita en las propiedades del suelo para reducir el impacto ambiental causado por el uso de fertilizantes químicos", (Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, MX), 2013, 91 pp.
11. V. R. Peña-Manchego, "Aplicación foliar de diatomita en el control de polilla de la col (*Plutella xylostella*) y pulgón (*Brevicoryne brassicae*) en el cultivo de brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*) cv. "Rumba". (Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa, PE), 2018, 141 pp.
12. L. González-Zertuche, A. Orozco-Segovia "Métodos de análisis de datos en la germinación de semillas, un ejemplo: *Manfreda brachystachya*", Bol. Soc. Bot. México 58, 1996, pp. 15-30.
13. A. M. P. H. Carberry, <https://es.wikihow.com/medir-la-tasa-de-crecimiento-de-las-plantas#Referencias>. 2020.
14. J. J. G. Mosquera, "Valoración de la aplicación de inóculos de microorganismos benéficos (MOBs) en el cultivo de rábano (*Raphanus sativus*) en la granja experimental-Paute" (Universidad Politécnica Salesiana, Quito, EC), 2018, 138 p.

## ESTIMACIÓN DE LA EDAD POR OTOLITOS Y MODELACIÓN DEL CRECIMIENTO DE *LUTJANUS INERMIS* EN PUERTO ANGEL, OAXACA, MEXICO.

Pérez-Olivares Iztzel<sup>1</sup>, Salgado-Ugarte Isaías H<sup>1</sup>. Y Verónica Mitsui Saíto Quezada<sup>1</sup>

Laboratorio de Biometría y Biología Pesquera, FES Zaragoza, Campus II. Batalla 5 de mayo S/N esq. Fuerte de Loreto, Ejército de Oriente Iztapalapa, 09230, México, D.F.

[itzel.p.o@gmail.com](mailto:itzel.p.o@gmail.com)

### RESUMEN

La determinación de la edad y la modelación del crecimiento en los peces, son pasos fundamentales en el estudio y comprensión de la ecología de las poblaciones. El objetivo de este trabajo fue estimar la edad y modelar el crecimiento de *Lutjanus inermis* en Puerto Ángel, Oaxaca, México. Para esto se realizaron muestreos de marzo 2014-noviembre 2015 en el área de desembarque en Puerto Ángel, Oaxaca; los organismos se compraron a los pescadores locales, después eran transportados utilizando una mezcla frigorífica y se procesaban. La extracción de los otolitos se realizó con un corte en la cabeza, retirando la parte superior del cráneo para poder remover la masa encefálica. Una vez obtenidos los otolitos se limpiaban y medían en largo y alto con un ocular micrométrico. Para la observación de los anillos de crecimiento, se utilizaron dos técnicas: aclarado y pulido y la lectura se realizó en una caja Petri con agua y luz reflejada sobre un fondo oscuro; se midió el radio total ( $R$ ) y de cada anillo ( $r_i$ ). A partir de lo anterior se observó que la distribución de tallas presentó una modal principal en los 20.8 cm en machos y en hembras a los 20.4 cm de longitud patrón ( $L_p$ ); el tipo de crecimiento fue hipoalométrico. En cuanto al crecimiento, se observó que los valores más bajos de la razón del incremento marginal ( $RIM$ ), fueron en octubre 2014-2015, lo que indica una formación anual; al comparar  $RIM$  con  $IGS$  mostró una relación negativa, mientras que con  $Kr$  fue positiva, indicando que la reproducción limita el crecimiento; mientras que con la temperatura superficial del mar y la concentración de clorofila  $a$  fue positiva, indicando que estos factores favorecen el crecimiento. El modelo que mejor describió el crecimiento fue von Bertalanffy y las edades predominantes fueron tres y cuatro años.

### INTRODUCCIÓN

La determinación de la edad y la modelación del crecimiento en los peces, se consideran prerrequisitos para lograr una adecuada explotación de poblaciones, ya que estos permiten la comprensión de la ecología de estas, además que proporcionan datos necesarios para determinar otros aspectos de la población como: edad en la que ocurre la maduración, longevidad, mortalidad y producción; y de esta forma poder lograr describir y/o cuantificar los cambios que se pueden estar dando en dicha población.

Para la estimación de la edad en peces existen dos métodos: los indirectos y los directos; los métodos indirectos suelen ser los más utilizados, ya que estos pueden resultar ser menos laboriosos y costosos en comparación a los directos. Este tipo de métodos se basa principalmente en la distribución de tallas de una población de peces (Petersen, 1891 En: Morales-Nin, 1991).

En el caso de los métodos directos existen diversos tipos como: la liberación y recuperación de peces marcados de edad conocida, colocación de peces de edad conocida y tamaño en cuerpos de agua experimentales y la interpretación y conteo de capas depositadas en estructuras duras.

Este último es el más usado para la determinación de la edad y se basa en la observación de discontinuidades del crecimiento en estructuras duras como escamas y otolitos. Estas discontinuidades son producto de cambios en el metabolismo de los individuos y los que tienen mayor efecto son aquellos debidos a la reproducción y/o desove y su correlación con el tiempo en el que ocurrieron (Everhart, 1981, en Gómez-Márquez, 1994).

En el presente trabajo se hizo uso de los otolitos, estos son concreciones de carbonato de calcio (principalmente en forma de aragonita); estas estructuras se encuentran contenidas dentro del laberinto membranoso (García-Godos, 2001).

La lectura de los otolitos se puede realizar de diferentes maneras. Para este trabajo se combinaron dos técnicas: pulido y aclarado, las cuales se explican a detalle en el método y la lectura se realizó con luz reflejada. Una vez estimada la edad a través de la lectura de las partes duras y conociendo

la talla de los organismos, se puede hacer uso de modelos matemáticos que permitan evaluar cuantitativamente el crecimiento individual. (Katsanevakis 2006; Guzmán-Castellanos, *et al.*, 2013). En el presente trabajo se decidió realizar la comparación entre tres modelos de crecimiento, con el fin de determinar cuál es que refleja mejor el crecimiento de *Lutjanus inermis*, los modelos de von Bertalanffy, Logístico y Gompertz permiten la comparación entre sus componentes ya que los tres modelos, son modelos de crecimiento del tipo asintótico y de complejidad semejante por el número de parámetros. Con esto se pretende hacer un estimado de crecimiento más robusto para la especie.

## PARTE EXPERIMENTAL

Se realizaron visitas mensuales durante el periodo de marzo 2013 a enero 2014, a la zona de desembarque de Puerto Ángel, Oaxaca; los organismos se obtuvieron de la captura realizada por los pescadores locales. Los ejemplares se transportaron en una hielera con mezcla frigorífica (agua-sal) al laboratorio donde se conservaron en un frigorífico.

Para ser procesados, los organismos se descongelan durante 24 horas en un refrigerador; una vez descongelados se tomaron las siguientes medidas: longitud total, furcal, patrón y altura y los siguientes pesos: total, tracto digestivo, hígado, gónadas y eviscerado.

### Extracción de otolitos.

Para extraer los otolitos a cada organismo; se le diseccionaba la cabeza para dejar expuesto el cerebro (Escoto, 1988), posteriormente se retiraba la masa encefálica para acceder a las cámaras óticas y así poder extraer los otolitos con ayuda de unas pinzas, tomándolos con precaución de no romperlos. Una vez extraídos los otolitos se enjuagaban y frotaban suavemente entre los dedos para desprender la membrana transparente (sáculo) que los envuelve, así como la materia orgánica y por último se secan con papel absorbente (Morales-Nin, 1997; Saito-Quezada, 2004).

### Aclarado y pulido de otolitos.

Para lograr la observación de los anillos de crecimiento en los otolitos, fue necesario la combinación de dos técnicas; el aclarado que ha demostrado ser adecuado para la interpretación de anillos concéntricos, en este caso se utilizó Xilol (en algunos casos ya no fue necesario el uso de la segunda técnica para la lectura de los otolitos)

Para el pulido se utilizó un rectificador Dremel 3000 de velocidad variable; el accesorio utilizado fue una piedra de amolar de silicio (esmeril) para lograr rebajar el grueso del otolito, se utilizó una velocidad 2; se colocó el otolito con la cara interna hacia arriba en una superficie dura y plana, y se adhirió con pequeños trozos de material adhesivo (Polibutileno), con el fin de que no se mueva al momento de pasar el rectificador por el otolito.

El rectificador se pasaba por el otolito tres o cuatro veces dependiendo el grueso; para pulirlos se sigue la forma de los otolitos, sin tocar las orillas de este; posterior a esto, se observa en el microscopio estereoscópico para determinar si aún requería más pulido o no; de requerir más pulido se utiliza el ladrillo para pulir de grano fino; el ladrillo se humedecía varias veces con agua, para mantenerlo limpio y así lograr un mejor pulido

### Lectura de otolitos

Para realizar la lectura se sumergen en una caja petri con agua, con el lado cóncavo hacia arriba y observados con luz reflejada sobre un fondo oscuro, esto permitió observar las zonas hialinas como bandas oscuras y las opacas se observan blanquecinas (Saito-Quezada, 2004).

Una vez preparados los otolitos, se midió el radio total  $R$  y los radios a cada uno de los anillos  $r_i$ , a partir del foco (núcleo) en dirección al extremo anterior del otolito (Fig. 1).



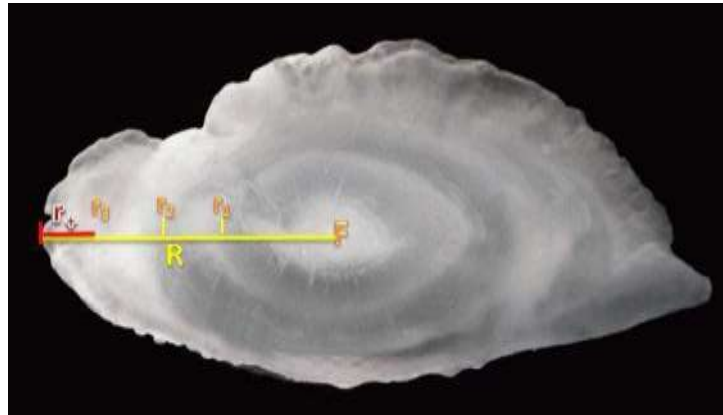


Figura 1. Medición de los radios en el Otolito con dos anillos de crecimiento y borde opaco.  
F = foco, R = radio total, r1= radio 1, r2=radio 2, r3= radio 3, r+ = incremento marginal.

Actividades de gabinete. Composición de tallas.

El cálculo de los EDKs y el cálculo de bandas “óptimas” se realizaron mediante las rutinas computarizadas de Salgado-Ugarte *et al.* (1993, 1995a, 1995b, 1997); Salgado-Ugarte (1995; 2002), Salgado-Ugarte *et al.* (2000b; 2002; 2005), Salgado-Ugarte (2013) y Mosqueda-Romo y Salgado-Ugarte (2011) para el paquete estadístico Stata (StataCorp, 2013).

Relación peso eviscerado-longitud patrón.

Con el fin de conocer qué tipo de crecimiento presentan los organismos se llevó a cabo la relación peso-longitud. Para esto, se realizaron regresiones lineales (transformación logarítmica de los datos) y regresión no lineal (función potencial) con una confianza del 95%.

Se usó la siguiente fórmula potencial:

$$Pe = aLp^b \quad (1)$$

Dónde:  $Pe$  = Peso eviscerado (g),  $Lp$  = Longitud patrón (cm) y  $a$  y  $b$  = constantes (coeficiente y exponente respectivamente)

Modelos de crecimiento

Se estimaron los parámetros para cada modelo de crecimiento a probar que fueron los siguientes: von Bertalanffy se calculó con la siguiente ecuación:

$$L_t = L_\infty (1 - e^{-K(t-t_0)}) \quad (2)$$

Gompertz, se calculó con base a la siguiente formula:

$$L_t = L_\infty e^{-e^{-K(t-t_0)}} \quad (3)$$

Y por último el logístico calculado con la siguiente formula:

$$L_t = L_\infty / (1 + e^{-K(t-t_0)}) \quad (4)$$

Dónde:  $L_\infty$  = Longitud asintótica del pez (longitud promedio máxima para la especie),  $K$  = Parámetro de curvatura (determina que tan rápido se alcanza el valor de  $L_\infty$ ),  $t$  = Edad y  $t_0$  = Tiempo teórico de inicio de crecimiento cuando  $L_t = 0$

Selección del modelo.

Para la selección de modelo se utilizó el valor de  $R^2$  y los residuales de cada modelo.

Validación de las marcas.

Para la validación de las marcas se utilizó la razón del incremento marginal, para lo cual se siguieron las sugerencias de Hyndes, *et al.* (1992) y este incremento se considerará como la distancia entre el borde externo de la última zona hialina y el margen del otolito; lo que se espera es que un incremento relativamente pequeño, indique que el anillo que acaba de formarse (Salgado-Ugarte *et al.*, 2005).

Adicionalmente se analizará la Razón de Incremento Marginal a partir de la siguiente fórmula:

$$RIM = (R - r_n) / (r_n - r_{n-1}) \quad (5)$$

Dónde:  $R$  = radio total,  $r_n$  = longitud del foco al último anillo de crecimiento en el otolito y  $r_{n-1}$  = longitud del foco al penúltimo anillo.

Para determinar la relación que puede existir entre el crecimiento y variables ambientales como: Temperatura Superficial del Mar y la concentración de Clorofila  $a$  se compararon dichas variables con  $RIM$ .

Los valores mensuales para cada variable ambiental se obtuvieron de: Goddard Earth Sciences Data and Information Services Center, National Aeronautics and Space Administration (GES DISC - NASA), 2016. Monthly average of the sea surface temperature at daylight, expressed in Celsius degrees. Raster digital data available at <<http://giovanni.gsfc.nasa.gov/giovanni/>>. Published at <<http://www.icmyl.unam.mx/uninmar/>>. Consulted on 2016/06/01.

Y para determinar si la época reproductiva afecta el crecimiento se calcularon el Índice Gonadosomático ( $IGS$ ) y el Factor de Condición relativo ( $Kr$ ), para esto se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$IGS = Pg/Pe * 100 \quad (6)$$

Dónde:  $Pg$  = peso de la gónada y  $Pe$  = peso eviscerado

$$Kr = Pe / (aLp^b) \quad (7)$$

Dónde:  $Pe$  = peso eviscerado,  $Lp$  = longitud patrón,  $a$  = ordenada al origen de la relación P-Llogarítmica y  $b$  = pendiente de la relación P-L logarítmica o coeficiente de la relación P-L potencial.

## RESULTADOS

En los EDKs de la distribución de tallas, en machos se distinguen tres modas 15.6, 20.8 y 27.7 cm en hembras a los 14.6, 20.4 y 27.1 cm e indiferenciados se observa una única moda a los 15 cm (fig. 2).

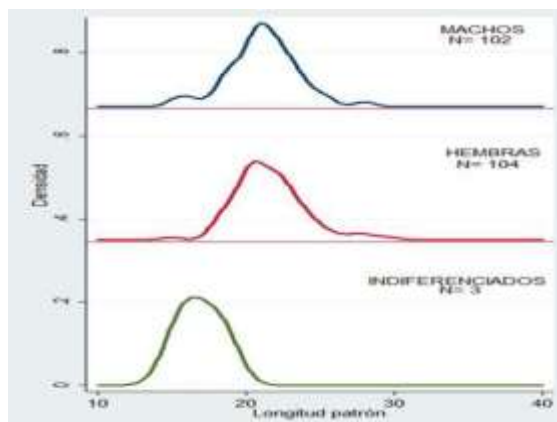


Figura 2. EDKs de tallas para machos, hembras e indiferenciados.

En la relación peso-longitud se obtuvo una  $b=2.760$ , lo cual indica que *Lutjanus Inermis* tienen un

crecimiento de tipo hipoalométrico, es decir que crece más en longitud que en peso.

La formación de los anillos de crecimiento es anual y está relacionada con las variaciones metabólicas causadas por el desarrollo gonadal y el gasto de energía resultado del desove (Fig.3A y 3B) (Morales y González, 2009; Bilici *et. al.*, 2016).

En cuanto a la relación del crecimiento con las variables ambientales, no se logró determinar una relación clara con la temperatura superficial del mar (Fig.3C), sin embargo, se observó una relación positiva con la concentración de clorofila a (Fig. 3D), esto podría indicar que la disponibilidad de alimento permite una tasa de crecimiento alta en los organismos (Uchiyana *et. al.*, 1998).

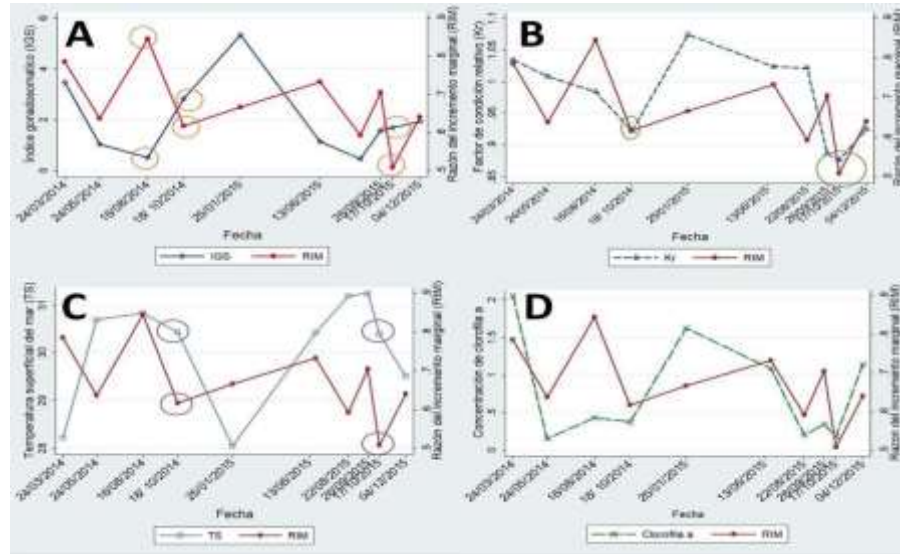


Figura 3. A) Índice gonadosomático (IGS) vs *RfM* B) factor de condición relativo (*Kr*) vs *RfM* temperatura superficial del mar vs *RfM* D) concentración de clorofila a vs *RfM* (los círculos muestran las coincidencias entre variables).

El crecimiento se modeló con base a los modelos de von Bertalanffy, Gompertz y Logístico (Fig. 4A), siendo el primero el que mejor describió el crecimiento de *Lutjanus inermis*, esto con base a los valores de  $R^2$  (fig. 4A) y análisis gráfico de residuales (fig. 5B).

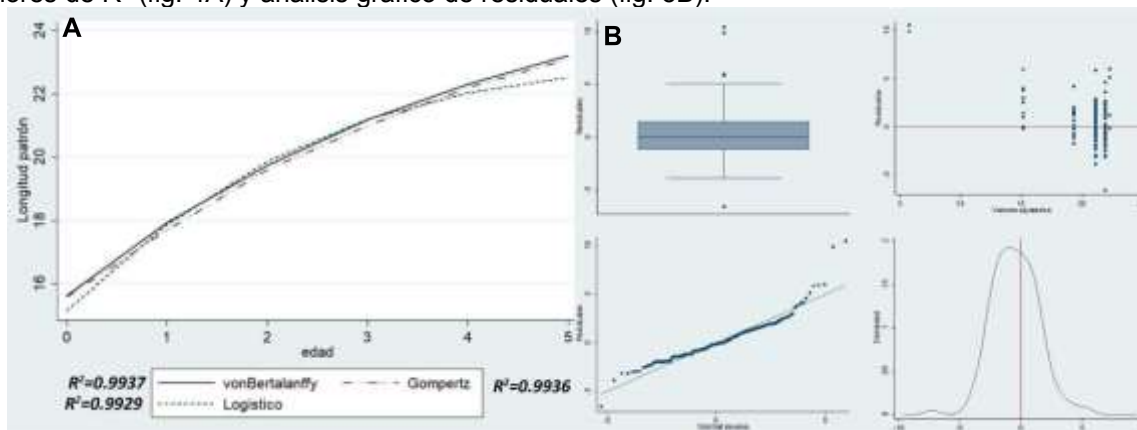


Figura 4. A) Comparación entre modelos de crecimiento y valores de  $R^2$  B) Gráficos de los Residuales del modelo von Bertalanffy (diagrama caja y bigote, residuales vs valores ajustados, Q-Q plot y EDK).

Las edades predominantes fueron 3 años y 4 años y una edad máxima de 5 años.

**CONCLUSIONES**

El tipo de muestreo y el arte de pesca provocaron un intervalo de tallas reducido, predominando las tallas entre los 20 cm y 25 cm (Lp) y las edades de 4 y 3 años.

El tipo de crecimiento para *Lutjanus inermis* es hipoalométrico, es decir que es menos pesado para la longitud que alcanza.

El modelo que mejor describe el crecimiento de la especie es el de von Bertalanffy.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. M. Morales y L. González. 2010. Edad y crecimiento del pez *Haemulon steindachneri* (Perciformis: Haemulidae) en el suroeste de la isla de Margarita, Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 58(1):299-310.
2. S. Bicili, T. Cicek y E. Ünlü. 2016. Observation on the age, growth and somatic condition of *Carasobatus luteus* (Heckel, 1843) and *Copoeta trutta* (Heckel, 1843) (Cyprinidae) in Tigris River, Turkey. *Iranian Journal Fisheries Sciences*, 16(1): 170-187.
3. J. H Uchiyama, R. Skillman y J. D. Sampaga. 1998. A preliminary assesment of the use of hard parts to age central Pacific swordfish, *Xiphias gladius*. U.S. Dep. Commer. NOAA Tech.Rep. NMFS, 142: 261-273.

## IDENTIFICACIÓN DE GENES BACTERIANOS EN LOS GENOMAS DEL HONGO DEL GENERO *METARHIZIUM*

Andrea Patricia Lugo Pérez, Iván Horacio Piña Torres, Gloria Angelica González Hernández, Juan Carlos Torres Guzmán, Enrique Israel Padilla Guerrero.

Posgrado en Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato.  
[ap.lugoperez@ugto.mx](mailto:ap.lugoperez@ugto.mx)

### RESUMEN

Las interacciones bióticas son las asociaciones que se establecen entre al menos dos organismos de la misma o de distintas especies; existen diferentes tipos de interacciones entre las que encontramos a las mutualistas, que es cuando dos especies que interactúan buscan obtener un beneficio de ello. Un ejemplo de esto son algunas asociaciones que se establecen entre ciertos hongos y bacterias. Durante este tipo de interacciones se ha reportado que se puede modificar el comportamiento de los individuos e inclusive hay evidencia de cambios heredables. Los hongos del género *Metarhizium* tienen una amplia distribución global y como característica principal es que poseen diversos estilos de vida, ya sea como entomopatógeno o como micorriza, y por medio del análisis de su genoma se ha podido determinar su origen evolutivo e inclusive identificar la presencia de genes adquiridos por transferencia horizontal.

Recientemente, en nuestro grupo de trabajo se reportó que *Metarhizium* podía establecer asociaciones con las bacterias, a través de la obtención de aislados que contenían este tipo de interacción. Por lo tanto, en este proyecto se evaluó la presencia de genes que tienen un origen bacteriano en los distintos genomas disponibles de los hongos del género *Metarhizium* por medio del uso de distintas herramientas bioinformáticas. También se determinó la posible función biológica de los genes identificados y se analizó si los genes se compartían entre las cepas de *Metarhizium* o si eran exclusivo de cada genoma. Estos resultados nos permitieron ampliar el conocimiento sobre las diversas facetas del hongo como entomopatógeno o micorriza las cuales podrían estar influenciadas por la adquisición de distintos genes en su genoma.

### INTRODUCCIÓN

Interacciones bióticas

Las interacciones bióticas son las asociaciones que se establecen entre al menos dos organismos de la misma o de distintas especies, (Figura 1). Como resultado de estas asociaciones, los organismos pueden verse beneficiados, perjudicados o no afectados, dependiendo del contexto en el que ocurran. Por lo general el objetivo de estas interacciones implica la obtención de recursos para poder sobrevivir (Parra-Tabla 2015).

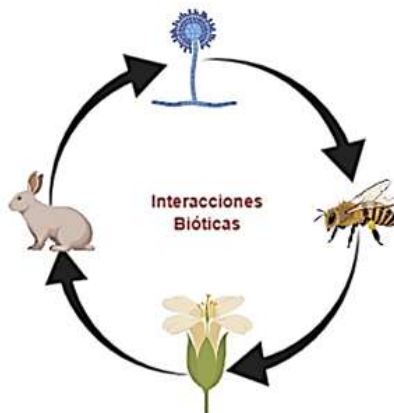


Figura 1. Interacciones bióticas. Imagen ilustrativa acerca de las asociaciones que se establecen entre los distintos organismos.

Las interacciones bióticas se han clasificado de acuerdo al efecto que tienen sobre las especies interactuantes, entre las que podemos encontrar las interacciones por competencia que es la lucha que se presenta entre dos o más individuos con el fin de alcanzar algo, la depredación que es la ingesta de un organismo por otro, el parasitismo en donde el individuo depredador vive ligado físicamente a su hospedero ya sea en su interior o en su exterior y el mutualismo sucede cuando dos especies interactúan de modo que ambas obtienen un beneficio de ello (Begon, Townsend et al. 2006)

Se han desarrollado relaciones mutualistas especializadas en las que un organismo huésped alberga un simbionte para utilizar sus capacidades de síntesis química para combatir a los competidores o mantener un cierto estilo de vida. Y un ejemplo de estas interacciones mutualistas son las que se establecen entre los hongos y las bacterias.

La importancia para la comprensión de complejas redes en la ecología microbiana no solo nos ayudará a entender los procesos biológicos fundamentales, sino que también nos conducirá al descubrimiento de nuevos factores de virulencia y el aprovechamiento de sus productos en el área médica o en la ingeniería de alimentos.

#### Interacción Hongo-Bacteria

Los microorganismos se encuentran en todas partes y colonizan casi todos los nichos ecológicos. Entre estos microorganismos encontramos a los hongos y a las bacterias las cuales pueden establecer algunas interacciones entre ellos. Los estudios han revelado que los hongos y las bacterias a menudo forman consorcios interdependientes física y metabólicamente que albergan propiedades distintas de las de sus componentes individuales. Estas interacciones tienen un papel importante en los numerosos ecosistemas debido a que influyen en el estado fisiológico de las plantas y los animales y por consiguiente pueden influir en sus ciclos bioquímicos (Frey-Klett, Burlinson et al. 2011) y (Tarkka, Sarniguet et al. 2009)

Los productos que se obtienen de estas interacciones son empleados en distintas actividades como en la agricultura, horticultura, biotecnología, procesamiento de alimentos y aplicaciones médicas. Para poder realizar el estudio de las Interacciones Hongo-Bacteria se tienen que tomar en cuenta múltiples disciplinas como la Biología Molecular, Genómica, Ecología Microbiana que nos van a facilitar la comprensión de su comportamiento, función y desarrollo (Frey-Klett, Burlinson et al. 2011).

Los patrones de co-ocurrencia entre las bacterias y los hongos son el resultado de las interacciones biofísicas y metabólicas en donde los socios bacterianos y fúngicos se desarrollan y coevolucionan de manera interdependiente. Otra característica de estas interacciones es que se puede producir un rango de diversas asociaciones que van desde las antagonistas hasta las mutualistas y que a su vez pueden modular el comportamiento de uno o de ambos socios que están interactuando. En el caso de las interacciones multipartitas estas pueden estar dentro de un solo ambiente, por ejemplo: en la placa oral o en el suelo, pero también pueden estar en múltiples ambientes (Deveau, Bonito et al. 2018)

Con la ayuda de las distintas herramientas moleculares se ha permitido la identificación de los diversos microorganismos que se encuentran en los diferentes biomas y ambientes de la Tierra y las posibles interacciones que se realizan entre ellos. Una de las nuevas herramientas empleadas es la Secuencia de Siguiendo Generación la cual nos permite conocer el potencial de las Interacciones Hongo-Bacteria en todos los hábitats y a su vez nos permite identificar con que microorganismos interactúan (Olsson, Bonfante et al. 2017)

Las interacciones Hongo-Bacteria más cercanas ocurren cuando los dos organismos establecen una simbiosis. Estas simbiosis se pueden clasificar como una relación ectosimbiótica, en la que las bacterias permanecen externas a la membrana plasmática fúngica, o una relación endosimbiótica, en la que las bacterias que se encuentran dentro de la célula fúngica, por ejemplo, este fenómeno ocurre en los cianoliquenos, que son las simbiosis formadas entre hongos (por lo general

ascomicetos) y las cianobacterias fotosintéticas. Es importante señalar que debe existir un balance ecológico entre el microbioma y su hospedero, en algunos estudios se ha sugerido que esto puede ser fundamental para el mantenimiento de la salud de los organismos hospederos. También se ha reportado que las interacciones Hongo-Bacteria puede ser un factor que modula las enfermedades en los humanos si se cambia el equilibrio ecológico entre los organismos asociados, pero también se ha reportado que los efectos de las BFI en la salud humana podrían permitir el uso de hongos y bacterias como probióticos. Otro ejemplo que se presenta es que estas interacciones Hongo-Bacteria pueden generar varias infecciones en las plantas hospederas y a menudo se asocian con disbiosis (alteraciones en la microbiota) y a la pérdida de diversidad en el microbioma (Olsson, Bonfante et al. 2017) y (Deveau, Bonito et al. 2018)

Es importante analizar los diferentes tipos de interacciones que se pueden presentar entre los Hongos y las Bacterias como organismos asociados. Las interacciones nutricionales entre hongos y bacterias son importantes para muchos BFI. La competencia trófica entre hongos y bacterias está ampliamente documentada en las raíces de las plantas (rizosfera). Los ejemplos de competencia trófica bacteriana-fúngica en otros entornos incluyen la competencia por sustratos de carbono durante la descomposición de las hojas (Møller, Miller et al. 1999). Además de la transferencia de metabolitos nutritivos, antibióticos y moléculas de señalización, el intercambio de otras biomoléculas entre bacterias y hongos también puede ocurrir. En este caso muchas bacterias dependen de sistemas de secreción para translocar moléculas, como proteínas y ADN, en las células vecinas y en el medio extracelular (Frey-Klett, Burlinson et al. 2011). También se ha reportado que durante este tipo de interacción es posible el intercambio del material genético, es decir, que puede existir una adquisición o pérdida de caracteres.

#### Adquisición de genes procarióticos por genomas fúngicos

A través del estudio hacia el material genético se ha determinado que puede existir una pérdida o ganancia de genes, que las regiones genómicas pueden expandirse o contraerse en escalas de tiempo cortas, que diferentes locis pueden evolucionar a diferentes ritmos debido a las presiones selectivas desiguales, y que los genes se pueden obtener mediante la duplicación dentro de los genomas. También se han reportado los mecanismos por los cuales se permite la adquisición de material genético. Uno de esos mecanismos es a través de la Transferencia Horizontal de genes, es decir, que es el movimiento de material genético entre organismos a través de la transmisión no vertical (no es de padres a hijos) (Husnik and McCutcheon 2018). Este tipo de eventos es muy común en organismos como las bacterias o las arqueas. Sin embargo, se cree que las transferencias horizontales a los genomas eucariotas son eventos de baja frecuencia, ya que el material genético debe ingresar al núcleo de la célula receptora para ser incorporado al genoma y ser transmitido verticalmente (Matriano, Alegado et al. 2021). Si bien la HGT ha sido difícil de demostrar en linajes eucariotas se ha reportado que por el estilo de vida que presentan varios géneros de hongos estos pueden mantener interacciones con las bacterias y a su vez estas pueden carecer de algunas barreras clásicas para la Transferencia Horizontal de Genes como la diferenciación de la línea germinal (Marcet-Houben and Gabaldón 2010). De hecho, la HGT puede haber acelerado la evolución e innovación del genoma en eucariotas microbianos al contribuir a la divergencia de especies, la diversidad metabólica y la versatilidad, y el establecimiento del intercambio genético entre reinos.

En el 2010, Marcet-Houben y Gabaldón realizaron una búsqueda filogenética completa de genes procarióticos adquiridos en 60 genomas fúngicos completamente secuenciados. En este caso determinaron que los genes transferidos incluían arsenito reductasa bacteriana, catalasa, diferentes racemasas y enzimas del metabolismo de peptidoglicanos, por lo tanto, estos resultados nos sugieren un papel importante para la HGT en la evolución de los hongos (Marcet-Houben and Gabaldón 2010)

La HGT puede desempeñar un papel importante en la adaptación de especies a nuevos nichos o estilos de vida, y se ha demostrado que participa en transiciones evolutivas a corto plazo. Por ejemplo, la adquisición de un gen que codifica la toxina por *Pyrenophora tritici - repentis* de

*Stagonospora nodorum* convirtió un hongo que causaba manchas ocasionales en las hojas de trigo en una plaga devastadora en cuestión de décadas. La HGT ha estado involucrada en cambios drásticos en el estilo de vida, como la adquisición de un hábito entomopatógeno a partir de un estilo de vida endófito de gramíneas en el género *Metarrhizium* (Zhang, Chen et al. 2019) Otro ejemplo de adquisición reciente de genes novedosos con implicaciones funcionales se refiere a los hongos involucrados en entornos de producción de alimentos y bebidas. Cepas de vino de *S. cerevisiae* contiene genes que no están presentes en las cepas de cerveza y probablemente estén relacionados con la adaptación a su entorno industrial particular. Estos ejemplos destacan el poder de HGT para permitir la adaptación microbiana a nuevos nichos, incluidos los relacionados con la domesticación (Naranjo - Ortiz and Gabaldón 2020)

Si bien los eventos antiguos son difíciles de detectar, existe una clara evidencia de que algunos grupos de hongos se han visto afectados por HGT durante largos períodos de tiempo evolutivos. Una gran fracción de los genes de la policétido sintasa en *Lecanoromycetes* parecen surgir de *Actinobacteria*, seguida de expansiones de genes (Schmitt and Lumbsch 2009). Algunos de estos genes están involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios ecológicamente relevantes como micotoxinas o antibióticos. Los terpenoides y alcaloides también son familias extendidas de metabolitos secundarios cuyas vías biosintéticas se han dispersado a través del reino fúngico a través de HGT (Naranjo - Ortiz and Gabaldón 2020).

#### Hongo *Metarrhizium*

La importancia de estudiar a este género de hongos radica en sus características particulares lo que nos permite emplearlos de diversas maneras como es el caso de agentes biocontroladores, con el fin de disminuir el impacto causado por los pesticidas químicos y controlar los efectos causados por las plagas. Los hongos del género *Metarrhizium* se encuentran ampliamente distribuidos alrededor del mundo y como característica poseen un estilo de vida bifuncional ya sea como entomopatógeno y como micorriza (Sasan and Bidochka 2012) pero esto a su vez no lo exenta de interactuar con otros organismos o microorganismos. Con respecto a su clasificación *Metarrhizium* pertenece a la familia de hongos *Clavicipitaceae* y al orden de los *Hypocreales*. Además de ser un parasito necrótrofo, es un saprofito facultativo y para su crecimiento y esporulación el hongo requiere un rango de temperatura de 24 a 30°C (JIMÉNEZ 2015)

#### Interacción *Metarrhizium*-Insecto

Los hongos entomopatógenos son un factor regulador importante para el biocontrol en la agricultura y la silvicultura. Su biología y ecología se han estudiado durante más de un siglo (Mudrončková, Mazáň et al. 2021). Los hongos parásitos, tales como *Metarrhizium* difieren de otros entomopatógenos mediante la infección de insectos hospedadores directamente a través del integumento, una barrera física típicamente impenetrable contra los invasores microbianos.

Las diferentes especies de *Metarrhizium* tienen un amplio rango de hospedadores de insectos. Por ejemplo, *M. robertsii*, puede infectar a más de 200 especies de insectos que representan los órdenes Orthoptera, Dermaptera, Hemiptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera y Coleoptera. Otras especies o genotipos de *Metarrhizium* están restringidas a ciertos tipos de artrópodos. Por ejemplo, *M. acridum* y *M. album* muestran un rango estrecho de hospedadores restringido a los ortópteros y hemípteros, respectivamente (Brunner-Mendoza, Reyes-Montes et al. 2019)

Se sabe que algunos endófitos inducen la resistencia de su huésped al cebar el sistema de defensa de este, mientras que otros secretan metabolitos secundarios que influyen en los patógenos de forma directa o indirecta como la antibiosis o inducen la defensa en consecuencia. En este caso se sabe que los hongos del género *Metarrhizium* inhiben el crecimiento y la reproducción de una amplia gama de herbívoros de diferentes gremios de alimentación. Estos incluyen miembros de los géneros Coleoptera, Diptera, Lepidoptera y Orthoptera (Ment, Raman et al. 2020). Existen reportes en donde los patógenos fúngicos coevolucionan las estrategias de infección para resistir los antimicrobianos especializados del huésped mediante la adaptación recíproca. Por ejemplo, en el caso de *M. robertsii* no solo puede detectar la presencia de inhibidores de la proteinasa y péptidos antimicrobicos



producidos por los insectos, sino que puede contraatacar al expresar selectivamente quimotripsina y metaloproteinasas que se dirigen a las moléculas de defensa del insecto para la degradación. Esto implica que el hongo ha desarrollado una estrategia que reduce los costos de aptitud física y evita el desperdicio innecesario de los recursos insecticidas almacenados durante la penetración de la cutícula, cuando los recursos externos no están disponibles (Mukherjee and Vilcinskis 2018)

También es posible que la capacidad endofítica y la patogenicidad hacia los insectos por parte de *Metarhizium* se unan para proporcionar un método activo de transferencia de nitrógeno hacia las plantas huésped a través de los micelios fúngicos para facilitar la obtención de nutrientes como los compuestos carbonados que le podría proporcionar la planta (Behie, Zelisko et al. 2012)).

#### Interacción *Metarhizium*-Planta

Las plantas agrícolas utilizan la compleja comunidad de microorganismos rizosféricos para mantener la salud y la producción primaria. Estos microorganismos varían en sus funciones ecológicas y proporcionan beneficios que incluyen la estimulación del crecimiento de las plantas, la supresión competitiva de los patógenos a través de metabolitos secundarios o restricción espacial, una mayor resistencia al estrés biótico y abiótico por la resistencia sistémica inducida, y el transporte y solubilización de los nutrientes que podrían de lo contrario no estar disponible para la planta (Barelli, Waller et al. 2020). *Metarhizium* también proporciona beneficios a una variedad de plantas huésped, incluida la resistencia al estrés salino, el aumento de la biomasa y el crecimiento de las plantas, la estimulación del crecimiento de las raíces, la adquisición de nitrógeno derivado de insectos y el antagonismo de los patógenos de las plantas. (Barelli, Waller et al. 2020).

((Hu, Xiao et al. 2014) reportaron en sus estudios que los hongos de género *Metarhizium* pueden ser colonizadores de las raíces de las plantas, demostrándolo por medio de una cepa de *Metarhizium* que expresa la proteína verde fluorescente (GFP). Como se observa en la *Figura 2* comprobándose que *M. robertsii* se encuentra íntimamente asociado con las raíces de las plantas y que promueve la proliferación de los pelos radiculares del pasto varilla (Wyrebek, et al. 2011). También se ha reportado que la aplicación de *M. anisopliae* promovió el desarrollo temprano de las raíces de maní y la inoculación con *M. robertsii* promovió el crecimiento lateral de la raíz y el desarrollo de pelos de radiculares de las plántulas de *Arabidopsis thaliana* por medio de un mecanismo dependiente de auxinas (Liao, Lovett et al. 2017).

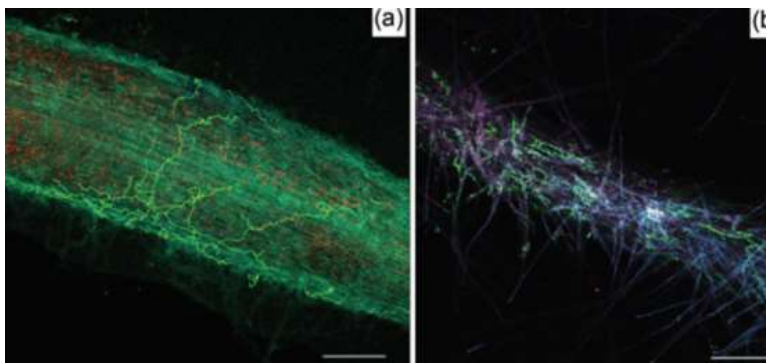


Figura 2. Colonización de raíces por parte de *Metarhizium* (ARSEF2575) expresando GFP. a) Asociación con la raíz de *Phaseolus vulgaris*, y b) *Panicum virgatum* (Wyrebek, et al. 2011).

#### Interacción *Metarhizium*-Bacterias

Las bacterias y hongos entomopatógenos son los grupos microbianos más populares para el control biológico de las plagas, pero la aplicación de estos microorganismos por lo general tiene un efecto de inestabilidad por lo tanto es importante identificar las combinaciones sinérgicas eficientes para el control de las plagas. Son bien conocidos los efectos sinérgicos y aditivos entre los patógenos de diferentes grupos sistemáticos sobre los insectos plaga. También se observaron estos efectos durante la infección fúngica combinada con bacterias, por ejemplo, se realizó un estudio en donde

se analizaron las interacciones en un modelo de tres componentes entre las larvas del escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*), las Bacterias y los hongos entomopatógenos (*Metarhizium anisopliae*) en donde se mostró un efecto sinérgico estable en condiciones de laboratorio y campo en todos los estadios de larvas. Los autores demostraron que las bacterias arrestaron la nutrición de los insectos, retrasaron su crecimiento y aumentaron el período de intermoliación por lo tanto propusieron que estos efectos pueden ayudar a la penetración del hongo a través de los integumentos en el hemocoel que conduce a un desarrollo más rápido de los hongos y la muerte del huésped (Wraight and Ramos 2005) y (Yaroslavtseva, Dubovskiy et al. 2017).

En otro ejemplo reportado se midió el efecto antagonista de la alta tasa de dosis de *B. thuringiensis* en combinación con *M. anisopliae* contra todos los estadios larvarios de *H. armigera*. Las posibles razones para la interacción sinérgica entre hongos entomopatógenos y *B. thuringiensis* podrían deberse a la inanición, ya que las bacterias pueden detener la nutrición de los insectos y por lo tanto las esporas de los hongos podrían matar a las larvas debilitadas (Wakil, Ghazanfar et al. 2013)

Por otro lado, también se ha investigado el papel que juegan los hongos entomopatógenos en asociación con las bacterias para interactuar a su vez con las plantas. Es importante mencionar que al identificar a las bacterias y los hongos específicos que están vinculados a las propiedades beneficiosas de las plantas se impulsará el desarrollo de las comunidades sintéticas y suelos supresores de enfermedades para su uso en la agricultura. Se ha descrito que *M. robertsii* puede contribuir a la supresión general de las enfermedades y a la promoción del crecimiento de las plantas en conjunto con los miembros de la comunidad PGPB (Organismos que Promueven el Crecimiento de las Plantas). Es de destacar que se descubrió que las bacterias del género *Bradyrhizobium* aumentaron significativamente su presencia en las raíces de las plantas después de la inoculación con *Metarhizium* lo que sugiere que el hongo podría tener un efecto benéfico para su proliferación (Barelli, Waller et al. 2020).

#### *Metarhizium* y su Genoma

El género *Metarhizium* incluye los hongos entomopatógenos mejor estudiados a nivel molecular y bioquímico. A través del estudio de su genoma se ha podido determinar varios aspectos sobre la biología y el comportamiento de este género de Hongos. Por medio del análisis completo de su genoma se determinó el origen evolutivo, es decir, se encontró que estos hongos provienen de endófitos o patógenos de plantas, estos hallazgos sugieren que *Metarhizium* pudo haber evolucionado a partir de hongos adaptados para crecer en plantas, aunque ahora infectan insectos. Esta inferencia está respaldada por la existencia constante de genes para enzimas degradantes de plantas dentro de los genomas de *Metarhizium* (Gao, Jin et al. 2011). También con este tipo de estudios realizado a múltiples especies de *Metarhizium* en donde se indicó que carecen de teleomorfos conocidos se reveló que, exhiben diversos modos de reproducción que influyeron fuertemente en la evolución del genoma y que están vinculados como causa o efecto con estrategias patogénicas (St. Leger and Wang 2020). Hu, Xiao en el 2014 determinaron que la dirección evolutiva de la especiación de *Metarhizium* es de especialistas a especies de transición con un rango de hospedadores intermedios y luego a generalistas capaces de atacar a diversos hospederos (Hu, Xiao et al. 2014).

Se han realizado algunos estudios de comparación genómica entre las especies de *Metarhizium robertsii*, *Metarhizium anisopliae* y *Metarhizium acridum* con el objetivo de identificar algunos conjuntos de genes que se diferencian entre ellos. Por ejemplo, se determinó que en el genoma de *M. anisopliae* había alrededor de 127 genes que no se encontraron en los otros genomas, es decir que eran genes divergentes y entre las funciones descritas para estos genes se encontraban su papel como proteínas de membrana, elementos transponibles, etc. (Pattemore, Hane et al. 2014).

Otros resultados obtenidos del análisis de los genomas de *Metarhizium* es que existe una adquisición de genes por transferencia horizontal y que pertenecen a distintos reinos, Figura 3. Con estos estudios también se determinó que las especies generalistas de *Metarhizium* contenían un mayor número de genes que provienen de las bacterias (Hu, Xiao et al. 2014). Recientemente se ha

reportado la adquisición de 18 genes por transferencia horizontal que están involucrados en el proceso de infección del hongo hacia el insecto, lo que nos sugiere que la interacción con otros.

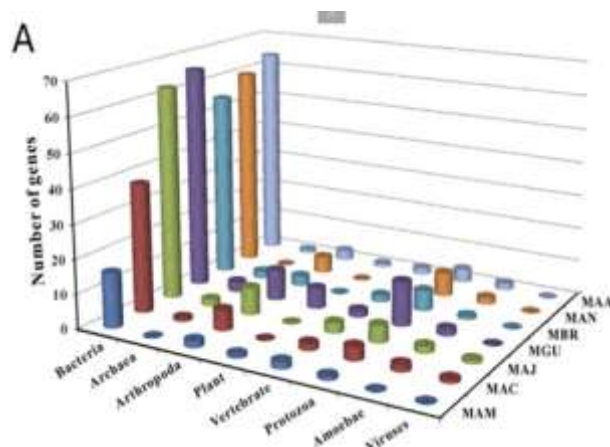


Figura 3. Estimación de genes HGT putativos en diferentes especies de *Metarhizium* adquiridas de otros reinos

## OBJETIVOS

### General

- Evaluar la presencia de los diferentes genes bacterianos en los distintos genomas disponibles en los hongos del género *Metarhizium*

### Específico

- Analizar los genes bacterianos putativos de los genomas del género *Metarhizium*

## PARTE EXPERIMENTAL

A continuación, en la *Figura 4* se muestra la estrategia general empleada para cumplir con los objetivos planteados en la investigación.

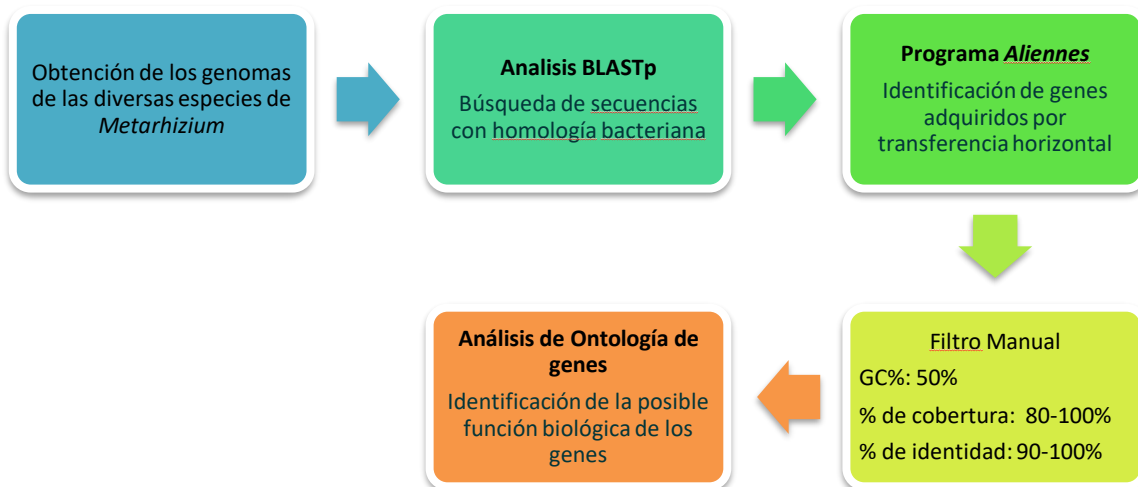


Figura 4. Estrategia General empleada para la identificación de los genes de origen bacteriano en los distintos genomas del hongo del género *Metarhizium*

## RESULTADOS

### Identificación de los genomas del hongo del género *Metarhizium*

Se realizó una búsqueda en las bases de datos de NCBI y en las bases de datos de EMBL-EBI para la identificación de los genomas disponibles de los hongos del género *Metarhizium*, encontrándose 14 genomas que correspondían a 8 especies diferentes de *Metarhizium*. En la *Tabla 1* se observa la especie y la cepa a la cual pertenece cada genoma, así como el sitio de origen de donde fue aislada la cepa. Esto nos podría sugerir el nicho ecológico en donde se desarrolla la cepa y las posibles interacciones que puede establecer, también se indica la clave de identificación de cada genoma y el nivel de secuenciación de cada uno. De los 14 genomas disponibles solo uno se encuentra secuenciado al 100% y corresponde a la cepa de *Metarhizium brunneum* ARSEF 3297, con respecto a los demás genomas 12 se encuentran a nivel scaffold y uno más a nivel contig.

Especie	Cepa	Clave de Identificación WGS	Origen	Nivel de secuenciación
<i>Metarhizium anisopliae</i>	E6	JNNZ00000000.1	Brasil	Conting
	ARSEF 549	AZNF00000000.1	Brasil	Scaffold
	BRIF 53248	APNC00000000.1	Australia	Scaffold
	BRIP 53293	APNB00000000.1	Australia	Scaffold
<i>Metarhizium acridum</i>	CQMa 102	ADNI00000000.1	África	Scaffold
<i>Metarhizium majus</i>	ARSEF 297	AZNE00000000.1	Samoa	Scaffold
<i>Metarhizium rileyi</i>	Cep018-CH2	SBHS00000000.1	Argentina	Scaffold
	RCEF 4871	AZHC00000000.1	China	Scaffold
<i>Metarhizium brunneum</i>	ARSEF 3297	AZNG00000000.1	México	Scaffold
	ARSEF 4556	GCA_013426205.1	Estados Unidos	Genoma completo
<i>Metarhizium guizhouense</i>	ARSEF 977	AZNH00000000.1	Francia	Scaffold
<i>Metarhizium robertsii</i>	ARSEF 2575	JELW00000000.1	Estados Unidos	Scaffold
	ARSEF 23	ADNJ00000000.2	Estados Unidos	Scaffold
<i>Metarhizium album</i>	ARSEF 1941	AZHE00000000.1	Filipinas	Scaffold

Tabla 1. Genomas disponibles de las distintas especies de *Metarhizium* en la base de datos de NCBI y en EMBL-EBI

#### Identificación de genes bacterianos adquiridos por Transferencia Horizontal

Una vez que se obtuvieron los resultados de los análisis con *Aliennes* se procedió a realizar un filtro manual para seleccionar solo aquellos genes que cumplieran con los parámetros de porcentaje de cobertura ( $\geq 60\%$ ) y el porcentaje de G-C ( $\geq 50\%$ ) ya que estos datos nos ayudarían a corroborar que los genes obtenidos son de origen bacteriano. A continuación, se muestran los resultados obtenidos después de realizar los filtros manuales *Figura 5*. En el caso de la cepa de *Metarhizium brunneum* 4556 se muestran el total de genes identificados, pero también se describe el desglose de genes adquiridos por cada uno de sus cromosomas (señalado con flecha roja).

Cepa		Núm. De genes identificados
1	<i>Metarhizium brunneum</i> 4556	94
2	<i>Metarhizium brunneum</i> ARSEF 3297	32
3	<i>Metarhizium anisopliae</i> E6	2
4	<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF 549	3
5	<i>Metarhizium anisopliae</i> BRIP 53293	4
6	<i>Metarhizium anisopliae</i> BRIP 53284	2
7	<i>Metarhizium rileyi</i> Cep018-CH2	8
8	<i>Metarhizium rileyi</i> RCEF 4871	33
9	<i>Metarhizium robertsii</i> ARSEF 23	9
10	<i>Metarhizium robertsii</i> ARSEF 2575	7
11	<i>Metarhizium album</i> ARSEF 1941	3
12	<i>Metarhizium majus</i> ARSEF 297	61
13	<i>Metarhizium guizhouense</i> ARSEF 977	15
14	<i>Metarhizium acridum</i> CQMa 102	6

<i>Metarhizium brunneum</i> 4556	Núm. De genes identificados
Cromosoma 1	11
Cromosoma 2	27
Cromosoma 3	18
Cromosoma 4	14
Cromosoma 5	7
Cromosoma 6	13
Cromosoma 7	4

Figura 5. Número de genes que cumplieron con los parámetros para su identificación como de origen bacteriano en los genomas del hongo del género *Metarhizium*.

#### Análisis de Ontología de genes

Una vez identificados los genes de origen bacteriano en los distintos genomas del hongo del género *Metarhizium* se procedió a realizar un análisis de ontología para conocer la posible función de estos genes en el hongo. Este análisis fue por medio de la herramienta bioinformática Hmmer2go la cual es una aplicación de línea de comandos que permite mapear las secuencias de DNA, típicamente a transcritos para Gene Ontology basado en la similitud de las secuencias de consulta con modelos HMM curados para familias de proteínas representadas en Pfam.

Este análisis se realizó con cada uno de los genomas disponibles del hongo del género *Metarhizium* y los resultados se agruparon en 3 categorías: Componente celular, Función molecular y Proceso biológico. En las Figuras 6 y 7 se observan los gráficos correspondientes a cada uno de los genomas analizados.



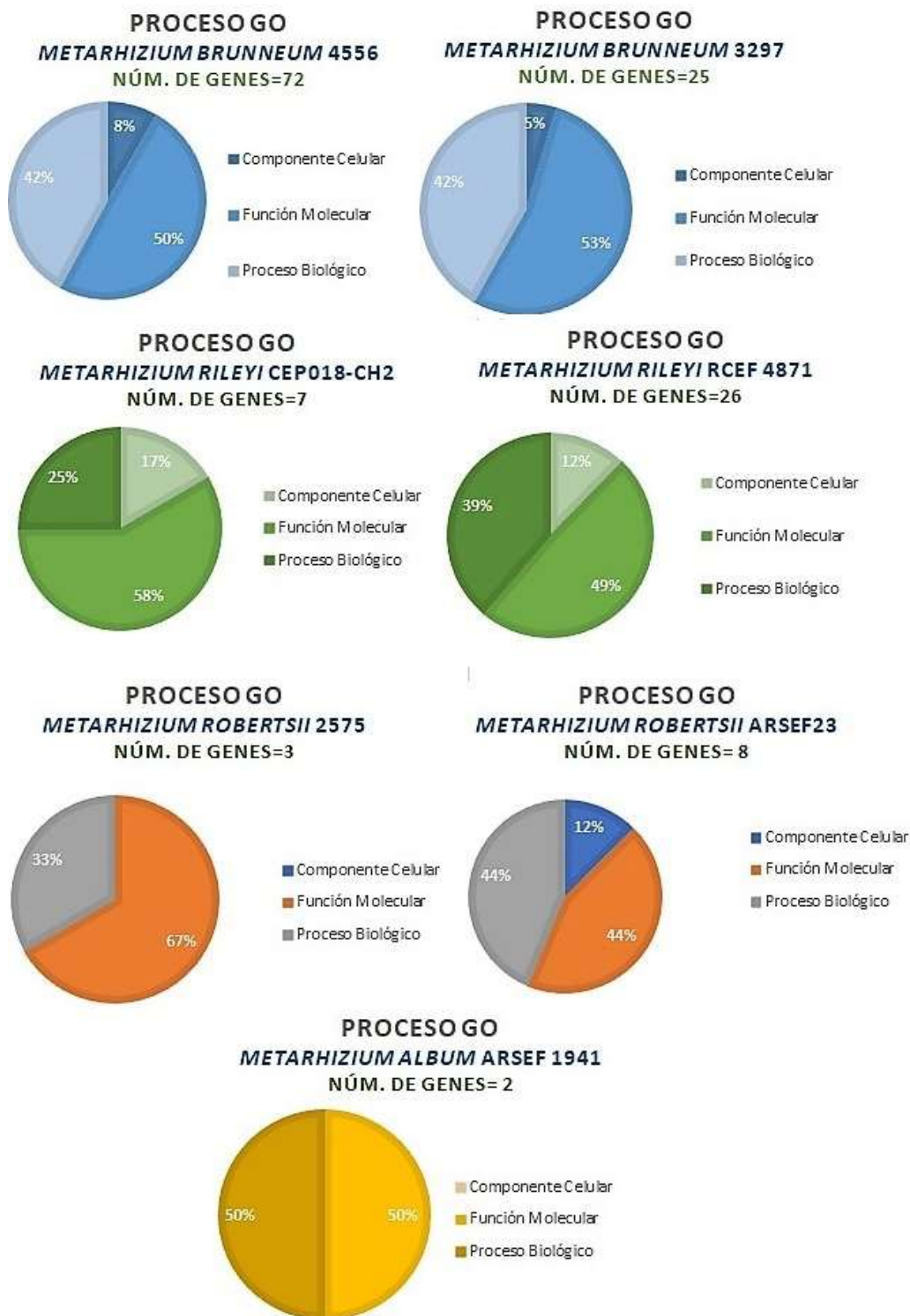


Figura 6. Análisis de ontología de genes de origen bacteriano, encontrados en cada uno de los genomas de los hongos del género *Metarhizium*

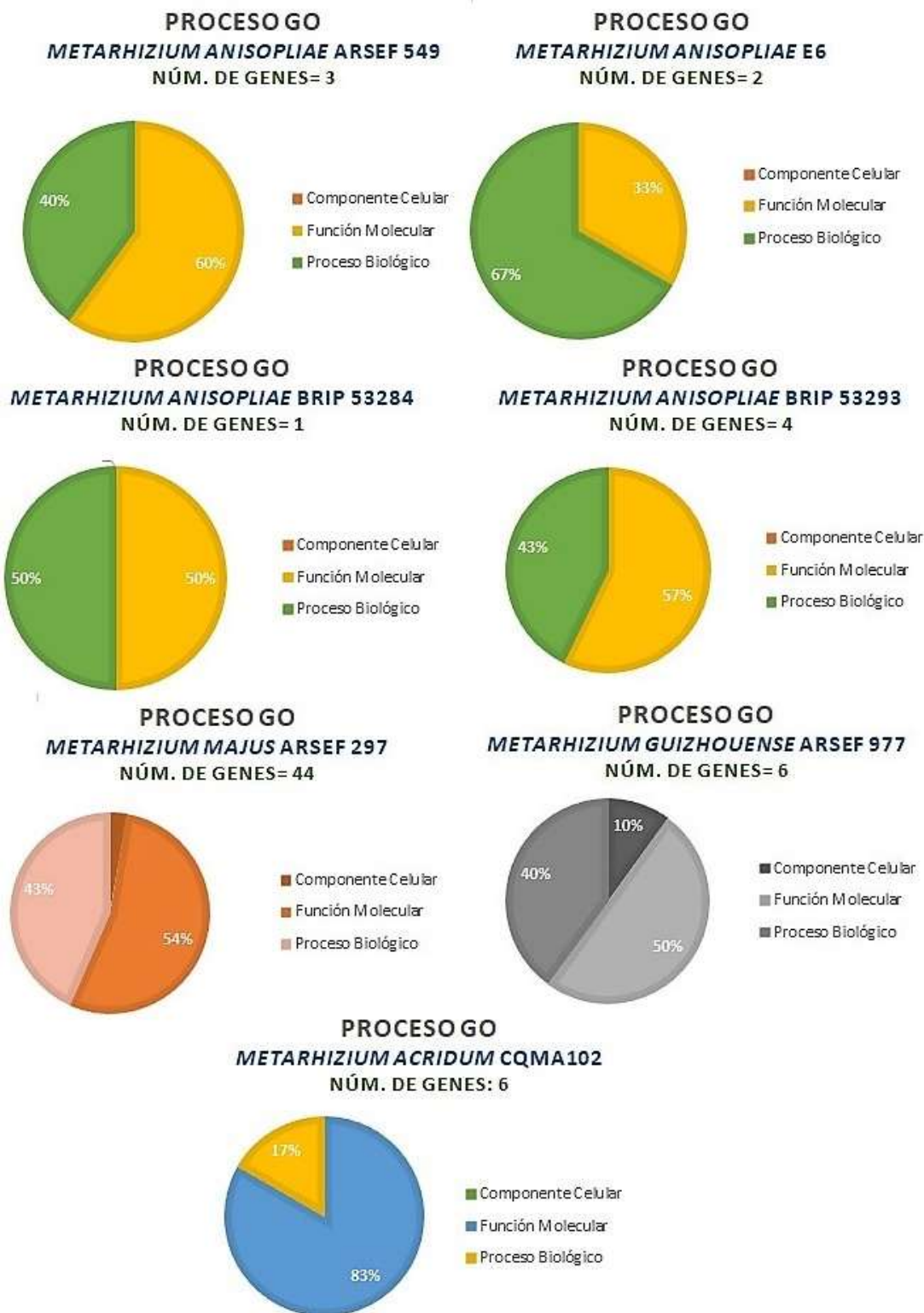


Figura 7. Continuación de los resultados obtenidos del Análisis de ontología de genes de origen bacteriano, encontrados en cada uno de los genomas de los hongos del género *Metarhizium*



## CONCLUSIONES

- Se propuso una metodología eficiente y de fácil acceso para la identificación de genes de transferencia Horizontal a través de diversas herramientas bioinformáticas.
- Se logró el análisis de los 14 genomas disponibles de los hongos del género *Metarhizium* a través de las distintas herramientas bioinformáticas.
- Se identificaron los genes de origen bacteriano de cada uno de los genomas disponibles de los hongos del género *Metarhizium* y se llevó a cabo la identificación de las bacterias donadoras de estos genes.
- De los genes de origen bacteriano se identificaron aquellos que presentaban homología entre los genomas analizados de las distintas especies de *Metarhizium*.
- Determinamos las posibles funciones biológicas de los genes identificados de origen bacteriano a través de diversas herramientas bioinformáticas, entre las que se destacaron las Funciones Moleculares y los Procesos biológicos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Barelli, L., A. S. Waller, S. W. Behie and M. J. Bidochka (2020). "Plant microbiome analysis after *Metarhizium* amendment reveals increases in abundance of plant growth-promoting organisms and maintenance of disease-suppressive soil." *PloS one* 15(4): e0231150.
2. Begon, M., C. R. Townsend and J. L. Harper (2006). *Ecology: from individuals to ecosystems*.
3. Behie, S., P. Zelisko and M. Bidochka (2012). "Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants." *Science* 336(6088): 1576-1577.
4. Brunner-Mendoza, C., M. d. R. Reyes-Montes, S. Moonjely, M. J. Bidochka and C. Toriello (2019). "A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico." *Biocontrol science and technology* 29(1): 83-102.
5. Deveau, A., G. Bonito, J. Uehling, M. Paoletti, M. Becker, S. Bindschedler, S. Hacquard, V. Hervé, J. Labbé and O. A. Lastovetsky (2018). "Bacterial–fungal interactions: ecology, mechanisms and challenges." *FEMS microbiology reviews* 42(3): 335-352.
6. Frey-Klett, P., P. Burlinson, A. Deveau, M. Barret, M. Tarkka and A. Sarniguet (2011). "Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists." *Microbiology and molecular biology reviews* 75(4): 583-609.
7. Gao, Q., K. Jin, S.-H. Ying, Y. Zhang, G. Xiao, Y. Shang, Z. Duan, X. Hu, X.-Q. Xie and G. Zhou (2011). "Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*." *PLoS genetics* 7(1): e1001264.
8. Hu, X., G. Xiao, P. Zheng, Y. Shang, Y. Su, X. Zhang, X. Liu, S. Zhan, R. J. S. Leger and C. Wang (2014). "Trajectory and genomic determinants of fungal-pathogen speciation and host adaptation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(47): 16796-16801.
9. Husnik, F. and J. P. McCutcheon (2018). "Functional horizontal gene transfer from bacteria to eukaryotes." *Nature Reviews Microbiology* 16(2): 67-79.
10. JIMÉNEZ, M. A. (2015). "Diseño de una formulación microencapsulada a base de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control del gusano del fruto de tomate *Heliothis virescens* (fabricius)."
11. Liao, X., B. Lovett, W. Fang and R. J. St Leger (2017). "*Metarhizium robertsii* produces indole-3-acetic acid, which promotes root growth in *Arabidopsis* and enhances virulence to insects." *Microbiology* 163(7): 980-991.
12. Marcet-Houben, M. and T. Gabaldón (2010). "Acquisition of prokaryotic genes by fungal genomes." *Trends in Genetics* 26(1): 5-8.
13. Matriano, D. M., R. A. Alegado and C. Conaco (2021). "Detection of horizontal gene transfer in the genome of the choanoflagellate *Salpingoeca rosetta*." *Scientific reports* 11(1): 1-11.
14. Ment, D., S. Raman, S. Gal, D. Ezra and E. Palevsky (2020). "Interactions of *Metarhizium brunneum*-7 with Phytophagous Mites Following Different Application Strategies." *Insects* 11(6): 330.

15. Møller, J., M. Miller and A. Kjølner (1999). "Fungal–bacterial interaction on beech leaves: influence on decomposition and dissolved organic carbon quality." Soil Biology and Biochemistry 31(3): 367-374.
16. Mudrončeková, S., M. Mazáň, M. Nemčovič and I. Šalamon (2021). "Entomopathogenic fungus species *Beauveria bassiana* (Bals.) and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) used as mycoinsecticide effective in biological control of *Ips typographus* (L.)." Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences 2021: 2469-2472.
17. Mukherjee, K. and A. Vilcinskas (2018). "The entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* communicates with the insect host *Galleria mellonella* during infection." Virulence 9(1): 402-413.
18. Naranjo-Ortiz, M. A. and T. Gabaldón (2020). "Fungal evolution: cellular, genomic and metabolic complexity." Biological Reviews 95(5): 1198-1232.
19. Olsson, S., P. Bonfante and T. E. Pawlowska (2017). "Ecology and evolution of fungal-bacterial interactions."
20. Parra-Tabla, V. (2015). "Ecología y evolución de las interacciones bióticas del Val E. & Boege K. 2012." Revista de Biología Tropical 63(1): 313-317.
21. Pattemore, J. A., J. K. Hane, A. H. Williams, B. A. Wilson, B. J. Stodart and G. J. Ash (2014). "The genome sequence of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* and comparative genomics of *Metarhizium* species." BMC genomics 15(1): 1-15.
22. Sasan, R. K. and M. J. Bidochka (2012). "The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development." American journal of botany 99(1): 101-107.
23. Schmitt, I. and H. T. Lumbsch (2009). "Ancient horizontal gene transfer from bacteria enhances biosynthetic capabilities of fungi." PLoS one 4(2): e4437.
24. St. Leger, R. J. and J. B. Wang (2020). "*Metarhizium*: jack of all trades, master of many." Open Biology 10(12): 200307.
25. Tarkka, M. T., A. Sarniguet and P. Frey-Klett (2009). "Inter-kingdom encounters: recent advances in molecular bacterium–fungus interactions." Current genetics 55(3): 233-243.
26. Wakil, W., M. U. Ghazanfar, T. Riasat, M. A. Qayyum, S. Ahmed and M. Yasin (2013). "Effects of interactions among *Metarhizium anisopliae*, *Bacillus thuringiensis* and chlorantraniliprole on the mortality and pupation of six geographically distinct *Helicoverpa armigera* field populations." Phytoparasitica 41(2): 221-234.
27. Wraight, S. and M. Ramos (2005). "Synergistic interaction between *Beauveria bassiana*-and *Bacillus thuringiensis tenebrionis*-based biopesticides applied against field populations of Colorado potato beetle larvae." Journal of Invertebrate Pathology 90(3): 139-150.
28. Yaroslavtseva, O. N., I. M. Dubovskiy, V. P. Khodyrev, B. A. Duisembekov, V. Y. Kryukov and V. V. Glupov (2017). "Immunological mechanisms of synergy between fungus *Metarhizium robertsii* and bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* on Colorado potato beetle larvae." Journal of insect physiology 96: 14-20.
29. Zhang, Q., X. Chen, C. Xu, H. Zhao, X. Zhang, G. Zeng, Y. Qian, R. Liu, N. Guo and W. Mi (2019). "Horizontal gene transfer allowed the emergence of broad host range entomopathogens." Proceedings of the National Academy of Sciences 116(16): 7982-7989.

## COMPLEJOS DE COORDINACIÓN MONONUCLEARES DE EUROPIO Y ÁCIDOS CARBOXÍLICOS

Roberto García Rosales<sup>1</sup>, Rosario Ruiz Guerrero<sup>1</sup>, Aristeo Garrido Hernandez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación e Innovación Tecnológica del instituto politécnico nacional, dirección Cerrada de Cecati s/n, Santa Catarina, Azcapotzalco, 02250 Azcapotzalco, CDMX

<sup>2</sup>Universidad Tecnológica de Tecámac, dirección Carretera Federal México – Pachuca, Km. 37.5, Predio Sierra Hermosa, C.P. 55740, Tecámac, Estado de México.

[rgarcia1903@alumno.ipn.mx](mailto:rgarcia1903@alumno.ipn.mx)

### RESUMEN

En este trabajo se presenta la síntesis de 2 nuevos complejos de coordinación órgano-metálicos, a partir de núcleos de europio y ácido benzoico como ligando. En una primera etapa se forma el primer complejo, producto de uniones bidentadas entre los ligandos orgánicos y los iones de europio, posteriormente en la segunda etapa se forma el complejo 2 como resultado de la saturación de la esfera de coordinación con enlaces monodentados de ácido benzoico que desplazan a las moléculas agua coordinada del complejo 1, esto mediante una ruta de síntesis a condiciones ambientales de presión (1 atmósfera) y temperatura (~25°C) en medio acuoso. Las caracterizaciones por fluorescencia de los complejos permitieron la identificación del estado triplete, demostrando que la luminiscencia de los complejos es sensibilizada por los ligandos.

### INTRODUCCIÓN

Los iones lantánidos (Ln) son de gran interés tecnológico en el campo de la óptica, sistemas optoelectrónicos, biológicos, entre otras, debido a que presentan bandas de emisión estrechas e intensas y emisiones en colores altamente puros, sin embargo, estos materiales exhiben coeficientes de absorción bajos debido a las transiciones f-f prohibidas por Laporte[1], por lo cual, algunos trabajos mencionan que estos iones requieren el uso sensibilizadores energéticos que promuevan sus propiedades ópticas[2].

El uso de moléculas orgánicas como agentes acomplejantes, también llamadas ligandos, son comúnmente utilizados para generar complejos de coordinación con algunos metales como los elementos de transición y los lantánidos [3], [4], estos agentes acomplejantes son capaces de generar un fenómeno denominado “efecto antena”, el cual es capaz de concentrar la energía hacia los núcleos lantánidos. Este fenómeno se define como un proceso de conversión de luz a través del cual se genera una secuencia de absorción-transferencia-emisión de energía, donde el ligando funciona como un colector de luz y el ion lantánido como un emisor energía en forma de fotones [5].

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Reactivos

Se utilizó ácido benzoico (99%), hidróxido de sodio (99,9%) y cloruro de europio (III) (99%) dichos reactivos fueron suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, EE. UU.), se utilizó agua desionizada como disolvente.

Síntesis del complejo precursor,  $[\text{Eu}(\text{OOC}\text{C}_6\text{H}_5)_3 \cdot (\text{H}_2\text{O})_3]$ .

Se disolvió de ácido benzoico (0.1 mol.L<sup>-1</sup>) en una disolución acuosa de hidróxido de sodio (1 mol.L<sup>-1</sup>) esto con el fin de conseguir una desprotonación del ácido, de manera simultánea se disolvió en agua desionizada cloruro de europio hexahidratado (0.1 mol.L<sup>-1</sup>), una vez que ambas disoluciones estuvieron completamente homogéneas se prosiguió a adicionar en forma de goteo la disolución de cloruro de europio a la de ácido benzoico a una velocidad de adición de 1mL por minuto, pasando el tiempo de goteo la reacción se dejó reposar por 8 horas a condiciones ambientales manteniendo una agitación continua, una vez transcurrido el tiempo de envejecimiento se retiró la reacción de la agitación y se prosiguió a realizar una serie de lavado de los polvos obtenidos utilizando papel filtro y agua desionizada para eliminar el acceso de impurezas solubles, finalmente se dejó secar el producto obtenido a condiciones ambientales por 24hrs.

### Síntesis del complejo $[\text{Eu}(\text{OOC}\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{-(HOOC}\text{C}_6\text{H}_5)_2]$

Se preparó una suspensión del complejo,  $[\text{Eu}(\text{OOC}\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{-(H}_2\text{O)}_3]$  en agua desionizada (1 mol. L-1), y de manera paralela, se preparó una disolución de ácido benzoico (1 mol. L-1), cumpliendo una relación estequiometría 1:2 de complejo,  $[\text{Eu}(\text{OOC}\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{-(H}_2\text{O)}_3]$  y ácido benzoico respectivamente. Posteriormente se mezcló el contenido de ambos matraces en forma de goteo a una velocidad de 1 mL por minuto y se dejó en agitación por un periodo de 8 horas, pasado este tiempo se prosiguió al lavado de los polvos con ayuda de papel filtro y agua destilada para finalmente dejar secar por 24hrs. En condiciones ambientales.

## RESULTADOS

### FT-IR

Los espectrofotogramas muestran un desplazamiento de las frecuencias de enlace carbonilo ( $\text{COO}^-$ ) para el ácido benzoico y ambos complejos, para el caso de los complejos se aprecian las bandas de estiramiento del enlace  $\text{COO-Eu}$  para los complejos  $[\text{Eu}(\text{OOC}\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{-(H}_2\text{O)}_3]$  (simetría =  $1429\text{ cm}^{-1}$  y asimetría =  $1538\text{ cm}^{-1}$ ) y  $[\text{Eu}(\text{OOC}\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{-(HOOC}\text{C}_6\text{H}_5)_2]$  (simetría =  $1406\text{ cm}^{-1}$  y asimetría =  $1525\text{ cm}^{-1}$ ).

Así mismo se puede apreciar el espectro de Infrarrojo información sobre el agua coordinada. Para el caso del complejo  $[\text{Eu}(\text{OOC}\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{-(H}_2\text{O)}_3]$  se muestra una banda de tensión correspondiente al enlace  $\text{HO-H}$  a  $3420\text{ cm}^{-1}$ . Mientras que para el complejo  $[\text{Eu}(\text{OOC}\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{-(HOOC}\text{C}_6\text{H}_5)_2]$ , la banda correspondiente al grupo  $\text{HO-H}$  ya no está presente, lo que confirma su ausencia en la esfera de coordinación.

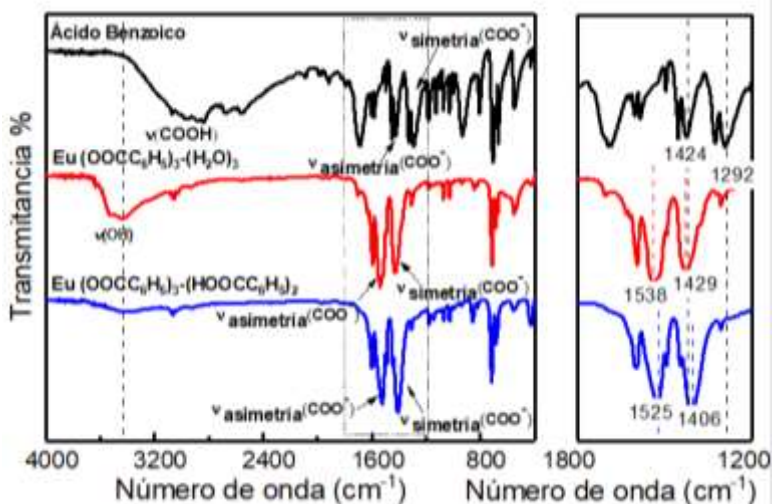


Fig. 1 Espectroscopia de FTIR del ácido benzoico,  $[\text{Eu}(\text{OOC}\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{-(H}_2\text{O)}_3]$  y  $[\text{Eu}(\text{OOC}\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{-(HOOC}\text{C}_6\text{H}_5)_2]$

### LUMINISCENCIA EXITACIÓN

En la figura 2 se muestran los espectros de excitación para ambos complejos ( $[\text{Eu}(\text{OOC}\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{-(H}_2\text{O)}_3]$  y  $[\text{Eu}(\text{OOC}\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{-(HOOC}\text{C}_6\text{H}_5)_2]$ ), ambas mediciones se realizaron para una longitud de onda de emisión de 616 nm, el complejo  $[\text{Eu}(\text{OOC}\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{-(H}_2\text{O)}_3]$  muestra una banda ancha a 290 nm correspondiente a la transición  $\text{S}_0\text{-S}_1$ , mientras que para el complejo  $[\text{Eu}(\text{OOC}\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{-(HOOC}\text{C}_6\text{H}_5)_2]$  dicha banda se encuentra centrada en 288 nm, del lado derecho, se observan las excitaciones correspondientes a las bandas de absorción que se originaron desde el estado fundamental  ${}^7\text{F}_0$  al nivel excitado  ${}^5\text{L}_7$  centrado en 393 nm, correspondientes al europio.

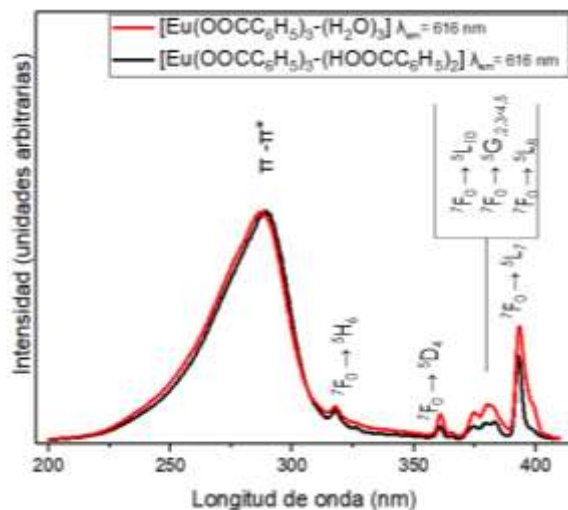


Fig. 2 Espectros de excitación de los complejos,  $[\text{Eu}(\text{OOCC}_6\text{H}_5)_3-(\text{H}_2\text{O})_3]$  y  $[\text{Eu}(\text{OOCC}_6\text{H}_5)_3-(\text{HOCC}_6\text{H}_5)_2]$

### Emisión

la intensidad de la transición  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$  del dipolo magnético (centrada en 592 nm) es independiente del entorno de  $\text{Eu}^{3+}$ , mientras que la intensidad de  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$ , correspondiente a la transición del dipolo eléctrico centrada a 616 nm, es muy sensible a la simetría del sitio

El complejo 2 presenta mayor intensidad en la emisión, por el hecho de presentar un mayor número de ligandos, lo cual permite una mayor transferencia de energía al núcleo activo de europio, otro factor que promueve este aumento en la intensidad lumínica, es la ausencia de moléculas de agua coordinadas al núcleo, las cuales actúan como especies sustractoras de energía, ya que el nivel de emisión disminuye fuertemente al acoplarse con los niveles vibratorios excitados del oscilador OH de las moléculas de agua coordinadas

En ambos complejos, el área bajo la curva se calculó usando la integración para la transición  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$ . Se determinó que el complejo  $[\text{Eu}(\text{OOCC}_6\text{H}_5)_3-(\text{HOCC}_6\text{H}_5)_2]$  presenta un 15% más de emisión de energía que el complejo  $[\text{Eu}(\text{OOCC}_6\text{H}_5)_3-(\text{H}_2\text{O})_3]$ .

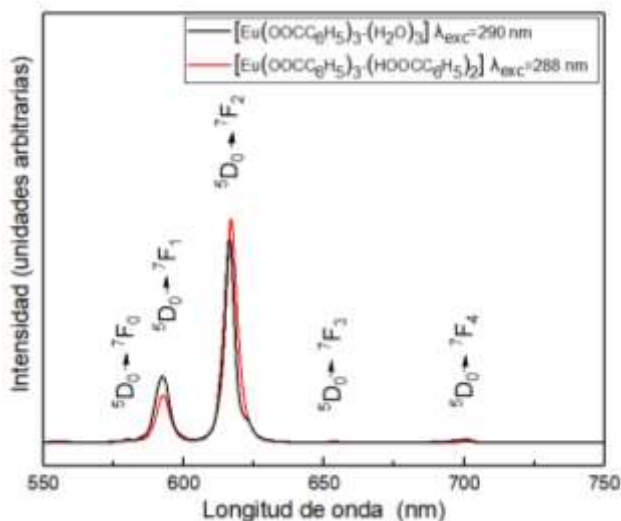


Fig. 3 Espectros de emisión de los complejos,  $[\text{Eu}(\text{OOCC}_6\text{H}_5)_3-(\text{H}_2\text{O})_3]$  y  $[\text{Eu}(\text{OOCC}_6\text{H}_5)_3-(\text{HOCC}_6\text{H}_5)_2]$

## CONCLUSIONES

Se lograron sintetizar 2 mononucleares, uno con agua coordinada y otro libre de disolventes coordinados a partir de núcleos de europio y ácido benzoico como ligando, Los análisis de luminiscencia de ambos compuestos evidencian la mejora en las propiedades luminiscentes en el compuesto sin disolvente en la esfera de coordinación. El complejo de formula  $[\text{Eu}(\text{OOC}\text{C}_6\text{H}_5)_3(\text{HOOC}\text{C}_6\text{H}_5)_2]$  presenta mayor emisión (15 %) para las transiciones  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$  y  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$ , En ambos complejos la emisión se ve favorecida por la asimetría del ion Europio, al observarse una mayor emisión en las transiciones  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$  (correspondiente a la transición del dipolo eléctrico), respecto a las  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$  Y  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_4$

## BIBLIOGRAFÍA

1. K. Binnemans, "Interpretation of europium(III) spectra," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 295, pp. 1–45, 2015, doi: 10.1016/j.ccr.2015.02.015.
2. LITTELL WC and JR, "Use of Metal Masks To Improve Printing of Thick Film Geometrics," vol. 123, pp. 227–232, 1968, doi: 10.1016/0026-2714(69)90347-3.
3. E. S. Andreiadis, N. Gauthier, D. Imbert, R. Demadrille, J. Pécaut, and M. Mazzanti, "Lanthanide complexes based on  $\beta$ -diketonates and a tetradentate chromophore highly luminescent as powders and in polymers," *Inorg. Chem.*, vol. 52, no. 24, pp. 14382–14390, 2013, doi: 10.1021/ic402523v.
4. J. P. Byrne, J. A. Kitchen, J. E. O'Brien, R. D. Peacock, and T. Gunnlaugsson, "Lanthanide directed self-assembly of highly luminescent supramolecular 'peptide' bundles from  $\alpha$ -amino acid functionalized 2,6-bis(1,2,3-triazol-4-yl)pyridine (btp) ligands," *Inorg. Chem.*, vol. 54, no. 4, pp. 1426–1439, 2015, doi: 10.1021/ic502384w.
5. Y. H. Pham, V. A. Trush, V. M. Amirkhanov, and P. Gawryszewska, "Structural and spectroscopic study of the europium complex with N-(diphenylphosphoryl)pyrazine-2-carboxamide," *Opt. Mater. (Amst)*, vol. 74, pp. 197–200, 2017, doi: 10.1016/j.optmat.2017.04.031.

## CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE 6 AISLADOS FUNGICOS CON POTENCIAL DE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO

Martha Lizeth Pérez Méndez, Luis Mauricio Salazar García, Lérica Liss Flores Villavicencio, Alberto Flores Martínez, Patricia Ponce Noyola y Julio César Villagómez Castro<sup>1</sup>

Departamento de Biología, DCNE, Universidad de Guanajuato  
castroj2407@hotmail.com

### RESUMEN

La acumulación de residuos de polímeros naturales y/o sintéticos en el ambiente se ha incrementado en los últimos años ocasionando daños al ecosistema y a la salud humana. Se han planteado varias estrategias para reducir su impacto y, en lo posible, reciclarlos. Sin embargo, los métodos de reciclado químicos y físicos no resuelven esta problemática, por lo que recientemente se han dirigido los esfuerzos hacia su aprovechamiento utilizando microorganismos. En los últimos años se ha descrito el aislamiento de bacterias y hongos capaces de degradar el polietileno-tereftalato (PET), un plástico altamente resistente a la biodegradación. En el laboratorio contamos con 6 aislados fúngicos provenientes de un consorcio de microorganismos capaces de crecer en una suspensión acuosa de PET pulverizado. Dos de los aislados fueron caracterizados con base a su morfología conidial y colonial, así como por su desarrollo en diferentes medios de cultivo como hongos pertenecientes a los géneros *Penicillium*, *Trichoderma* o *Talaromyces*, sin determinar específicamente su género o especie. Por este motivo nos propusimos realizar la caracterización taxonómica molecular de los 6 aislados fúngicos del consorcio, incluyendo los dos previamente semi caracterizados y determinar, al mismo tiempo, su capacidad hidrolítica sobre PET y diferentes sustratos poliméricos derivados de celulosa. Los hongos se cultivaron sobre celofán en medio YPG agar y al alcanzar el crecimiento colonial un diámetro correspondiente al 70 % del diámetro de la caja Petri. Se recuperó el micelio, se congeló con nitrógeno líquido y se homogenizó en un mortero para posteriormente extraer el ADN por el método de fenol-cloroformo. El ADN se sometió a electroforesis en gel de agarosa para determinar su integridad y se utilizó como templado de amplificación con los cebadores ITS 1-4, NS 1-4 y NS 5-8. Al término de la reacción de polimerización (PCR) el ADN recuperado se sometió a electroforesis para corroborar el tamaño de los amplicones, los cuales se purificaron en columnas de afinidad. Los amplicones purificados se enviaron a secuenciar y una vez obtenidas las secuencias se realizó el análisis bioinformático, utilizando la herramienta BLAST, para comparar las secuencias obtenidas con las reportadas en el NCBI. El resultado del análisis bioinformático confirmó que 3 cepas pertenecen al género *Penicillium* (aislados 3, 6 y 7); 2 cepas al género *Verticillium* (aislados 2 y 8) y una al género *Talaromyces* (aislado 4), de la cual se confirmó la especie utilizando el cebador para  $\beta$  tubulina 2a. Todos los aislados presentaron actividad de  $\beta$ -glucosidasa, mayoritariamente el aislado 4 y, actividad de celobiohidrolasas solamente los aislados 4 y 3. No se logró determinar cuantitativamente la actividad de esterasa observada en los aislados del género *Penicillium* y *Talaromyces* a las 5 semanas de cultivo sécil. Con estos resultados concluimos que los aislados fúngicos recuperados del consorcio inicial, y ahora caracterizados taxonómicamente, presentan capacidad hidrolítica sobre derivados celulósicos, requiriéndose un análisis bioquímico en un plazo mayor de tiempo para determinar su actividad de esterasa/petasa y su posible potencial biotecnológico.

### INTRODUCCION

La elevada producción de los polímeros sintéticos, utilizados con un sinnúmero de propósitos, desde almacenamiento de comida y medicamentos, hasta su implementación en artículos electrónicos; aunada a su gran durabilidad y un inadecuado destino final, ha ocasionado grandes problemas ambientales. Entre ellos, la pérdida de especies por su ingesta, la propagación de especies invasoras y la pérdida de ecosistemas [1]. Actualmente existen alternativas para evitar que estos polímeros lleguen a los ecosistemas: reciclado físico y químico, empaquetamiento para relleno sanitario, incineración y, recientemente, protocolos de biodegradación. Desafortunadamente, algunas de estas alternativas también ocasionan daños al ambiente, ya sea por la producción de gases nocivos o por la formación de micropartículas que contaminan tierra, aire y/o agua. Si bien, los polímeros naturales como la celulosa y la lignina son degradados en el ambiente por los microorganismos presentes,



esta degradación es relativamente lenta, de tal forma que se han implementado protocolos biotecnológicos que permiten acelerar este proceso y recuperar productos intermediarios o sus monómeros para utilizarlos en otras aplicaciones industriales. El éxito en algunos procesos de biorremediación, para evitar la acumulación de polímeros naturales, aprovechando microorganismos, hongos y bacterias principalmente, ha conducido a la búsqueda de protocolos que se puedan aplicar para la degradación de polímeros sintéticos, entre ellos el polietilen-tereftalato o PET [2]. El PET puede ser degradado por algunos hongos y bacterias que secretan hidrolasas como la petasa (enzima específica) [3], o esterases y cutinasas (enzimas inespecíficas) [4]. Por otro lado, para la degradación de polímeros naturales de celulosa o sus derivados se han descrito una gran cantidad de enzimas celulolíticas (celulasas, celobiohidrolasas, glicosidasas, lacasas, etc.) de diversos orígenes [5].

En el laboratorio de Biología Celular de Hongos y Protozoarios (K-102) del departamento de Biología en la DCNE de la Universidad de Guanajuato, se cuenta con un consorcio de microorganismos capaces de desarrollarse en una suspensión acuosa de PET pulverizado. Al cultivar el consorcio en diferentes medios de cultivo, se lograron aislar 6 cepas fúngicas diferentes con base a sus características de crecimiento colonial. Dos de los aislados fúngicos, capaces de crecer en medio mínimo adicionado de PET o PET-S (PET funcionalizado con sorbitol), se caracterizaron morfológicamente (morfología colonial y conidial) como hongos de los géneros: *Penicillium* y *Talaromyces* [6]. Sin embargo, no se determinó la especie a la que pertenecían. Adicionalmente, se determinó si los aislados podrían utilizar otros polímeros, como la celulosa o sus derivados [7] y se purificó parcialmente, una proteína secretada por uno de los aislados, que resultó ser una  $\beta$ -glucosidasa inducida por sustrato (celofán adicionado como fuente de carbono en el medio mínimo de Mathur) [8]. En este trabajo se describe la caracterización molecular de los seis aislados fúngicos, así como su perfil de actividad hidrolítica sobre polímeros naturales y sintéticos, utilizando sustratos fluorogénicos (derivados de 4-metilumbeliferona, 4-MU-) y colorimétricos (derivados de *p*-nitrofenol, pNP-).

## HIPÓTESIS

Alguno de los aislados fúngicos recuperados en el laboratorio a partir de un consorcio microbiano, pueden utilizar polímeros sintéticos o naturales, como fuente de carbono, aprovechando sus enzimas secretadas (PETasas, cutinasas, esterases, glucanasas, celobiohidrolasas o glicosidasas).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Mantenimiento de los aislados fúngicos. El mantenimiento de las cepas fúngicas se realizó en medio de extracto de levadura-peptona-dextrosa (YPD) líquido o agar-YPD, pH 4.5 e incubadas a 28°C. Para su mantenimiento se sembraron periódicamente en el mismo medio utilizando bocados de 4 mm de diámetro [6].

Caracterización morfológica macro y microscópica de los aislados fúngicos. La morfología colonial se analizó utilizando cultivos en medio Papa-Dextrosa (PDA), medio extracto de malta, medio Sabouraud y medio YPD; todos ellos a pH 4.5. Las cepas fúngicas se sembraron por bocado central y se incubaron a 28°C durante 6 días. Para el análisis microscópico se realizaron microcultivos de todas las cepas, los cuales se observaron bajo microscopio después de teñirlos con azul de algodón. El resultado obtenido se comparó con reportes en la literatura [7, 9].

Perfil enzimático de los aislados fúngicos. Para el análisis de la actividad hidrolítica y cinética de secreción de los aislados, las cepas se incubaron en medio mínimo de Mathur, pH 4.5, utilizando cloruro de amonio como fuente de nitrógeno, 0.1 % (p/v) de glucosa, para inducir el crecimiento fúngico y, diferentes sustratos al 2 % (p/v) como fuente de carbono: PET, PET-S, celofán, carboximetilcelulosa, celulosa cristalina (Avicel) o glucosa (control). Los cultivos se incubaron a 28 °C durante 2 semanas. Al término del periodo de incubación, los cultivos se centrifugaron a 3000 x g y, en el sobrenadante se determinó la proteína secretada y la actividad enzimática utilizando amortiguador a pH 5 y, como sustrato, diversos derivados sintéticos acoplados a 4-MU ó *p*-NP [10] tales como 4-MU-glucósido (5  $\mu$ M), 4-MU-celobiósido (10  $\mu$ M), 4-MU-xilósido (10  $\mu$ M), 4-MU-acetato (0.1  $\mu$ M), pNP-glucósido, pNP-celobiósido, pNP-xilósido (todos ellos 50  $\mu$ M) y pNP-acetato (1  $\mu$ M), conforme a técnicas estándar [8].



Caracterización molecular de los aislados fúngicos. Para la caracterización molecular los aislados fúngicos se cultivaron en medio YPD sobre celofán para recuperar el micelio y realizar la extracción de ADN por el método fenol-cloroformo. El ADN recuperado se utilizó como templado para la reacción de PCR utilizando como cebadores las secuencias de los oligonucleótidos ITS 1-4, NS 1-4, NS 5-8 y RPB2-5F-RPB2-7cR (para la cepa 4 exclusivamente). Las condiciones de la reacción de síntesis por la polimerasa (PCR) fueron: 3 minutos a 94°C, 45 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, 1 minuto a 72 °C durante 35 ciclos y finalmente durante 5 minutos a 72°C. Al término de la PCR se analizaron los productos de la amplificación en geles de agarosa, se cortaron las bandas correspondientes y se purificó el ADN con el uso de una columna de afinidad de la marca DNeasy. Una vez purificado el ADN se mandó a secuenciar. Una vez obtenidas las secuencias de los amplicones enviados, se procedió a realizar una búsqueda bioinformática mediante el programa blast para reconocer la identidad de las cepas fúngicas de interés, Adicionalmente, los resultados bioinformáticos se compararon con los resultados obtenidos por la caracterización micro y macroscópica de las cepas [9, 10] para determinar el género y especie de los diferentes aislados.

## RESULTADOS

Caracterización morfológica macroscópica de los aislados fúngicos. Los 6 aislados analizados son hongos filamentosos. Dos de las cepas presentan colonias terrosas de elevación plana y formación de pseudohifas, mientras que las cuatro restantes presentan colonias algodonosas e hifas hialinas septadas con conidioforos compuestos. En la Figura 1 se muestra la morfología colonial de los 6 aislados en medio YPG pH 4.5.

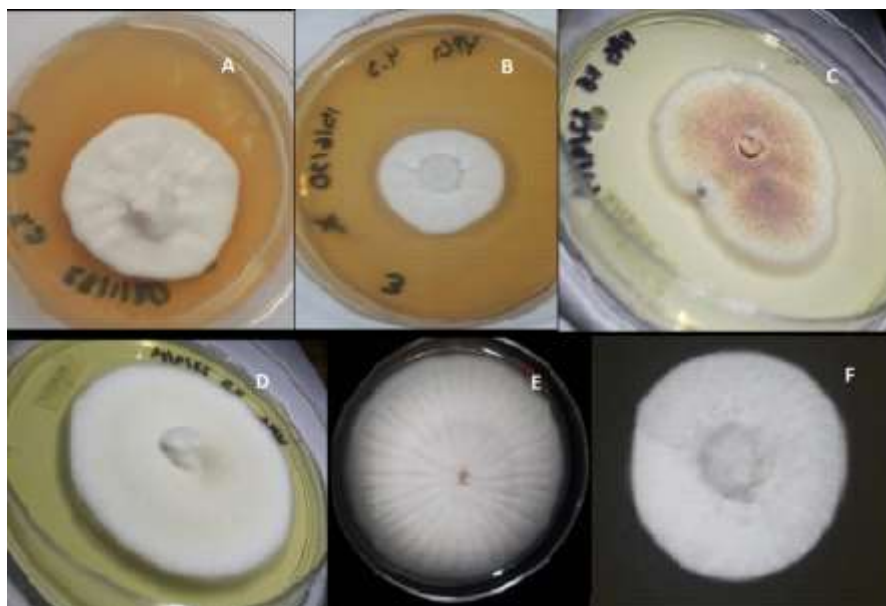


Figura 1. Morfología colonial de los aislados fúngicos crecidos en medio YPD pH 4.5 a 28°C por 6 días. En orden secuencial las letras corresponden a los aislados 2, 3, 4, 6, 7 y 8 respectivamente.

Al analizar la morfología presentada por los diferentes aislados en los diferentes medios de cultivo se observaron diferencias morfológicas que apoyaron para su clasificación morfológica colonial al compararla con los datos presentes en la literatura su diagnóstico [9, 10]. A continuación, se presenta la descripción de las características observada y utilizadas para su diagnóstico.

Morfología colonial del aislado 2. En medio YPD presenta colonia filamentososa redonda con bordes irregulares ondulados, elevación crateriforme de color blanco y textura algodonosa. Su reverso es de color amarillo y textura rugosa. En medio extracto de malta presenta colonia filiforme con borde ondulado y elevación convexa plana de color blanco. Su reverso es de color crema con borde de textura lisa y color opaco. En medio Sabouraud presenta una colonia redonda con bordes irregulares y ondulados, elevación crateriforme y color blanco. Su reverso es rugoso y de color naranja. En

medio PDA presenta colonia redonda con bordes irregulares y ondulados, elevación crateriforme y color blanco. El reverso es rugoso y de color naranja.

Morfología colonial del aislado 3. En medio YPD presenta colonia filamentosa, elevada, irregular, con borde ramoso, textura algodonosa y color blanco. Presenta esporas similares a pequeñas gotas transparentes. El reverso es de color amarillo oscuro, de textura rugosa y orilla más clara. En medio extracto de malta presenta una colonia de forma rizoide, blanca con borde ramoso, elevación umbonada y textura algodonosa lisa. Su reverso es de textura lisa con el centro oscuro. En medio Sabouraud presenta colonia filamentosa, circular, con borde suave (entero), elevación alta, color blanco y textura algodonosa. Su reverso es rugoso con borde más claro. En medio PDA presenta una colonia de forma irregular, con borde ramoso y elevación convexa; textura algodonosa y color blanco. Presenta esporas en forma de gotas grandes de color amarillo-anaranjado. En el reverso presenta textura algodonosa y color blanco.

Morfología colonial del aislado 4. En medio YPD presenta colonia filamentosa, filiforme, con borde ondulado y elevación plana; textura de velcro, color rosado y esporas blancas. El reverso es de color naranja, textura lisa y forma anillada con tonos naranja-rojizo. En medio extracto de malta presenta colonia filamentosa, filiforme, con borde filamentoso y elevación plana; color verde, borde de color gris tenue opaco y textura con apariencia de pelusa. En medio Sabouraud presenta colonia filamentosa, filiforme, con borde ondulado de color verde y elevación plana; color verde con esporas color rosa y textura de velcro. El reverso es anillado de tonos rojos a rosados y orilla blanca. En medio PDA presenta colonia filamentosa, filiforme, con borde ondulado y elevación plana; color verde con borde opaco incoloro. Su reverso presenta color rosado con borde verde y exterior blanco.

Morfología colonial del aislado 6. En medio YPD presenta colonia filamentosa, circular, con borde suave y elevación plana; textura afelpada, color crema y borde más claro. Se observa un círculo más oscuro antes de la orilla. En medio extracto de malta presenta colonia circular con borde filamentoso y elevación plana; color gris verdoso y textura de pelusa con un anillo verdoso circular. En medio Sabouraud presenta colonia circular con borde filamentoso y elevación plana, de color crema y aspecto afelpado con orilla blanca y después opaca. En medio PDA presenta colonia circular con borde filamentoso y elevación plana, color amarillo con centro verde y textura de velcro. Presenta tres anillos verdes de los cuales dos se encuentran cercanos al centro y uno antes del borde.

Morfología colonial del aislado 7. En medio YPD presenta colonia filamentosa, redonda, con borde suave y elevación plana; textura afelpada y rugosa, color blanco con esporas en forma de pelusa gris en el borde. Se observa un círculo más oscuro al centro del aislado. Su reverso es rugoso de color naranja oscuro casi café. En medio extracto de malta presenta colonia filiforme, con borde filamentoso y elevación plana; de color crema y textura de velcro. Reverso de textura lisa, color crema tenue y un tono café en el centro. En medio Sabouraud presenta colonia redonda con bordes irregulares, elevación plana, color blanco, aspecto algodonoso y pocas rugosidades. Reverso de un tono café anaranjado con tonos más tenues del centro hacia el borde, textura lisa. En medio PDA presenta colonia circular, con borde filamentoso, elevación plana, color verde y textura de velcro. Su reverso es de color amarillo con un anillo antes del borde.

Morfología colonial del aislado 8. En medio YPD presenta colonia filamentosa de forma ovalada, rugosa, con borde curvado y elevación plana; color perla. Reverso rugoso color café-naranja. En medio extracto de malta presenta colonia filamentosa de forma ovalada, bordes radiales y elevación plana; color blanco tenue a transparente opaco con textura terrosa. Su reverso es liso de color amarillento. En medio Sabouraud presenta colonia filamentosa, ovalada, rugosa con bodes ondulados y elevación plana; color perla y reverso amarillo. En medio PDA presenta colonia ovalada lisa con borde suave y elevación plana; color blanco y borde naranja. Su reverso es liso de color café anaranjado. Libera un pigmento naranja en el medio alrededor de la colonia.

Caracterización morfológica microscópica de los aislados fúngicos. Los 6 aislados se cultivaron con técnica de microcultivo en medio YPD pH 4.5 durante 5 días. Al término de la incubación a 28 °C, se recuperaron los hongos y se tiñeron con azul de algodón para determinar la morfología de sus conidios y crecimiento micelial. Como se observa en la Figura 2., los aislados 3, 6 y 7 presentan morfología micelial semejante, mientras que el resto de los aislados tienen características diferentes que a continuación se describen.

Característica microscópica del aislado 2. Presenta hifas hialinas, cenocíticas, con conidióforos rectos. Presentan formación tipo acrópeta, holotático. De forma cuadrada, tamaño de 1.3  $\mu\text{m}$ .

Característica microscópica del aislado 3. Presenta hifas generativas, con talo septado hialino, conidióforos simples y presenta blastoconidios con conidios enteroblastico y filioconidios con formación basípeta. Conidios circulares con tamaño de 3  $\mu\text{m}$  x 3.2  $\mu\text{m}$ .

Característica microscópica del aislado 4. Presenta micelio hialino, con talo septado, fialides primarias, conidióforos compuestos y blastosporas circulares. Conidios enteroblastico con filioconidios con formación basípeta. Conidios ovoides, con tamaño de 2.9  $\mu\text{m}$  x 3.6  $\mu\text{m}$ .

Característica microscópica del aislado 6. Presenta hifas septadas, hialinas, conidióforos compuestos, blastoconidios y fialides primarios. Conidios enteroblasticos con filioconidios con formación basípeta. Presentan forma elíptica y tamaño de 4.5  $\mu\text{m}$  x 3.12  $\mu\text{m}$ .

Característica microscópica del aislado 7. Presenta hifas septadas hialinas, conidióforos compuesto, blastoconidios y fialides primarias. Conidios enteroblastico con filioconidios con formación basípeta. Presentan forma circular y tamaño de 4.5  $\mu\text{m}$  x 4.18  $\mu\text{m}$ .

Característica microscópica del aislado 8. Presenta talo recto, tabicado con artroconidias y conidióforo primario recto. Presentan formación tipo acrópeta, holotático. De forma oval con tamaño de 0.5  $\mu\text{m}$  x 1.8  $\mu\text{m}$ .

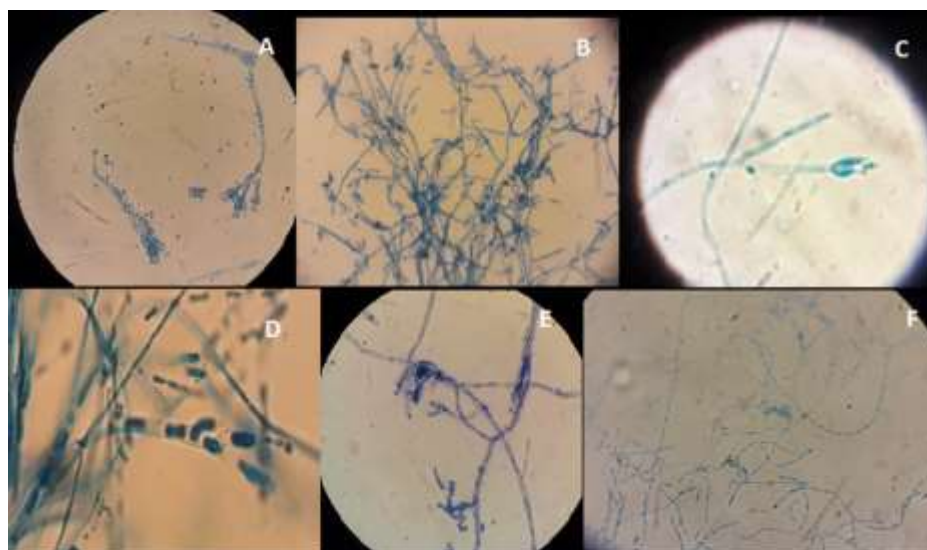


Figura 2. Morfología microscopia de campo claro de los aislados fúngicos crecidos en microcultivo en medio YPD pH 4.5, incubados a 28 °C durante 5 días. Tinción con azul de algodón y vistos en campo claro. En orden secuencial las letras corresponden a los aislados 6 (100X), 2 (40X), 3 (100X), 4 (100X), 7 (100X) y 8 (40X), respectivamente.

Perfil enzimático de los aislados fúngicos. Al determinar la hidrólisis de los 4 sustratos ensayados por los 6 aislados cultivados en presencia de diferentes inductores, se observó que fue mayor la actividad secretada de  $\beta$ -glucosidasa en las cepas inducidas con celofán como fuente de carbono (cepas 4 > 7 > 6 > 3), con respecto al uso de CMC como inductor (cepas 6 > 4 > 3) y que el PET empleado como fuente de carbono también favorece la secreción de la enzima, si bien de manera inespecífica (cepa 6 > 8 > 2 > 3). Con respecto a la actividad de celobiohidrolasa, solamente la cepa 4 mostro buena actividad cuando se indujo con celofán y en la cepa 3 cuando se usó CMC (Tabla 1.). Las determinaciones de actividad con el sustrato para xilosidasa y esterasa dieron resultados no significativos (Tabla 1.). Sin embargo, cabe mencionar que en cultivos donde no se logró cuantificar las actividades enzimáticas a causa de la pandemia del COVID-19, se observó que algunos de los aislados fueron capaces, a las 5 semanas de incubación, de disminuir significativamente la cantidad de PET adicionado al cultivo.

Tabla 1. Actividad enzimática secretada por los aislados fúngicos cultivados en medio mínimo de Mathur adicionado de diferentes sustratos como inductores de la actividad

Aislado	Inductor	Actividad secretada (U/ensayo)			
		$\beta$ -glucosidasa	Celobiohidrolasa	Xilosidasa	Esterasa
2	PET	169	0	0	0
3	Celofán	401	1	0	0
	CMC	24	147	0	0
	PET	85	0	0	0
4	Celofán	995	203	0	0
	CMC	202	4	0	0
6	Celofán	422	23	0	0
	CMC	783	0	0	0
	PET	428	0	0	0
7	Celofán	478	0	0	0
8	PET	318	0	0	0

- Las casillas sombreadas representan la mayor actividad en cada condición de inducción.
- La actividad se determinó en el medio de cultivo libre de células después de 2 semanas de incubación en presencia del inductor como fuente de carbono.

Caracterización molecular de los aislados fúngicos. Una vez obtenidas las secuencias de los amplicones descritos anteriormente, se procedió a comparar la secuencia recuperada con las reportadas en la plataforma del NCBI mediante el programa BLAST. A continuación, se presentan los resultados del BLAST resumidos para cada aislado (Tabla 2), donde se muestran, los nombres de los organismos que presentaron en el análisis bioinformático con una mayor repetitividad, cobertura y porcentaje de identidad con respecto a los cebadores utilizados para la amplificación y posterior caracterización.

Tabla 2. Géneros fúngicos obtenidos con el análisis bioinformático (BLAST) de las secuencias amplificadas con los diferentes cebadores para los 6 aislados.

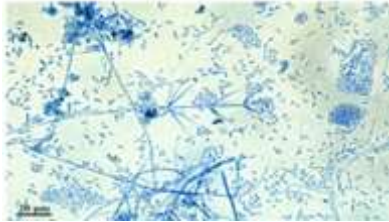

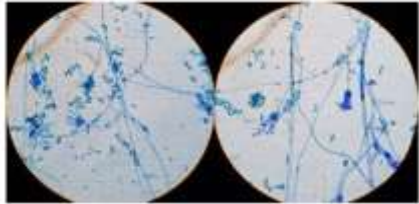
Aislado	Cebadores utilizados durante la amplificación			
	ITS (1-4)	Gen ribosomal 18S (NS1-4)	Gen ribosomal 18S (NS5-8)	RPB2 (5f-c7R)
	Géneros de hongos posibles con base en análisis tipo BLAST			
2	<i>Leptobacillus leptobactrum</i> , <i>Verticillium spp</i>	<i>Leptobacillus leptobactrum</i> , <i>Verticillium lectobactrum</i> , <i>Phaeocellomyces insectorum</i>	<i>Fusarium spp</i> , <i>Verticillium insectorum</i> ,	NR
3	<i>Eupenicillium sp</i> <i>Penicillium sp</i>	<i>Penicillium sp</i> , <i>Eupenicillium javanicum</i>	<i>Penicillium sp</i> ; <i>Penicillium decumbens</i>	NR
4	NR	NR	NR	<i>Talaromyces amestolkiae</i>
6	<i>Penicillium simplicissimum</i> ; <i>Penicillium clone</i>	<i>Penicillium sp</i>	<i>Penicillium sp</i> ; <i>Penicillium decumbens</i> ; <i>Fungicum sp</i>	NR
7	<i>Penicillium granulatum</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Penicillium crustosum</i>	<i>Penicillium crustosum</i> <i>Penicillium sp</i> <i>Penicillium commune</i>	<i>Penicillium sp</i> ; <i>Penicillium chrysogenum</i>	NR
8	<i>Leptobacillus leptobactrum</i> <i>Verticillium leptobactrum</i>	<i>Verticillium insectorum</i> ; <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> ; <i>Verticillus leptobactrum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> ; <i>Fusarium sp</i> ; <i>Verticillium sp</i>	NR

NR: No realizado

Con base en los resultados del análisis bioinformático de las secuencias de los amplicones obtenidos con los distintos cebadores se sugiere que el aislado 2 pertenezca al género *Verticillium* o al género *Leptobacillus*, los aislados 3, 6, y 7 al género *Penicillium*, el aislado 4 se confirmó pertenece al género *Talaromyces* y se confirma la especie como *amestolkiae*; mientras que el aislado 8 puede ser un organismo del género *Verticillium*.

Para tratar de confirmar el género al que pertenece cada uno de los aislados se realizó una comparación morfológica microscópica (conidios e hifas) y macroscópica (morfología colonial) de las características reportadas en la literatura para organismos pertenecientes a los géneros fúngicos mencionados como posibles. Con base en esta comparación (Tabla 3) se sugiere que los aislados 2 y 8, correspondan a organismos del género *Verticillium*, o a su anamorfo, el género *Leptobacillium*, posiblemente la especie sea *leptobactrum* o *insectorum*. En lo que respecta al aislado 4, se consideró, dadas las características morfológicas macro- y microscópicas, así como los resultados del análisis bioinformático, corresponde al hongo *Talaromyces amestolkiae*. En cuanto a los aislados restantes, 3, 6 y 7, se sugiere pertenezcan al género *Penicillium*, posiblemente de las especies *P. sp* para el aislado 3; *P. simplicissimum*, *P. decumbens* o *P. oxalicum*; para el aislado 6 y; *P. commune* o *P. chrysogenum*, para el aislado 7.

Tabla 3. Comparación de los aislados fúngicos identificados con base al análisis molecular de sus amplicones y la morfología reportada en la literatura para los géneros fúngicos identificados.

Genero identificado y aislado correspondiente	Morfología microscópica reportada en la literatura (tinción de azul de lactofenol)	Comparación de datos bioinformáticos amplicones vs NCBI		
		% de cobertura	% de identidad	Valor e
<i>Verticillium</i> Aislado 2	 <i>Verticillium</i> , microscopia de campo claro 40x (Cedeño y Carreño, 1997).	ITS 1-4 100%	ITS 1-4 99.80%	0.0
		NS 1-4 99%	NS 1-4 97.36%	0.0
		NS 5-8 99%	NS 5-8 99.32%	0.0
<i>Leptobacillum</i> Aislado 8		ITS 1-4 100%	ITS 1-4 100%	0.0
		NS 1-4 99%	NS 1-4 99%	0.0
		NS 5-8 99%	NS 5-8 99%	0.0
<i>Talaromyces amestolkie</i> Aislado 4.	 <i>Talaromyces amestolkie</i> , microscopia de contraste 100x (Yilmaz et al., 2014).	RPB2 (5f-c7R) 100%	RPB2 (5f-c7R) 98.02%	0.0
<i>Penicillium</i> Aislado 6	 <i>Penicillium</i> , microscopia de campo claro 40x (Morales-García, et al. 2016).	ITS 1-4 100%	ITS 1-4 99.8%	0.0
		NS 1-4 100%	NS 1-4 98.31%	0.0
		NS 5-8 99%	NS 5-8 99.33%	0.0
<i>Penicillium</i> Aislado 7		ITS 1-4 100%	ITS 1-4 100%	0.0
		NS 1-4 100%	NS 1-4 98.59%	0.0
		NS 5-8 99%	NS 5-8 99.83%	0.0

<i>Penicillium</i>	ITS 1-4	ITS 1-4	0.0
	98%	99.80%	
Aislado 3	NS 1-4	NS 1-4	0.0
	100%	98.78%	
	NS 5-8	NS 5-8	0.0
	99%	99.48%	

## CONCLUSIONES

En la caracterización molecular, con base a la homología de las secuencias recuperadas de las reacciones de PCR con los diferentes cebadores se puede concluir que los aislados caracterizados pertenecen a 4 géneros diferentes: *Verticillium*, cepa 2; *Penicillium*, cepas 3, 6 y 7; *Talaromyces*, cepa 4; y *Leptobacillum*, cepa 8. Esto corroboró la caracterización morfológica inicial en las cepas 4 y 6, reportadas como *Talaromyces* y *Penicillium*, respectivamente.

Si bien los 6 aislados crecen en medio mínimo de Mathur adicionado de polímeros naturales o sintéticos como fuente de carbono, el agente inductor empleado en su cultivo no parece ser determinante en las actividades enzimáticas secretadas por ellos.

Se sugiere que algunos de los aislados secreten esterases debido a la disminución cualitativa observada del PET y aumento del crecimiento de las cepas en el medio adicionado con este polímero y cultivadas durante 5 semanas.

Los aislados 4 y 6, conforme a la actividad enzimática secretada, podrían utilizarse en biorremediación de residuos celulósicos y el aislado 8 en la de residuos plásticos. Si bien, es necesario realizar un análisis más detallado de los diferentes aislados, haciendo énfasis en su actividad enzimática secretada, la purificación de la misma y el estudio del genoma de los aislados para determinar la presencia de los genes correspondientes a petasas, esterases y celulasas.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con recursos de la DAIP de la Universidad de Guanajuato en el convenio 056/2020 y del investigador responsable.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Jenna R. Jambeck, Roland Geyer, Christ Wilcox, Theodore R. Siegler, Miriam Perryman, Anthony Andrady, Ramani Narayan, Kara Lavender Law. (2018). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 347, 768-771. doi: 10.1126/science.1260352
2. Hayden K. Webb, Jaimys Arnott, Russell J. Crawford, Elena P. Ivanova. (2013). Plastic Degradation and Its Environmental Implications with Special Reference to Poly (ethylene terephthalate) . *Polymers*, 5, 1-18. Doi: 10.3390/polym5010001
3. Davies, G., Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9), 853–859. doi:10.1016/s0969-2126(01)00220-9
4. Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., Pretorius, I. S. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506– 739
5. Ivonne Gutiérrez-Rojas, Nubia Moreno-Sarmiento, Dolly Montoya. (2015). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(1), 1-12.
6. Silva-Rodríguez, A.V.; 2019, Caracterización de microorganismos degradadores de PET. Tesis de Licenciatura, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Gto., México, 10-22.
7. Ruano Najarro, Madeline Janette , Villagómez Castro, Julio César . (2018). Jóvenes en la ciencia. Estudio de la degradación de PET por consorcios fúngicos II, 4, 1076-1082.

8. Ruano Najarro Madeline Janett, Cruces González David Francisco, Navarro Rangel Cynthia Alejandra, Regla León, Gabriela Quetzally, Villagómez Castro Julio César. (2019). Caracterización de enzimas secretadas por hongos que crecen sobre una suspensión acuosa de PET y su potencial uso en biorremediación. *Veranos de la ciencia*, 5, 1056-1062.
9. Pinto, F. C. J., Lima, D. B. de, Agustini, B. C., Dallagassa, C. B., Shimabukuro, M. F., Chimelli, M. Bonfim, T. M. B. (2012). Morphological and molecular identification of filamentous fungi isolated from cosmetic powders. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(6), 897–901.
10. Barnett H. L. y Hunter B.B. (2006). *Illustrated genera of imperfect fungi*. Fourth edition. APS Press. St. Paul, Minnesota, USA. ISBN: 0890541922.
11. Zverlov, V. V., Velikodvorskaya, G. A., & Schwarz, W. H. (2002). A newly described cellulosomal cellobiohydrolase, CelO, from *Clostridium thermocellum*: investigation of the exo-mode of hydrolysis, and binding capacity to crystalline cellulose. *Microbiology*, 148, 247–255.



## ANÁLISIS DE LA OBTENCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE ACEITE RESIDUAL DE COCINA CON EL USO DE TECNOLOGÍA VERDE

Arizbeth Cerón Hernández<sup>1</sup>, Selenia Ramírez Cornejo<sup>1</sup>, Abril Lizeth Ramírez Estrada<sup>1</sup>, Keops Xeki García Galván<sup>1</sup>, Rogelio Cuevas García<sup>2</sup> y José Roberto Contreras Bárbara<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Tecnológico Nacional de México campus Atitalaquia, <sup>2</sup>Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México  
jose.cb@atitalaquia.tecnm.mx

### RESUMEN

En la actualidad los aceites que se utilizan en la industria restaurantera o alimenticia no tienen una reutilización, se habla de aproximadamente 303 toneladas desechadas de este al año por lo cual generan a largo plazo contaminación en el suelo y finalmente contamina los mares. En este trabajo se realizaron diversas pruebas de obtención de biodiésel mediante método convencional a nivel laboratorio a partir de aceite gastado de soya de un solo uso por medio de la reacción de transesterificación utilizando metanol y metóxido de sodio como catalizador. De acuerdo a uno de los principios de la química verde postulado por Anastas<sup>1</sup>, se aplicó un baño de ultrasonido como propuesta de energía verde alternativa para la producción de biodiésel. El biodiesel obtenido se caracterizó mediante espectroscopía infrarroja y mediante determinaciones de las densidades de la fase de biodiesel. Con el uso del ultrasonido se favorece la reacción de transesterificación a temperatura ambiente mientras que a 60 °C aumenta la reacción de saponificación. Los resultados de la caracterización por espectroscopia infrarroja mostraron bandas características de estiramiento del grupo carbonilo del grupo funcional éster (biodiesel) de similar a lo encontrado por Hyuck<sup>2</sup>. Las densidades obtenidas de las muestras de biodiesel se encontraron en el intervalo de las recomendadas por la ASTM D67513<sup>3</sup>.

### INTRODUCCIÓN

Los aceites de cocina usados provenientes de la industria restaurantera o alimenticia no tienen una disposición final adecuada, aproximadamente 303 toneladas desechadas de este al año, por lo cual generan a largo plazo contaminación en el suelo y agua, se busca una alternativa para obtener una fuente de energía que en un futuro se espera sustituya al diésel convencional trayendo consigo ciertos beneficios que ayudarán a la sociedad en general y al mismo tiempo al medio ambiente.

En este trabajo se plantea reciclar el aceite de cocina previamente utilizada una sola vez y se pretende obtener biodiesel mediante una reacción de transesterificación con asistencia de una fuente de energía alterna como el ultrasonido.

### TEORÍA

El biodiésel es una mezcla de metilésteres de ácidos grasos, es un combustible alternativo al diésel de petróleo, este es un producto biodegradable, no es tóxico y de igual forma se considera menos perjudicial para el ambiente en comparación con el diésel de petróleo. Se puede obtener de aceites vegetales y es una alternativa para comenzar a reemplazar parte del petróleo cuando se agoten los yacimientos. El biodiésel se obtiene a través de la reacción de transesterificación de triglicéridos que son los que constituyen principalmente los aceites vegetales y grasas animales con un alcohol de cadena corta y en presencia de un catalizador básico<sup>4</sup>.

El aceite de cocina gastado, se deriva de la preparación de un sinfín de alimentos, la mala disposición actual genera un serio problema de contaminación ambiental, debido a que un litro de este puede contaminar un millón de litros de agua. La descarga de aceites y grasas genera una acumulación de estos materiales en tuberías y demás instalaciones de fontanería con su consecuente obstrucción y la reducción de su capacidad de almacenamiento, sumando la presencia de lípidos incrementa la necesidad de limpieza y mantenimiento. Se generan alrededor de 303 toneladas de aceite de cocina usado cada año. Contiene ácidos grasos libres, triglicéridos, fosfolípidos, tocoferoles, esteroides, hidratos de carbono y otros compuestos que resultan de reacciones termolíticas, oxidativas e hidrolíticas durante procesos como la fritura, sin embargo, este podría ser utilizado como materia prima para la elaboración de biodiésel, a través de una reacción de transesterificación<sup>5</sup>.

Las propiedades de los aceites vegetales residuales dependen del tipo de tratamiento al que son sometidos. El tipo de aceite, duración de la cocción, temperatura del aceite, exposición al aire, periodo de almacenamiento y el tipo de alimento cocinado, determinan la presencia de contaminantes primarios y secundarios que le darán el aceite residual sus características finales. Las altas temperaturas de los procesos típicos de cocción y el agua de los alimentos aceleran la hidrólisis de los triglicéridos e incrementan el contenido de ácidos grasos libres, impartiendo al aceite un color oscuro y un olor desagradable<sup>4</sup>.

Las propiedades físicas y químicas de las grasas y aceites residuales provenientes de restaurantes dependen del tipo de comida y de las practicas que se utilizan. México tiene una tradición culinaria, que se refleja en su amplia variedad de restaurantes.

La reacción de transesterificación consiste en tres reacciones consecutivas reversibles donde los triglicéridos son convertidos a diglicéridos, los diglicéridos se convierten a mono glicéridos y finalmente estos a glicerol que es el subproducto principal de esta reacción, en cada una de las etapas se utilizan tres moléculas de alcohol por cada molécula de triglicérido. La reacción se lleva a cabo a 60 °C, con un alcohol, metanol, en presencia de un catalizador como metóxido de sodio y los productos de reacción son una mezcla de alquilesteres y glicerol, la reacción general se muestra en la figura 1.



Figura 1. Ruta general de la reacción de transesterificación de un triglicérido.

La química verde, la cual reemplaza metodologías clásicas por métodos no convencionales; por ejemplo, el empleo de fluidos supercríticos (como dióxido de carbono), microondas, ultrasonido, entre otros. La principal ventaja del empleo de ellos es el incremento de la eficiencia de los procesos, dando como resultado el aumento del rendimiento de la producción en un menor tiempo. La idea de “Química verde” fue desarrollada como respuesta al Acta de Prevención de la Contaminación de 1990, la cual declara como política nacional de los Estados Unidos la eliminación de la contaminación mejorando el diseño (incluyendo cambios en el costo efectividad de productos, procesos, usos de materias primas y reciclaje) en lugar de su tratamiento y disposición final<sup>6</sup>.

El ultrasonido también puede ser usado para la producción del biodiésel, teniendo como ventajas el aumento del rendimiento del producto principal, la reducción en el tiempo de reacción, la separación del biodiésel y la disminución en la cantidad del catalizador (debido al fenómeno que se produce, denominado cavitación), además se sabe que usando el ultrasonido, la cantidad necesaria de metanol disminuye y la glicerina obtenida como subproducto, la cual puede utilizarse en farmacia, industria cosmética, alimentación, polímeros, surfactantes y lubricantes<sup>6</sup>.

## PARTE EXPERIMENTAL

Se recolectó el aceite residual proveniente de las cocinas de los hogares, así como de puestos de comida, el aceite se clasificó de acuerdo a las veces que este fue utilizado y de acuerdo al fin con que estos se habían usado, se recolectó aceite gastado proveniente de la cocción: de papas fritas, alitas, churros, tacos dorados, arroz, etc. Se utilizó aceite de soya gastado de la marca Nutrioli de un solo uso, como este aceite contenía residuos sólidos de comida, se decantó para eliminar los residuos sólidos más grandes, posteriormente se filtró, se calentó previamente a 120°C para evaporar agua que pudiera contener. El equipo donde se llevó a cabo la reacción de transesterificación quedó de la siguiente manera como muestra la figura 2.



Figura 2. Equipo utilizado para la reacción de transesterificación.

En todos los experimentos se agregaron 10 g de aceite de cocina usado con 13 mL de metanol y se variaron las cantidades de metóxido de sodio, el tiempo de reacción fue de 2 h a una temperatura de 60°C agitado a 200 RPM. Las reacciones de transesterificación se llevaron a cabo de manera convencional y reacciones asistidas con ultrasonido. Al término de cada reacción de transesterificación se dejó reposar la mezcla en un embudo de separación de fases, para separar el biodiésel de la glicerina, una vez que se separaron las fases en el embudo, se cuantificó el volumen obtenido de biodiésel y se calcularon las densidades del producto. La identificación de los productos de la fase de biodiésel se realizó utilizando un equipo Nicolet 6700 FT-IR Spectrometer from Thermo Scientific.

## RESULTADOS

Un ejemplo típico del producto obtenido de la reacción de transesterificación del aceite gastado de soya se observa en la figura 3.



Figura 3. Muestra de biodiesel, fase superior y glicerol, fase inferior.

Las densidades según los estándares de ASTM D6751 y EN14214 reportadas son de 0.860- 0.900 g/mL, de las muestras obtenidas de igual forma se calculó en promedio de 0.8619 g/mL.

La caracterización por espectroscopia infrarroja se muestra con los espectros en la figura 4. Los resultados se compararon con los reportados de Hyuck S y colaboradores<sup>2</sup>.

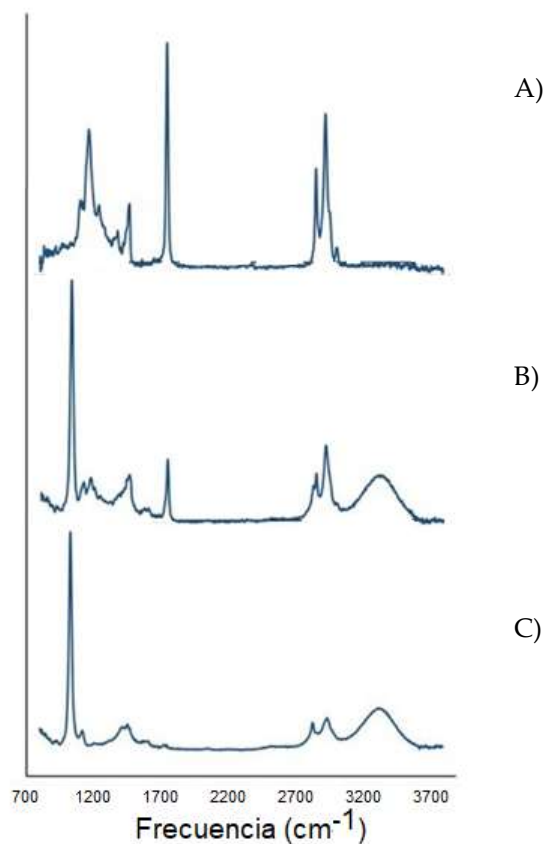


Figura 4. Espectros de FTIR de las muestras utilizadas: aceite puro (A), producto de reacción obtenido con ultrasonido (B) y por el método convencional (C).

En la figura 4 se hacen los comparativos de los espectros de infrarrojo obtenidos del aceite usado antes de la reacción de transesterificación con el método de reacción convencional y con la reacción apoyada con ultrasonido. Los resultados muestran que desaparece casi por completo la banda de  $1720\text{ cm}^{-1}$  atribuida a la vibración de un grupo carbonilo del triglicérido por el método convencional pero con el ultrasonido aún a temperatura ambiente y con menor tiempo también disminuye considerablemente ésta misma banda. La banda a  $2850\text{ cm}^{-1}$  se le atribuye al estiramiento de los enlaces C-H de los grupos metilo del éster. Las bandas intensas de  $1030$  y  $3300\text{ cm}^{-1}$  indican la presencia de grupos OH atribuidos al glicerol.

### CONCLUSIONES

Fue posible llevar a cabo las reacciones de transesterificación con el aceite de cocina usado como lo indicaron los resultados en las condiciones convencionales.

Las reacciones apoyadas con el ultrasonido favorecen la reacción de transesterificación a temperatura ambiente y en menor tiempo. El uso del ultrasonido a temperaturas de  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  favorece las reacciones de saponificación en lugar de las reacciones de transesterificación.

### BIBLIOGRAFÍA

1. P. Anastas, N. Eghbali. "Green Chemistry: Principles and Practice", Chem. Soc. Rev., Vol. 39, 2010, pp. 301–312.

2. P. Hyuck, N. Khan, S. Lee, K. Zimmermann, M. De Rosa, L. Hamilton, W. Hudson, M. Serratos, S E. Heffield, A. Veludhandhi, & D. Pursell, "Biodiesel Production from Locally Sourced Restaurant Waste Cooking Oil and Grease: Synthesis, Characterization and Performance Evaluation". ACS OMEGA, Vol. 4, 2019, pp. 7775-7784.
3. ASTM-D6751. "Especificación estándar para mezclas de combustible biodiesel (B100) para combustibles destilados medios", 2020.
4. G. Veymar, A Rosales. y B. Torrestiana, "Evaluación y caracterización de grasas y aceites residuales de cocina para la producción de biodiésel: un caso de estudio." Rev. Int. Cont. Amb., Vol. 32, 3, 2016, pp. 304-309.
5. T. Parra, F. Marín, , G. Jácome, y M. Sinche, "Clarificación de aceite de cocina usado y decoloración de aceite rojo de palma con el uso de ozono, carbón activado y peróxido de hidrógeno". Enfoque UTE, Vol. 9, 2, 2018. pp 77-88.
6. M. Fuentes, M. Aranda, y S. Gómez, "Ondas ultrasónicas aplicadas en el biodiesel producido con diferentes tipos de aceites vegetales". Rev. Inst. Inv. Vol. 19, 38, 2016 pp. 147-151.

## RECUPERACIÓN DE $\Psi,\Psi$ -CAROTENO A PARTIR DE JITOMATE SENESCENTE MEDIANTE TECNOLOGÍA DE QUÍMICA VERDE

José Roberto Contreras Bárbara<sup>1</sup>, Shanny Ivete López Cerón<sup>1</sup>, Ingrid Magali Cabrera Sánchez<sup>1</sup>, Macaria Hernández Chávez<sup>2</sup> y Rogelio Noriega Vargas<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Tecnológico Nacional de México campus Atitalaquia, <sup>2</sup>Instituto Politécnico Nacional – UPIIH  
[jose.cb@atitalaquia.tecnm.mx](mailto:jose.cb@atitalaquia.tecnm.mx)

### RESUMEN

La organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura FAO<sup>1</sup>, indica que 1300 millones de toneladas de alimentos se desperdician cada año en el mundo. En América Latina se desperdician hasta 127 millones de toneladas de alimentos al año. Un 55 % equivale a frutos y hortalizas de pérdidas y desperdicios. El destino final de estos desperdicios orgánicos sirve en algunos casos como alimento para ganado, en la mayor parte en los basureros, tiraderos, rellenos sanitarios, incineración, además ocupa el tercer lugar como responsable en la emisión de gases de efecto invernadero. Aunque ha avanzado la tecnología en algunos casos se utilizan estos desperdicios para la producción biogás y composta. Recientemente se han realizado diversas investigaciones para recuperar biocompuestos de alto valor agregado a partir de los desechos de frutas y de verduras, tales como pectina, compuestos fenólicos,  $\Psi,\Psi$ -caroteno (licopeno),  $\beta$ -carotenos, fibras, d-limoneno, aceites de cáscaras, aceites de semillas y naringina (flavonoide)<sup>2</sup>. Por otro lado, tradicionalmente se han usado disolventes altamente volátiles como éteres, etil acetato, cloroformo, pero estos compuestos además de ser tóxicos son inflamables. Paul Anastas<sup>3</sup> publicó los 12 principios de la química verde en cuyos puntos 5, 6 y 11 proponen el uso de disolventes menos peligrosos, el uso de fuentes energéticas alternativas y disminución de emisiones. En esta propuesta se plantea el uso de disolventes menos peligrosos como el isopropanol para la extracción de licopeno a partir de jitomate senescente y con la asistencia de ultrasonido, y se compara su eficiencia con el n-hexano. Los disolventes comerciales como etanol al 70 % y acetona “pura” no extraen  $\Psi,\Psi$ -caroteno. En cambio, el hexano y el isopropanol si tienen efecto en la extracción de  $\Psi,\Psi$ -caroteno. La caracterización por UV-VIS indicó que en el caso del uso del isopropanol aumenta la extracción en función del tiempo de sonificación y el hexano no muestra ningún efecto al usar el ultrasonido. Se pudo obtener  $\Psi,\Psi$ -caroteno a partir del jitomate senescente demostrando que, aunque el jitomate se considere deshecho en esta etapa puede ser una buena fuente de  $\Psi,\Psi$ -caroteno.

### INTRODUCCIÓN

De acuerdo a los datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura ONUAA, reportan más de 1300 millones de toneladas de alimentos se desperdician por año en el mundo. En América Latina se desperdician hasta 127 millones de toneladas de alimentos al año, 55 % equivale a frutos y hortalizas de pérdidas y desperdicios<sup>1</sup>. La disposición final de estos desperdicios orgánicos en algunos casos termina como alimento para ganado, un porcentaje alto termina en los basureros, tiraderos, rellenos sanitarios, otra fracción se incinera, y es responsable de un tercer lugar en la emisión de gases de efecto invernadero. En algunos casos estos desperdicios se usan para la producción de biogás y composta. Recientemente se ha reportado diversas investigaciones para la recuperación de biocompuestos de alto valor agregado a partir de los desechos de frutas y de verduras, tales como pectina, compuestos fenólicos, licopeno, beta-carotenos, fibras, d-limoneno, aceites de cáscaras, aceites de semillas y naringina (flavonoide)<sup>2,4-6</sup>. Los autores antes mencionados proponen la creación de biorefinerías para la recuperación de biocompuestos de alto valor agregado<sup>4-6</sup>.

Tradicionalmente para procesos de extracción se han usado disolventes altamente volátiles como éteres, acetato de etilo, hexano y cloroformo, pero estos compuestos además de ser tóxicos son inflamables.

En 1999 Paul Anastas<sup>3</sup> publicó los 12 principios de la química verde en cuyos puntos 5, 6 y 11 proponen el uso de disolventes menos peligrosos, el uso de fuentes energéticas alternativas como el ultrasonido y microondas además de procesos con disminución de emisiones.

En esta propuesta se plantea el uso de disolventes menos peligrosos como el isopropanol para la extracción de licopeno a partir de jitomate senescente y con la asistencia de ultrasonido, se compara su eficiencia con el n-hexano.

### TEORÍA

El jitomate contiene una gran variedad de agentes bioactivos tales como polifenoles, carotenoides y vitaminas los cuales tienen un efecto positivo en la salud humana debido a su actividad antioxidante, hipolipidémica y anticarcinogénica. Por lo tanto es una buena fuente de micronutrientes y nutraceuticos. El jitomate se ha procesado como ingrediente de una amplia gama de productos, incluyendo jugo de jitomate, ketchup, salsas, sopas, etc. El licopeno también conocido como  $\psi, \psi$ -caroteno, pertenece a la familia de los carotenoides, es uno de los componentes bioactivos del jitomate, es un isopreno con 11 dobles enlaces conjugados y 2 dobles enlaces no conjugados<sup>7</sup>. La estructura es  $C_{40}H_{56}$  con un peso molecular de 536.85 g/mol, como característica principal es su solubilidad en disolventes orgánicos. En la naturaleza se encuentra como pigmento natural liposoluble de color rojo y naranja en frutas y verduras. En fruta fresca existe como *trans*-licopeno mientras que la forma *cis*-licopeno se encuentra en los alimentos procesados<sup>8</sup>, figura 1.

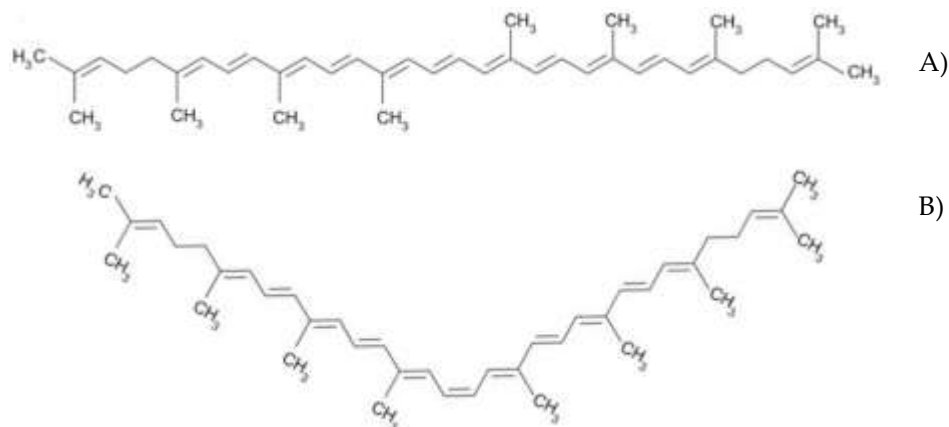


Figura 1. Estructuras del licopeno en configuración *trans*- (A) y *cis*-licopeno (B).

Recientemente se han realizado diversas investigaciones para recuperar biocompuestos de alto valor agregado a partir de los desechos de frutas y de verduras, tales como pectina, compuestos fenólicos, licopeno, beta-carotenos, fibras, d-limoneno, aceites de cáscaras, aceites de semillas y naringina (flavonoide)<sup>4-6</sup>. Estos estudios proponen la creación de biorefinerías para la recuperación de biocompuestos de alto valor agregado.

Kehili<sup>7</sup>, realizó la extracción de licopeno a partir de la cáscara de jitomate con aceite de oliva, analizó el efecto del calor a temperaturas de 40 a 80 °C y tiempos de maceración, sus estudios intentaron enriquecer el aceite de oliva con la finalidad de prevenir su oxidación y reveló que las mejores condiciones de obtener el licopeno fueron a 80 °C y 45 min de maceración.

Rahimi y Mikani<sup>9</sup>, indican que el uso del ultrasonido puede ser una fuente de energía viable para la extracción de licopeno. Los beneficios del ultrasonido son que disminuyen el tiempo de extracción con un máximo de rendimiento, generando un ahorro de energía<sup>3</sup>. El ultrasonido rompe las paredes orgánicas celulares facilitando la penetración del disolvente y mejora la extracción del licopeno. Los estudios realizados en esta investigación encontraron que un tiempo de 10 min fue el óptimo con un 87 % de rendimiento comparado con el uso de un disolvente convencional.

### PARTE EXPERIMENTAL

El jitomate senescente de la especie (*Solanum lycopersicum*) se adquirió en un mercado local en la comunidad de Tezoquipa, Atitalaquia Hgo, previo a la extracción, el jitomate se lavó, se realizó la separación del epicarpio del fruto junto con una capa de exocarpio, estas muestras se deshidrataron a 80°C por 2 horas y se trituraron en pedazos finos, las muestras a utilizar fueron de 0.20 g, los

disolventes utilizados fueron acetona "pura", etanol grado comercial, hexano e isopropanol, figura 2, la cantidad de disolvente fue constante, se agitó por 15 minutos y se llevó al ultrasonido durante 15, 30, 45, 60 minutos, en un equipo de la marca Raypa Ultrasonic Cleaner operando a 50/60 Hz, se comparó la extracción con muestras sin pasarlas al ultrasonido. Los espectros se obtuvieron en un espectrofotómetro UV-VIS de la marca BioChrom con un intervalo de longitud de onda 300 a 600 nm.



Figura 2. Preparación del jitomate senescente para la extracción de licopeno

## RESULTADOS

Los experimentos de extracción con disolventes comerciales como etanol al 70 % y acetona "pura" no extraen licopeno. El hexano y el isopropanol si tienen efecto positivo en la extracción de licopeno. En el caso del uso del isopropanol aumenta la extracción en función del tiempo de ultrasonificación y mientras que el hexano no muestra ningún efecto al usar el ultrasonido. La caracterización de las muestras por espectroscopía UV-VIS muestran bandas de 470 y 500 nm bandas características de licopeno atribuidas a las transiciones energéticas de los enlaces dobles. De acuerdo a Chemat-Djenni<sup>10</sup>, las bandas de licopeno son 457, 483 y 516 nm respectivamente. Estas bandas se incrementan de intensidad a medida que aumenta el tiempo de ultrasonificación cuando se usa el isopropanol, figura 3.

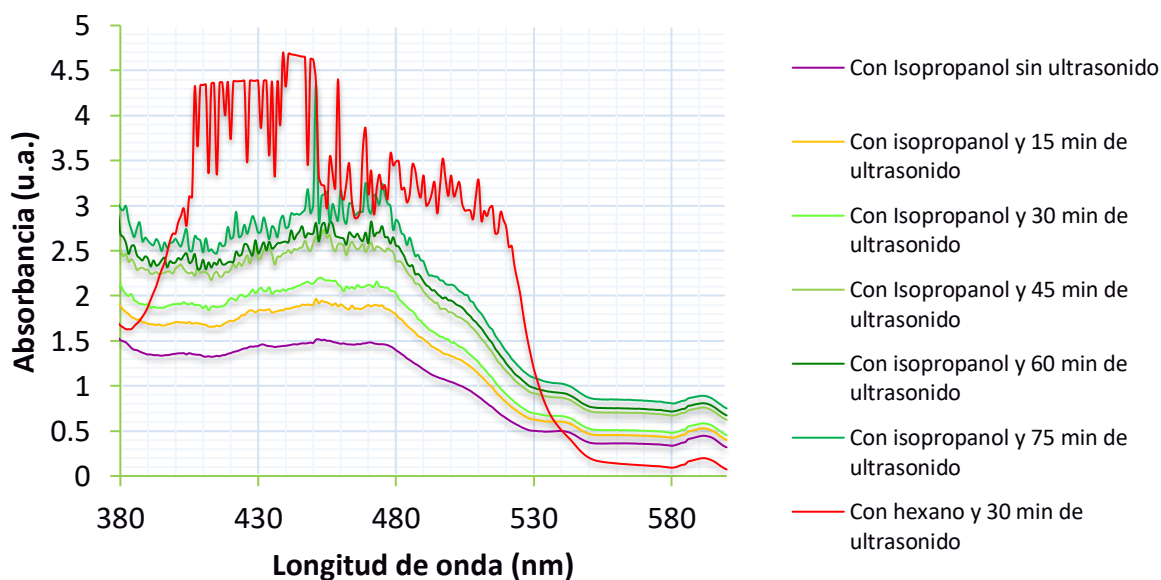


Figura 3. Espectros de absorción UV-VIS de las muestras de licopeno.

## CONCLUSIONES

Se realizaron varios experimentos con diferentes disolventes, entre ellos acetona, hexano, isopropanol y etanol. Los disolventes comerciales como etanol al 70 % y acetona "pura" no extraen licopeno. En cambio, el hexano y el isopropanol si tienen efecto positivo en la extracción de licopeno. En el caso del uso del isopropanol aumenta la extracción en función del tiempo de sonificación y el hexano no muestra ningún efecto al usar el ultrasonido.



Se pudo obtener licopeno a partir del jitomate senescente demostrando que aunque el jitomate se considere deshecho en esta etapa puede ser una buena fuente de licopeno.

## BIBLIOGRAFÍA

1. FAO. "Pérdidas y desperdicios de alimentos en América Latina y el Caribe". 2016, Boletín 3.
2. I. Esparza, N. Jiménez-Moreno, F. Bimbela, C. Ancín-Azpilicueta, y L. M. Gandía, "Fruit and vegetable waste management: Conventional and emerging approaches", *J. Environ. Manage*, 2020, Vol. 265, 1-18.
3. P. Anastas, N. Eghbali. "Green Chemistry: Principles and Practice", *Chem. Soc. Rev.*, Vol. 39, 2010, pp. 301–312.
4. A. S. Engelberth, "Evaluating economic potential of food waste valorization: Onward to a diverse feedstock biorefinery". *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, 2020, Vol. 26, pp. 1- 6.
5. J. Banerjee, R. Singh, R. Vijayaraghavan, D. MacFarlane, A. F. Patti, & A. Arora, "Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals", *Food Chem.*, 2017, Vol. 225, 10–22.
6. M. Kehili, S. Sayadi, F. Frikha, A. Zammel, y N. Allouche, "Optimization of lycopene extraction from tomato peels industrial by-product using maceration in refined olive oil", *Food Bioprod. Process.*, 2019, Vol.117, pp. 321–328.
7. Y. Lu, K. Mu, D. J. McClements, X. Liang, X. Liu, F. Liu, "Fermentation of tomato juice improves in vitro bioaccessibility of lycopene", *J. Funct. Foods*, Vol. 71, 2020, pp. 1-8.
8. A. M. Delgado, M. D. Vaz, S. Parisi, "Chemistry of the Mediterranean Diet" (Springer, Switzerland, 2017), pp. 68-70.
9. S. Rahimi, y M. Mikani, "Lycopene green ultrasound-assisted extraction using edible oil accompany with response surface methodology (RSM) optimization performance: Application in tomato processing wastes", *Microchem. J.*, 2019, Vol. 146, pp. 1033–1042.
10. Z. Chemat-Djenni, M. A. Ferhat, V. Tomao & F. Chemat. Carotenoid Extraction from Tomato Using a Green Solvent Resulting from Orange Processing Waste, *J. Essent. Oil-Bear. Plants*, 2010, Vol. 13, 2, pp. 139-147.

## SINTESIS DE BIOPELICULAS DE QUITOSANO/CALÉNDULA PARA LA REGENERACIÓN CELULAR

Ma. Elena Calixto-Olalde, Ana Guadalupe Alpizar Negrete, María Besamath Rodríguez Rivera, Alicia García Torres

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato.  
elena.co@irapuato.tecnm.mx

### RESUMEN

La piel es el órgano más grande del cuerpo, lo cual requiere de un cuidado adecuado ya que es la que protege al organismo de factores externos como bacterias, sustancias químicas y temperatura. Aun cuando existe una gran cantidad de productos para su cuidado, la gran mayoría son caros y no de fácil acceso a la población, por lo cual se busca encontrar materiales que puedan ser accesibles, efectivos y de bajo costo. El presente trabajo tiene como objetivo, desarrollar una biopelícula a base de quitosano, el cual favorece el crecimiento de tejidos debido a sus propiedades regenerativas y antiinflamatorias además de capacidad filmogénica, y caléndula (*C. officinalis*) que es coadyuvante en la cicatrización de heridas. La metodología utilizada para la obtención de las biopelículas fue utilizar una base compuesta de una mezcla de quitosano, polialcohol vinílico y glicerina. Las variables involucradas fueron; presentación de caléndula, infusión y aceite esencial. Para la incorporación adecuada del aceite en la mezcla acuosa se utilizó un surfactante. Se evaluó también el orden de adición de los componentes de la mezcla. Se obtuvo una biopelícula de color café oscuro para el caso de la infusión y un color beige para el caso del aceite. En ambos casos las películas presentaron buena flexibilidad y adherencia. También se encontró que el orden de adición de los reactivos tiene un efecto muy significativo. Se modificó el orden de adición de los reactivos para evitar la precipitación de la infusión y con ello favorecer la homogeneidad de la película obtenida. Así mismo se pudo observar que el surfactante en una proporción del 1.25% permite estabilizar el aceite en la película y favorece su estabilidad mecánica. La permeabilidad de la película no cambia significativamente la permeabilidad por la presencia de la caléndula respecto de la base. Las películas obtenidas son homogéneas y con buenas propiedades mecánicas para la aplicación planteada.

### INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el desarrollo de películas poliméricas para usos biomédicos, ha cobrado gran importancia debido al creciente interés en el estudio de ingeniería de tejidos por su gran campo de aplicación; entre las que destaca la utilización de apósitos para la recuperación de tejidos dañados. Una de las causas más comunes son las lesiones provocadas por quemaduras. Cada año, cientos de miles de pacientes sufren quemaduras debido a accidentes domésticos e industriales<sup>1</sup> El desafío común al que se enfrenta la cirugía plástica y reconstructiva, es cómo mejorar la curación de tales heridas. Se han desarrollado diversas formulaciones tales como productos pasivos, interactivos y bioactivos<sup>2</sup>. Un apósito ideal para heridas debe proteger la herida de infección, proporcionar un ambiente húmedo y curativo y ser biocompatible<sup>3</sup>. Los hidrogeles se han considerado ventajosos en su aplicación como un material para el vendaje de la herida<sup>4-6</sup>. Los hidrogeles son polímeros hidrofílicos (afinidad al agua) en forma reticulada de forma química o física. Durante la última década, los materiales muy prometedores para el vendaje de heridas sintetizado con poli (vinilpirrolidona)<sup>7-9</sup> poli (vinil -Alcohol)<sup>10</sup>, poli (óxido de etileno)<sup>11</sup> y polisacáridos como; quitosano, alginato, colágeno y celulosa<sup>12, 13</sup>. Considerando lo anterior se establece la relevancia que representa el desarrollo de apósitos que puedan acelerar la recuperación de tejidos dañados, también existen diferentes plantas con propiedades que favorecen la regeneración celular, es por ello que se propone en este proyecto el uso de extractos naturales de plantas que potencialicen la regeneración celular y aceleren el proceso de curación. Entre la gran diversidad de plantas que existen con esta propiedad se encuentra la caléndula, particularmente el aceite será utilizado para establecer las condiciones de síntesis de las biopelículas y después realizar su caracterización

## TEORÍA

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, que al mismo tiempo es difícil de repararse después de una lesión; en la cicatrización de heridas, presentando etapas de la curación en la que se incorporan células importantes, como Linfocitos y macrófagos, que ayudan a cada etapa. Después de la lesión o trauma, se inicia la **inflamación**, del cual interviene la hemorragia, coagulación, la migración celular y la activación del sistema inmune, siguiendo con la **proliferación**, en la cual interviene la fibroplasia, inicio de la síntesis de matriz extracelular, angiogénesis y reepidermización; finalmente le toca la remodelación, del cual ocurre la síntesis de la matriz extracelular, el inicio del cierre de la herida y la contracción, para que exista el cierre y cicatrización completa de la herida. Aun cuando la cicatrización de heridas es el proceso natural del cuerpo para la regeneración de daños y/o tejidos, un apósito apropiado es capaz de mejorar el proceso de curación ampliamente, mediando en la etapa correcta o en la prestación de excelentes condiciones para la cicatrización<sup>12</sup>.

Generalmente, un apósito ideal para curación de heridas debe poseer las siguientes propiedades:

- a. absorber los exudados y componentes tóxicos de las heridas superficiales.
- b. preservar un alto nivel de humedad en la superficie de la herida.
- c. permitir el intercambio gaseoso.
- d. proporcionar aislamiento térmico.
- e. proteger la herida de la penetración de bacterias.
- f. ser no tóxico.
- g. promover la regeneración y el crecimiento del tejido nuevo.
- h. ser eliminado fácilmente sin trauma de la herida.

Entre los materiales principalmente utilizados la preparación de apósitos se encuentran los hidrogeles de biopolímeros.

### Biopolímeros.

Se definen como materiales poliméricos o macromoleculares sintetizados por los seres vivos. Se clasifican en tres principales familias: *proteínas* (fibroínas, globulinas, etc.), polisacáridos (celulosa, alginatos, quitina, quitosano, etc.) y *ácidos nucleicos* (ADN, ARN, etc.), aunque también otros más singulares como los politerpenos (terpenos), entre los que se incluye el caucho natural, los polifenoles (la lignina) o algunos poliésteres como los polihidroxicanoatos producidos por algunas bacterias. Es importante recordar que el biopolímero más abundante en la tierra es la celulosa, seguida por la quitina (encontrada en los exoesqueletos de arácnidos, crustáceos e insectos y de la cual se deriva el quitosano, biopolímero utilizado ampliamente en la elaboración de apósitos).

### Quitosano

Es un polímero natural derivado de la desacetilación de la quitina, la cual es insoluble en los disolventes habituales; está compuesto de 2 polisacáridos distribuidos aleatoriamente, de  $\beta$ -(1-4) D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina. Es considerado el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza y en los últimos años, el quitosano y sus derivados han atraído la atención debido a sus propiedades beneficiosas en aplicaciones de curación y cicatrización de heridas; despertando así un gran interés debido a la posibilidad de modular y controlar sus propiedades químicas, físicas y biológicas bajo suaves condiciones de reacción. La protonación obtenida por el procesamiento del material le provee de características antisépticas importantes, evitando el crecimiento bacteriano no deseado en estas ulceraciones. La clave para la cicatrización por segunda intención es básicamente lograr la migración de fibroblastos capaces de estimular y liberar factores de crecimiento que favorezcan el proceso cicatrizal; esta característica de estimulación fibroblástica es lograda por apósitos a base de quitosano. Entre los derivados más utilizados se encuentran el N, N, N-trimetilquitosano (NTQ), O-carboximetilquitosano (OCQ), N-carboximetilquitosano (NCQ) y N, O-carboximetilquitosano (NOCQ). En general, el quitosano, sus derivados y su combinación con otros materiales han sido utilizados en la fabricación de una gran variedad de esponjas, geles, películas, andamios y polvos poliméricos para el tratamiento de heridas, los cuales se hidratan rápidamente por la absorción del exudado, formando un hidrogel en la superficie de la herida, propiedad fundamental en un apósito<sup>13</sup>.

El uso de apósitos para heridas es una de las aplicaciones médicas más prometedoras para el quitosano, debido a su naturaleza adhesiva en conjunto con su carácter bactericida y antifúngico, y su permeabilidad al oxígeno, propiedades asociadas al tratamiento de heridas y quemaduras. No obstante, aun con todas sus propiedades, la aplicación del quitosano en la ingeniería de tejidos ha sido restringida por su inherente sensibilidad al agua, su pobre estabilidad térmica y propiedades mecánicas relativamente débiles, especialmente en ambientes húmedos<sup>13</sup>. Es por ello que se ha buscado realizar la combinación de éste biopolímero con otros materiales que pueden mejorar su desempeño o potencializarlo, como es el caso del alcohol polivinílico, glicerina y extractos naturales.

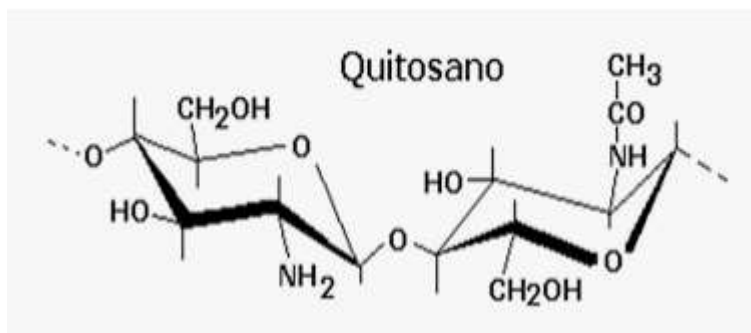


Figura 1. Estructura química del quitosano

#### Polialcohol vinílico (PVA)

Generalmente obtenido por la hidrólisis del poliacetato de vinilo. Puede ser clasificado de acuerdo a su grado de hidrólisis, siendo el de 99% el más utilizado en la elaboración de hidrogeles y/o apósitos.

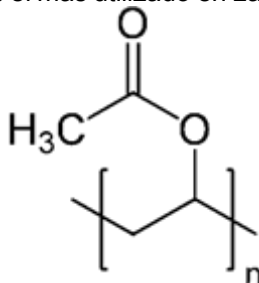


Figura 2.- Estructura de la PVA

Es un polímero hidrofílico, biodegradable, no tóxico, biocompatible, con buenas propiedades mecánicas y muy estables durante largos períodos en diferentes condiciones de temperatura y pH. Las propiedades del hidrogel estarán en función de; su concentración, proceso de fabricación, grado de hidrólisis y peso molecular. Entre sus principales aplicaciones se encuentra como; sistemas de suministro de medicamentos, apósitos húmedos, matrices para el cultivo de células, así como lentes de contacto, sensores, como reemplazo de tendones, piel, ligamentos y cartílago, entre otros<sup>14</sup>.

#### Glicerina

Este compuesto es un alcohol que se usa en cosmética por sus propiedades para la piel. También llamada glicerol, es un alcohol líquido que se utiliza para elaborar diversos productos cosméticos. La glicerina puede ayudar a mejorar la hidratación de la piel, así como tener efectos calmantes. Como humectante, la glicerina atrae naturalmente el agua. Por lo tanto, cuando se aplica sobre la piel, la glicerina promueve la retención de humedad y aumenta la hidratación de la piel. La glicerina es un alcohol, de sabor dulce, transparente y con una textura muy viscosa. Se obtiene mediante la saponificación de grasas animales y aceites vegetales, como un subproducto de la fabricación del jabón.

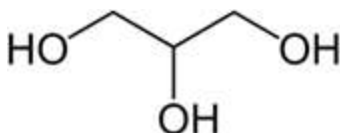


Figura 3-Estructura molecular de la glicerina.

La glicerina puede ayudar a mejorar la hidratación de la piel, así como tener efectos calmantes. Como humectante, la glicerina atrae naturalmente el agua. La glicerina es ideal para las pieles secas y sensibles, además de tratar enfermedades cutáneas, disminuir la picazón de la piel y acelerar la curación de heridas.

#### Caléndula

La caléndula (*Calendula officinalis*) es una conocida planta de tamaño hasta 50 cm de alto, con grandes capítulos de color anaranjado, de unos 5 cm de diámetro y hojas lanceoladas, de color verde alimonado, que abrazan el tallo.



Figura 4. Planta de caléndula

Es una planta de uso ancestral, y popularmente se le atribuye la estimulación de la cicatrización de las heridas. Las caléndulas se utilizaban tradicionalmente para irritaciones, eczemas, úlceras y heridas en forma de emplasto o unguento. Otras formas de preparación como la tintura o el extracto también han sido utilizadas frecuentemente. Debido a estas propiedades es que en este proyecto se propone su utilización para potencializar las propiedades del apósito de quitosano.

#### Span 80

Es un emulsionante lipofílico que tiene como función favorecer y estabilizar la incorporación del aceite de caléndula en la mezcla polimérica hidrofílica.

Permeabilidad a vapor de agua

Una combinación de la primera Ley de Fick de difusión y la Ley de Henry de solubilidad se utilizan para expresar la permeabilidad en estado estacionario de un permeante (gas o vapor de agua), a través de una barrera no porosa o con imperfecciones no significativas. La primera ley de Fick, establece que el flujo del permeante  $J$ , es dependiente del coeficiente de difusión  $D$ , de la diferencia de concentraciones  $dC$ , en la película y de la diferencia del espesor ( $dX$ ). Esto se puede expresar mediante la siguiente ecuación:

$$J = -D \frac{dC}{dX}$$

El signo negativo indica que la migración ocurre en dirección de la menor concentración. La ley de solubilidad de Henry indica que la concentración  $C$ , del permeante en la película es igual al producto del coeficiente de solubilidad  $S$ , y la presión parcial del permeante en el aire adyacente,  $P$ .  $C = SP$ . La combinación de la ley de Fick con la ley de Henry queda de la siguiente manera:

$$J = -DS \frac{dP}{dX}$$

Donde  $dP$  es la diferencia de las presiones parciales a través de la película y  $DS$  es la permeabilidad. La permeabilidad de vapor de agua en un recubrimiento es muy compleja, ya que las consecuencias de la adsorción de vapor de agua son la plastificación y la aglomeración. Por lo tanto, existe una gran dependencia de las condiciones de humedad relativa a las que es sometido. Normalmente la

permeabilidad al vapor de agua ocurre cuando un gas entra en contacto con un polímero y depende del grado de hidratación del recubrimiento. La permeabilidad se ve afectada por factores tales como:

- Polaridad de los componentes
- Naturaleza estructural del polímero
- Naturaleza del penetrante
- Homogeneidad en la dispersión del material en el recubrimiento

La microestructura y el estado superficial de un recubrimiento dependen principalmente de la técnica de preparación. En los recubrimientos emulsificados la superficie es generalmente irregular y su estructura heterogénea. El espesor también es un factor importante que afecta los valores de permeabilidad. La transferencia de vapor de agua en un recubrimiento emulsificado disminuye al incrementar la hidrofobicidad ya que el paso de vapor de agua ocurre preferentemente a través de la matriz hidrofílica.

El agua es el constituyente más abundante en el cuerpo humano y en los fluidos de igual manera forma gran parte, el agua constituye un disolvente para las numerosas especies químicas que pueden difundirse y reaccionar entre ellas. Los microorganismos necesitan la presencia de agua, en forma disponible, para crecer y llevar a cabo sus funciones metabólicas.

La mejor forma de medir la disponibilidad de agua es mediante la actividad de agua ( $a_w$ ). La actividad de agua también se relaciona con la humedad relativa en el equilibrio (HRE) que se refiere estrictamente a la atmósfera en equilibrio con una solución. En forma de ecuación se convierte.

$$a_w = \frac{HRE}{100} = \%$$

Para calcular la permeabilidad a vapor de agua o WVTR

Se sella una caja con silica seca (10 gramos), y se añade parafilm teniendo cuidado de evitar dejar un área expuesta al sistema, se mete al sistema a 32 °C y se mantiene expuesto a una humedad relativa de 50% y se va viendo la evolución o cambio de peso conforme pasa el tiempo, siguiendo la siguiente formula.

$$Permeabilidad = \frac{\Delta w}{t \cdot A \cdot \Delta P} = \frac{\Delta w}{t \cdot A \cdot S \cdot (R_1 - R_2)}$$

Donde  $\Delta w$ , es el cambio de peso en gramos que ocurre en el tiempo  $t$  en horas,  $A$  es el área expuesta en metros cuadrados,  $S$  es la presión de vapor de saturación en mmHg ( $1.333 \times 10^2$  Pa),  $R_1$  es la humedad relativa del sistema y  $R_2$  es la humedad dentro de la caja, para este caso 50% y 0% HR, respectivamente.

La permeabilidad obtenida se multiplica por el espesor y se tiene la permeancia de las películas al vapor de agua.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Material

Quitosano de bajo peso molecular (Sigma Aldrich), alcohol polivinílico ( $M_n=83,000-93,000$  g/mol, Sigma Aldrich) y grado de hidrólisis de 99%. Ácido acético glacial (Sigma Aldrich), glicerina grado comercial, surfactante Spam 80 (Sigma Aldrich) y agua tridestilada.

### Preparación de las biopelículas.

La preparación de las biopelículas se realizó conforme al estudios previamente realizados (ref-calixto). En un matraz se coloca agua destilada y solución de PVA, la cual se prepara poniendo la cantidad adecuada de PVA en un volumen de agua tridestilada se mantiene en agitación magnética y se lleva hasta una temperatura de 80°C durante una hora aproximadamente, completamente disuelto el PVA y a temperatura ambiente se adiciona una cantidad de ácido acético para tener una concentración final del 2%. La mezcla se agita a 300 rpm, durante dos minutos para homogenizarla, después de éste tiempo se agrega el quitosano de manera gradual en el matraz y se suben las revoluciones a 350. Tanto el quitosano como el PVA se incorporan en un porcentaje de 1% peso/volumen. Después de media hora de agitación se incorpora la glicerina, en un porcentaje de 5%, respecto al volumen final de la solución. El aceite de caléndula y el surfactante Spam 80 (1.25% respecto al aceite) se mezclan y se mantiene en agitación durante una hora, posterior a esto se

incorporan al final a la solución polimérica. La solución fue vaciada en cajas Petri. El secado de las películas se realizó en una incubadora a 28°C durante 24h, utilizando el método de evaporación lenta o "casting".

#### *Pruebas mecánicas*

Se utilizó una máquina universal SHIMATSU de una tonelada (AGS-X 10KN) a temperatura ambiente con una longitud de calibre de 100mm y con una velocidad de 1mm/min. Las pruebas serán realizadas bajo la norma ISO 527-1:1993. La probeta tenía 150 mm de longitud y 25 mm de ancho.

#### *Permeabilidad al agua WVTR*

En una caja Petri de poliestireno se depositan 10g de sílica seca y se cubre con la biopelícula a evaluar, sobre ésta se coloca la tapa de la caja Petri, la cual tiene pequeños orificios en toda su superficie, posterior a esto se mete a una estufa a 32 °C y una humedad relativa de 50%, cada media hora se registra el cambio de peso. Para determinar la permeabilidad se utiliza la siguiente formula,

$$\text{Permeabilidad} = \frac{\Delta w}{t \cdot A \cdot \Delta P} = \frac{\Delta w}{t \cdot A \cdot S \cdot (R_1 - R_2)}$$

Donde;

$\Delta w$ = es el cambio de peso en gramos que ocurre en el tiempo t en horas, A es el área expuesta en metros cuadrados, S es la presión de vapor de saturación en mm de Hg ( $1.333 \times 10^2$  Pa), R1 es la humedad relativa del sistema y R2 es la humedad dentro de la caja, para este caso 50% y 0% HR, respectivamente. La permeabilidad obtenida se multiplica por el espesor y se tiene la permeancia de las películas al vapor de agua.

#### *Ensayo de actividad citotóxica de biopelículas.*

Fibroblastos gingivales humanos (HGF) serán cultivados en medio de Cultivo de águila modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (FBS) desactivado por calor al 10%, 100 UI/mL de penicilina G y 100 µg/mL de sulfato de estreptomycin. Los HGF inoculados a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/ml e incubados a 37°C, 5% de CO2 y 95% de humedad relativa durante 48 horas para permitir una adhesión y densidad celular adecuada. Las biopelículas serán inoculadas en los platos de cultivo durante 24, 48, 72 y 96 horas. La viabilidad celular se determinará mediante el ensayo de MTT. En resumen, 0.2 mg/mL del reactivo será disuelto en medio de cultivo y se incubarán las células durante 4 horas a 37°C, 5% de CO2 y 95% de humedad. El formazán será disuelto con dimetil sulfóxido (DMSO), la viabilidad celular por actividad metabólica será determinada en un lector de microplaca a 570 nm (Multiskan go, Biochromatic Labssystem, Finlandia). Análisis de resultados de las pruebas de citotoxicidad. El análisis de los datos estará con base a la norma ISO 10993-5:1999 E: Biological evaluation of medical devices--Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Se realizarán tres experimentos independientes por triplicado cada muestra y se determinará la media, desviación estándar y porcentajes. Los datos serán sometidos a pruebas de Shapiro-Wilks y prueba de ANOVA de una vía post hoc de Tukey. La significancia estadística será fijada con un valor p

## **RESULTADOS**

### **Síntesis**

El orden de adición de los reactivos favorece su integración. El surfactante, Span 80 no tóxico, permite una adecuada incorporación y estabilidad del aceite de caléndula en biopelícula. El aceite se mezcla con el surfactante y se incorpora al final.

Las condiciones finales en la síntesis permiten establecer que la composición más adecuada del surfactante para la incorporación del aceite de caléndula y estabilización del mismo fue del 1,25%.

Los resultados del infrarrojo no proporcionan gran información, debido que al parecer el PVA traslapa las señales de los otros reactivos.

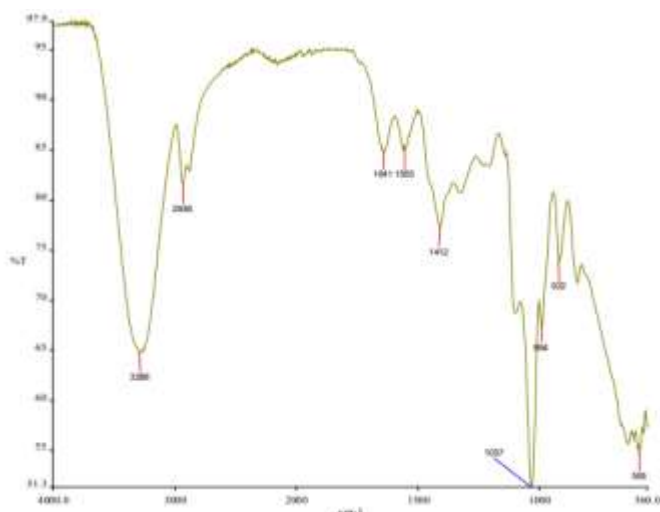


Figura 5. Espectro de infrarrojo de la biopelícula quitosano/PVA/Glicerina.

#### Análisis por TGA.

Película	Porcentaje de humedad (%)	Temperatura de máxima velocidad de pérdida de peso (°C)	Porcentaje de peso residual a 300 °C (%)
B	20	205	15
B-AC/1	25	211	10
B-AC/2	20	213	18

#### Pruebas mecánicas.

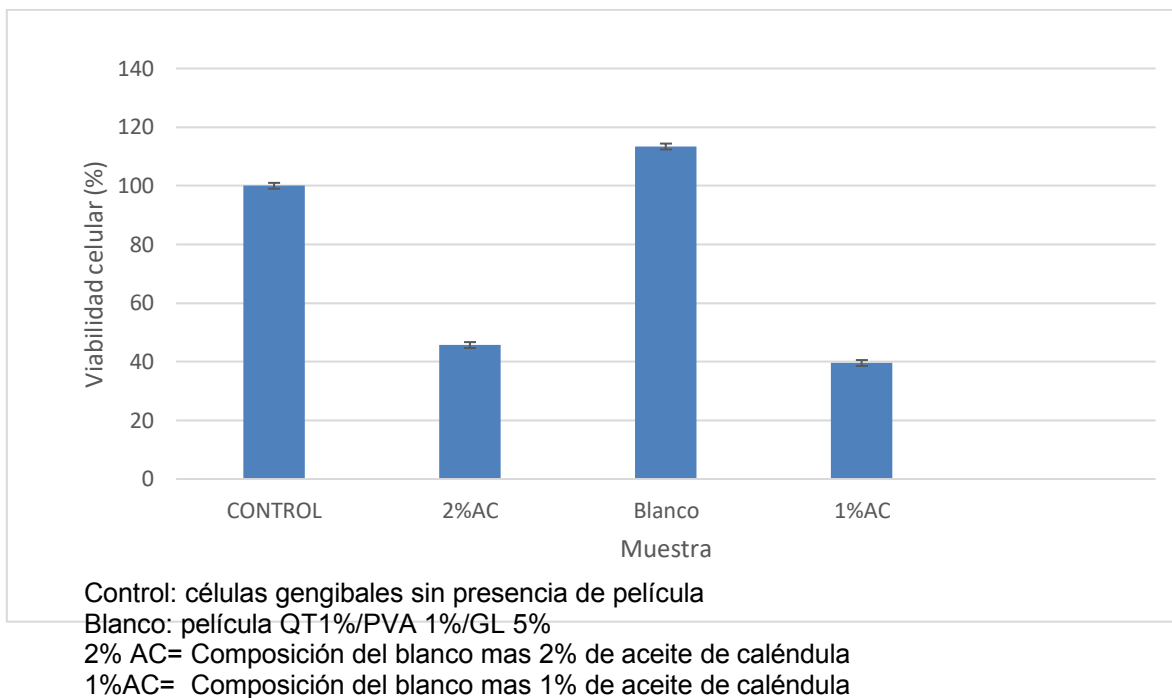
El efecto del aceite de caléndula es poco significativo de acuerdo a los resultados obtenidos de las pruebas mecánicas, este se puede atribuir a la presencia del surfactante el cual permite una buena dispersión y estabilización del aceite en la matriz polimérica.

Película	Módulo (Mpa)	Desviación estándar
B	0.81	±0.19
B-AC/1	0.83	±0.14

#### Pruebas de viabilidad celular

Las pruebas de viabilidad celular muestran que la presencia del aceite de caléndula disminuyen la viabilidad celular respecto al blanco, así como a la biopelícula sin aceite. Además se observa que en cuanto a la concentración no existe un cambio sigbificativo





## CONCLUSIÓN

El orden de adición de los reactivos así como la incorporación de surfactante, spam 80 favorece la dispersión del aceite de caléndula en la biopelícula.

El análisis por espectroscopía infrarroja no muestra diferencias entre el blanco y el 1%AC.

El AC modifica ligeramente la temperatura de máxima velocidad de descomposición.

La incorporación del AC, tiene efecto poco significativo respecto del blanco en el módulo.

La viabilidad celular disminuye casi el 40% por la presencia del AC, respecto al blanco.

## BIBLIOGRAFÍA

1. F. L. Suárez, J. Tulandé, J. H. Mina J. Peñaranda "Desarrollo de Apósitos de Quitosano para su posible aplicación en la regeneración celular". *Revista Colombiana de Materiales*. (2014). No 5, pp 56-63. Edición especial artículos cortos
2. S. Purna, M. Babu M. "Collagen based dressings: a review". *Burns* (2000);26:54–62.
3. T. Chandy, C. Sharma. "Chitosan as a biomaterial". *Biomater Artif Cells Artif Organs*; (2000), 18:1–24.
4. R. Muzzarelli. "Biochemical significance of exogenous chitins and chitosans in animals and patients". *Carbohydr Polym* 1993;20:7–16.
5. Y. Shigemasa, S. Minami S. "Application of chitin and chitosan for biomaterial". *Biotechnol Genet Eng Rev*; (1995), 13:383–420.
6. J. M. Rosiak, P. Ulanski, L.A. Pajewski, F. Yosh, K. Makuuchi. "Radiation formation of hydrogels for biomedical purposes. Some remarks and comments". *Radiat Phys Chem* (1995);46:161–8.
7. J. M. Rosiak, J. Olejniczak. "Medical applications of radiation formed hydrogels". *Radiat Phys Chem*; (1993), 42(4–6):903–6.
8. S. Benamer, M. Mahlous, A. Boukrif, B. Mansouri, S. Larbi. "Synthesis and characterisation of hydrogels based on poly(vinyl pyrrolidone)". *Nucl Instrum Methods Phys Res B*. (2006); 248:284–90.
9. L. Varshney. "Role of natural polysaccharides in radiation formation of PVA–hydrogel wound dressing". *Nucl Instrum Methods Phys Res B*. (2007);255:343–9.

10. W. Paul, C.P. Sharma. "Chitosan and alginate wound dressings: a short review". *Trends Biomater Artif Organs*. (2004), 18(1):18–23.
11. J. Kumirska., M.X. Weinhold, J. Thöming, P. Stepnowski. "Biomedical activity of Chitin/chitosan Based materials- Influence of Physicochemical properties apart from molecular weight and degree of N-acetylation". *Polym*. (2011);3-1875-1901.
12. M.E Calixto, R. García, J. Hernández, J. F., Louvier. A., García. "Biopelículas plastificadas de Quitosano para la regeneración celular", *Research J.*,(2019):1(1) 1-11.

## MATERIA ORGANICA Y PH DE SUELOS AGRICOLAS DE LA RIVERA DEL LAGO DE CUITZEO

Mariela Casillas Corona<sup>1</sup> y María Alcalá De Jesús <sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Institución de adscripción A, <sup>2</sup>Institución de adscripción B.  
Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich.  
e-mail: [\\_mari\\_liz87@msn.com](mailto:_mari_liz87@msn.com).

### RESUMEN

Las propiedades químicas de los suelos presentan relaciones estrechas entre ellas y de estas también depende la productividad agrícola entre las cuales se encuentran la Materia orgánica (MO) y el pH que son de suma importancia en la productividad agrícola. Los suelos de la rivera del lago de Cuitzeo han disminuido su productividad en los últimos años, los agricultores argumentan que debido a las tolvaneras presentes en esa región las propiedades químicas no son las adecuadas para los cultivos; por lo cual el objetivo de este trabajo fue ver la relación entre la MO y el pH de suelos agrícolas de la rivera del lago de Cuitzeo. Se realizaron pequeños perfiles de 30 cm de profundidad de los cuales se tomaron muestras se llevaron al laboratorio para secarlas y posteriormente analizarlas; la MO se determinó por el método de combustión húmeda y la de pH b con el potenciómetro. El valor de MO varía de 2.1 % e clase media a 10.9 % muy alta y los pH 6.6 ácidos a 11.2 alcalinos, los valores en su mayoría presentan una relación directa esto es al aumentar la MO lo mismo sucede con el pH. Los resultados pueden estar influyendo en la productividad agrícola ya que los pH son alcalinos y no son aptos para la siembra de ese lugar y en efecto las propiedades químicas presentan una relación directa por lo que es necesario realizar más estudios.

### INTRODUCCIÓN

Los suelos agrícolas han disminuido la producción en los últimos años debido principalmente al mal manejo y el uso excesivo de fertilizantes químicos lo que ocasiona modificaciones en las propiedades químicas de los suelos; entre las cuales se encuentran el pH y la materia orgánica (MO), el primero es una de las propiedades más importantes en los suelos porque de este depende la disponibilidad de los nutrientes para los cultivos y se relaciona con el contenido de MO al depender de él la actividad de los microorganismos encargados de la mineralización de la MO; Ramírez (1997) menciona que pH y MO junto a otras propiedades determinan la fertilidad del suelo.

Los suelos agrícolas de la rivera del lago de Cuitzeo han presentado varios problemas ente los cuales el bajo rendimiento de productividad en los últimos años por lo que la agricultura ya no es redituable para los campesinos de esta región así mismo, ellos señalan que la problemática es debido a las tolvaneras que se presentan en épocas de estiaje las cuales pueden haber ocasionado cambio en las propiedades químicas de los suelos por el alto contenido de sales que traen consigo, es por ello que el objetivo de este trabajo fue analizar si existe relación entre la MO y el pH de suelos agrícolas de la rivera del lago de Cuitzeo.

### PARTE EXPERIMENTAL

El área de estudio se localiza en varias comunidades en la ribera oeste del Lago de Cuitzeo: Copándaro, San Agustín del Maíz, Santa Rita, El Salitre, Chucándiro, La Estancia, Arúmbaro, Huandacareo, Cuitzeo y San Agustín del Pulque. En los siguientes párrafos se hará una breve descripción de la Cuenca del Lago de Cuitzeo (Figura 1) para enseguida abordar aspectos de las localidades indicadas.

La Cuenca del Lago de Cuitzeo se encuentra al norte del estado de Michoacán entre las coordenadas 19°30' y 20°05' de latitud norte y, 100°35' y 101°30' de longitud oeste; tiene una extensión aproximada de 4000 km<sup>2</sup>. El nombre de Cuitzeo proviene de la palabra purhépecha "cuiseo" que significa "lugar de tinajas" (Bravo *et al.*, 2008).

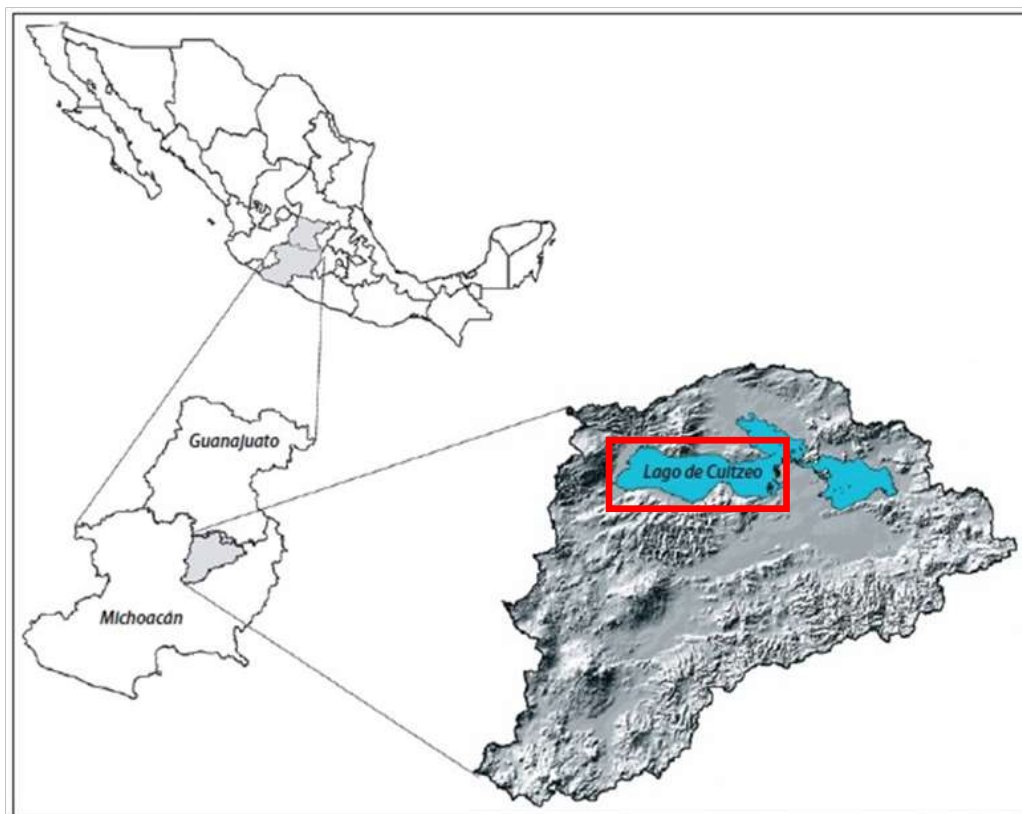



Figura 1. Ubicación de la cuenca del Lago de Cuitzeo.

 Área de estudio: ribera oeste del Lago.

Para obtener las muestras de suelo primero se georreferenciaron los puntos a muestrear (Cuadro 1), en cada sitio de estudio se realizaron cortes de suelo de 30 cm e largo por 30 cm de ancho con la ayuda de una barra y pala, se tomó aproximadamente 0.5 kg de suelo, se etiquetó y se llevó al laboratorio para su posterior tratamiento. Las muestras de suelo se dejaron secar al aire y en la sombra. Posteriormente, el suelo se trituroó y se pasó por un tamiz de 2.0 mm de diámetro para obtener la fracción de tierra fina con la que se realizaron los análisis de los suelos.

Los análisis se realizaron de la siguiente manera de acuerdo a la Norma oficial Mexicana (DOF, 2003):

*pH*: Se determinó en una relación suelo agua 1:2.5 medido en potenciómetro marca Conductronic PC 45; *Materia orgánica*. Se realizó mediante el método de combustión húmeda de Walkley y Black

Cuadro 1. Georreferencia de los sitios de estudio en la ribera oeste del Lago de Cuitzeo.

Sitio	Simbología	Localidad	Coordenadas	
			LN	LW
1	SR1	Santa. Rita	19°54'41.7"	101°15'51.6"
2	SR2	Santa. Rita	19°54'22.5"	101°13'19.07"
3	SR3	Santa. Rita	19°54'4.95"	101°13'23.92"
4	SR4	Santa. Rita	19°54'28.20	101°13'24.8"
5	C1	Copándaro	19°53'25.38"	101°13'54.25"
6	C2	Copándaro	19°53'51.7"	101°13'34.80"
7	C3	Copándaro	19°54'22.5"	101°15'58.5"
8	C4	Copándaro	19°54'30"	101°15'57.5"
9	SAM1	S.A del Maíz	19°54'53.5"	101°15'50.1"
10	SAM2	S.A del Maíz	19°53'38"	101°10'34.7"
11	SAM3	S.A del Maíz	19°53'36.6"	101°10'27.6"
12	SAM4	S.A del Maíz	19°53'29.4"	101°10'25.34"
13	A1	Arumbaro	19°54'27.4"	101°11'45.7"
14	A2	Arumbaro	19°52'59.1"	101°11'38.6"
15	A3	Arumbaro	19°52'46.4"	101°11'40.4.6"
16	A4	Arumbaro	19°52'45.81"	101°11'36.73"
17	H1	Huandacareo	19°58'20.3"	101°15'08.3"
18	H2	Huandacareo	19°58'17.2"	101°15'02.7"
19	H3	Huandacareo	19°58'35.2"	101°15'05.7"
20	S1	Salitre	19°54'27.1"	101°18'05.7"
21	S2	Salitre	19°54'30.6"	101°17'59.9"
22	S3	Salitre	19°54'16.3"	101°18'35.7"
23	S4	Salitre	19°53'44.4"	101°18'58.3"
24	Ch1	Chucandiro	19°55'21.0"	101°20'00.8"
25	Ch2	Chucandiro	19°55'22.9"	101°19'44.2"
26	Ch3	Chucandiro	19°55'22.6"	101°20'08.5"
27	Ch4	Chucandiro	19°56'8.47"	101°20'11.71"
28	LE1	La Estancia	19°58'19.9"	101°17'15.3"
29	LE2	La Estancia	19°58'20.8"	101°17'48.4"
30	LE3	La Estancia	19°58'37.4"	101°18'8.8"
31	CE1	Cuitzeo E	19°57'55.2"	101°9'9.8"
32	CE2	Cuitzeo E	19°58'6.7"	101°9'15.8"
33	CE3	Cuitzeo E	19°58'12.6"	101°9'14.9"
34	CS1	Cuitzeo salida	19°57'.57.5"	101°8'17.1"
35	CS2	Cuitzeo salida	19°57'46"	101°7'58.1"
36	CS3	Cuitzeo salida	19°57'29.5"	101°8'9.7."
37	SAP1	S.A del Pulque	19°57'35"	101°4'56.2"
38	SAP2	S.A del Pulque	19°57'28.6"	101°4'56.5"
39	SAP3	S.A del Pulque	19°57'38"	101°5'3.5"
40	SAP4	S.A del Pulque	19°57'27.5"	101°5'19.5"

S. A.: San Agustín, Cuitzeo E: Cuitzeo entrada (Oriente).

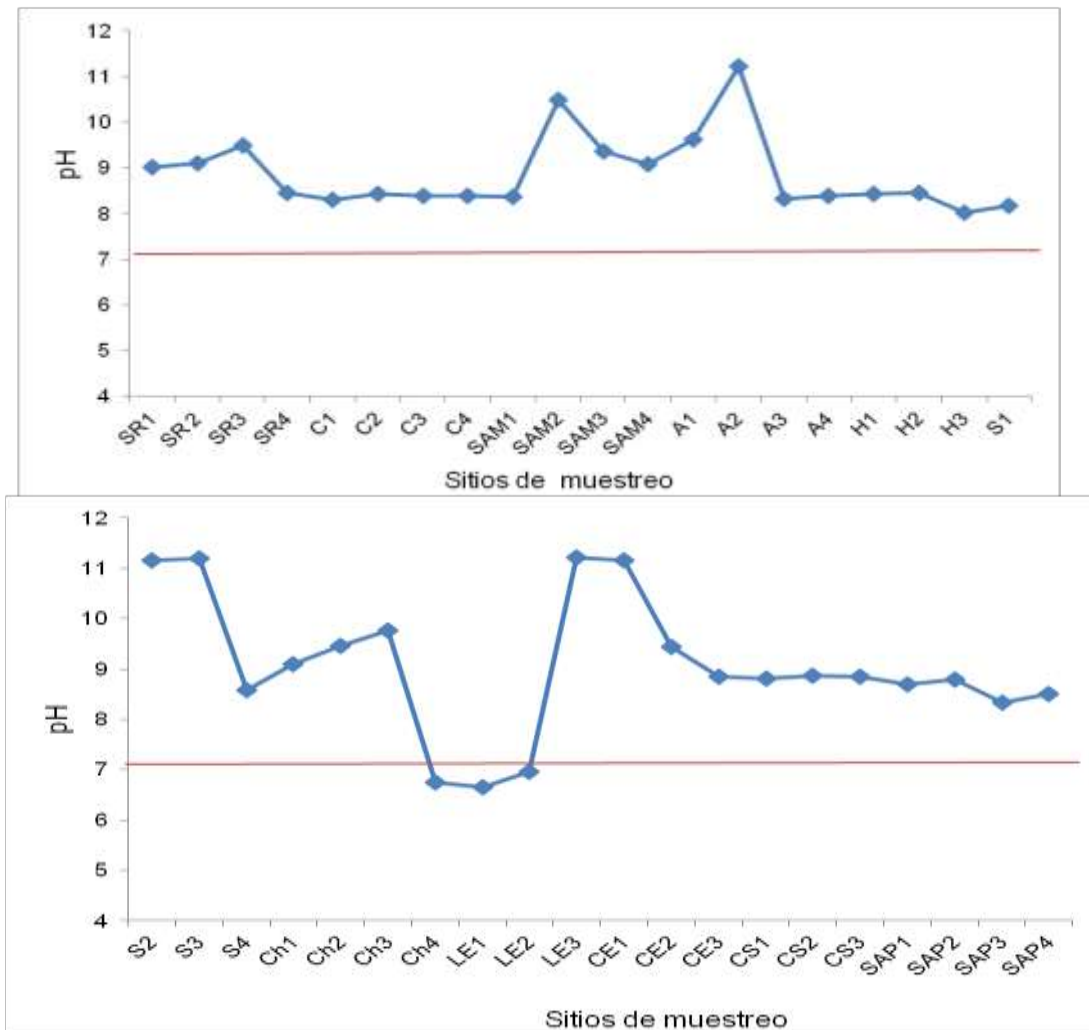
## RESULTADOS

Los resultados para las propiedades químicas se presentan a continuación.

*Reacción del suelo (pH).* El pH de los suelos estudiados varía según sus clases de neutro (6.65 a 8.44) a fuertemente alcalinos (8.58 a 11.29), predominando los últimos. Valores de pH de 6.9 en suelos se han reportado para la cuenca del lago de Cuitzeo (Ortiz-Villanueva y Ortiz 2010) y pH neutros (7.0) a altamente alcalinos (10), valores que coinciden con los encontrados en este trabajo (Casillas, 2016; Alfaro 2010 y Villalobos 2008).

Como se puede observar en la (Figura 2) la línea roja indica el valor neutro del pH, por lo que se puede apreciar que la mayoría de los sitios están por encima de este valor a excepción de tres sitios correspondientes a las comunidades de Chucandiro y La estancia.

Las pocas lluvias y la alta evaporación de las sales incrementan el pH (Zamora *et al.*, 2005) proceso que se ha presentado en los últimos años en las partes secas del lago de Cuitzeo las sales acumuladas son transportadas con las tolvaneras es hasta llegar a las parcelas e incrementar el pH de estos suelos agrícolas además del uso continuo de fertilizantes.



SR= Santa Rita, C= Copándaro, SAM= San Agustín del Maíz, A= Arumbaro, H= Huandacareo,  
 S= Salitre, Ch= Chucandiro, LE= La Estancia, CE= Cuitzeo Entrada, CS= Cuitzeo Salida, SAP= San Agustín del Pulque

Figura 2. pH en suelos agrícolas de la cuenca del Lago de Cuitzeo

*Materia orgánica (MO)*. La clase de MO varía de clase muy baja (0.19%) a clase muy alta (10.94%) (Figura 3). El alto contenido de MO en algunos casos indica la calidad del suelo y la productividad agrícola aunque este contenido también depende de la intensidad de labranza y uso de fertilizantes. La MO adsorbe a elementos como el Cu y Ni reteniéndolos y evitando su disponibilidad al formar complejos (Jaramillo, 2002; Sánchez, 2003). que facilitara su solubilidad, disponibilidad y dispersión de nutrientes (Acosta, 2007).

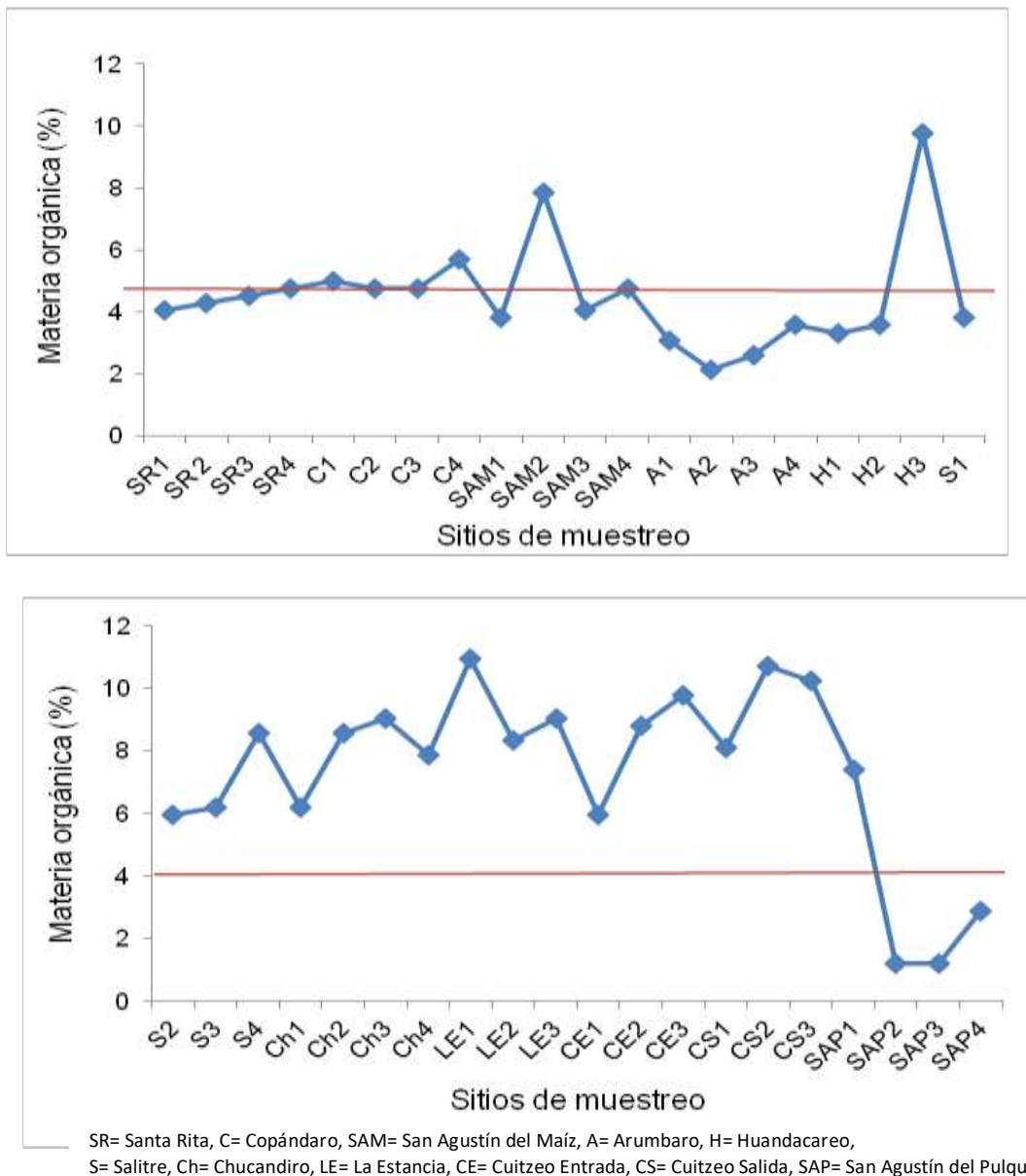


Figura 3. Materia orgánica en suelos agrícolas de la cuenca del Lago

Los resultados de pH y MO en la mayoría de los suelos muestra una relación directa es decir al aumentar el pH lo mismo pasa con la MO incrementa, se esperaría un pH con tendencia a la acidificación por el uso constante de fertilizantes sin embargo, el contenido de sales es mayor pues los suelos presentan valores alcalinos. Cuando un suelo se empieza a deteriorar debido al manejo lo primero que empieza a cambiar son sus propiedades químicas (Torres *et al.*, 2006).

**CONCLUSIONES**

Los suelos presentan pH alcalinos y alto contenido de materia orgánica.



Las propiedades químicas de los suelos si presentan una relación directa es decir al incrementar el pH en la mayoría de los sitios también la MO incrementa. La clases de MO en su mayoría son altas pero no es suficiente para los cultivos debido a que los valores de pH son muy alcalinos lo cual no es favorable para la agricultura de la cuenca del Lago de Cuitzeo.

El incremento de los valores de pH puede estar relacionado con las sales provenientes de las partes secas el lago e Cuitzeo transportadas por las tolvaneras y las cuales se acumulan en los suelos de las parcelas que rodean el Lago.

Es necesario realizar estudios más a detalle donde se relacionen mayor número de propiedades.

## BIBLIOGRAFÍA

1. M. Acosta A. Determinación de metales pesados en suelos agrícolas del Valle del Mezquital, Hgo (2007). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Tesis para obtener el grado de biólogo.
2. R. Alfaro. Estudio de la movilidad y toxicidad de metales pesados y arsénico en agua y sedimentos del lago de Cuitzeo, Michoacán (2010). Tesis Doctoral. Universidad Autónoma del Estado de México
3. M. Casillas, C. Metales pesados y su impacto en la población humana del municipio de Copándaro, Michoacán. (2016). Tesis de Maestría en Geociencias y Planificación del territorio. UMSNH.
4. M. Bravo E, F. Oliva G., E. Patrón R., M. Endoza C, Camacho, G. B., & López, E. G. La cuenca del lago de Cuitzeo: problemática, perspectiva y retos hacia el desarrollo sostenible (2008).. *Fondo Editorial Morevallado. Morelia, Michoacán, México.*
5. D. F. Jaramillo J. Introducción a la Ciencia del Suelo. (2002). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Medellín. 613 pp.
6. B. Ortiz-Villanueva, C. A. Ortiz S. Edafología. 7ª ed. en español (2010). Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Suelos. México, D. F. V. A Gómez C (Ed).
7. C. R. Ramirez. "Propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos", CONVENIO FENALCE - SENA - SAC. (1997), primera Edición.
8. M. I. Sánchez B. Determinación de metales pesados en suelos de Medina del campo (Valladolid). Contenidos extraíbles, niveles fondo y de referencia. (2003). Tesis de Doctorado. Universidad de Valladolid. Disponible en: <http://bvc.s3.dev.cervantesvirtual.com/pdfparser/0010148e-82b2-11df-acc7-002185ce6064.pdf> (Revisado el 20 de julio de 2021).
9. DOF 2003. Norma Oficial Mexicana. 2003 (23 de abril) NOM-023-SEMARNAT-2001. p 73.
10. N. Torres, D, Rodríguez, H. Yendis, A. Florentino y F. Zamora. Cambios en algunas propiedades químicas del suelo según el uso de la tierra en el sector El Cebollal, estado Falcón, Venezuela. (2006) *Bioagro* 18(2): 123-128.
11. B. Villalobos-Castañeda, Ruth Alfaro-Cuevas, Raúl Cortés-Martínez, Verónica Martínez-Miranda y Liliana Márquez-Benavides. DISTRIBUTION AND Partitioning of iron, zinc, and arsenic in surface sediments in the grande river mouth to Cuitzeo lake, México. *Springer Science. Environ Monit Assess* (2010) 166:331-346. DOI 10.1007/10661-009-1005-7.
12. J.P. Zamora, F. Mogollón y N. Rodríguez. Cambios en la biomasa microbiana y la actividad enzimática inducidos por la rotación de cultivos en un suelo bajo producción de hortalizas en el estado Falcón, Venezuela (2005). *Multiciencias* 5(1): 62-70.

**ANÁLISIS COMPUTACIONAL DE POLIÉSTERES-URETANOS AUTOCURABLES**

Iván Alberto Granados Segoviano<sup>1</sup>, Fernando Orozco Guerrero<sup>1</sup>, Isis Rodríguez Sánchez<sup>2</sup>,  
Ma. Elena Calixto Olalde<sup>1</sup>, Ana Guadalupe Alpizar Negrete<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, <sup>2</sup>Unidad Profesional Interdisciplinaria de ingeniería  
Campus Guanajuato del Instituto Politécnico Nacional.

\*ana.an@irapuato.tecnm.mx

**RESUMEN**

En los últimos años los materiales autocurables han provocado gran interés en sectores como la medicina o automotriz, con la intención de aumentar el tiempo de vida de dichos materiales. Las cumarinas se han vuelto un centro de atención para brindarles a estos materiales la habilidad de realizar autocuración. La simulación del proceso de síntesis de estos materiales permite realizarlo de forma más eficiente, para lo cual se utilizó el programa Gaussian 09<sup>®</sup> con la Teoría de los funcionales de la Densidad (DFT) con la siguiente ruta de cálculo: B3LYP/STO-3G. Se optimizaron las moléculas: 7-hidroxi-4-metilcumarina, el poliéster-uretano y la inserción del 7-hidroxi-4-metilcumarina en la cadena del poliéster para la evaluación de la cicloadición [2+2] que proveerá la fotocuración al material polimérico. Se calcularon los descriptores de reactividad global y local de tres especies de estudio. Los resultados de los descriptores de reactividad indican un ataque por radicales para la formación de un enlace entre la cumarina y la policaprolactona-diol, además, el análisis de los espectros infrarrojos permite valorar el cambio de las bandas de absorción con respecto a la inserción de la cumarina al poliéster-uretano; por otro lado, la evaluación de los espectros de ultravioleta visible permitió determinar la banda de absorción de la fotodimerización [2+2]. En conclusión, los resultados obtenidos permitieron establecer la factibilidad de la obtención de poliésteres-uretanos fotocurables.

**INTRODUCCIÓN**

En la última década, los materiales inteligentes han sido de gran interés para el campo científico por el nivel de respuesta a estímulos hacia las condiciones ambientales (luz, pH, temperatura, campo magnético, campo eléctrico, entre otros) evaluando los cambios en sus propiedades mecánicas, propiedades ópticas, propiedades magnéticas, propiedades eléctricas etc. Su importancia radica en las múltiples aplicaciones en sectores como la medicina, aeronáutica, automotriz, ingeniería electrónica, textil y varios sectores más <sup>[1,2]</sup>.

Los polímeros son uno de los materiales que han sido estudiados exhaustivamente como una tendencia hacia los materiales inteligentes; los polímeros con memoria de forma (SMP) son una ramificación de los materiales poliméricos el cual, pueden recuperar por completo su anterior forma mediante estímulos <sup>[3]</sup>. De acuerdo con Jinlian Hu y sus colaboradores <sup>[4]</sup> los SMP tienen varias ventajas: (1) La variedad de estímulos externos que pueden recibir, (2) Facilidad a la programación para la recepción de estímulos diferentes, (3) La variedad de diseños estructurales y (4) la adaptabilidad con el ser humano. En este sentido, la diversificación de familias de polímeros ha permitido incrementar el estudio de los SMP. La familia de los poliuretanos, son uno de los materiales más estudiados, debido a su gran versatilidad fisicoquímica en las ramas de la industria como la automotriz, aeronáutica, textil, recubrimientos, calzado, así como su gran biocompatibilidad con el cuerpo humano siendo de gran impacto en el sector médico <sup>[5,6]</sup>. Sin embargo, para que los poliuretanos puedan ser receptivos necesitan ser complementados en su estructura por moléculas que respondan a estímulos como luz, calor, temperatura etc. Por otro lado, las cumarinas son moléculas orgánicas ampliamente estudiadas por la facilidad de llevar a cabo cicloadición [2+2] cuando están sometidas a una longitud de onda mayor a 300 nm que, al introducir las en la cadena polimérica del poliuretano genera un estímulo de fotocuración, reparando el daño del material <sup>[7,8,9]</sup>. Sabiendo que, en presencia de luz, se puede llevar a cabo una reacción de cicloadición formando un enlace sigma ( $\sigma$ ) a través del reordenamiento de los electrones pi ( $\pi$ ) <sup>[10]</sup>, el análisis de la densidad electrónica, su arreglo geométrico y sus propiedades fisicoquímicas de la molécula pueden ser estudiadas por medio de la química computacional. Esta estrategia es ampliamente utilizada para determinar la estructura y propiedades moleculares mediante el uso de la mecánica molecular, métodos semiempíricos, ab initio y teoría de los funcionales <sup>[11]</sup>. El método de la teoría de

los funcionales de la densidad (DFT) han probado ser eficiente en la predicción de frecuencias vibracionales a un costo computacional razonable, además, los funcionales híbridos como el B3LYP es uno de los métodos que brinda un mejor resultado a los compuestos orgánicos [12,13]. En el presente estudio, se evalúa la viabilidad de obtener poliésteres-uretanos autocurables utilizando el programa Gaussian 09® aplicando la teoría de los funcionales de la densidad (DFT) mediante un nivel de teoría B3LYP/STO-3G; se realizan estudios de descriptores de reactividad global y local, así como la obtención de espectros de infrarrojo y ultravioleta para su caracterización y evaluación de la longitud de onda para determinar cuál de las dos especies podría experimentar la fotocuración.

## TEORÍA

Los poliuretanos son polímeros que se obtienen de la combinación entre un poliol y un disocianato, clasificándose en dos grupos, los termoestables y los termoplásticos, teniendo como principal grupo funcional el uretano. Los poliuretanos se han diversificado en diferentes familias, entre ellos cabe resaltar los poliésteres-uretanos que han sido estudiados ampliamente por el sector médico, debido a sus buenas propiedades mecánicas, biodegradabilidad y biocompatibilidad con el ser humano [14]. Sin embargo, el avance de la ciencia ha propiciado que el material polimérico no solo sea biocompatible y presente un incremento en las propiedades mecánicas, sino que además exhiba estímulos de autoreparación, prolongando y controlando su vida útil. Una de las investigaciones más sobresalientes es la de Tanaka y colaboradores, en el cual publicaron el fenómeno de fotodimerización y fotoescisión reversible que se produce en las cumarinas cuando se irradian a las longitudes de onda de 254 nm y 300 nm controlando el almacenamiento y liberación de un fármaco [15].

Las cumarinas son compuestos orgánicos pertenecientes a la familia de las benzopironas; su obtención se lleva a cabo a partir de reacciones de cicloadición de compuestos bencénicos monosustituídos o disustituídos siendo la condensación de Pechmann el más utilizado [15]. Últimamente, se han tomado en cuenta a las cumarinas en el área de los polímeros para la generación de estímulos al incidir radiación electromagnética y generar fotocuración en el material. En este sentido, la evaluación de las cumarinas por medio de métodos computacionales ha sido de gran relevancia para el entendimiento del comportamiento electrónico, como la evaluación de su estructura y sus espectros de absorción. El equipo de Zhang y colaboradores ha investigado las estructuras electrónicas, espectros de absorción y emisión de las cumarinas, utilizando la Teoría de los Funcionales de la Densidad (DFT) y los dependientes del tiempo (TD-DFT) con el uso del software Gaussian 09® [16].

Gaussian es un programa de química computacional que permite obtener cálculos desde la optimización geométrica, obtención de espectros de infrarrojo, ultravioleta, resonancia, determinación de la reactividad de un sinfín de moléculas, entre otras funciones más. Sus resultados dependen del método a utilizar, así como del conjunto base y el nivel de teoría. El conjunto base es una descripción matemática de los orbitales atómicos y moleculares de un sistema químico; su correcta elección mejorará la precisión de los resultados [17]. El método DFT ha sido utilizado para entender la reactividad química y los sitios selectivos de sistemas moleculares; su análisis depende los cálculos de energía para la obtención de descriptores de reactividad como el potencial químico, la dureza, blandura, electronegatividad y filicidad [18].

La dureza ( $\eta$ ), la filicidad ( $\omega$ ), la electronegatividad ( $\chi$ ) y la blandura (S) corresponden a los descriptores de reactividad de las moléculas como un todo determinándose de la siguiente manera:

$$\eta = \frac{I - A}{2} \quad (1)$$

$$\omega = \frac{\chi^2}{2\eta} \quad (2)$$

$$\chi = \frac{I + A}{2} \quad (3)$$

$$S = \frac{1}{2\eta} \quad (4)$$

Sabiendo que  $I$  es potencial de ionización y  $A$  es afinidad electrónica.

Concretamente; la dureza puede ser definida como la resistencia a la transferencia de carga del sistema y si el valor de este descriptor varía en un sistema duro que dará como resultado un mayor costo energético y por lo tanto tendrá poca tendencia a dar o aceptar electrones. La blandura es la contraparte de la dureza, además, predice los sitios reactivos y el tipo de ataque que sufrirá la molécula, es decir, ataque, nucleofílico, electrofílico y radicalico. La filicidad se utiliza para evaluar la reactividad de los átomos en la molécula y la electronegatividad está basada en el potencial de ionización y afinidad electrónica, el cual pueden calcularse de la siguiente manera<sup>[18,19]</sup>:

$$I = \text{Energía}(-1) - \text{Energía}(0) = E_{q^+} - E_{q^0} \quad (5)$$

$$A = \text{Energía}(0) - \text{Energía}(+1) = E_{q^0} - E_{q^-} \quad (6)$$

Donde la energía positiva, negativa y neutra calculan la energía de una estructura catiónica aniónica y radicalica. Por otro lado, el potencial de ionización y la afinidad electrónica pueden aproximarse a los orbitales HOMO y LUMO utilizando el teorema de koopmans permitiendo cuantificar la energía necesaria para la formación de un enlace sigma partiendo de un enlace pi conjugado.

## PARTE EXPERIMENTAL

Los cálculos computacionales se llevaron por el método de la teoría de los funcionales de la densidad (DFT) con la ruta de calculo B3LYP/STO-3G, usando el programa Gaussian 09®. En fase gaseosa se llevo a cabo la optimización geométrica de las moléculas: 7-hidroxi-4-metilcumarina, el poliéster-uretano, la inserción del 7-hidroxi-4-metilcumarina en la cadena polimérica y la fotodimerización del 7-hidroxi-4-metilcumarina cabeza-cabeza (HH) y cabeza-cola (HT). Los teoremas de Mulliken y Koopmans se utilizaron para calcular los descriptores de electronegatividad, dureza, blandura y filicidad así como el análisis de orbitales moleculares HOMO y LUMO. Utilizando Gauss view 6 se analizó las bandas vibracionales del espectro infrarrojo, además, el software SpecDis permitió la adquisición de los espectros ultravioleta-visible.

## RESULTADOS

Para evaluar la obtención del poliéster-uretano autocurable, se analizó la síntesis del material en dos etapas, iniciando con la obtención del poliéster-uretano lineal, partiendo de reactivos como el dietilenglicol, policaprolactona (que al reaccionar se genera la policaprolactona-diol) y el diisocianato difenilmetano. En la Figura 1A, se muestra el espectro de infrarrojo del poliéster-uretano, en el cual se identifican bandas de absorción características de los grupos funcionales causadas por las vibraciones de estiramiento ( $\nu$ ) y deformación ( $\delta$ ). A  $3757 \text{ cm}^{-1}$  se reconoce al grupo NH ( $\nu$ ) debido al enlace amida, en los picos ubicados a  $3460 \text{ cm}^{-1}$  y  $3439 \text{ cm}^{-1}$  se aprecian los grupos CH<sub>2</sub> ( $\nu$ ) y CH ( $\nu$ ), el grupo C=O ( $\nu$ ) se puede valorar a  $1891 \text{ cm}^{-1}$  correspondiendo al grupo amida del diisocianato y a  $1865 \text{ cm}^{-1}$  se identifica al grupo éster de la policaprolactona. En las bandas de absorción localizadas a  $1644 \text{ cm}^{-1}$  y  $1507 \text{ cm}^{-1}$  se identifica el grupo CH<sub>2</sub> ( $\delta$ ) debido a la cadena alifática que provee el dietilenglicol y la policaprolactona. Finalmente, el grupo funcional uretano H-N ··· O=C( $\nu$ ) se visualiza en la banda de  $1212 \text{ cm}^{-1}$ . Es importante recordar que los cálculos y la visualización del espectro infrarrojo se llevaron a cabo en ausencia de solvente y en fase gaseosa por el cual, causa la obtención de valores más altos que los documentados de manera experimental, aun así, la Figura 1A permitió corroborar la obtención del poliéster-uretano indicativo de una reacción completa. En la Figura 1B, se muestra parte de la cadena polimérica del poliéster-uretano utilizada para la obtención del espectro infrarrojo; los grupos metilos ubicados en los extremos de la cadena polimérica indican la continuación de esta.

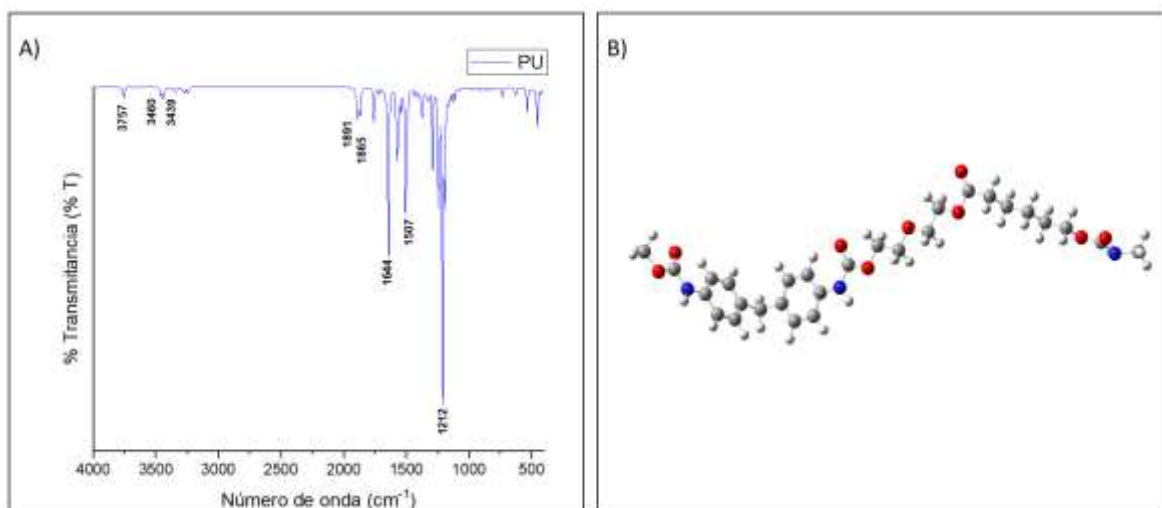


Figura 1. A) Espectro de infrarrojo del poliéster-uretano. B) Optimización geométrica de la cadena polimérica del poliéster-uretano.

En la segunda etapa se añadió la cumarina a la cadena polimérica. Para evaluar su inserción, se trabajó con descriptores de reactividad global y local. Los descriptores de reactividad global nos permiten evaluar la electronegatividad, la dureza química, el potencial químico, entre otros, con la finalidad de conocer la naturaleza del enlace químico y los descriptores de reactividad local nos permiten obtener información acerca de la reactividad de las moléculas y el control estereoespecífico asociado a una reacción química<sup>[18]</sup>. En la Figura 2, se ilustran las moléculas de las cuales se partió el estudio de los descriptores de reactividad global y local, permitiendo, además, visualizar los átomos de mayor a menor electronegatividad.

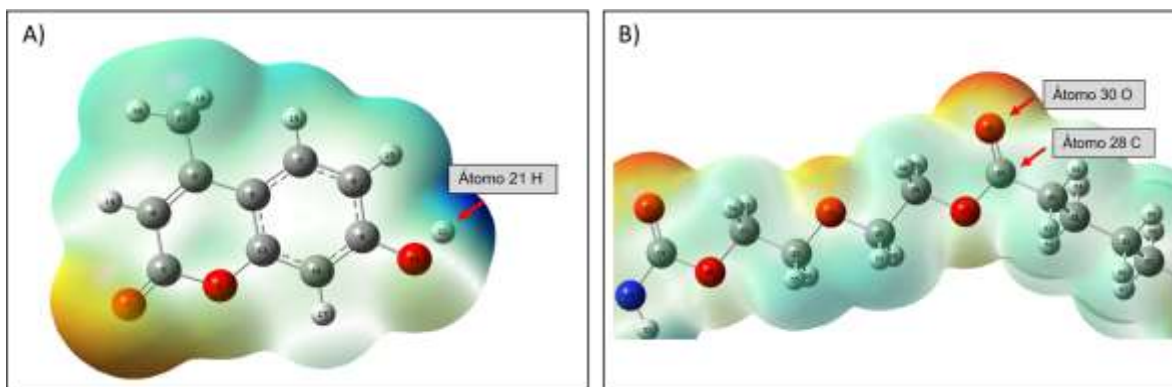


Figura 2. A) Densidad electrónica del 7-hidroxi-4-metilcumarina. B) Ataque radicalico al grupo C=O del poliéster-uretano.

Los descriptores globales se evaluaron a partir de los teoremas de Mulliken y Koopmans, registrando los valores de ambas moléculas en la Tabla 1, identificando que la dureza y la blandura en ambos teoremas suele ser poco variables, sin embargo, en la filicidad y la electronegatividad, indican un cambio en el ambiente químico en ambas moléculas, es decir, al interaccionar la cumarina y el poliéster-uretano cambian su estabilidad química identificando una variación en su reactividad para la formación de un nuevo enlace.

<b>Tabla 1. Descriptores de reactividad global con DFT/B3LYP/STO-3G, en Kcal/mol</b>				
<b>Moléculas</b>	Electronegatividad $\chi$	Dureza $\eta$	Blandura S	Filicidad $\omega$
<b>Teorema de Mulliken</b>				
<b>7-hidroxi-4-metilcumarina</b>	-33.1952	100.6525	50.3263	5.45933178
<b>Poliéster-uretano</b>	-13.5542	95.3814	47.6907	0.9412641
<b>Teorema de Koopmans</b>				
<b>7-hidroxi-4-metilcumarina</b>	-77.6229	62.4999	28.2379	48.1927219
<b>Poliéster-uretano</b>	-56.1621	92.3694	46.1847	17.0682557

La Tabla 2 muestra la selección de resultados de los descriptores locales de la cumarina como del poliéster-uretano, identificando que el átomo de hidrogeno (H,21) de la cumarina presenta un aumento significativo en el descriptor de la blandura identificándose como un sitio reactivo<sup>[18]</sup>. Como se puede apreciar en la figura 2A, el átomo 21 muestra el incremento de la longitud de enlace (de 0.9495 Å a 1.0259 Å) indicando una posible ruptura entre el oxígeno (O,13) y el hidrogeno (H,21). Por otro lado, el átomo de carbono (C,28) y el de oxígeno (O,30) del poliéster-uretano indica una disminución notable en su electronegatividad, además, como se muestra en la tabla 2 la diferencia de electronegatividad entre el átomo 28 y 30 del poliéster-uretano no son tan variables, indicando la probabilidad de llevarse un ataque radicalico en el medio de reacción (figura 2B).

<b>Tabla 2. Descriptores de reactividad local DFT/B3LYP/STO-3G, en Kcal/mol</b>					
<b>Átomo</b>	<b>Elemento</b>	Electronegatividad $\chi$	Dureza $\eta$	Blandura S	Filicidad $\omega$
<b>7-hidroxi-4-metilcumarina</b>					
<b>21</b>	H	-7.0281	21.3981	21.3353	1.1295
<b>Poliéster-uretano</b>					
<b>28</b>	C	-0.3765	2.8238	1.4433	0.0628
<b>30</b>	O	-0.5020	3.5768	1.7570	0.0628

Con base en los resultados la Figura 3, se muestra el mecanismo de reacción de un ataque radicalico entre la cumarina y el poliéster-uretano.

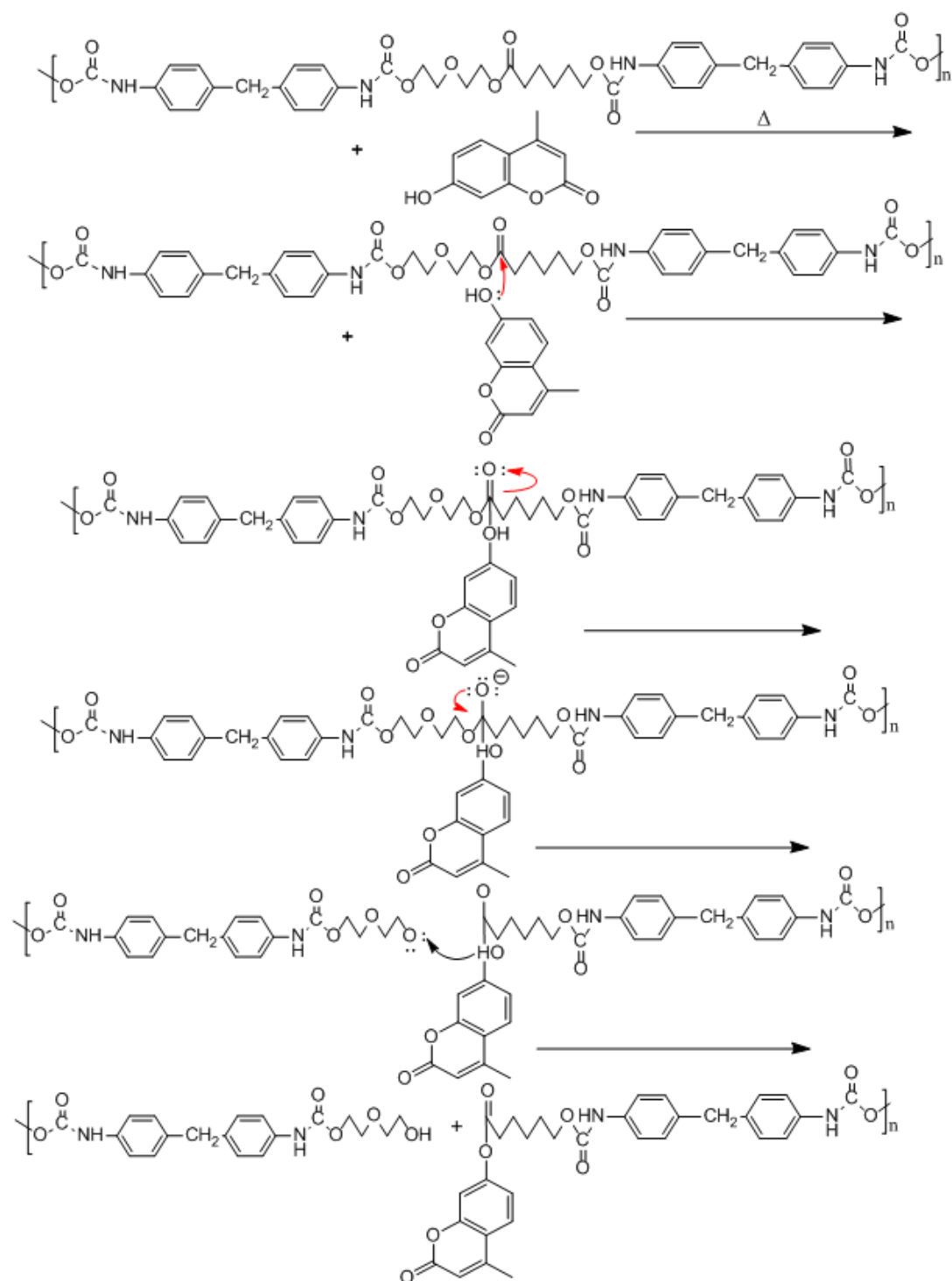


Figura 3. Mecanismo de reacción radicalico basado en los resultados de los descriptores locales.

De acuerdo con el mecanismo de reacción de la Figura 3, se propone que el oxígeno 13 de la cumarina ataque al carbono 28 perteneciente al carbonilo de la caprolactona que, como se mencionó con anterioridad es el que presenta menor electronegatividad como lo indica en la tabla 2, provocando la formación de un enlace y la ruptura homolítica entre los carbonos 27 y 28 el cual se lleva a cabo por el movimiento electrónico del del oxígeno 30 del carbonilo (caprolactona).

Finalmente, para la estabilidad electrónica del carbono 27 genera un enlace con el hidrógeno 21 de la cumarina, separándose del oxígeno 13. Por lo tanto, este estudio genera la posibilidad de obtener oligómeros en el medio de reacción propuesto.

Por otro lado, se evaluó la fotodimerización que presentaría el material al encontrarse con dos cumarinas en el extremo de la cadena polimérica, optando por la formación geométrica de la cicloadición [2+2] de la cumarina siendo esta cabeza-cabeza (HH) y cabeza-cola (H-T). En la Figura 4 se muestra tales estructuras optimizadas, siendo los grupos metilos la continuación de la cadena polimérica.

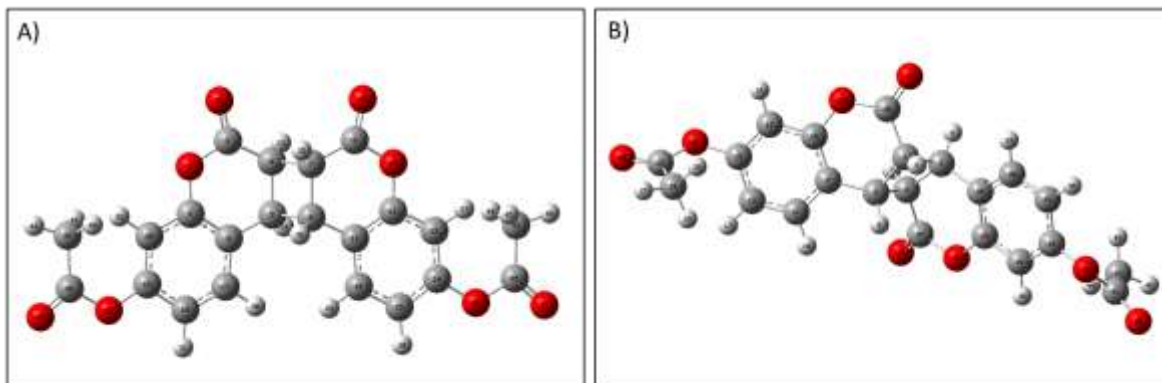


Figura 4. A) Fotodimerización de la 7-hidroxi-4-metilcumarina cabeza-cabeza (HH). B) Fotodimerización de la 7-hidroxi-4-metilcumarina cabeza-cola (HT).

Utilizando la espectroscopia ultravioleta-visible se evaluó la longitud de onda a la cual puede absorber dicho material para llevar a cabo la fotodimerización entre las cumarinas.

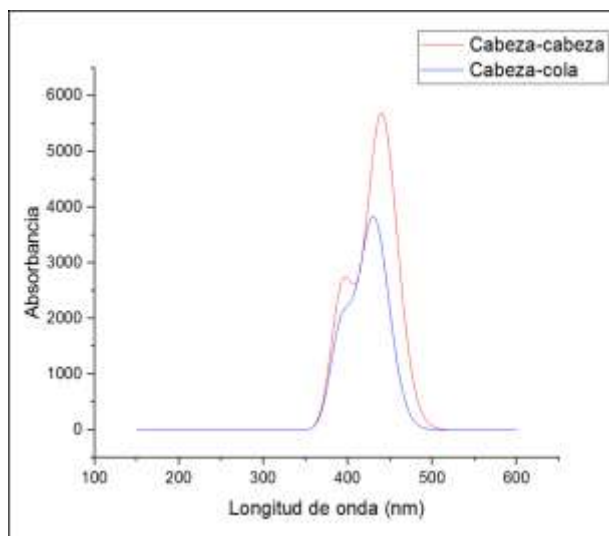


Figura 5. Espectro de ultravioleta-visible de la fotodimerización de la 7-hidroxi-4-metilcumarina cabeza-cabeza (HH) y cabeza-cola (HT).

La Figura 5 ilustra el espectro UV-Vis de la fotodimerización de la cumarina cabeza-cabeza (HH) y cabeza-cola (HT) absorbiendo una longitud de onda 349.9 nm y 430.2 nm, indicando que la fotodimerización HH caería dentro del ultravioleta lejano y la fotodimerización HT se llevaría a cabo dentro de la zona del visible.

Sin embargo, para evaluar la probabilidad de formación de la fotodimerización HH y HT, se recurrió a los descriptores globales y locales de cada molécula. La Tabla 3 muestra el contenido de los



descriptores globales en donde los resultados de los teoremas de Mulliken y Koopmans se aprecian con poca diferencia sobre los valores de energía, indicando que la fotodimerización HT es la que tiene una mayor reactividad que la fotodimerización HH.

<b>Tabla 3. Descriptores de reactividad global de la fotodimerización de la 7-hidroxi-4-metilcumarina cabeza-cabeza (HH) y cabeza-cola (HT) con DFT/B3LYP/STO-3G, en Kcal/mol.</b>				
<b>Moléculas</b>	Electronegatividad $\chi$	Dureza $\eta$	Blandura S	Filicidad $\omega$
<b>Teorema de Mulliken</b>				
<b>HH</b>	-35.9563	95.0049	47.5025	6.8399
<b>HT</b>	-36.8976	96.1972	48.0672	7.0909
<b>Teorema de Koopmans</b>				
<b>HH</b>	-77.8739	-111.1947	-55.5973	-27.2339
<b>HT</b>	-82.7685	-112.3869	-56.1621	-30.4970

En este sentido se analizaron los descriptores de reactividad local como se puede ver en la Tabla 4. Tomando en cuenta la formación del ciclobutano debido a la cicloadición [2+2], llama la atención la columna de la filicidad, el cual es el índice de reactividad global que mide la estabilización en energía cuando el sistema adquiere carga electrónica adicional del medio [19], en este sentido se percibe que la estructura más estable es la fotodimerización HH, sin embargo, utilizando el teorema de Koopmans se evaluó los orbitales HOMO y LUMO, los cuales explican la formación del enlace sigma ( $\sigma$ ) a través del reordenamiento de los electrones pi ( $\pi$ ) del sistema. Ambas moléculas muestran que, para el orbital HOMO de la fotodimerización HH es de -94.5029 Kcal/mol y de la fotodimerización HT es de -97.5777 Kcal/mol, por lo tanto, el valor más alto es el HOMO de la fotodimerización HT que proporciona una mayor densidad electrónica facilitando la formación de un enlace al ceder electrones. Por otro lado, el orbital LUMO para la fotodimerización HH es de 33.3207 Kcal/mol y el de la fotodimerización HT es de 29.6184 Kcal/mol, indicando nuevamente que el orbital LUMO de la fotodimerización HT es el orbital de menor energía permitiéndole aceptar los electrones para la formación del enlace. La Figura 6 muestra los orbitales moleculares de la fotodimerización HH y HT.

<b>Tabla 4. Descriptores de reactividad local de la fotodimerización de la 7-hidroxi-4-metilcumarina cabeza-cabeza (HH) y cabeza-cola (HT), con DFT/B3LYP/STO-3G en Kcal/mol</b>					
<b>Átomo</b>	Elemento	Electronegatividad $\chi$	Dureza $\eta$	Blandura S	Filicidad $\omega$
<b>Cabeza-Cabeza (HH)</b>					
<b>4</b>	C	2.6983	-7.0281	-3.5141	-0.5020
<b>5</b>	C	2.1963	-5.7103	-2.8865	-0.3765
<b>7</b>	C	2.6983	-7.0281	-3.5141	-0.5020
<b>8</b>	C	2.1963	-5.7103	-2.8865	-0.3765
<b>Cabeza-Cola (HT)</b>					
<b>1</b>	C	2.7610	-7.2164	-3.5768	-0.5020
<b>2</b>	C	2.1335	-5.5221	-2.6983	-0.3765
<b>3</b>	C	2.8865	-7.5929	-3.7651	-0.5648
<b>4</b>	C	2.1963	-5.7103	-2.8238	-0.4393

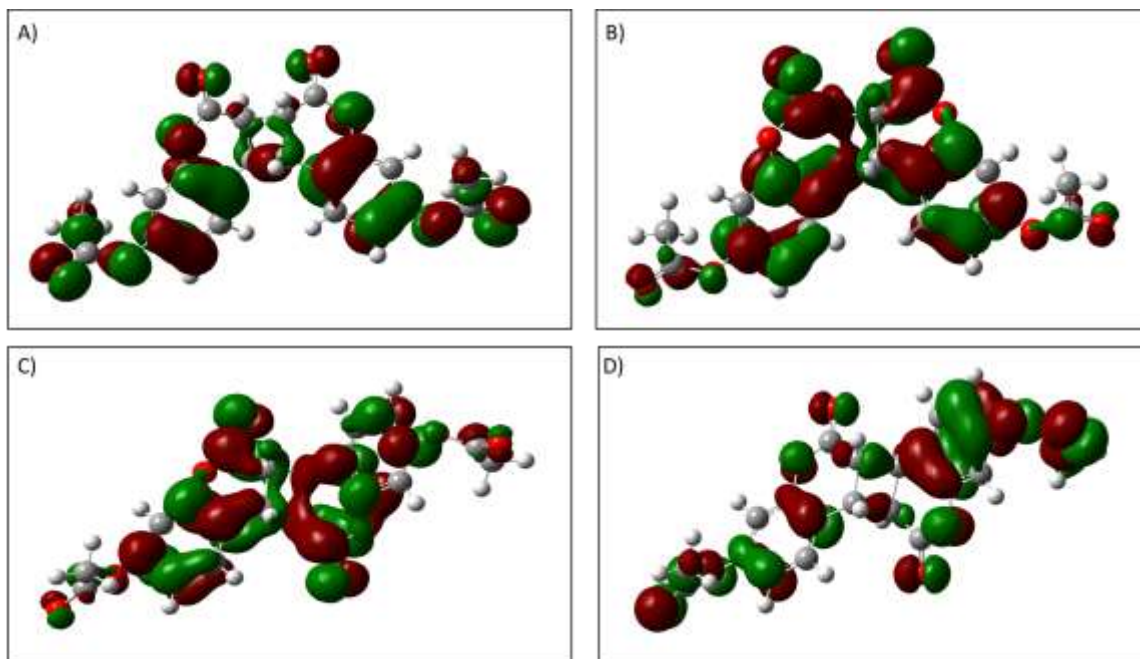


Figura 6. Fotodimerización de la 7-hidroxi-4-metilcumarina cabeza-cabeza (HH), A) Orbital HOMO, B) Orbital LUMO. Fotodimerización de la 7-hidroxi-4-metilcumarina cabeza-cola (HT), C) Orbital HOMO, D) Orbital LUMO.

## CONCLUSIONES

En este trabajo se demostró la obtención de un material polimérico autocurable utilizando el programa Gaussian09<sup>®</sup>, permitiendo evaluar su caracterización por espectroscopia infrarroja, así como el uso de los descriptores de reactividad global y local que son indispensables para el análisis computacional del material. Los descriptores de reactividad como la filicidad y la electronegatividad permitieron identificar que los átomos C28 y O30 del poliéster-uretano y el H21 de la cumarina son los átomos con mayor probabilidad a reaccionar formando oligómeros dentro de la matriz polimérica; esta evidencia nos ayuda a tomar en cuenta que la obtención de oligómeros a nivel experimental puede afectar las propiedades mecánicas del material fotocurable.

Por otro lado, los espectros de ultravioleta-visible nos permitieron identificar la longitud de onda para la fotodimerización de la 7-hidroxi-4-metilcumarina cabeza-cabeza (HH) y cabeza-cola (HT), sin embargo, utilizando nuevamente los descriptores de reactividad global, local y el análisis de orbitales moleculares, se determinó que el material fotocurable con mayor respuesta al estímulo es la fotodimerización de la 7-hidroxi-4-metilcumarina cabeza-cola (HT) expresando valores de energía en el orbital HOMO de -97.5777 Kcal/mol y el orbital LUMO de 29.6184 Kcal/mol; permitiendo aumentar la probabilidad de formación de la cicloadición [2+2] que generará el estímulo sobre el material fotocurable extendiendo así su tiempo de vida.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Harper Meng, Guoqi Li. A review of stimuli-responsive shape memory polymer composites. *Polymer.*, Vol.54, 9, 2013, pp. 2199 - 2221.
2. Fang Liu, Marek W. Recent advances and challenges in designing stimuli-responsive polymers. *Progress in Polymer Science.*, Vol. 35, 1-2, 2010, pp. 3 - 23.
3. Yongwei Wu, Huahua Huang, Yongming Chen. Synthesis of triple shape memory polyurethanes by introducing photo-responsive coumarin units into the crystalline soft segment. *Material today: Proceedings.*, Vol 16, 2019, pp. 1507 - 1511.

4. Jinlian Hu, Yong Zhu, Huahua Huang, Jing Lu. Recent advances in shape -memory polymers: structure, mechanism, functionality, modeling and applications. *Progress in Polymer Science.*, Vol. 37, 2012, pp. 1720 – 1763.
5. Abhijit Das, Prakash Mahanwar. A brief discussion on advances in polyurethanes applications. *Advanced industrial and engineering polymer research.* Vol. 3, 2020, pp. 93 – 101.
6. Monhan Prasath, Saravana Kumar Jaganathan, Ahmad Zahran Md Khudzari, Praseetha Prabhakaran. Development of advanced nanostructured polyurethane composite comprising hybrid fillers with enhanced properties for regenerative medicine. *Polymer Testing.*, Vol. 73, 2019, pp. 12 – 20.
7. N.Dennis. Addition Reaction: Cycloaddition, in *Organic Reactions Mechanisms* (John Wiley & sons 2019), Chapter 11, pp. 517- 566.
8. Man Jiang, Nicholas Paul, Nikolai Bieniek, Tiago Buckpup, Norbert Hammp, Marcus Motzkus. Photocleavage of coumarin dimers studied by femtosecond UV transient Absorption Spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics.* Vol. 19, 2017, pp.4597-4606.
9. José María Cuevas, Rubén Seoane-Rivero, Rodrigo Navarro, Ángel Marcos-Fernández. Coumarins into polyurethanes for smart and functional materials. *Polymer.* Vol. 12, 3, 2020, pp.1 - 26.
10. Francis A. Carey, Richard J. Sundberg. *Advanced Organic Chemistry Part B: Reactions and Synthesis* (Springer, Fifth edition, New York, NY, 2007), Chapter 6, pp. 474 – 478
11. Gabriel Cuevas, Fernando Cortés. *Introducción a la química computacional*, (Fondo de cultura económica, México, 2003), Chapter 1, pp. 15 - 27
12. Gang Zhang, Charles B. Musgrave. Comparison of methods for molecular orbital eigenvalue calculations. *Journal Physical Chemistry. A.* Vol. 111, 8, 2007, pp. 1554- 1561.
13. Alfredo Tlahuice Flores, Eduardo Pérez Tijerina, Sergio Mejía Rosales. Modos Vibracionales de C60 obtenidos mediante el método DFT. *Ciencia UANL.* Vol X, 3, 2007, pp. 261-268.
14. Barrera-Rivera, Marcos-Fernandez, Martinez-Richa. Chemo-Enzymatic Synthesis of Polyester Urethanes. In *green polymer chemistry: biocatalysis and biomaterials* (Washington, DC.2010), Chapter16, pp. 227-235
15. Kishor Mal, Masahiro Fujiwara, Yuko Tanaka. Photocontrolled reversible release of guest molecules from coumarin-modified mesoporous silica. *Nature.* Vol. 42, 23, 2003, pp. 350-353.
16. Yihui Bai, Fang Zhang, Jim Ying, Yingzi Wu. Theoretical investigation of the substituent effects on the electronic and optical properties of 6-substituted coumarin derivatives. *Journal of molecular structure.* Vol. 1089, 2015, pp.53 - 58.
17. Anna Tomberg. An introduction to chemistry using G09W and Avogadro software. *Gaussian 09W Tutorial.*
18. Isis Rodríguez Sánchez. Evaluación teórica de agentes de transferencia de adición-fragmentación reversible (RAFT) empleando cálculos de DFT. *Centro de investigación en materiales avanzados* (Chihuahua, chih,2009).
19. R.Parthasarathi, J. Padmanabhan, M.Elango, V. Subramanian, P.K. Chattaraj. Intermolecular reactivity through the generalized philicity concept. *Elsevier Chemical Physics Letters.* Vol. 394, 2004, pp.225 – 230.
20. J.Padmanabha, R. Parthasarathi,U.Sarkar, V. Subramanian, P.K. Chattaraj.Effect of solvation on the condensed Fukui function and the generalized philicity index. *Elsevier Chemical Physics Letters.* Vol. 383, 2004, pp.122 – 128.

## EFFECTO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LUPINOS EXALTATUS ZUCC SOBRE LA LOCOMOCIÓN EN NEURONAS GABAÉRGICAS DEL ORGANISMO MODELO *CAENORHABDITIS ELEGANS*

Gabriela Camargo Hernández<sup>1</sup>, Ana Sofía Barba Peralta<sup>2</sup>, Sergio Sánchez Enríquez<sup>3</sup>, Jaime Briseño Ramírez<sup>3</sup>, Araceli Castillo Romero<sup>4</sup>, Rafael Cortés Zarate<sup>4</sup>, Josué Alejandro Mata Sanromán<sup>2</sup> y Leonardo Hernández Hernández<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias de la Salud del Centro Universitario de los Altos, UdeG, <sup>2</sup> Centro Universitario de los Altos, Universidad de Guadalajara, <sup>3</sup>Departamento de Clínicas del Centro Universitario de los Altos, Universidad de Guadalajara, <sup>4</sup>Departamento de Microbiología y Patología del Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, <sup>5</sup>Departamento de Fisiología del Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

[gabriela.camargo@academicos.udg.mx](mailto:gabriela.camargo@academicos.udg.mx)

### RESUMEN

La acumulación de daño celular causado por especies reactivas de oxígeno (ERO) contribuye al envejecimiento, al declive funcional y al aumento en la mortalidad. Esto ha fundamentado estudios sobre daño oxidativo, algunos de ellos realizados en modelos animales, como el nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). *C. elegans* es uno de los organismos relativamente más simples, con un sistema nervioso complejo completamente mapeado, constituido por 302 neuronas, lo que permite ser usado como modelo animal en estudios fisiológicos, genéticos y farmacológicos. 26 de estas 302 neuronas del *C. elegans* son GABAérgicas y participan de manera fundamental en la locomoción del nematodo. Se han reportado antioxidantes capaces de reducir el daño celular por ERO, como vitaminas y fenoles. Un candidato como agente antioxidante es el extracto metanólico de las semillas de *Lupinus exaltatus Zucc* (*EMLEZ*), una planta que crece entre los 1800-2200 msnm en estados del centro-occidente de México (endémica de nuestro país, México). El *EMLEZ* posee flavonoides e isoflavonoides, compuestos con conocida actividad antioxidante. El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia del *EMLEZ* como antioxidante y neuroprotector en el *C. elegans*. Para esto, gusanos tratados con este extracto, fueron sometidos a daño oxidativo con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y a choque de calor (ChC [34°C]) como inductor de ERO. Evaluamos la sobrevivencia, fertilidad y locomoción (desplazamiento del *C. elegans*), con la intención de analizar un defecto o eficiencia en el desplazamiento del nematodo. Utilizamos *C. elegans* adultos de la cepa N2 Wild type. En nematodos N2 se examinó la supervivencia a diferentes dosis de *EMLEZ*, y se exploró el efecto de la exposición a choque de calor (34 °C por 1 h) sobre la locomoción del *C. elegans*, en los grupos control, ChC [34°C], *EMLEZ* y ChC [34°C + *EMLEZ*]. En nuestros resultados encontramos que los nematodos tratados con *EMLEZ* no mostraron un efecto negativo en cuanto a la supervivencia al tratamiento. En nematodos expuestos a ChC [34°C] observamos disminución en la locomoción del *C. elegans* con respecto al grupo control, mientras que el tratamiento con *EMLEZ* (0.5 mg/ml) + ChC [34°C], no se observó disminución de la locomoción del *C. elegans* con respecto al grupo control, y sin diferencias significativas en el grupo *EMLEZ* comparado con el grupo control. De este modo podemos concluir que el *EMLEZ* induce protección en el sistema locomotor del *C. elegans* ante daño oxidativo provocado por la exposición a estrés por calor y al Peróxido de Hidrogeno como agente oxidante.

Palabras clave: *Lupinus exaltatus Zucc*, *Caenorhabditis elegans*, Daño oxidativo, Antioxidantes naturales, Locomoción y Neuronas GABAérgicas.

### INTRODUCCIÓN

Los sistemas biológicos, incluido el cuerpo humano, mantienen un balance de óxido-reducción constante, preservando el equilibrio entre la producción de pro-oxidantes que se generan como resultado del metabolismo celular y los sistemas de defensas antioxidantes (Gutiérrez Venereo, 2002). La pérdida de este balance lleva a un estado de estrés oxidativo (EO), que se caracteriza por un aumento en los niveles de las llamados especies reactivas de oxígeno (ERO) que no alcanzan a ser compensadas por los sistemas de defensa antioxidante. Esto provoca daño y muerte celular, y se ha asociado con el envejecimiento y muchas enfermedades (Cabrera Céspedes and Serrano, 2000), entre ellas algunas enfermedades neurológicas como la enfermedad cerebrovascular

isquémica, los traumatismos craneales y medulares, etc. (Jiménez Jiménez, 2006). También se le ha relacionado con enfermedades neurodegenerativas como las de Parkinson, Alzheimer (EA), y con la esclerosis amiotrófica lateral.

El estrés oxidativo es incompatible con la vida a menos que existan mecanismos antioxidantes celulares de defensa que los neutralice. Dentro de los (Gutiérrez Venereo, 2002) antioxidantes endógenos se encuentran 3 enzimas que son fundamentales; la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPx). Estas enzimas destoxifican los compuestos reactivos superóxido y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La SOD convierte el superóxido en agua y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y la CAT y GPx produce agua y oxígeno a partir del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Dada la complejidad de las rutas intracelulares por las que se pueden generar radicales libres, se ha sugerido que los antioxidantes exógenos pueden ofrecer neuroprotección. En los últimos años, el empleo de antioxidantes sintéticos con fines terapéuticos ha sido altamente cuestionado. En este contexto, ha ganado interés la búsqueda y utilización de compuestos antioxidantes de origen natural. Esto se inserta dentro de la tendencia mundial actual a abordar el uso de las fuentes naturales para la obtención de fármacos efectivos contra diversas enfermedades (Adyary, 2005).

A partir de estas consideraciones, se ha propuesto el uso de extractos de plantas u otras fuentes naturales como agentes neuroprotectores, ya que estos extractos pueden constituir mezclas de compuestos antioxidantes con diversos modos de acción. Entre otras ventajas de los antioxidantes naturales puede mencionarse que exhiben una elevada diversidad molecular y funcionalidad biológica, a ello se une que muchos de estos compuestos no son tóxicos y por ende, su uso es mayormente aceptado como seguro, aunque esto no siempre es cierto y algunos antioxidantes naturales puedan tener algún riesgo toxicológico (Adyary, 2005).

Un candidato a agente antioxidante es el extracto metanólico de las semillas de plantas del género *Lupinus*. Los compuestos fenólicos tales como flavonoides e isoflavonoides están presentes en varias partes de la planta de lupino, incluyendo las semillas. Estas sustancias están relacionadas a alta actividad antioxidante y puede ser considerado como un producto natural para combatir los radicales libres causados por el estrés oxidativo.

Numerosas investigaciones se han realizado con el fin de examinar propiedades antioxidantes de extractos de plantas, algunos de estos se han realizado usando modelos animales, incluyendo al nemátodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). El *C. elegans* es un organismo simple, de fácil mantenimiento en el laboratorio y bajo costo. Además, se ha demostrado que posee las enzimas antioxidantes (CAT, SOD y GPx) y forman parte de su sistema de defensa antioxidante, del mismo modo que ocurre en los mamíferos. Asimismo, la vía de señalización del factor de crecimiento I similar a la insulina (IGF-1 por sus siglas en inglés) en *C. elegans* (que controlan su metabolismo, desarrollo, longevidad y respuesta al estrés) muestra un alto grado de conservación evolutiva de secuencias de proteínas y de sitios de fosforilación, lo cual sugiere un complejo regulatorio similar en la señalización por insulina de mamíferos. En este sentido, este nemátodo brinda una oportunidad hacia una visión integrada de la respuesta del organismo a diversos estreses ambientales en correlación con sus mecanismos celulares y moleculares (Chiang et al., 2012).

## TEORÍA

Diversos estudios relacionados con el estrés oxidativo han sido realizados en organismos modelo, incluyendo al *Caenorhabditis elegans*, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y el ratón *Mus musculus*. Desde hace tiempo, el *C. elegans* se ha reconocido como un organismo modelo biológico y genético atractivo para el estudio de los procesos biológicos básicos. Adicionalmente como modelo animal presenta la ventaja de ser de fácil manejo en el laboratorio y tener bajo costo de mantenimiento (Kahn et al., 2008). *C. elegans* es un nemátodo perteneciente a la familia *Rhabditidae*, de vida libre, de 1 mm de longitud, cada adulto hermafrodita es capaz de colocar un promedio de 200 a 300 huevos. El *C. elegans* es un organismo simple y costa de cuatro etapas larvarias ante de llegar a ser un adulto, pero durante el segundo estado larvario y en condiciones extremas del ambiente o ausencia de comida la larva entra a un estado de Dauer (estado resistente a condiciones desfavorables como estrés ambiental, sobrepoblación o carencia de alimento); además de expandir la esperanza de vida. A partir del cuarto estado larvario, los hermafroditas son capaces de producir espermatozoos y en el estado adulto pueden generar huevos. El tiempo promedio de todo el ciclo biológico del *C. elegans* en condiciones naturales es de dos o tres días, mientras que en condiciones



de laboratorio, a una temperatura constante de 20 °C su ciclo biológico es de dos a tres semanas (figura 11) (Wightman., 2015). *C. elegans* es uno de los organismos relativamente más simples; su sistema nervioso está constituido por 302 neuronas lo que permite ser usado como modelo animal en estudios genéticos y fisiológicos. *C. elegans* es un nemátodo de vida libre de 1mm de longitud y habita climas templados (18 - 22°C). Ha sido usado como modelo de estudio para la biología, genética del desarrollo y neurofisiología, entre otros. El desarrollo ontogénico de cada célula neural ha sido caracterizado, y se conoce el arreglo casi invariable de sus 5000 sinapsis químicas y 2000 uniones neuromusculares. Su sistema nervioso relativamente simple sustenta algunas conductas que han sido estudiadas cuantitativamente.

A pesar de la distancia filogenética entre los nemátodos y los vertebrados, entre ellos se comparten muchas similitudes en relación a la fisiología neuronal, por lo que pueden ser comparables. La secuenciación genómica de *C. elegans* ha revelado un nivel de conservación del 60% en relación a los vertebrados y la homología y estructura génica conservada se ha identificado en los genes responsables de muchos componentes neurales, incluyendo, canales iónicos, enzimas que sintetizan neurotransmisores, mecanismos de liberación sináptica, receptores a neurotransmisores y sistemas de segundos mensajeros. En el nemátodo se ha demostrado la existencia de la transducción mediada por neurotransmisores como la acetilcolina ACh, la serotonina, la dopamina, el glutamato, y el ácido gammaaminobutírico (GABA), como ocurre en los vertebrados.

#### Neuronas GABAérgicas en *C. elegans*

El marcaje del sistema nervioso del *C. elegans* con anticuerpos contruados contra el neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico ha revelado que 26 de las 302 neuronas presentes en *C. elegans* expresan el neurotransmisor GABA (Figura 1).

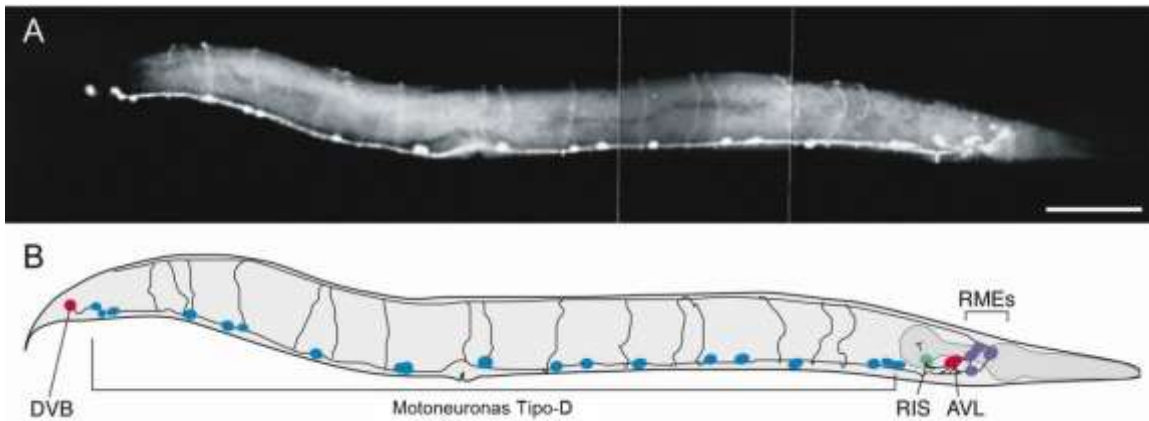


Figura 2. El sistema nervioso GABAérgico. (A) microfotografía fluorescente de un *C. elegans* hermafrodita adulto teñido con antisero antiGABA. Se muestran las 26 neuronas teñidas para GABA. En el lado derecho de la imagen se observa la parte anterior y lado derecho del *C. elegans*. Barra escala =0.10 mm. (B) Dibujo esquemático de las 3 posiciones de las 26 neuronas que contienen GABA. Las motoneuronas DD y VD inervan los músculos del cuerpo, las neuronas RME inervan los músculos de la cabeza, las AVL y DVB inervan los músculos entéricos, y la neurona RIS es una interneurona. Tomado de Jorgensen (2005).

#### Función inhibitoria de GABA en el *C. elegans*

El receptor GABA<sub>A</sub> es activado por el GABA liberado por 19 neuronas del tipo D del cordón ventral y las 4 motoneuronas RME. Las primeras inhiben la contracción de los músculos de las paredes ventrales y dorsales del cuerpo del nemátodo durante la locomoción. Un encorvamiento en el cuerpo del animal se realiza por la contracción de músculos en un lado del cuerpo mientras que se relajan los músculos en el lado opuesto, vía la innervación GABAérgica, lo que da al gusano su distintiva postura corporal sinusoidal. El desplazamiento ocurre cuando un encorvamiento del cuerpo se propaga de un extremo del animal al otro. Por lo tanto, el GABA liberado de las neuronas tipo D del

cordón ventral se requiere para relajar al músculo, para restaurar la postura cuando se cambia la dirección, y además para proveer la forma de onda normal, cuando el *C. elegans* se desplaza.

Las neuronas RME regulan los movimientos de la cabeza durante la búsqueda del alimento; la punta de la probóscide se mueve de un lado a otro en un arco de movimiento estrecho. Es posible que el encorvamiento de la cabeza durante esta búsqueda active receptores al estiramiento en las neuronas SMB y SAA, las cuales entonces activan una neurona RME, la cual a su vez relaja el músculo en el lado opuesto del encorvamiento y restaura la postura de la cabeza.

La respuesta de evitación al toque

Las regiones del cuerpo en *C. elegans* se encuentran definidas como sigue: La nariz (probóscide) es la punta más anterior del animal. La región anterior del cuerpo se encuentra entre el bulbo posterior de la faringe y la vulva, y la región posterior del cuerpo del gusano se encuentra entre la vulva y la cola [28].

Posterior al toque leve de su probóscide, el nemátodo *Caenorhabditis elegans* detiene su locomoción hacia adelante e inicia un retroceso. Una clase de neuronas mecanosensoriales han sido ampliamente caracterizadas. Las neuronas ALM, AVM, PLM y PVM poseen terminales sensoriales que contienen 15-protofilamentos microtúbulos, de los 11-protofilamentos microtúbulos encontrados en la mayoría de las neuronas de *C. elegans*, en estas neuronas mecanosensoriales, los 15-protofilamentos microtúbulos, reciben el nombre de: microtubule touch cells (células microtúbulo al toque). Estas neuronas sensibles al toque dividen el cuerpo del gusano dentro de dos aparentes campos sensoriales, anterior y posterior [28].

## PARTE EXPERIMENTAL

- Extracción de polifenoles de plantas del género *Lupinus*.
- La extracción de los polifenoles se elaboró en el Laboratorio de Biotecnología del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara, municipio de Zapopan, Jalisco, México.
- Las semillas de las plantas del género *Lupinus exaltatus* Zucc se obtuvieron de vainas maduras colectadas de poblaciones silvestres localizadas en el Nevado de Colima. Las semillas obtenidas se preservaron en envases herméticamente sellados y colocados en refrigeración a 4°C (Rao et al., 2007).
- Se utilizaron nemátodos de la cepa N2 Wild Type (N2 WT) del tipo Bristol, obtenida del *Caenorhabditis* Genetics Center (Minneapolis, MN, EUA). Todos los experimentos fueron realizados sobre animales con la edad sincronizada. Dicha sincronización fue obtenida por la colección y el cultivo de los huevos puestos por los sujetos adultos provenientes de la fase Dauer según métodos estándar (Brenner et al., 1974).
- Los *C. elegans* fueron tratados con el EMLEZ, posteriormente en diferentes grupos (N=30) fueron sometidos a daño oxidativo con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y a choque de calor (ChC [34°C]) como inductores de ERO. Evaluamos la sobrevivencia, fertilidad y locomoción (desplazamiento del *C. elegans*), con la intención de analizar un defecto o eficiencia en el desplazamiento del nematodo. Utilizamos *C. elegans* adultos de la cepa N2 Wild type. En nematodos N2 se examinó la supervivencia a diferentes dosis de EMLEZ, y se exploró el efecto de la exposición a choque de calor (34 °C por 1 h) sobre la locomoción del *C. elegans*, en los grupos control, ChC [34°C], EMLEZ y ChC [34°C +EMLEZ].
- Ensayo de choque de calor. Los nemátodos dentro de cajas de petri, se llevaron a baño maría a 34°C por 1 hora. A todos los animales sometidos al choque térmico se les permitió recuperarse por un período de 4 horas antes de continuar con la siguiente fase experimental.
- Para observar el efecto neuroprotector, se expuso a los gusanos adultos de la cepa N2 WT a estrés oxidativo mediante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> más el extracto de *Lupinus*.

## RESULTADOS

En nuestros resultados encontramos que los nematodos tratados con EMLEZ no mostraron un efecto negativo en cuanto a la supervivencia al tratamiento. En nematodos expuestos a ChC [34°C] observamos disminución en la locomoción del *C. elegans* con respecto al grupo control, mientras

que el tratamiento con *EMLEZ* (0.5 mg/ml) + ChC [34°C], no se observó disminución de la locomoción del *C. elegans* con respecto al grupo control, y sin diferencias significativas en el grupo *EMLEZ* comparado con el grupo control.

### CONCLUSIONES

De este modo, los resultados de este estudio sugieren que el EO, ya sea a través de la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o la aplicación de HS, inactiva el sistema GABAérgico del nematodo *C. elegans*, el cual consecuentemente afecta la respuesta al EO, probablemente, realizando la actividad de los factores de transcripción DAF-16 y HSF-1, ambos regulados por la vía de señalización IIS, y relacionadas a la expresión de HSP-16.2.

### BIBLIOGRAFÍA

1. L. F. Adyary, Actividad antioxidante y neuroprotectora in vitro del extracto acuoso del alga *Bryothamnion triquetum* (Ceramiales, Rhodomelaceae). 2005, Maestría en Ciencias Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad de La Habana.
2. J. Bañuelos & S. Jiménez, La importancia y el estado actual del género *Lupinus*. In: GUADALAJARA, U. D. (ed.) LUPINOS DEL OCCIDENTE DE MÉXICO: Estudios biológico, bioquímico y toxicológico. Guadalajara, Jalisco: Universidad de Guadalajara. 2006.
3. T. Cabrera, & D. Serrano, Algunos Aspectos Sobre El Estrés Oxidativo, El Estado Antioxidante y La Terapia De Suplementación. Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular, 2000, 14, 55-60.
4. E. A. Jiménez, Estrés oxidativo y enfermedad de Alzheimer. Revista de Neurología, 2006, 42, 419-427.
5. N. W. Kahn, S. L. Rea, S. Moyle, A. Kell, & T. E. Johnson, Proteasomal dysfunction activates the transcription factor SKN-1 and produces a selective oxidative-stress response in *Caenorhabditis elegans*. Biochem J, 2008, 409, 205-13.
6. B. Wightman, A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*, 2015. [Online]. USA. [Accessed].
7. S. Brenner: THE GENETICS OF *CAENORHABDITIS ELEGANS*. Genetics 1974, 77(1):71-94.
8. M. Chalfie, J. Sulston: Developmental genetics of the mechanosensory neurons of *Caenorhabditis elegans*. Developmental biology 1981, 82(2):358-370.
9. J. E. Richmond, E. M. Jorgensen: One GABA and two acetylcholine receptors function at the *C. elegans* neuromuscular junction. Nat Neurosci 1999, 2(9):791-797.
10. M. A. Castro, M. A. Arevalo, I. Torres: Involvement of protein kinase C and nitric oxide in the modulation by insulin-like growth factor-I of glutamate-induced GABA release in the cerebellum. Neuroscience 1996, 70(4):843-847.



## ACTIVIDAD SINÉRGICA DE TRITERPENOS PENTACÍCLICOS EN UN MODELO MURINO DE HIPERSENSIBILIDAD TIPO IV

Jania Godinez Orozco, Ana Edith Higareda Mendoza, Marco Aurelio Pardo Galván, Ramón Godinez Pacheco

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
higareda@umich.mx

### RESUMEN

Los triterpenos son compuestos conformados por 6 unidades de isopreno que se encuentran presentes en múltiples especies vegetales, incluyendo aquellas de uso etnomedicinal. Son reconocidos por su amplio espectro farmacológico, principalmente como antiinflamatorios. Uno de los problemas de salud más frecuentes es la inflamación producida tras el contacto con alérgenos producidos por otras especies vegetales, como los catecoles secretados por especies de la familia *Anarcadiaceae*, que tras el contacto con el tejido cutáneo humano se metabolizan como o-quinonas, ocasionando una reacción de hipersensibilidad de tipo IV. Esta reacción de hipersensibilidad se caracteriza por la producción de citocinas proinflamatorias y la activación de linfocitos Th2, responsables de la formación de edema, eritema y prurito en el sitio de lesión. Además, producen muerte celular a nivel de queratinocitos, como consecuencia de la predominante activación de linfocitos T citotóxicos, mediante la secreción de perforinas y granzimas. Uno de los géneros vegetales que destacan por su uso tradicionales el de *Lobelia*, del cual se ha demostrado que distintas especies producen compuestos con amplio espectro farmacológico, incluyendo aquellos con actividad antiinflamatoria. Sin embargo, hasta el momento no se han reportado estudios donde se demuestre la actividad antiinflamatoria de triterpenos aislados de plantas de este género. Por ello, el objetivo fue desarrollar un estudio para establecer la actividad antiinflamatoria de los triterpenos pentacíclicos ácido ursólico (AU), ácido oleanólico (AO), taraxerol (T), lupeol (L) y beta-amirina (B). Para su identificación se utilizó el extracto con acetato de etilo de la hoja de una especie mexicana del género *Lobelia* y como modelo biológico de hipersensibilidad tipo IV se emplearon especímenes de la especie *Mus musculus* de 6-8 semanas de edad. La inducción de la hipersensibilidad se realizó con catecoles de origen natural, administrados vía tópica por dos días en el dorso desnudo de cada animal una vez cada 24 horas, hasta la aparición de una costra. Los antiinflamatorios fueron administrados vía tópica, tanto de forma aislada (AU, AO, TLB) como en conjunto, una vez cada 24 horas por tres días y se midieron las dimensiones del sitio de lesión de norte a sur y de este a oeste diariamente. Los resultados mostraron que en todos los tratamientos el efecto antiinflamatorio, mediante la reducción de la inflamación, fue notorio a partir de las 24 horas tras su administración. Además, sorpresivamente, se observó una reducción mayor del sitio inflamado tras la administración de los 5 triterpenos en forma conjunta, indicando una mayor capacidad antiinflamatoria de los mismos, similar a lo observado en la naturaleza al utilizar dicha planta de forma medicinal. Se concluye que la administración tópica de una mezcla de ácido ursólico, ácido oleanólico, taraxerol, lupeol y  $\beta$ -amirina presenta un efecto antiinflamatorio sinérgico.

### INTRODUCCIÓN

Los metabolitos secundarios son compuestos químicos sintetizados por diversas especies vegetales que intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente, ya sea brindando protección contra depredadores, o bien, actuando como quimio atrayentes para polinizadores. Sin embargo, desde hace varios siglos se ha demostrado que muchos de ellos presentan propiedades terapéuticas de interés, los cuales han sido identificados, aislados y analizados a través del tiempo mediante estudios farmacológicos de especies de uso en la terapéutica tradicional<sup>(1,2)</sup>. Tal es el caso de los triterpenos, que son compuestos con 30 átomos de carbono sintetizados a partir de seis unidades de isopreno, ya sea en forma libre o como glicósidos, con una gran variedad estructural, siendo conocidas hasta el momento 20 000 de ellas. Entre las propiedades terapéuticas que presentan estos productos vegetales se encuentran anti-VIH, antimicrobianos, hepato-cardioprotectores, analgésicos, antifúngicos y, principalmente como antiinflamatorios<sup>(3,4)</sup>.

Por otra parte, las reacciones de hipersensibilidad pueden definirse como procesos patológicos resultantes de la reacción exacerbada o inusual del sistema inmunológico ante agentes externos generalmente inocuos o alérgenos, desencadenando una respuesta inflamatoria tisular. De acuerdo a Gel y Coombs, estas pueden clasificarse en cuatro tipos, de acuerdo con el tipo de respuesta presentada: tipo I o inmediata, tipo II o citotóxica, por inmunocomplejos o tipo III, y retardada o tipo IV. Esta última fue ampliada en 2010 por Pichler y col., subclasificándola según las estirpes celulares de respuesta en IVA-d, dentro de las cuales IVa y IVc se distinguen en el tejido cutáneo <sup>(5)</sup>.

Una de las patologías más comunes que presentan este perfil de hipersensibilidad es la fitodermatitis por contacto, que ocurre tras el contacto de la epidermis con alérgenos de carácter oxidante, los cuales están presentes en oleresinas secretadas en plantas del género *Toxicodendron*, constituidas por una mezcla de compuestos polifenólicos ramificados de 17-19 carbonos denominada urushiol (Figura 1). Dicha oleoresina presenta un comportamiento hapténico, ya que tras ingresar al organismo a través de la epidermis, se oxida como o-benzoquinona y es captado por las células de Langerhans, quienes inducen a linfocitos T naïve a su activación y diferenciación en linfocitos T colaboradores tipo 2 y linfocitos T citotóxicos, dando lugar a dos mecanismos de respuesta. Por un lado, los linfocitos Th2 secretan citocinas proinflamatorias, que en conjunto con diversas quimiocinas estimulan a otras células de la inmunidad innata para amplificar la respuesta inflamatoria en el sitio de contacto, mientras que los linfocitos T citotóxicos entran en contacto con las células dañadas, de manera que secretan perforinas y granzimas inductoras de la necrosis cutánea <sup>(6)</sup>.

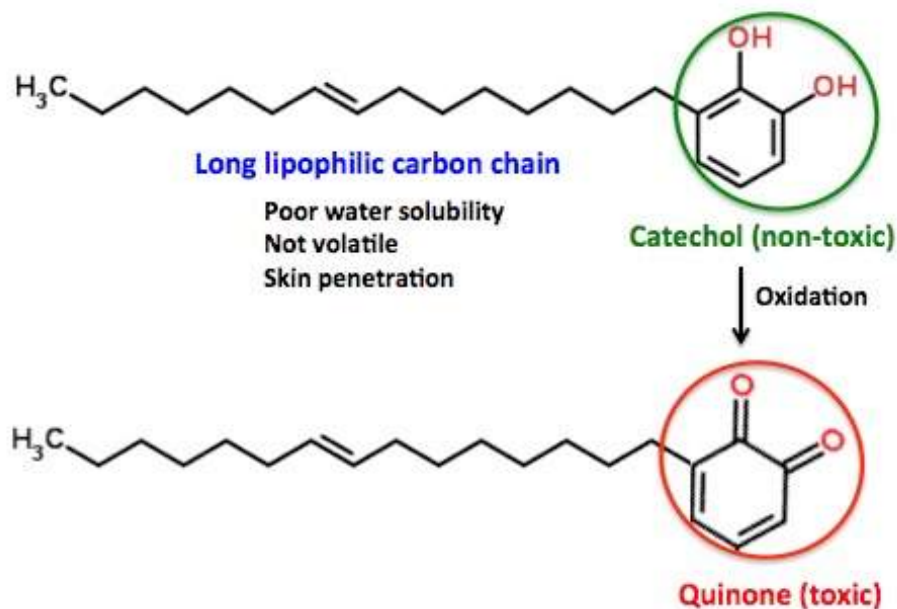


Figura 1. Oxidación de urushiol.

## TEORÍA

Los corticosteroides son los fármacos por excelencia utilizados en la medicina alopática para contrarrestar los signos y síntomas presentes en la hipersensibilidad por urushiol. A pesar de su gran eficacia respecto a su actividad farmacológica, presenta una amplia gama de efectos secundarios, entre los que se incluyen retraso de la cicatrización cutánea, síndrome de Cushing, hipertrichosis, telangiectasias, dislipidemia, trombosis, inmunosupresión, por mencionar algunos <sup>(7)</sup>. Debido a ello, la comunidad científica y farmacéutica se ha dado a la tarea de encontrar alternativas de origen natural que puedan utilizarse de forma eficaz y con un menor riesgo de manifestar reacciones

adversas, por lo que en los últimos años ha realizado diversas investigaciones etnofarmacognósticas. A partir de las mismas, han identificado al género *Lobelia* como una fuente rica en biocompuestos de interés, algunas de las cuales se demostró su potencial antiinflamatorio mediante modelos celulares y/o animales, tales como *L. flaccida*, *L. chinensis*, *L. nicotianaefolia* y *L. laxiflora* L. <sup>(8,9)</sup>.

Asimismo, se ha reportado que en el estado de Michoacán, existe una especie llamada *Lobelia laxiflora* var. *patzquarensis* utilizada por las comunidades Purépechas utilizada como tratamiento tradicional para la hipersensibilidad causada por urushiol secretado a partir de hiedra venenosa (Figura 2). Se ha reportado de forma oral que tras las 24 horas de aplicación por frotamiento de la planta previamente deccioda en el sitio de lesión hay una reducción significativa de la inflamación, despertando un gran interés en su estudio <sup>(10)</sup>.



Figura 2. *Lobelia laxiflora* var. *patzquarensis*.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Aislamiento e identificación de triterpenos pentacíclicos

Para la obtención de triterpenos pentacíclicos, las hojas frescas de la planta fueron maceradas en frío con acetato de etilo, obteniendo así el extracto crudo. Posteriormente, dicho extracto fue fraccionado mediante cromatografía en columna, utilizando gel de sílice 230-400 Mesh como fase estacionaria, y mezclas de hexano-acetato de etilo a polaridades crecientes como fase móvil (Tabla 1). Las fracciones resultantes fueron sometidas a cromatografía en capa fina (TLC), utilizando mezclas de hexano-acetato de etilo como fase móvil, tal como se realizó en cromatografía en columna, y placas de sílica gel como fase estacionaria. Asimismo, dichas fracciones fueron caracterizadas mediante espectrometría por resonancia magnética nuclear de protones (RMN <sup>1</sup>H), de manera que se pudiesen identificar compuestos de interés en cada fracción.

Tabla 1. Relación de disolventes empleados como fase móvil en cromatografía en columna y TLC.

Fracción	Relación de los disolventes empleados
A	100% Hexano
B	9:1 Hexano/ Acetato de etilo
C	7:3 Hexano/ Acetato de etilo
D	5:5 Hexano/ Acetato de etilo
E	3:7 Hexano/ Acetato de etilo
F	1:9 Hexano/ Acetato de etilo
G	100% Acetato de etilo
H	Metanol 100%

Evaluación del efecto antiinflamatorio de triterpenos pentacíclicos en un modelo *in vivo* de hipersensibilidad tipo IV

Para demostrar la actividad antiinflamatoria de los triterpenos identificados, se utilizaron 25 ratones albinos hembra (*Mus musculus*), los cuales fueron depilados del área dorsal en un área de 1 cm<sup>2</sup> y sensibilizados con savia fresca de hiedra venenosa (*Toxicodendron radicans*) 1 vez cada 24 horas por 3 días. Una vez sensibilizados, los animales fueron divididos en cinco grupos, tomando en cuenta los tratamientos a administrar:

Tabla 2. Tratamientos administrados al modelo experimental.

Grupo	No. individuos	Tratamiento	Dosis
A	5	Ácido ursólico	10 µL
B	5	Ácido oleanólico	
C	5	Taraxerol, lupeol y β-amirina	
D	5	Ácido ursólico - Ácido oleanólico + Taraxerol, lupeol y β-amirina	
Control	5	Etanol 70%	

Posteriormente, se midió el área afectada previo y postratamiento en cada uno de los animales, de manera que se tomaron las mediciones de norte a sur y de este a oeste, para determinar el grado de inflamación aparente en los mismos 1 vez cada 24 horas durante 3 días (Figura 3).



Figura 3. Inducción de fitodermatitis por contacto (hipersensibilidad tipo IV) en murinos.

## RESULTADOS

### Aislamiento e identificación de triterpenos pentacíclicos

Se obtuvieron un total de 19 fraccionados a partir de extracto acetato de etilo de *Lobelia laxiflora* var. *patzquarensis* (Tabla 3), a partir de los cuales se identificaron cinco triterpenos pentacíclicos mediante RMN  $^1\text{H}$ . En las fracciones B3, E1 y E2 fue donde se observó la presencia de triterpenos pentacíclicos (Figuras 4-6).

Tabla 3. Fracciones obtenidas por cromatografía extracto de *L. laxiflora* var. *patzquarensis*.

Fracción	Relación de los disolventes empleados	Nº fraccionados
A	100% Hexano	2
B	9:1 Hexano/ Acetato de etilo	3
C	7:3 Hexano/ Acetato de etilo	5
D	5:5 Hexano/ Acetato de etilo	3
E	3:7 Hexano/ Acetato de etilo	3
F	1:9 Hexano/ Acetato de etilo	2
G	100% Acetato de etilo	1
H	100% Metanol	2

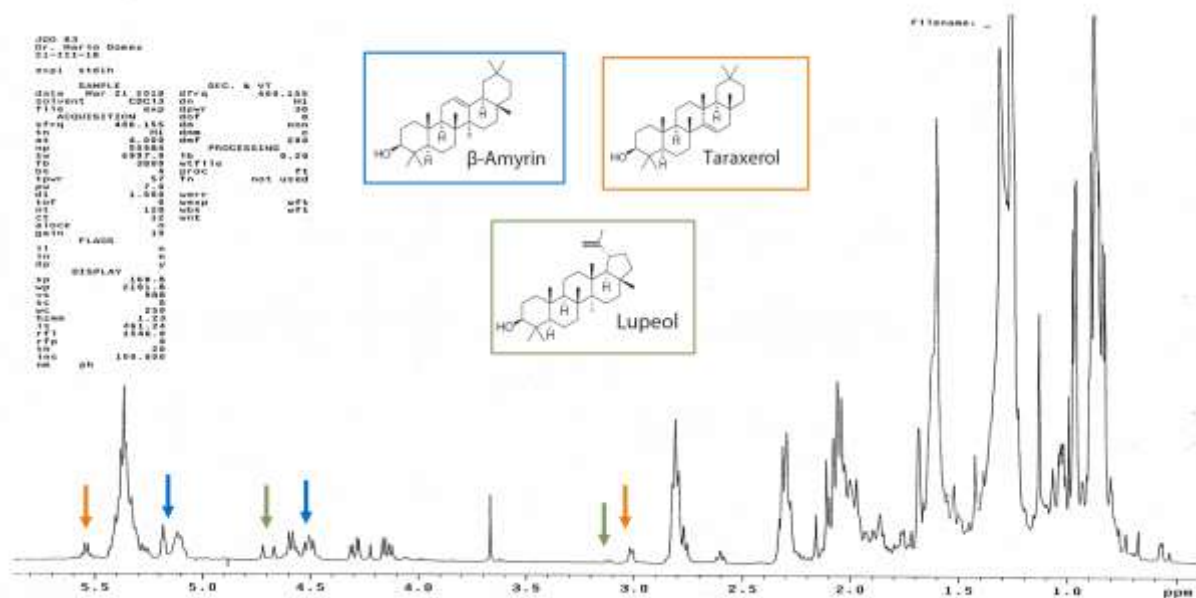


Figura 4. Espectros de RMN 1H de los terpenos taraxerol, lupeol y β-amirina en el fraccionado B3.

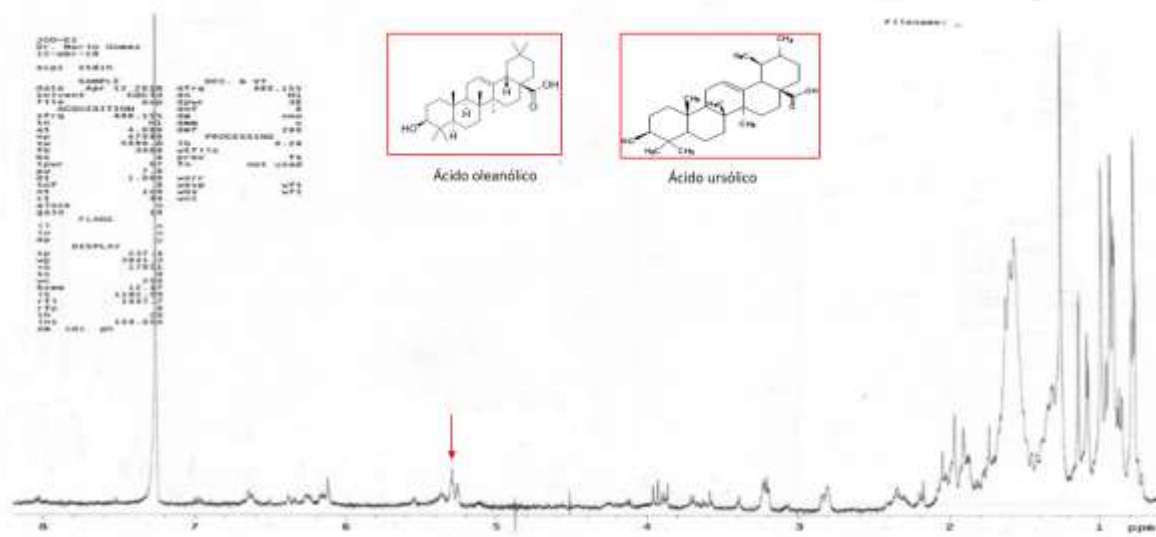


Figura 5. Espectros de RMN 1H de ácido ursólico y ácido oleanólico en el fraccionado E1

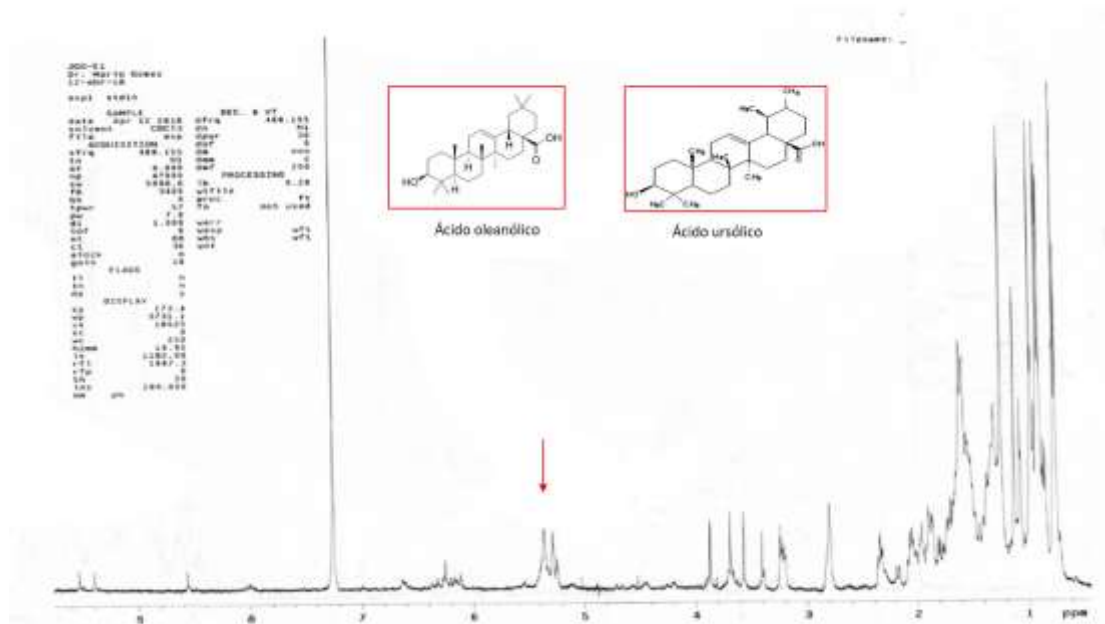


Figura 6. Espectros de RMN 1H de ácido ursólico y ácido oleanólico en el fraccionado E2.

Evaluación del efecto antiinflamatorio de triterpenos pentacíclicos en un modelo *in vivo* de hipersensibilidad tipo IV

En los animales tratados con ácido ursólico, se pudo apreciar que el efecto antiinflamatorio fue sumamente notorio a partir de las primeras 24 horas de tratamiento, donde el tamaño de la costra disminuyó en un 22%; al día siguiente el efecto se mantuvo de manera que el tamaño de la costra disminuyó de forma similar al día anterior (Figura 7). Sin embargo, en el último día de tratamiento se pudo apreciar una disminución importante de la actividad antiinflamatoria de dicho compuesto, lo cual implica que la recuperación de los individuos de dicho grupo tiende a ser ligeramente lenta.

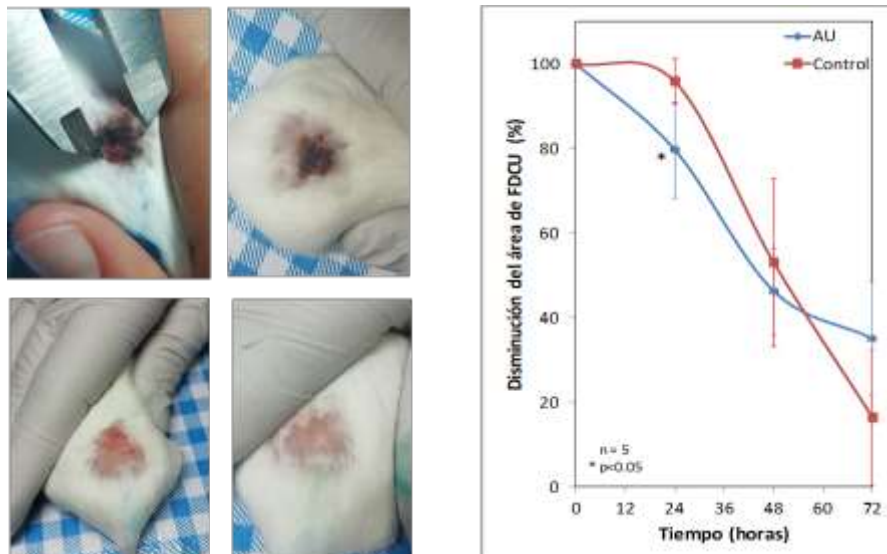


Figura 7. Evolución del fitodermatitis por contacto pre y postratamiento con ácido ursólico.



Los animales que fueron tratados con ácido oleanólico presentaron una disminución del proceso inflamatorio del 18% tras las 24 horas de inicio del tratamiento, incrementó en comparación con la actividad producida por su estereoisómero, la cual se mantiene de la misma manera. Sin embargo, al día siguiente, la actividad antiinflamatoria incrementó de forma ligera en comparación con el control y, a las 72 horas, el porcentaje de disminución fue mucho mayor que en días anteriores (Figura 8).

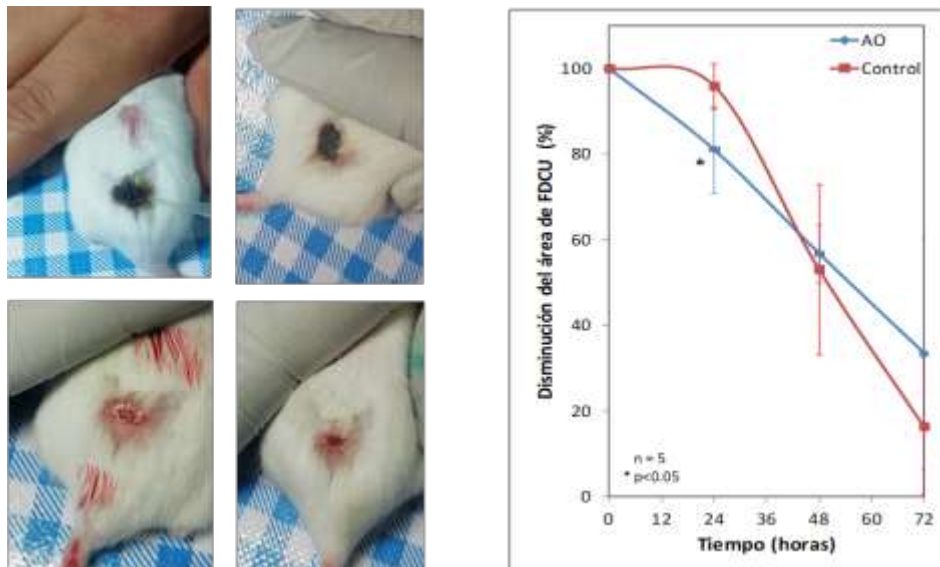


Figura 8. Evolución de fitodermatitis por contacto pre y postratamiento con ácido oleanólico.

En los animales tratados con taraxerol, lupeol y  $\beta$ -amirina, se pudo apreciar que hubo un efecto antiinflamatorio similar al observado con ácido ursólico, en donde el porcentaje de disminución del proceso inflamatorio del 21% tras las 24 horas de inicio del tratamiento, presentando un comportamiento bastante similar durante el tiempo restante del tratamiento y similar a los tratamientos mencionados con anterioridad (Figura 9).

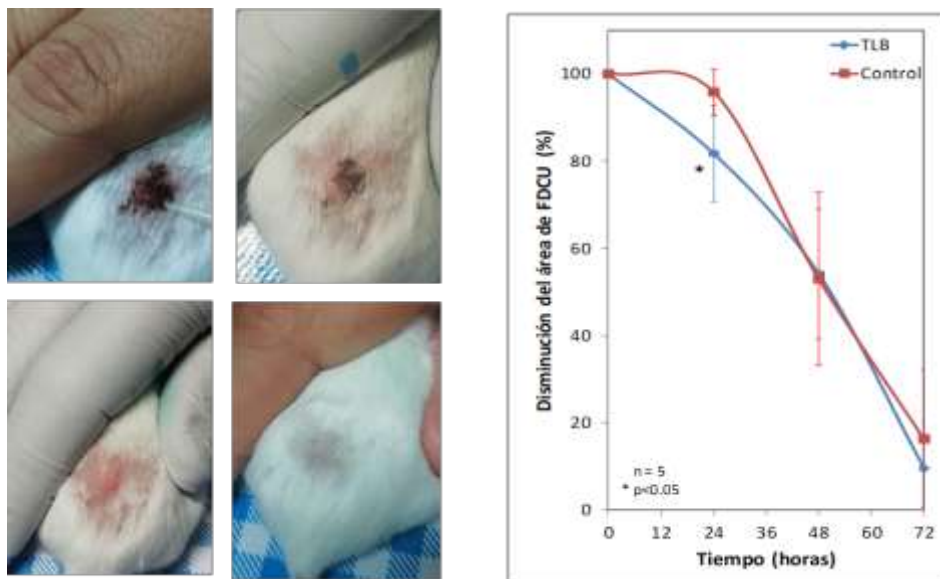


Figura 9. Evolución de fitodermatitis por contacto pre y postratamiento con isómeros taraxerol, lupeol y  $\beta$ -amirina.



En los animales tratados con el conjunto de metabolitos ácido ursólico, ácido oleanólico, taraxerol, lupeol y  $\beta$ -amirina, se pudo apreciar una mejoría sumamente notoria, debido a que el efecto antiinflamatorio tras las 24 horas de administración del tratamiento se duplicó comparado con los individuos sometidos a los tratamientos anteriormente mencionados. A las 48 horas post tratamiento el efecto antiinflamatorio fue muy similar al de los grupos anteriores ocurriendo lo mismo al día siguiente, demostrando que en conjunto generan sinergia en cuanto a su efecto antiinflamatorio, tal como sucede en la naturaleza (Figura 10).

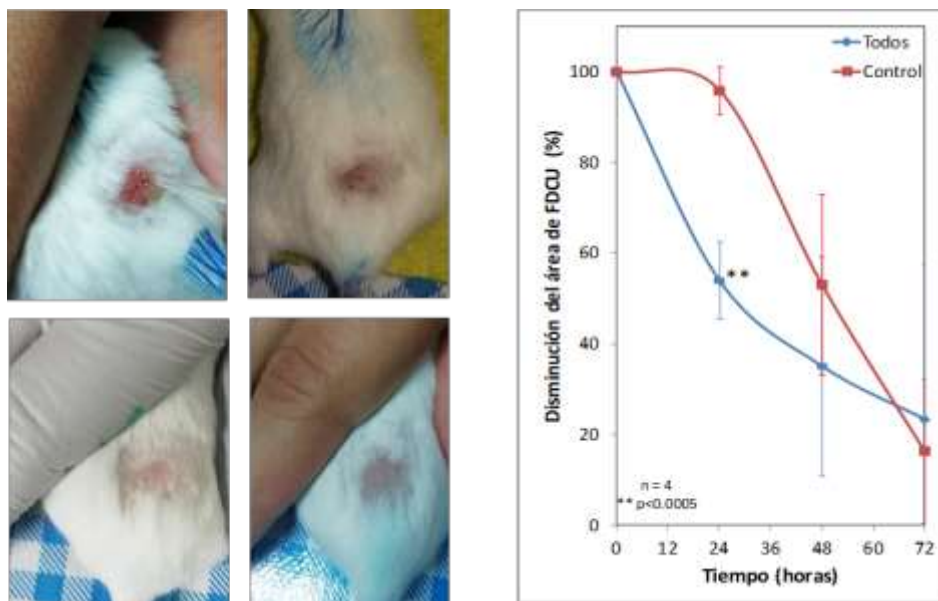


Figura 10. Evolución de fitodermatitis por contacto pre y posttratamiento con los cinco triterpenos pentacíclicos ácido ursólico, ácido oleanólico, taraxerol, lupeol y  $\beta$ -amirina.

## CONCLUSIONES

De este trabajo concluimos que los metabolitos secundarios aislados de *Lobelia laxiflora* var. *patzquarensis* presentan actividad antiinflamatoria moderada por separado, mientras que en conjunto, su actividad antiinflamatoria fue de carácter sinérgico, por lo que son los responsables de la actividad antiinflamatoria de esta planta en la fitodermatitis causada por hiedra venenosa.

## BIBLIOGRAFÍA

1. G. Sepúlveda, H. Porta & M. Rocha, "La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas", *Revista Mexicana de Fitopatología*, Vol. 21, 3, 2003, pp. 355-363.
2. C. Valares-Masa, "Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente", Tesis Doctoral, Universidad de Extremadura, 2011.
3. S. Ghosh, "Triterpenoids: Structural diversity, biosynthetic pathway, and bioactivity", in *Studies in Natural Products Chemistry* (Elsevier, 2021). Chapter 12, pp. 411-461.
4. A. Cano-Flores, "Biotransformación de triterpenos con diferentes microorganismos", *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, Vol. 44, 2, 2013, pp. 7-16.
5. A. Uzzaman, & S.H. Cho, "Classification of hypersensitivity reactions", in *Allergy and Asthma Proceedings* (OceanSide Publications Inc., 2012), Chapter 28, pp. 96-99.
6. S. Patel & A. Raulf, "Oleoresin urushiol: Can its immunogenicity be exploited for healthcare?", *Biomedicine and Pharmacotherapy*, Vol. 104, 2018, pp. 851-853.

7. J. Galofré, "Manejo de los corticoides en la práctica clínica", *Revista de Medicina de la Universidad de Navarra*, Vol. 53, 1, 2009, pp. 9-18.
8. Q. Zheng, Y. Wang, & S. Zhang, "Beyond Alkaloids: Novel bioactive natural products from *Lobelia* species", *Frontiers in Pharmacology*, Vol. 12, 2021, pp. 1-11.
9. D. G. Folquitto. *et al.*, "Biological activity, phytochemistry and traditional uses of genus *Lobelia* (Campanulaceae): A systematic review", *Fitoterapia*, Vol.134, 2018, pp. 23-38.
10. J. Rzedowski & G. Calderón, "Campanulaceae", *Flora Del Bajío y de Regiones Adyacentes*, Vol. 58, 1997, pp. 1-64.

**TRANSPORTE DE ALGUNOS GASES SIMPLES EN MEDIOS POROSOS**

M.G. Hernández Morales, G. del Valle días Muñoz, D. Muciño Cruz, I. Pineda Calderón

Universidad Autónoma Metropolitana-Azc., Departamento de Ciencias Básicas,  
gpe@azc.uam.mx.**RESUMEN**

La difusión es el movimiento aleatorio de las moléculas, debido a un gradiente de concentración. Es uno de los fenómenos fundamentales en la naturaleza que independientemente de la diferencia de escalas en longitud y tiempo en que se dé es común a la materia (Kärger y Ruthven, 1992). En este trabajo analizaremos los mecanismos por medio de los cuales se lleva a cabo la difusión en un medio poroso y encontraremos el mecanismo de difusión de, N<sub>2</sub>, He, O<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> en los poros de Silicalita-1, LTA y α-alúmina.

**INTRODUCCIÓN**

La difusión, para un gas ideal a temperatura y presión constante puede expresarse en términos de la trayectoria libre media entre colisiones,  $\lambda$ , y la velocidad molecular promedio  $v_m$ , de la siguiente manera:

$$D = \frac{1}{3} v_m \lambda . \quad (1)$$

Para un gas de esferas duras a baja densidad, con gradientes de presión, temperatura y velocidad pequeños, las expresiones para la trayectoria libre media y la velocidad molecular promedio son (Kikoin, Kikoin, 1979; Bird et al. 2002),

$$\lambda = \frac{\text{trayectoria total}}{\text{No. de colisiones}} = \frac{k_B T}{\sqrt{2} \pi \sigma^2 p} \quad (2)$$

$$v_m = \sqrt{\frac{8RT}{\pi M}} = \sqrt{\frac{8k_B T}{\pi m}} . \quad (3)$$

Donde  $k_B = 1.38 \times 10^{-23} \text{ J / K}$  es la constante de Boltzmann,  $R = N_A k_B = 8.34 \text{ J / mol.K}$  es la constante universal de los gases y  $N_A = 6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$  el número de Avogadro,  $M$  el peso molecular (Kg/mol) y  $m$  la masa de las moléculas (kg),  $\sigma$  el diámetro de colisión (m),  $p$  la presión en (Pa) y  $T$  la temperatura absoluta (K).

Sustituyendo (2 y 3) en (1), se obtiene la expresión para la difusión en m<sup>2</sup>/s

$$D = \frac{2}{3\pi\sigma^2} \frac{k_B T}{p} \sqrt{\frac{k_B T}{\pi m}} . \quad (4)$$

En el caso de una mezcla binaria de gases, el coeficiente de difusión binario para un gas de esferas duras de acuerdo a la teoría cinética de Chapman- Enskog es,

$$D_{AB} = \frac{1.8829 \times 10^{-4} T^{1.5}}{P \sigma_{AB}^2 \Omega_{AB}} \sqrt{\frac{1}{M_A} + \frac{1}{M_B}} \quad (5)$$

en donde  $\sigma_{AB} = \frac{1}{2}(\sigma_A + \sigma_B)$ ,  $M_A$  y  $M_B$  el peso molecular de los gases y  $\Omega_{AB}$  es la integral de colisión, que contiene toda la información sobre las fuerzas intermoleculares y la dinámica de las colisiones binarias (Bird et al. 2002).

## TEORÍA

Transporte de gases en medios porosos

Los mecanismos para el transporte de masa a través de un medio poroso ideal, en el cual los poros pueden considerarse como poros cilíndricos rectos, son principalmente: difusión Knudsen, difusión molecular, flujo viscoso y difusión superficial. (Figura 1).

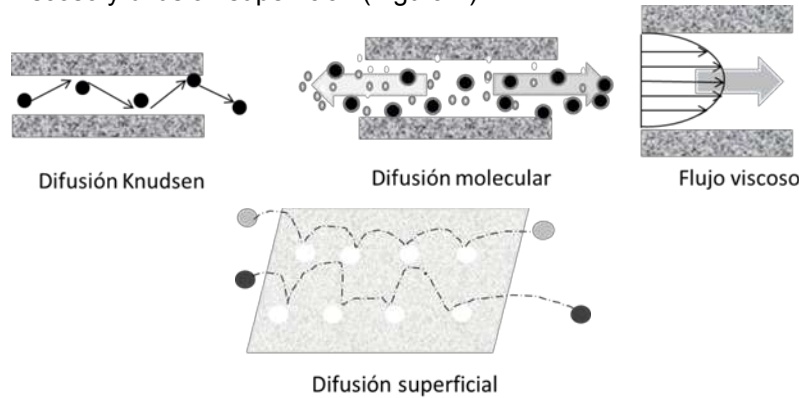


Figura 1. Mecanismos de transporte en medios porosos

### Difusión Knudsen

Este régimen es importante cuando el diámetro de poro,  $d_p$ , es muy pequeño comparado con la trayectoria libre media de las moléculas,  $\lambda > d_p$ , y/o se tienen densidades de gas muy bajas. En la difusión Knudsen, las moléculas del gas chocan con mucha mayor frecuencia con las paredes, que con otras moléculas. De esta manera, si hay una mezcla de gases, cada especie actúa de manera independiente. Así, para la especie  $i$ , el flux de Knudsen está dado por la siguiente ecuación

$$J_{i,K} = -D_{i,K} \frac{dc_i}{dz} = -\frac{D_{i,K}}{RT} \frac{dp_i}{dz} \quad (6)$$

En donde  $c_i$  y  $p_i$  son la concentración y presión parcial de la especie  $i$  respectivamente. Si se considera el flujo de la especie  $i$ , a través de un poro cilíndrico, el coeficiente de difusión de Knudsen  $D_{i,K}$ , se define de la siguiente manera

$$D_{i,K} = \frac{2r_p}{3} \sqrt{\frac{8k_B T}{\pi m_i}} = \frac{2r_p}{3} \sqrt{\frac{8RT}{\pi M_i}} \quad (7)$$

Como se observa en la Ec. (7),  $D_{i,K}$  es proporcional al radio de poro  $r_p$  y a la velocidad molecular media. En un medio poroso, con una fracción hueca (porosidad:  $\varepsilon$ ) a través de la que se lleva a cabo el flujo y considerando que en general los poros no son rectos, esto es, que existe tortuosidad,  $\tau$ , el coeficiente de Knudsen está dado por la siguiente expresión

$$D_{i,K,eff} = \frac{\varepsilon}{\tau} \frac{2r_p}{3} \sqrt{\frac{8RT}{\pi M_i}} \quad (8)$$

### Difusión molecular (continuo)

Por otro lado, cuando el diámetro de poro es mayor que la trayectoria libre de las moléculas, ( $\lambda < d_p$ ), éstas chocan con mucha mayor frecuencia entre sí que con las paredes de los poros, en este caso el mecanismo de transporte es por difusión molecular. De esta manera, la influencia de los poros es menor y en el caso de una mezcla, el movimiento de una especie en relación a otra es

bajo la influencia de gradientes de concentración, gradientes térmicos (difusión térmica) o gradientes de fuerzas externas (difusión forzada). Su representación matemática fue desarrollada alrededor de 1950 bajo dos diferentes formulaciones: el modelo de Maxwell – Stefan (1867-1872), a partir de la teoría cinética y de los experimentos en mezclas de Graham (1850) y Fick (1855),

$$\vec{J}_i = -D\nabla c_i. \quad (9)$$

En esta ecuación el coeficiente de difusión  $D$ , es el factor de proporcionalidad entre la densidad de flujo ( $\vec{J}_i$ ) y el gradiente de concentración ( $c_i$ ) de la especie  $i$  bajo estudio.

Para mezclas binarias y difusión equimolar, el coeficiente de difusión binario  $D_{i,j}$  coincide con la ecuación de Chapman-Enskog para el modelo de esferas duras (Kärger y Ruthven 1992)

$$D_{i,j} = \frac{3}{8\sqrt{2}\sigma_{i,j}^2} \left( \frac{k_B T}{p} \right) \sqrt{\frac{k_B T}{\pi m^*}} \quad (10)$$

donde  $p$  es la presión total de la mezcla y  $m^*$  está dada por:  $\frac{1}{m^*} = \frac{1}{m_i} + \frac{1}{m_j}$ .

#### Flujo viscoso

Cuando el movimiento de las moléculas es originado por un gradiente de presión total,  $\Delta p$ , entre los extremos de un tubo capilar, el mecanismo de difusión es por flujo viscoso. Si el flujo es laminar y el gas es Newtoniano, entonces el comportamiento del gas está determinado por la viscosidad dinámica, que en el caso de gases no depende de la presión. El flujo viscoso a través de los poros se obtiene de la ecuación de balance de momento. Considerando la ley de viscosidad de Newton,

$$\tau_{rz} = -\mu \frac{dv_z}{dr}$$

y como el flujo se produce por una caída de presión, se satisface la distribución de velocidades de Hagen- Poiseuille (Bird *et al* 2002):

$$v_z = -\frac{\varepsilon r_p^2}{8\tau\mu} \frac{dp}{dz} = -\frac{\varepsilon d_p^2}{32\tau\mu} \frac{dp}{dz}. \quad (11)$$

donde,  $\varepsilon$  es la porosidad del medio y  $d_p$  el diámetro del tubo.

Por otro lado, la ley de Darcy es la ecuación para un fluido en un medio poroso y está dada por la siguiente expresión (Bird *et al.* 2002)

$$v_z = -\frac{K}{\mu} \frac{dp}{dz}. \quad (12)$$

Igualando estas dos ecuaciones, podemos identificar la constante  $K \equiv \frac{\varepsilon d_p^2}{32\tau}$  como la constante de

permeabilidad del medio poroso que depende de su geometría y porosidad; multiplicando ambos lados de la ecuación (12) por la concentración molar  $c$ , se obtiene la densidad de flujo molar viscoso

$$J_{z,\text{viscoso}} = -K \frac{c}{\mu} \frac{dp}{dz} \quad (13)$$

Para gases ideales

$$J_{z,\text{viscoso}} = -K \frac{p}{\mu RT} \frac{dp}{dz} \quad (14)$$

Número de Knudsen

Para determinar el régimen de flujo, se define el número adimensional de Knudsen,  $K_n$ , que establece una relación entre la trayectoria libre media  $\lambda$  y el diámetro de poro  $d_p$ , de la siguiente manera:

$$K_n = \frac{\lambda}{d_p} \quad (15)$$

En la Tabla 1 se muestra la clasificación de régimen de flujo según número de Knudsen.

Tabla 1. Clasificación del régimen de flujos de acuerdo al número de Knudsen (Wang *et al.* 2013)

$K_n$		Régimen de flujo	
$\lambda > d_p$	$K_n > 10$	Difusión Knudsen	Las colisiones con las paredes son más frecuentes que con otras moléculas.
$\lambda \approx d_p$	$0.1 < K_n < 10$	Difusión en transición	Las colisiones con las paredes son tan importantes como las colisiones entre moléculas.
$\lambda < d_p$	$0.01 < K_n < 0.1$	Difusión molecular	Las colisiones con otras moléculas son más frecuentes que con las paredes.
$\lambda \ll d_p$	$K_n < 0.001$	Flujo viscoso	Predominan las interacciones entre moléculas.

## RESULTADOS

Determinamos el régimen de flujo de cuatro moléculas de gas, H<sub>2</sub>, He, N<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, que se difunden en los poros de membranas de Silicalita-1, LTA y  $\alpha$ -alúmina, con diámetros de poro;  $d_p = 0.54 \times 10^{-9}$  m,  $d_p = 0.43 \times 10^{-9}$  m y  $d_p = 200 \times 10^{-9}$  m respectivamente (Tabla 2). Los valores de la trayectoria libre media y velocidad media son los reportados en la Tabla 3 a temperatura ambiente y presión atmosférica.

Tabla 2. Diámetro de poro de los medios porosos

	$d_p \times 10^9$ (m)
Silicalita-1	0.54
LTA	0.43
$\alpha$ -alúmina	200

Tabla 3. Diámetro de colisión ( $\sigma$ ), trayectoria libre media ( $\lambda$ ), y velocidad promedio ( $v_m$ ) para H<sub>2</sub>, He, N<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> a T = 298.15 K y P = 1×10<sup>5</sup> Pa.

	$\sigma \times 10^{10}$ m	$\lambda \times 10^8$ m	$v_m \times 10^2$ m/s
H <sub>2</sub>	2.71	12.6	17.69
He	2.15	20.0	12.56
N <sub>2</sub>	3.70	6.76	4.75
O <sub>2</sub>	3.55	7.36	4.44

Calculamos el número de Knudsen ( $K_n$ ) para cada una de las partículas en Silicalita-1, LTA y  $\alpha$ -alúmina. Los datos obtenidos para  $K_n$ , así como el régimen de flujo se reportan en la Tabla 4.

Tabla 4. Números de Knudsen y clasificación de régimen de flujo para H<sub>2</sub>, He, N<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, en Silicalita-1, LTA y  $\alpha$ -alúmina a T = 298.15 K y P = 1×10<sup>5</sup> Pa

Número de Knudsen: $K_n$					
Medio Poroso	Gases				Régimen de flujo
	H <sub>2</sub>	He	N <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	
en LTA	293	465	157	171	Knudsen
en Silicalita-1	233	370	125	136	Knudsen
en $\alpha$ -alúmina	0.63	1.00	0.338	0.368	Transición

El coeficiente de difusión efectivo de Knudsen,  $D_{i,K,eff}$ , depende de la porosidad,  $\varepsilon$ , y tortuosidad,  $\tau$ , del material y por ende de la síntesis. Puede obtenerse de experimentos de permeabilidad (Reinecke and Sleep 2002). Más recientemente (Hibi Y. 2018) desarrolló un método teórico y por simulación para obtener el  $D_{i,K,eff}$ .

$$D_{i,K,eff} = \frac{\varepsilon}{\tau} \frac{2r_p}{3} \sqrt{\frac{8RT}{\pi M_i}} = \frac{\varepsilon}{\tau} D_{i,K}$$

Calculamos el Coeficiente de difusión de Knudsen  $D_{i,K}$  para los tres medios y los diferentes gases. Los resultados aparecen en la Tabla 5.

Tabla 5. Coeficiente de difusión de Knudsen para los diferentes gases y medios porosos

Medio poroso	$D_{i,K}$ ( m <sup>2</sup> /s)			
	H <sub>2</sub>	He	N <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>
LTA	1.43E-08	7.16E-09	2.71E-09	3.58E-09
Silicalita-1	1.14E-08	5.70E-09	2.15E-09	2.85E-09
$\alpha$ – alúmina	5.28E-06	2.65E-06	1.00E-06	1.33E-06

### CONCLUSIONES

Como puede observarse de la tabla 4, a medida que aumenta el diámetro de poro del medio, disminuye el número de Knudsen, en este régimen, las colisiones entre las moléculas del gas son mucho más importantes que las colisiones con las paredes del medio. Y por otra parte al calcular el coeficiente de difusión de Knudsen (Tabla 5), observamos que éste depende linealmente del diámetro de poro e inversamente proporcional con la raíz del peso molecular de la O<sub>2</sub> molécula de gas, es así que su valor es dos órdenes de magnitud mayor en la  $\alpha$ -alúmina, que tiene el mayor diámetro de poro y además como el peso molecular del N<sub>2</sub> > O<sub>2</sub> > He > H<sub>2</sub> se tiene que  $D_{KnH_2} > D_{KnHe} > D_{KnO_2} > D_{KnN_2}$ .

### BIBLIOGRAFÍA

1. J. Kärger y D.M. Ruthven, 1992 “*Diffusion in Zeolites and Other Microporous Solids*” (John Wiley, New York, USA, 1992), ISBN 0-47 1-50907-8.
2. A. Kikoin, I. Kikoin, “Física Molecular (termodinámica), Editorial Mir, 1979), Cap. 1, pp 44.
3. R. B. Bird, W.E. Stewart and E.N. Lightfoot, “Transport Phenomena 2<sup>nd</sup> edition, John Wiley & Sons, Inc., 2002), Cap.17, pp. 514.
4. R. Wang, N. Zhang, X. Liu, X. Wu, J. Yan, Characterization of Gas Flow Ability and Contribution of Diffusion to Total Mass Flux in the Shale, Res.J.Appl. Sci.Eng.Technol. 6, 9 (2013) 1663-1668.
5. S.A. Reinecke, B.E. Sleep., Knudsen diffusion, gas permeability, and water content in an unconsolidated porous medium, Water Resour. Res. 38 (12) 78, [http://refhub.elsevier.com/S2215-0161\(18\)30133-X/sbref0065Hibi Y. 2018](http://refhub.elsevier.com/S2215-0161(18)30133-X/sbref0065Hibi Y. 2018)
6. Y.Hibi, Method for obtaining the Knudsen diffusion coefficient, Methods X, 5 (2018), 959-972.



## PRESENCIA DE LOS FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS EN EL MEDIO AMBIENTE.

Diana Esmeralda Martínez Rodríguez, Luisa Fernanda Esparza Cepeda, María del Pilar González Muñoz, Diana Laura Navarro Segura y Mario Ávila Rodríguez.

Universidad de Guanajuato. División de Ciencias Naturales y Exactas.  
diany.mtz.r93@gmail.com

### RESUMEN

Los contaminantes emergentes comprenden una amplia gama de compuestos químicos que van desde los productos naturales hasta los sintéticos, incluyendo sus productos biotransformados. Se caracterizan por no estar regulados, su presencia en el entorno es inadvertida y se desconoce el impacto ambiental que causan. En la lista de contaminantes emergentes se encuentran los productos farmacéuticos. Se han detectado en el ambiente, a un nivel de  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , hasta 208 contaminantes provenientes de este grupo como: los antisépticos, hormonas, antibióticos, antiinflamatorios, reguladores de lípidos, diuréticos, betabloqueantes, esteroides, estimulantes no esteroideos, cocaína, anfetaminas y analgésicos ilícitos. Por esta razón la cuantificación y eliminación de estos productos es de suma importancia ya que, en el primer caso, se podrán determinar de manera más exacta las concentraciones en el entorno y así crear normas de regulación; y en el segundo caso, debido a que las plantas tratadoras de aguas residuales no degradan por completo a los fármacos, es importante el desarrollo de nuevas técnicas rentables y amigables con el medio ambiente para llevar a cabo su eliminación. En este trabajo se abordan principalmente a los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) como contaminantes emergentes. Se muestran las concentraciones detectadas de algunos AINEs en México y distintas regiones del mundo y los efectos nocivos que han causado en algunos seres vivos. También se abordan los métodos de detección de AINEs más utilizados y los métodos para llevar a cabo su recuperación o eliminación. El impacto del trabajo de investigación aquí presentado radica en el conocimiento de los efectos nocivos que provoca el desechar fármacos al medio ambiente de manera indiscriminada. Esto es de suma importancia, ya que el desafío para que exista un mejor control de la presencia de AINEs en el entorno es muy grande. Por ello es necesario continuar con el desarrollo de técnicas analíticas más sensibles, así como métodos de separación y eliminación más eficientes y sustentables y, sobre todo, crear conciencia en la sociedad con el fin de preservar el medio ambiente.

### INTRODUCCIÓN

Contaminantes emergentes.

Los contaminantes emergentes comprenden una amplia gama de compuestos químicos que van desde los productos naturales hasta los productos sintéticos, incluyendo en estos sus compuestos biotransformados. En la actualidad, las actividades antropogénicas como la agricultura, industria, minería, transporte, entre otras; son las principales fuentes de liberación de estos compuestos al medio ambiente y, por lo tanto, aún no se controla la propagación de la gran mayoría de estos contaminantes al entorno. Por esta razón aún no se puede cuantificar exactamente la concentración de estos compuestos en el ambiente y a su vez se desconocen, en la mayoría de los casos, los efectos adversos que pueden provocar en los seres vivos y los ecosistemas [1].

Las características principales de los contaminantes emergentes son [1]:

- No están regulados bajo alguna normatividad.
- Su presencia en el medio ambiente es inadvertida.
- Se desconoce el impacto ambiental que pueden causar y los posibles efectos adversos a la salud de los seres vivos.

Como una perspectiva histórica, se ha propuesto que el contaminante emergente más antiguo a nivel mundial es el plomo, esto debido a que su uso en la antigua Grecia y Roma ya era de una proporción lo suficientemente grande como para poder registrar su presencia en el hielo polar de esa época. Sin embargo, era de esperarse que no existiera el interés en el plomo como un contaminante que

estaba emergiendo ya que no se tenía el conocimiento de los efectos adversos que podría provocar [2].

La actualización y avances en la tecnología ha logrado crear técnicas analíticas más sensibles lo que ha permitido detectar concentraciones a nivel de nanogramos por litro de este tipo de contaminantes en el medio ambiente, logrando así que el número de estudios analíticos que reportan la detección de estos agentes, a nivel mundial, vaya en aumento. Gracias a esto se ha previsto que en un futuro estos compuestos puedan ser contemplados para su regulación [3].

Tipos de contaminantes emergentes.

En el 2005 se estableció por la Comisión Europea el proyecto NORMAN, el cual es una red de laboratorios de referencia, centros de investigación y organizaciones afines para el seguimiento de sustancias ambientales emergentes, en donde se identificaron más de 1036 contaminantes emergentes junto con sus productos de biotransformación [4] [5].

Los contaminantes emergentes se pueden clasificar [4] [5] en:

- *Productos farmacéuticos*: Fármacos y drogas ilícitas.
- *Productos de cuidado personal*: cosméticos, jabones (tensoactivos, desinfectantes, biocidas domésticos).
- *Productos químicos industriales*: aditivos de alimentos, pesticidas, bifenilo policlorado, retardantes de flama, sustancias antimicrobianas.
- *Subproductos de desinfección*: provenientes de las plantas de tratamiento de agua como nitrosamina, halonitrometanos, haloacetnitrilos, trihalometanos, ácidos haloacéticos.
- *Toxinas de algas*: cianotoxinas y microcistinas.
- *Biocidas y sus metabolitos*: plantas y agentes preventivos agrícolas (plaguicidas).
- *Bioterrorismo y dispositivos de disrupción*: armas biológicas y químicas.

Productos farmacéuticos y de cuidado personal.

Los productos farmacéuticos (incluyendo las drogas de abuso) y productos de cuidado personal, contienen ingredientes activos los cuales confieren las propiedades características del principal uso del producto. Es importante mencionar que estos productos también contienen excipientes y preservantes que, en algunos casos, pueden convertirse en contaminantes emergentes.

Dentro de la clasificación de productos farmacéuticos que ya se han detectado en el ambiente se pueden encontrar los antisépticos, hormonas, antibióticos, fármacos antiinflamatorios, reguladores de lípidos, diuréticos, betabloqueantes, esteroides, fármacos estimulantes no esteroideos, así como la cocaína, anfetaminas y analgésicos ilícitos. Por otro lado, en los productos de cuidado personal se encuentran los cosméticos, protectores solares, productos de higiene personal, fragancias, repelentes, aditivos alimenticios y sus metabolitos [4] [5].

En el listado de contaminantes emergentes del proyecto NORMAN [4] se han registrado hasta 208 y 60 contaminantes emergentes provenientes de los fármacos y productos de cuidado personal, respectivamente, dentro de esta lista se pueden encontrar algunos fármacos antiinflamatorios no esteroideos. En el caso de los productos farmacéuticos la lista es bastante extensa, es por tal motivo que esta categoría ha sido una de las que más preocupación ha causado a nivel mundial. Anteriormente estos compuestos no se consideraban como un contaminante debido a la poca o nula importancia que tenían con respecto a su acumulación en suelos, aguas, tejidos, entre otros; así como la presencia de sus productos biotransformados [6]. Sin embargo, hoy en día ya es bien conocida su presencia en el medio ambiente y, en algunos casos, ya se han observado algunos efectos adversos que ha provocado la exposición de estos contaminantes.

La problemática ambiental de los productos farmacéuticos.

El desarrollo y consumo a nivel mundial de productos farmacéuticos va en incremento, esto es debido a la tendencia que tienen de mejorar la salud y las expectativas de una larga vida. En países desarrollados, una persona suele consumir fármacos dentro de un rango de 50 a 150 gramos al año [3]. Debido al desarrollo, producción y amplio uso de estos productos, su presencia en el ambiente es cada vez más común, lo que ha causado un impacto perjudicial [7].

Dentro de la lista de los fármacos más consumidos a nivel mundial se encuentran los antiinflamatorios no esteroideos como ibuprofeno y el diclofenaco, los antipiréticos como la carbamazepina, antibióticos como la amoxicilina y el sulfametoxazol, y los betabloqueantes como el metoprolol [3]. Hasta ahora, los residuos farmacéuticos que más se han detectado en cuerpos acuíferos son los de carbamazepina y el diclofenaco, los cuales tienen un consumo anual estimado en el mundo de 1014 y 940 toneladas, respectivamente [8].

Las vías en las que los fármacos contaminan el entorno se representan en la Figura 1.1, como puede observarse, estas vías son a través de la industria farmacéutica (investigación, desarrollo y producción), su distribución, manejo de residuos, efluentes de los hospitales, consumo humano y animal (excreción), riego en tierras, entre otros [7].

Con el desarrollo de nuevos métodos analíticos se han encontrado más fácil y comúnmente estos compuestos en cuerpos de agua. Se han logrado detectar concentraciones a un nivel de  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  [7]. Se estima que se pueden encontrar entre 30 y 60 fármacos sin importar que tipo de cuerpo acuático se trate (agua superficial, subterránea y potable) [6].



FIGURA 1.1. Esquema representativo de las vías de contaminación por fármacos.

Por estas razones la cuantificación y eliminación de estos productos es de suma importancia ya que, en el primer caso, se podrán determinar de manera más exacta las concentraciones en el entorno [9] y así crear normas de regulación para estos compuestos y, en el segundo caso, debido a que las plantas tratadoras de aguas residuales no degradan por completo a los fármacos [8], es importante el desarrollo de nuevas técnicas rentables y amigables con el medio ambiente para llevar a cabo su eliminación.

Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).

Definición y breve historia de los AINEs.

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son un grupo de moléculas de estructura química variable, casi todos son ácidos orgánicos y su principal efecto es el inhibir, a través de la enzima ciclooxigenasa, la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos las cuales son mediadoras de la producción de fiebre, dolor e inflamación [10].

Su descubrimiento paulatino comenzó con el uso de la corteza del árbol de sauce blanco (*Salix alba* L.) desde la época de los egipcios (Papiro de Smith, año 1534 a. C.) para tratamientos quirúrgicos realizados en esa época. En la antigua China también se utilizaba dicha corteza para el tratamiento de los enfermos reumáticos, el principio activo encontrado en esta corteza es la salicina la cual fue aislada hasta el año 1826 por Ludovico Brugnatelli. 10 años después acuñó el término "ácido salicílico", para el año 1860 se estaba sintetizando este compuesto y en 1874 se inició la producción a gran escala de tal forma que, luego de 3 años, este compuesto se usara como tratamiento para la fiebre reumática aguda, la gota y la poliartritis crónica. Para el año 1898 se sintetizó la aspirina (ácido acetilsalicílico) al llevar a cabo la acetilación del ácido salicílico, al mejorar esta síntesis para obtener una mayor pureza se obtuvo un fármaco mejor tolerado a nivel sistémico y con la misma actividad analgésica, ya que el ácido salicílico es muy irritante y, actualmente, sólo se usa de forma tópica.

Desde entonces se han investigado y desarrollado una amplia gama de fármacos AINEs los cuales ya se encuentran comercializados [11].

Entre los AINEs más comúnmente utilizados se encuentran la aspirina, ibuprofeno, diclofenaco, naproxeno, piroxicam, tolmetin, fenilbutazona, fenoprofeno, indometacina y piroxicam, sus correspondientes estructuras químicas se pueden observar en la Figura 1.2 [10] y en la Tabla 1.1 se muestran las dosis terapéuticas recomendadas de algunos AINEs [12].

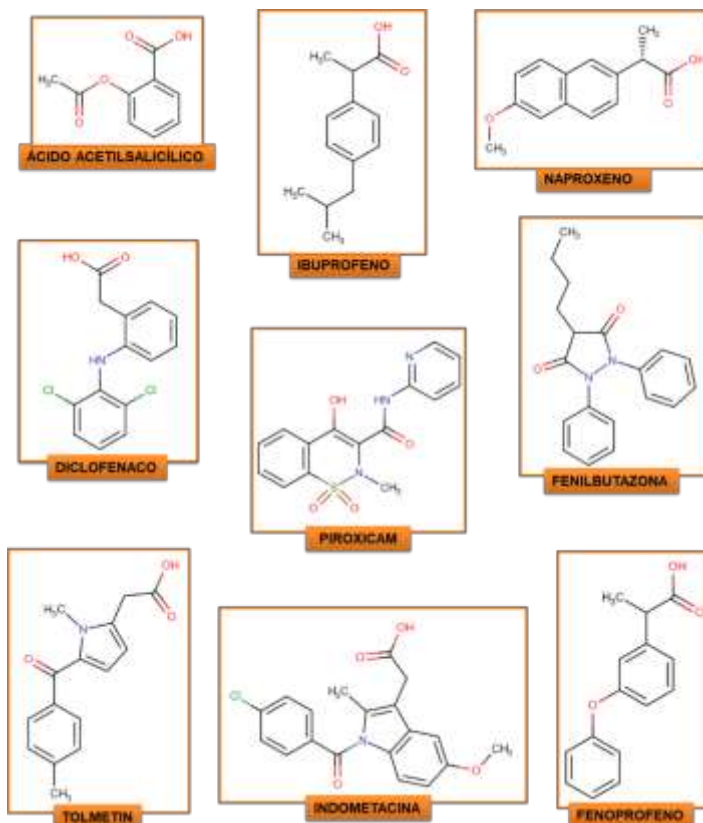


FIGURA 1.2. Estructuras químicas de algunos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) [10].

TABLA 1.1. Dosis terapéuticas recomendadas de algunos AINEs [12].

FÁRMACO AINE	DOSIS RECOMENDADA (mg)
Ácido acetilsalicílico	1500 – 3000
Tolmetin	400
Diclofenaco	75-150
Fenoprofeno	600-800
Ibuprofeno	800-3200
Indometacina	50-150
Naproxeno	500-1350
Piroxicam	20
Fenilbutazona	40-80

Efectos adversos de los AINEs.

De manera general, el consumo prolongado de AINEs aumenta la probabilidad de desarrollar afecciones graves como problemas estomacales (sangrado), infarto al corazón o al cerebro (especialmente el riesgo aumenta en personas con afecciones cardíacas) y problemas hepáticos y renales. También pueden causar problemas dérmicos, problemas pulmonares como asma,

pueden tener efectos hematológicos. Estas afecciones aumentan de riesgo cuando se utilizan estos fármacos durante un tiempo prolongado o en dosis más grandes de las establecidas [10] [13]. Se considera que un tratamiento con AINE no debe exceder el plazo de 10 días sin supervisión médica [14].

#### Contaminación por AINEs.

En su mayoría, estos fármacos tienen una gran demanda debido a sus propiedades terapéuticas y son accesibles ya que muchos de estos, en gran parte del mundo, son de venta libre, de tal forma que se tiene una estimación anual de que entre el 5 y 10 % de los medicamentos que se recetan son AINEs, provocando así que más del 15% de los fármacos detectados en medios acuosos sean provenientes de este grupo. Actualmente, en México ya se tienen detectados 5 fármacos AINEs como contaminantes emergentes: diclofenaco, ibuprofeno, ketoprofeno, ácido mefenámico y nimesulida [15].

Cuando un medicamento es consumido, cierto porcentaje del principio activo y sus correspondientes metabolitos son excretados mediante la orina y las heces hacia medio ambiente, pero como se ha mencionado anteriormente, ésta no es la única vía en la que pueden llegar estos fármacos al medio ambiente. En muchas ocasiones, tanto el principio activo como sus metabolitos pueden tener un efecto sinérgico con otro tipo de contaminantes emergentes [16].

#### Métodos analíticos utilizados para la determinación de AINEs en aguas superficiales.

La contaminación de cuerpos de agua provocada por fármacos ha causado una gran preocupación debido al riesgo en el que se encuentra expuesto el medio ambiente y la salud de los seres vivos. Específicamente, los AINEs se caracterizan por tener una baja estabilidad ambiental y son fáciles de degradar, específicamente si pasan por una biotransformación en condiciones aeróbicas y por fotólisis producida en aguas superficiales. Sin embargo, suelen ser resistentes a la hidrólisis y a la sorción. A pesar de lo anterior, la causa por la que se registra su presencia de manera persistente en el ambiente es la constante afluencia en las aguas superficiales y aunque exista degradación esto se compensa con el posterior suministro continuo de estos fármacos [16]. Por ello es necesario implementar normas de regulación para poder minimizar estos riesgos. Como se mencionó anteriormente, se suelen detectar concentraciones de  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , a este nivel es necesario que los métodos de análisis sean selectivos y sensibles, de tal forma que esto pueda ayudar a detectar y cuantificar de manera más eficiente a estos contaminantes emergentes en cuerpos de agua. En la Tabla 1.2 se muestran algunos de los métodos utilizados para la detección de fármacos AINEs en cuerpos de agua en distintas regiones del mundo [15]. A pesar de contar con este tipo de métodos para llevar a cabo el análisis de detección y cuantificación de AINEs, es necesario el continuar con la búsqueda de nuevas alternativas para llevar a cabo esta tarea, ya que los métodos aquí mostrados presentan ciertas desventajas como los altos costos y tiempos de trabajo prolongados.

TABLA 1.2. Métodos analíticos utilizados para detectar fármacos AINEs en cuerpos de agua en distintas regiones del mundo [15].

REGIÓN	MÉTODO DE ANÁLISIS
Pakistán	Cromatografía de líquidos (Agilent serie 1200) acoplada a espectrometría de masas (Agilent serie 6460) (LC-MS/MS).
Alemania	ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay/ Ensayo inmuno-absorbente ligado a enzimas) con anticuerpos monoclonales específicos para diclofenaco.
India	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría cuádruple de masas.
Chile	Cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD).
India Grecia China	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
China	Microextracción líquido-líquido dispersivo asistido por ultrasonido (DMLLE), seguido de cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento con espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS)

Distribución mundial de AINEs detectados en cuerpos acuíferos.

En la actualidad se puede detectar la presencia de estos compuestos en los distintos cuerpos acuíferos de todo el mundo. En la Figura 1.3 pueden observarse las distintas regiones en donde existe la presencia de algunos AINEs (diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno) y sus correspondientes concentraciones. Como puede observarse, el diclofenaco y el ibuprofeno son los fármacos que con mayor frecuencia y concentración (en algunos casos) se detectan en el mundo. Sin embargo, también se sabe que existe la presencia de ácido acetilsalicílico, indometacina, y ácido mefenámico en los distintos cuerpos de agua [16].



Ecosistemas acuáticos.



Reservorios de agua dulce.

REGIÓN	CONCENTRACIÓN MÁXIMA (ng·L <sup>-1</sup> )			
	Diclofenaco	Ibuprofeno	Naproxeno	Ketoprofeno
1	6	230	130	12
2	0.6	30	26	-
3	1398	1106	4880	664
4	19.4	2094	-	-
5	15085	10053	-	-
6	4	-	-	-
7	92.6	-	-	135
8	1036	1979	-	-
9	550	928	-	-
10	486	76	-	47
11	241	-	-	2.6
12	-	1146	-	-
13	1500	1500	-	6000
14	51	1317	260	75.3
15	-	310	-	270
16	14020	508	-	-
17	730	17400	-	-
18	-	680	11400	-
19	-	170	160	-
20	843	-	-	6.59
21	38	121	-	-

FIGURA 1.3. Concentraciones máximas (ng·L<sup>-1</sup>) de AINEs detectados en cuerpos acuíferos [16].

Efectos tóxicos de AINEs en especies acuáticas.

Las bajas concentraciones de AINEs detectadas en el medio ambiente pueden repercutir de forma negativa en muchos seres vivos, provocando cambios bioquímicos, fisiológicos, morfológicos y cambios en su comportamiento. Dentro de los AINEs que más se han estudiado sus efectos tóxicos se encuentran: ácido acetilsalicílico, diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, indometacina y ácido mefenámico [16].



Los AINEs presentan efectos tóxicos en una amplia gama de organismos acuáticos, ya sea por estar en exposición aguda o crónica, utilizando concentraciones terapéuticas o ambientales y con distintas formas de exposición (inyección, agua y sedimentos). Como se observa en la Figura 1.4 ya se han identificado distintas afecciones en la homeostasis de ciertos organismos acuáticos utilizados en estudios de toxicología como peces, moluscos, crustáceos, poliquetos, entre otros. Por lo tanto, de manera general, la presencia de AINEs en cuerpos acuáticos puede tener un impacto negativo en los organismos que habitan en estos ecosistemas, por dichas razones se ha vuelto preocupante la persistencia de estos compuestos en el medio ambiente ya que esta problemática, aparte de ser alarmante para otros seres vivos, también provocará que se vea afectada la socioeconomía basada en la industria acuática, así como su sostenibilidad [16].



FIGURA 1.4. Efectos tóxicos en algunas especies acuáticas provocados por la presencia de AINEs en cuerpos de agua [16].

Alternativas de tratamiento de aguas residuales contaminadas con productos farmacéuticos.

Como se ha visto, los residuos de los fármacos llegan a las plantas tratadoras de aguas residuales y a otros cuerpos de agua. Las plantas tratadoras de aguas residuales en México no cuentan con la tecnología necesaria para tratar este tipo de contaminantes.

Existen diferentes tipos de tecnologías que se han estudiado, y en algunos casos, utilizado para la remoción de contaminantes en general, se pueden clasificar en tecnologías fisicoquímicas, biológicas, avanzadas y combinadas [17].

En las tecnologías fisicoquímicas se incluyen la adsorción por carbón activado, procesos de oxidación (con ozono y peróxido de hidrógeno), coagulación/flotación, y cloración. Estas tecnologías han logrado tener una eficiencia de eliminación > 90 % de 30 fármacos contaminantes. Los procesos por medio de carbón activado y membranales han demostrado ser los más eficientes.

Las tecnologías biológicas incluyen los humedales, así como tratamientos convencionales como sistemas de lodos activados o filtros biológicos percoladores; estos pueden convertir diversos compuestos orgánicos en biomasa para su posterior separación por medio de clarificadores. En general, han demostrado tener una eliminación del 25 - 91 % dependiendo del AINE.

Las tecnologías avanzadas son de las últimas tendencias estudiadas, dentro de estas se encuentra la ósmosis inversa, ultrafiltración, nanofiltración y procesos de oxidación avanzada (POA); estas tecnologías son consideradas como las más apropiadas para remover concentraciones traza de fármacos. Por ejemplo, los POA han tenido hasta un 90 % de eficiencia de eliminación de ibuprofeno y diclofenaco.

En las tecnologías combinadas se han reportado diversas investigaciones que contemplan la combinación de procesos de oxidación con procesos biológicos, resaltando su gran potencial ante el problema del tratamiento de aguas contaminadas con desechos difíciles de eliminar por procesos convencionales, estos pueden ser fisicoquímicos/biológicos y con la ventaja de reutilizar esa agua y

contribuir con el cuidado medioambiental, son recomendables para tratar aguas residuales con contenido de fármacos pero costosas. [17].

A pesar de contar con este tipo de tecnologías, es necesario el continuar con estudios de otras alternativas que sean amigables con el medio ambiente, de bajo costo y de fácil aplicación.

## CONCLUSIONES

Ante la problemática ambiental que ha causado el uso indiscriminado de AINEs, es necesario continuar con el desarrollo de técnicas analíticas más sensibles para la detección de estos fármacos, así como métodos de separación y eliminación más eficientes y sustentables, pero, sobre todo, crear conciencia en la sociedad sobre el uso y desecho de los fármacos, esto con la finalidad de preservar el medio ambiente.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Gil, M., Soto, A., Usma, J., & Gutiérrez, O. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción más limpia*, 7(2), 52-73.
2. Sauv e, S., & Desrosiers, M. (2014) A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central Journal*, 8(15), 1-7.
3. Barcel o, L., & López de Alda, M. (2008). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC (Barcelona), Barcelona.
4. NORMAN Network of reference laboratories, research centres and related organisations for monitoring of emerging environmental substances (2020). Emerging substances. Recuperado en diciembre del 2020 de <https://www.norman-network.net/?q=node/19>
5. Abdulrazaq, Y., Abdulsalam, A., Rotimi, A., Abdulbasit, A., Clifford, O., Abdulsalam, O., Racheal, O., Joy, A., Victor, F., Johannes, Z., Bilal, M., & Umar, S. (2020). Classification, Potential Routes and Risk of Emerging Pollutants/Contaminant. *Emerging Contaminants*. IntechOpen.
6. Quesada Peñate, I., Jáuregui Haza, U., Wilhelm, A., & Delmas, H. (2009). Contaminación de las aguas con productos farmacéuticos. Estrategias para enfrentar la problemática. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 70(3).
7. Santibañez Villegas, S. (2014). Determinación de la cinética de degradación de diclofenaco, ibuprofeno y su mezcla, a temperatura ambiente. Toluca, Estado de México, México. Obtenido de <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/14484/421048.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
8. Zhang, Y., & Gei en, S., Gal, C. (2008). Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*, 73(8), 1151-1161.
9. Jürgensen, S. E., & Halling-S rensen, B. (2000). Drugs in the environment. *Chemosphere*, 40(7), 691-699.
10. Katzung, B., Masters, S., & Trevor, A. (2010). Farmacología Básica y Clínica. (12 ed.). Mc. Graw Hill.
11. Braña, M., Del Río, L., Trives, C., & Salazar, N. (2005) La verdadera historia de la Aspirina. *An. R. Acad. Nac. Farm*, 71, 813-819.
12. Herman Hernández, E. (2004). Estudio de la capacidad coordinante del diclofenaco sódico {[2-[(2, 6-Diclorofenil) Amino] Fenilato] de Sodio} y los iones contaminantes Pb(II), Cd(II), Zn(II) y Mn(II). Cholula, Puebla, México. Obtenido de [http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/lqf/herman\\_h\\_e/capitulo2.pdf](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lqf/herman_h_e/capitulo2.pdf)
13. Mayo Clinic. (2020). Dolor crónico: decidir sobre medicamentos. Recuperado en diciembre del 2020 de <https://www.mayoclinic.org/es-es/chronic-pain-medication-decisions/art-20360371>
14. US. National Library of Medicine. (2020). Analgésicos no narcóticos. Recuperado en diciembre del 2020 de <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/002123.htm>



15. Grijalva-Guiza, R., López-Vázquez, M., Cerro-López, M., Toledo-Wall, M., & Castro-Pastrana, L. (2019). Ocurrencia de fármacos antiinflamatorios como contaminantes emergentes en los ríos del mundo: Una revisión sistemática. *Entorno UDLAP*, (9), 24-35.
16. Świacka, K., Michnowska, A., Maculewicz, J., Caban, M., & Smolarz, K. Toxic effects of NSAIDs in non-target species: A review from the perspective of the aquatic environment. (2021). *Environmental Pollution*, 274(15), 115891.
17. Miceli-Montesinos, A., Nájera Aguilar, H., Rojas Valencia, M., Quintero López, L., & Orantes García, C. (2014). Revisión de tecnologías para el tratamiento de aguas residuales incluyendo algunos fármacos. *ESPACIO i+D, Innovación más Desarrollo*, 3(5), 73-95.

## COMPARACIÓN DEL RECONOCIMIENTO *IN SILICO* DEL DOMINIO HR2 DE LA PROTEÍNA S DE SARS-COV Y SARS-COV-2, POR LA PROTEÍNA SPLUNC1 Y EL COMPLEJO TLR2/TLR1

Reyna Cristina Zepeda Gurrola<sup>1</sup>, Gerardo Vázquez Marrufo<sup>2</sup>, Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, CP 58020, México. <sup>2</sup>Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Tarímbaro, Michoacán, CP 58893, México.  
reyna.zepeda@umich.mx

### RESUMEN

El SARS-CoV-2 se deriva del SARS-CoV y se considera el agente etiológico de la COVID-19, que ha causado millones de muertes a nivel mundial. Este virus contiene 4 proteínas estructurales, incluyendo a la proteína S (por sus siglas en inglés “Spike”), que se asocia con el reconocimiento y la invasión de células epiteliales en las vías respiratorias, sin embargo, el mecanismo molecular aún no ha sido completamente elucidado. La proteína S contiene varios dominios, tales como el HR2 (por sus siglas en inglés “heptad repeat 2”), que, a pesar de presentar una estructura cristalográfica, su función no ha sido caracterizada. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales para HR2 han conferido protección contra las variantes del SARS-CoV, lo que sugiere la comprensión del mecanismo de infección del SARS-CoV-2 a través de su comparación con el virus del que procede. Asimismo, la primera barrera a la que se enfrentan varios patógenos respiratorios, incluyendo el SARS-CoV y el SARS-CoV-2, es el sistema inmunológico de la cavidad oral y nasal del huésped, donde se localiza y desempeña un papel fundamental la proteína Splunc1 (por sus siglas en inglés “short palate, lung, and nasal epithelium clone 1”). Además, el complejo TLR2/TLR1 (por sus siglas en inglés “Toll-like receptor) desencadena la activación transcripcional de *splunc1*, en respuesta a agentes bacterianos y virales. Mediante la predicción de interacciones proteína-proteína usando dos algoritmos diferentes, en este trabajo se propone que la proteína Splunc1 y el complejo TLR2/TLR1, así como sus variantes genéticas, son capaces de reconocer de manera diferencial las subestructuras de la proteína S (estado de pre y post-fusión, así como los dominios HR1 y HR2) tanto del SARS-CoV como del SARS-CoV-2, resaltando una mayor afinidad de estas proteínas del sistema inmune humano por el dominio HR2 viral. Las variantes seleccionadas de Splunc1 y TLR2/TLR1 provocaron cambios conformacionales que resultaron en diferentes afinidades e interfaces en interacción con HR2 tanto de SARS-CoV como de SARS-CoV-2. Sin embargo, las variantes de Splunc1, también presentaron una mayor afinidad con el dominio HR2 de SARS-CoV-2, lo que podría influir en la expresión de *splunc1* en las células del epitelio respiratorio, dependiendo de las variantes genéticas para los TLR. Además, se determinaron los puntos críticos en las interacciones establecidas, que se localizaron en la interfaz de interacción de Splunc1 y la mayoría de sus variantes con HR2 de SARS-CoV-2. Este trabajo contiene información valiosa para el desarrollo de una terapia eficaz y para la mejora del diseño de vacunas, ante la epidemia actual de Covid-19.

### INTRODUCCIÓN

El SARS-CoV2 es el agente causal de la COVID-19 y se deriva del SARS-CoV. Esta enfermedad surgió en Wuhan, China y se extendió rápidamente por todo el mundo, comprendiendo síntomas diversos que pueden derivar en la muerte. La proteína S es esencial para estos virus, ya que es presuntamente responsable de la adhesión de los mismos a los receptores del hospedero. Contiene 3 subunidades, formadas por los dominios S1 y S2. Por su parte, el dominio S2 contiene las regiones HR1 y HR2, envueltos en la internalización del virus para iniciar la infección, cuyo mecanismo molecular no ha sido detallado. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales para HR2 han conferido protección contra las variantes del SARS-CoV, sugiriendo el entendimiento del mecanismo de infección del SARS-CoV-2 a través de su comparación con el SARS-CoV.

Tanto los SARS-CoVs como patógenos bacterianos respiratorios, enfrentan el sistema inmunológico de la cavidad oral y nasal del hospedero, en donde la proteína Splunc1 presenta una función central en el reconocimiento de los mismos. Asimismo, diversos polimorfismos dentro del gen *splunc1* se

han asociado con diversas enfermedades. El complejo TLR2/TLR1 desencadena la activación transcripcional de *splunc1*, en respuesta a agentes bacterianos y virales, por lo que podría existir una relación entre *Splunc1* y TLR2/TLR1 con la infección por SARS-CoV-2, que podría entenderse comparando la asociación de *Splunc1* con SARS-CoV.

En el presente estudio, la interacción de la proteína *Splunc1* y TLR2/TLR1, así como sus variantes SNP (por sus siglas en inglés "Single Nucleotide Polymorphism") seleccionadas, con subestructuras de la proteína S de SARS-CoV y SARS-CoV-2, se predijeron utilizando dos algoritmos diferentes, aportando sitios de unión y puntos críticos, sugiriendo el reconocimiento diferencial del SARS-CoV-2 por el sistema inmunológico del hospedero, en comparación con el SARS-CoV. Las interacciones proteína-proteína aquí predichas bioinformáticamente podrían contribuir a la realización de una terapia eficaz y a la mejora del diseño de la vacuna.

## TEORÍA

El nuevo coronavirus (2019-nCoV), taxonómicamente definido como SARS-CoV2 por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus,<sup>1</sup> es el agente causal de la COVID-19 y se deriva del SARS-CoV. Esta enfermedad surgió en diciembre de 2019 en la ciudad de Wuhan, China<sup>2,3</sup> y se extendió rápidamente a nivel mundial.<sup>4</sup> La Organización Mundial de la Salud (OMS) registró hasta el 7 de julio de 2021, 184,324,026 casos humanos confirmados y 3,992,680 muertes en América, Asia Sudoriental, Europa, Mediterráneo Oriental, África y Regiones del Pacífico Occidental.<sup>5</sup> Los síntomas de la COVID-19 son diversos y variados e incluyen fiebre, tos, dificultad para respirar e infiltración pulmonar inflamatoria.<sup>6</sup>

El SARS-CoV-2 es el virus de ARN monocatenario de sentido positivo más grande, perteneciente a la familia Coronaviridae, dentro del género *Betacoronavirus*. Este virus contiene 4 proteínas estructurales y 16 no estructurales.<sup>7</sup> Las proteínas estructurales incluyen a la proteína S, E, M y NC.

<sup>8</sup> Se sugiere que cada una de las proteínas estructurales tiene una función específica, siendo la proteína S responsable de la adhesión del virus a los receptores del hospedero, sin embargo, el mecanismo molecular no ha sido completamente elucidado.<sup>7</sup>

En comparación con el SARS-CoV, se propuso que la entrada del SARS-CoV-2 a la célula depende de la unión con el receptor de ACE2, a través de la proteína S.<sup>9,10</sup> La proteína S de SARS-CoV y SARS-CoV-2 contiene 3 subunidades, formadas por los heterodímeros S1 y S2, que pueden unirse simultáneamente a ACE2.<sup>9,11,12</sup> Se ha descubierto que el dominio de unión al receptor (RBD) de S1 es responsable de la unión del virión a ACE2. Por su parte, el heterodímero S2 contiene un péptido de fusión y dos regiones de repetición de heptada (HR1 y HR2). Se ha descrito que HR1 y HR2 del SARS-CoV interactúan formando una estructura de haz de seis  $\alpha$ -hélices (6-HB) denominada núcleo de fusión,<sup>13</sup> que acerca el virus a la membrana de la célula hospedera, permitiendo su internalización para iniciar la infección.<sup>14</sup> No obstante, sigue sin conocerse el mecanismo molecular detallado de infección del SARS-CoV-2. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales para HR2 han conferido protección contra las variantes del SARS-CoV.<sup>15</sup> Estos hallazgos sugieren la comprensión del mecanismo de infección del SARS-CoV-2 a través de su comparación con el SARS-CoV.

Por otro lado, la primera barrera que enfrentan varios patógenos respiratorios es el sistema inmunológico de la cavidad oral y nasal del hospedero.<sup>16</sup> La proteína *Splunc1* se encuentra y se expresa abundantemente en el epitelio respiratorio, aunque también se ha encontrado en las glándulas salivales<sup>17</sup> y las lágrimas.<sup>18</sup> Asimismo, el complejo TLR2/TLR1 desencadena la activación transcripcional de *splunc1*, en respuesta a agentes bacterianos y virales.<sup>19</sup> Por lo tanto, *Splunc1* juega un papel fundamental en el funcionamiento del sistema inmunológico del hospedero.<sup>20</sup> Interesantemente, diversos polimorfismos dentro del gen *splunc1* se han asociado con diversas enfermedades.<sup>17</sup> Por lo tanto, estos hallazgos plantean la pregunta sobre si existe una relación entre las proteínas *Splunc1* y TLR2/TLR1 con la infección por SARS-CoV-2, lo que podría entenderse comparando la asociación de *Splunc1* y SARS-CoV.

## PARTE EXPERIMENTAL

Acoplamiento molecular de la proteína *Splunc1* y el complejo TLR2/TLR1 con subestructuras de la proteína S

Las estructuras cristalográficas de *Splunc1* (PDB ID 4KGH) y TLR2/TLR1 (PDB ID 2Z7X) se acoplaron con subestructuras de la proteína S de SARS-CoV (proteína S en estado abierto) (PDB ID

5X5B) y en estado cerrado (PDB ID 5X58)), dominio de núcleo de fusión (PDB ID 1WNC) y dominio HR2 (PDB ID 2FXP)) y SARS-CoV-2 (proteína S en estado abierto (PDB ID 6VYB) y en estado cerrado (PDB ID 6VXX), dominio de núcleo de fusión (PDB ID 6LXT) y dominio HR2 (PDB ID 6LVN)). Para el acoplamiento molecular, se utilizaron simultáneamente los servidores PRISM (cuyo algoritmo se basa en un repositorio de interfaces como templados) y PatchDock (cuyo algoritmo se basa en la predicción de parches geométricos), ya que PRISM usa el servidor FiberDock como refinador, que es compatible con PatchDock y donde se emplearon 100 transformaciones por interacción para ser refinadas. Los modelos de acoplamiento se seleccionaron en función de la energía global de unión ( $\Delta G$ ) más baja registrada. Se utilizó la herramienta DimPlot del programa LigPlot para graficar los residuos de contacto de la interfaz. Los dominios de estructuras cristalizadas se obtuvieron de la base de datos InterPro. Las estructuras tridimensionales se visualizaron en el programa Chimera 1.13.1.

Modelos tridimensionales para las variantes de la proteína Splunc1 y el complejo TLR2/TLR1  
Basándose en los principales residuos de contacto predichos, se seleccionaron 4 variantes de Splunc1 (Gly62Trp, Glu69Lys, Asn70Lys y Glu117Lys), 2 variantes de TLR1 (Arg31Gly y Arg80Thr) y 2 variantes de TLR2 (His426Tyr y Arg447Gln). Se utilizó la base de datos BIOMUTA para obtener la información relativa a las variantes de Splunc1 (ID Q9NP55), TLR1 (ID Q15399) y TLR2 (ID O60603). A partir de cada variante, se generó un modelo monomérico por homología utilizando el servidor Swiss-Model, teniendo como templado el PDB ID 4KGG para las variantes de Splunc1 y el PDB ID 2Z7XB para las variantes de TLR1 y TLR2. Los modelos fueron refinados en el servidor Galaxy Refine (para mejorar su calidad por minimización de energía libre mediante simulación de dinámica molecular) y validados por Z-Score y gráficos de Ramachandran usando el servidor PROSA el programa Zeus, respectivamente. A partir de los modelos refinados y validados, se generaron homodímeros para las variantes de Splunc1 y heterodímeros para las variantes del complejo TLR1/TLR2 utilizando el servidor Galaxy Homomer y Galaxy Heteromer, respectivamente. Asimismo, las secuencias de las variantes seleccionadas se alinearon en el servidor Clustal Omega y se visualizaron en el programa GeneDoc.

Predicción de puntos críticos en las interacciones predichas

El servidor HotRegion se utilizó para determinar los puntos críticos de la interfaz en las interacciones predichas, considerando un estado  $\geq 1$  en la región crítica.

## RESULTADOS

Reconocimiento del dominio HR2 por Splunc1 y TLR2/TLR1

Las interacciones de Splunc1 y TLR2/TLR1 con subestructuras de la proteína S se llevaron a cabo registrando la  $\Delta G$  (Cuadro 1), encontrando que los modelos de acoplamiento generados en PatchDock mostraron valores de  $\Delta G$  más bajos que los de PRISM. Sin embargo, no todas las interacciones se pudieron realizar en PRISM ya que el servidor no presentó una interfaz similar como templado en su base de datos. Entre las interacciones predichas tanto en PRISM como en PatchDock, se destacó que los valores más bajos de  $\Delta G$  se registraron en las interacciones Splunc1-HR2 en SARS-CoV2 (-76.18 y -81.36 kcal/mol, respectivamente), TLR2/TLR1-HR2 en SARS-CoV (-11.25 y -66.85 kcal/mol, respectivamente) y TLR2/TLR1-HR2 en SARS-CoV-1 (-63.96 kcal/mol, respectivamente).

Cuadro 1. Energía libre de las interacciones entre Splunc1 y TLR2/TLR1 con subestructuras de la proteína S de SARS-CoV y SARS-CoV-2

INTERACCIÓN	$\Delta G$	INTERFAZ PRISM	$\Delta G$
	PRISM (kcal/mol)		PATCHDOCK (kcal/mol)
Splunc1-S estado abierto SARS-CoV	----	----	-64.41
Splunc1-S estado abierto SARS-CoV-2	-7.58	2x89DE	-83.67
Splunc1-S estado cerrado SARS-CoV	----	----	-81.17
Splunc1-S estado cerrado SARS-CoV-2	----	----	-65.45
Splunc1-HR1/HR2 SARS-CoV	-21.3	1yxOAB	-45.76
Splunc1-HR1/HR2 SARS-CoV-2	-13.79	3anyAB	-17.29
Splunc1-HR2 SARS-CoV	-29.26	2izpAB	-37.5
Splunc1-HR2 SARS-CoV-2	-76.18	2izpAB	-81.36
TLR2/TLR1-S estado abierto SARS-CoV	----	----	-45.74
TLR2/TLR1-S estado abierto SARS-CoV-2	----	----	-71.31
TLR2/TLR1-S estado cerrado SARS-CoV	----	----	-46.66
TLR2/TLR1-S estado cerrado SARS-CoV-2	-0.84	1viqAB	-46.44
TLR2/TLR1-HR1/HR2 SARS-CoV	----	----	-21.45
TLR2/TLR1-HR1/HR2 SARS-CoV-2	-11.26	1viqAB	-31.83
TLR2/TLR1-HR2 SARS-CoV	-11.25	2bg9AB	-66.85
TLR2/TLR1-HR2 SARS-CoV-2	-29.82	3fryAB	-63.96

Dado que las interacciones de Splunc1 y TLR2/TLR1 con HR2 establecidas en PRISM y PatchDock presentaron una  $\Delta G$  más baja en comparación con el resto de las interacciones predichas, se superpusieron para analizar el sitio de unión (Fig. 1). Los resultados indicaron que los modelos de acoplamiento Splunc1-HR2 en SARS-CoV y SARS-CoV-2 producidos en PRISM, presentaron sitios de unión similares, lo que no ocurrió en las interacciones TLR2/TLR1-HR2. Por el contrario, los modelos de acoplamiento de PatchDock mostraron sitios de unión similares en las interacciones establecidas tanto para Splunc1 como TLR2/TLR1 con HR2 en SARS-CoV y SARS-CoV-2.

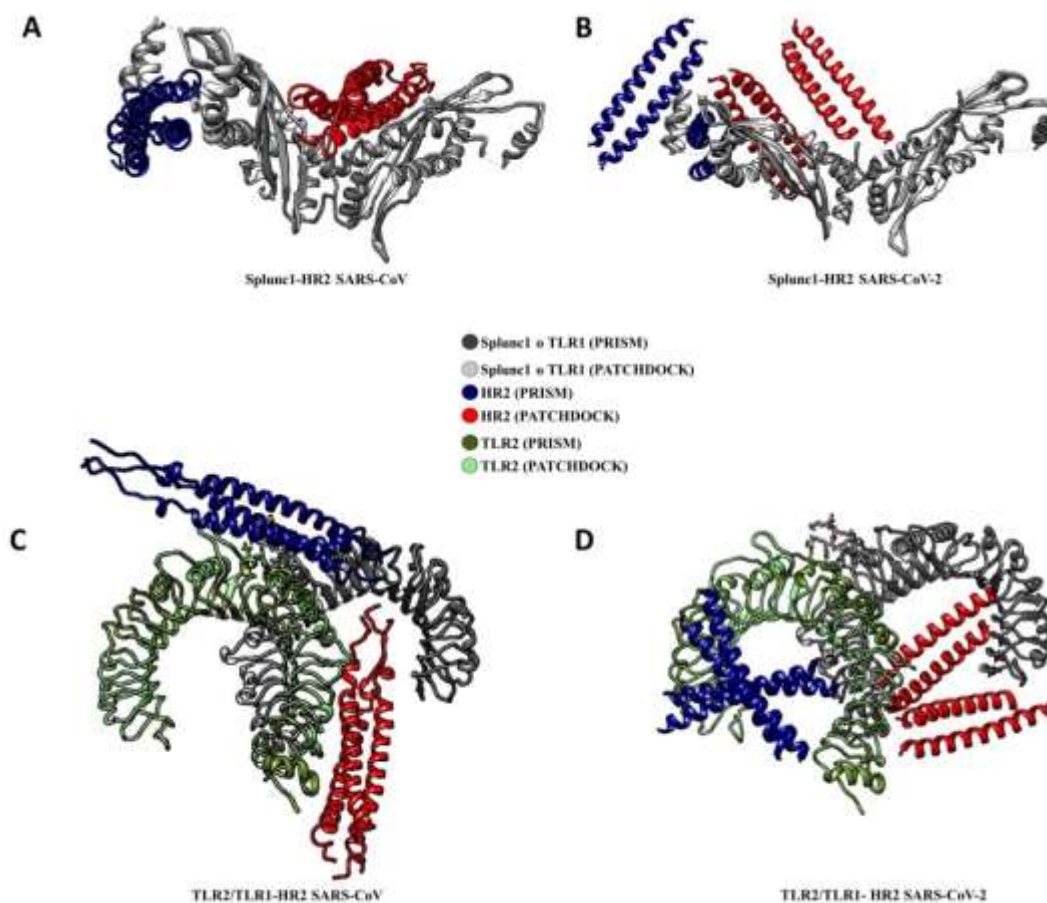


Figura 1. Modelos de acoplamiento molecular generados en PRISM y PatchDock. Se muestran los modelos de interacción generados por dos algoritmos diferentes para Splunc1- HR2 en SARS-CoV (A), Splunc1- HR2 en SARS-CoV-2 (B), TLR2/TLR1- HR2 en SARS-CoV (C) y TLR2/TLR1- HR2 en SARS-CoV-2 (D).

Por lo tanto, a pesar de que PRISM mostró una interfaz que se utilizó como templatado para la mayoría de las interacciones, los valores de  $\Delta G$  registrados para los modelos de acoplamiento de PatchDock fueron más bajos, además de la similitud en las interfaces de las interacciones predichas en este servidor. Por lo tanto, se seleccionaron las interacciones establecidas en Patchdock para análisis posteriores. La relevancia de considerar la proximidad del sitio de unión de HR2 con las proteínas de interés, es que la secuencia HR2 en SARS-CoV-2 es idéntica a la región intermedia de HR2 en SARS-CoV (Fig. 2).

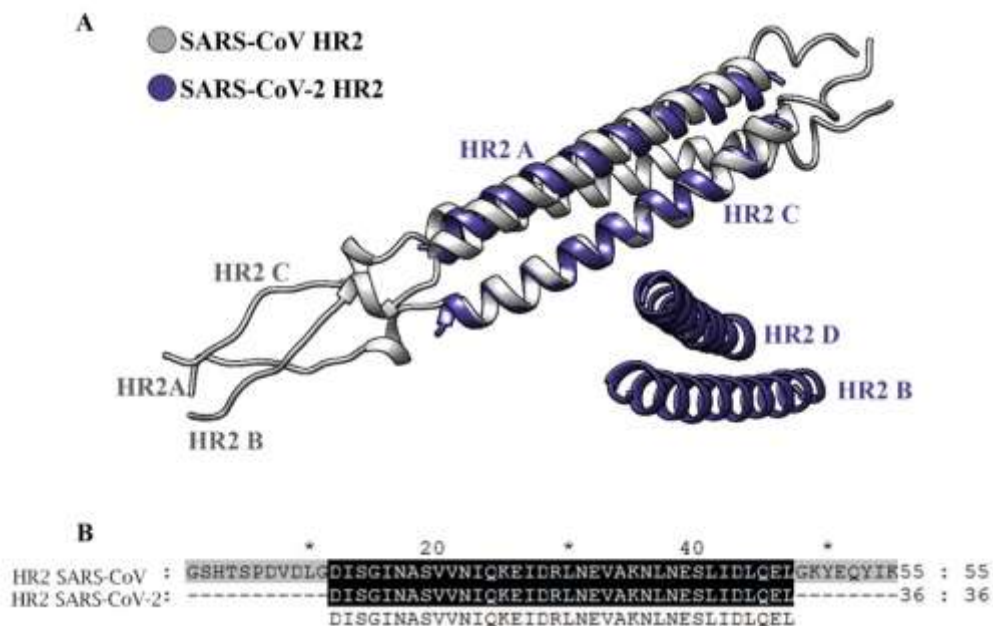


Figura 2. Comparación del dominio HR2 en SARS-CoV y SARS-CoV-2. Se muestra la similitud estructural (A) y de secuencia (B) del dominio HR2 en SARS-CoV y SARS-CoV-2.

Asimismo, se obtuvieron los dominios Splunc1 y TLR2/TLR1 para determinar si formaban parte de las interfaces de interacción. Se seleccionaron los dominios BPI (por sus siglas en inglés “bactericidal/permeability-increasing protein”) y LBP (por sus siglas en inglés “lipid binding protein”) de Splunc1, así como los dominios del receptor de linfocitos y de LRR (por sus siglas en inglés “leucine rich-repeats”) para TLR2/TLR1. Además, se obtuvieron los residuos de contacto para las interacciones predichas de HR2 en ambos virus (Fig. 3). En cada interacción se indicaron interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y puentes salinos. Los resultados mostraron que las interacciones de Splunc1 y TLR2/TLR1 con HR2 en SARS-CoV y SARS-CoV-2 se establecieron en sitios similares. El dominio HR2 de SARS-CoV pudo unirse a los dominios de Splunc1 en las cadenas A y B, mientras que HR2 en SARS-CoV-2 interactuó en la cadena B de Splunc1, compartiendo los residuos Asn53B y Asn57B. Sin embargo, la interfaz de interacción Splunc1-HR2 en SARS-CoV-2 incluyó los residuos Splunc1 Arg232 y Gly233, que no forman parte de dominios seleccionados. Aunque los sitios de unión de TLR2/TLR1-HR2 en SARS-CoV y SARS-CoV-2 fueron cercanos, no se compartieron residuos de contacto. El dominio HR2 de SARS-CoV interactuó con el dominio de unión a linfocitos TLR1, mientras que HR2 en SARS-CoV-2 con LRR de TLR1 y TLR2.

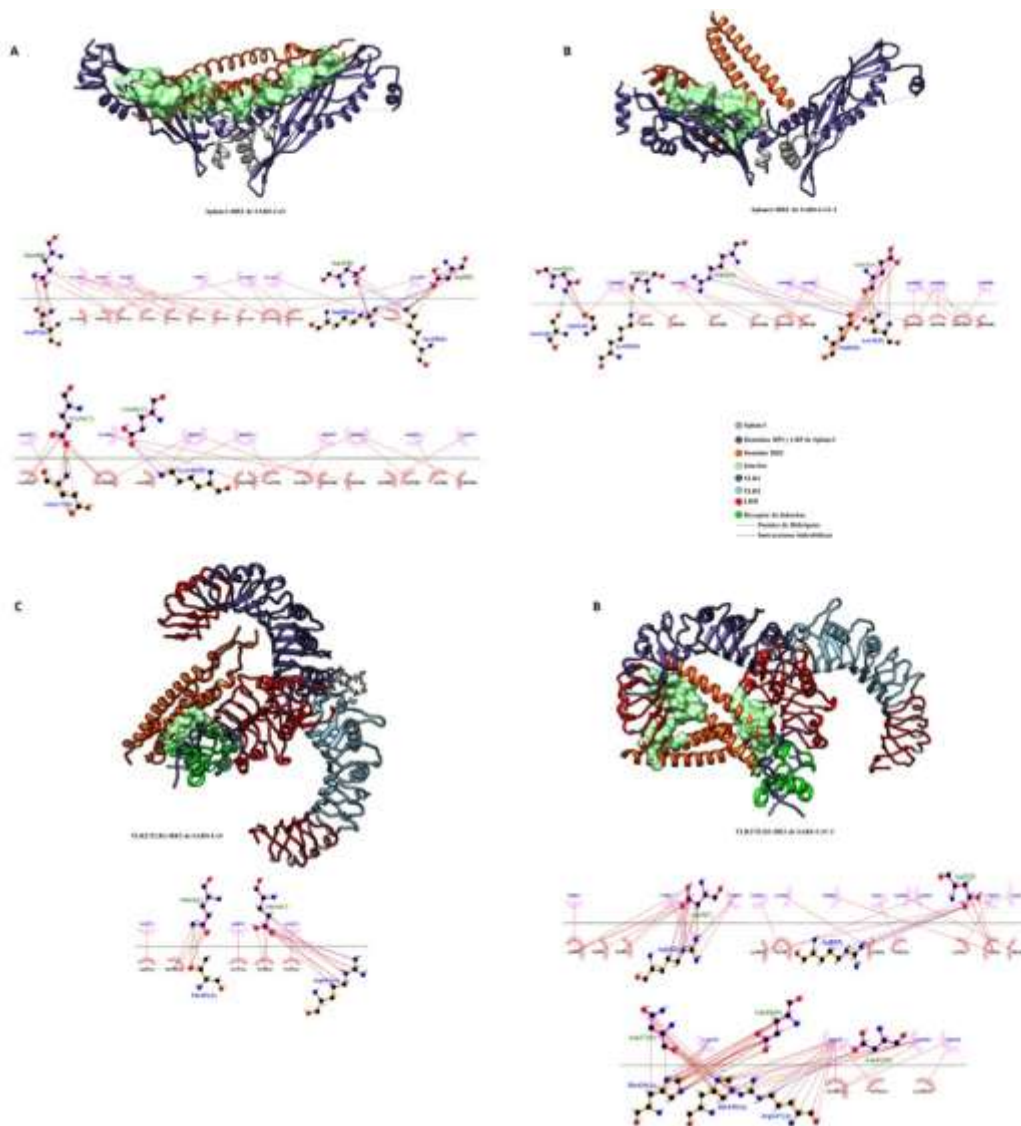


Figura 3. Residuos de contacto en la interacción de Splunc1 y TLR2/TLR1 con HR2 de SARS-CoV y SARS-CoV-2. Se indican los residuos de contacto y los enlaces de la interacción de Splunc1 y TLR2/TLR1 con HR2 de SARS-CoV (A y C, respectivamente) y SARS-CoV-2 HR2 (B y D, respectivamente).

Los resultados obtenidos sugieren que el SARS-CoV y el SARS-CoV-2 podrían unirse a TLR2/TLR1 a través del dominio HR2. Sin embargo, la  $\Delta G$  registrada sugiere que el SARS-CoV-2 podría ser mejor reconocido que el SARS-CoV por Splunc1. Además, los dominios de Splunc1 BPI y LBP, así como el dominio LRR de los TLRs considerados, participaron en el reconocimiento predicho. Los dominios seleccionados de Splunc1 han sido implicados en el reconocimiento y neutralización de lipopolisacáridos de bacterias Gram-negativas,<sup>18, 21</sup> pero también se ha reportado su participación en la defensa innata contra virus como la influenza A y el virus de Epstein-Barr.<sup>20</sup> Del mismo modo, los dominios LRR también se han implicado en el reconocimiento de los lipopolisacáridos bacterianos y las proteínas de la envoltura viral,<sup>22</sup> mientras que el dominio del receptor de linfocitos discrimina el componente antigénico de cualquier patógeno.<sup>[51]</sup> Las interacciones indicaron que HR2 mostró diferencias en el sitio de unión del dominio de reconocimiento de patógenos Splunc1 y TLR2/TLR1 entre el SARS-CoV y el SARS-CoV-2, lo que podría influir en la eficacia del reconocimiento de patógenos, así como en la activación de la respuesta inmune del hospedero.



## Reconocimiento diferencial del dominio HR2 por variantes de Splunc1 y TLR2/TLR1

Con base en la determinación de los sitios de contacto en las interacciones establecidas con HR2, se seleccionaron variantes de SNP para Splunc1, TLR1 y TLR2. El cuadro 2 muestra los SNP seleccionados, así como los residuos de contacto de la interacción de Splunc1, TLR1 y TLR2 con HR2 de SARS-CoV y SARS-CoV-2, indicando los aminoácidos involucrados en las interacciones más representativas, tales como puentes de hidrógeno, puentes salinos o interacciones hidrofóbicas.

Cuadro 2. Residuos de contacto en la interacción de HR2 con las variantes de Splunc1 y TLR2/TLR2

INTERACCIÓN	RESIDUOS DE CONTACTO	SNPs SELECCIONADOS
Splunc1A-HR2 SARS-CoV	*Asn57, Leu60, Ser61, Leu65, Arg112, Gln114, Val120, *Lys138, *Arg152, Ala154, Leu192	---
Splunc1B-HR2 SARS-CoV	Ser43, Pro44, Asn53, Asn57, Leu60, Gln114, Leu115, Leu116, *Glu117, Lys138, *Lys156, Ser190, Leu191, Leu192	Glu117Lys
Splunc1A-HR2 SARS-CoV-2	---	---
Splunc1B-HR2 SARS-CoV-2	Asn53, Asn57, *Ser61, Gly63, *Gly62, Gly66, Ile67, *Glu69, *Asn70, *Lys109, Ile173, Val176, Pro225, Leu226, Glu229, Arg232, Gly233	Gly62Trp, Glu69Lys, Asn70Lys
TLR1- SARS-CoV Spike HR2	---	---
TLR1-HR2 SARS-CoV-2	*Arg31, Pro40, Leu43, Thr50, Gln54, Tyr56, His78, *Arg80, Lys104, Lys530	Arg31Gly, Arg80Thr
TLR2-HR2 SARS-CoV	*Thr491, Met499, Ser513, Pro515, Pro540, *Arg541, Asp543	---
TLR2-HR2 SARS-CoV-2	Asn408, *His426, *Arg447, Ile448, His449, Lys488	His426Tyr, Arg447Gln

\* Residuos involucrados en las interacciones más relevantes

De esta manera, las variantes (Fig.4 A, B, D) para Splunc1 (Gly62Trp, Glu69Lys, Asn70Lys y Glu117Lys), TLR1 (Arg31Gly y Arg80Thr) y TLR2 (His426Tyr y Arg447Gln), se acoplaron con HR2 de SARS-CoV y SARS-CoV-2. La  $\Delta G$  se registró en cada interacción (Fig. 4C), obteniendo que las variantes de Splunc1 acopladas a HR2 de SARS-CoV-2 mostraron valores de  $\Delta G$  más bajos que las interacciones predichas con variantes de Splunc1 y HR2 de SARS-CoV. Además, la interacción establecida entre Splunc1 Gly62Trp y HR2 en SARS-CoV y SARS-CoV-2 presentó el valor más bajo de  $\Delta G$  (-68,46 y -106,4 kcal/mol, respectivamente). Las interacciones de Splunc1 silvestre y HR2 de SARS-CoV y SARS-CoV-2 mostraron la energía libre más alta (-37.5 y -86.06 kcal/mol, respectivamente). El complejo silvestre de TLR2/TLR1 en interacción con HR2 y la interacción TLR2 Arg447Gln/TLR1-HR2 en SARS-CoV (66.85 y 66.52 kcal / mol, respectivamente) así como TLR2 His426Tyr/TLR1-HR2 en SARS-CoV-2 (-92,99 kcal/mol), presentaron los valores más bajos de  $\Delta G$ . En contraste, las interacciones TLR2/TLR1 Arg80Thr-HR2 en SARS-CoV (-37.55 kcal/mol) y TLR2 Arg447Gln/TLR1-HR2 en SARS-CoV-2 (-53.3 kcal/mol) exhibieron la  $\Delta G$  más alta.

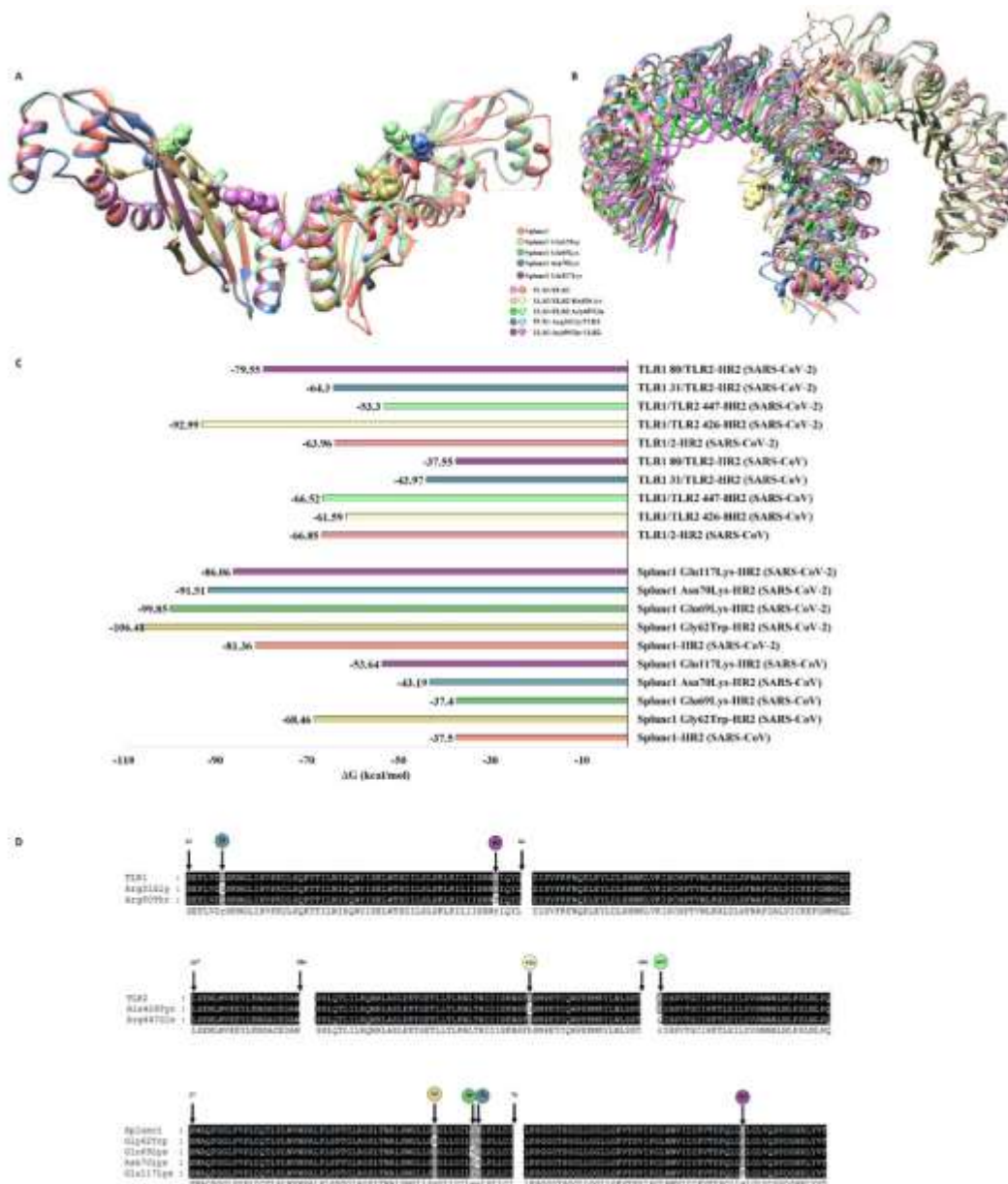


Figura 4. Interacción de las variantes para Splunc1 y TLR2/TLR1 y su interacción con HR2 de SARS-CoV y SARS-CoV-2 HR2. Se indican las variantes seleccionadas de Splunc1 (A) y TLR2/TLR1 (B), así como su  $\Delta G$  diferencial (C) al interactuar con HR2, además de sus diferencias en la secuencia de aminoácidos (D).

Por otro lado, las interacciones establecidas entre las variantes de Splunc1 y TLR2/TLR1 con el dominio HR2 mostraron diferencias no solo en la  $\Delta G$  registrada, sino también en la interfaz (Fig. 5). Los residuos de contacto determinados en cada interacción mostraron que las diferencias en el sitio de unión no estaban directamente asociadas con el aminoácido mutante, sino con un cambio conformacional originado por la variación en la secuencia.

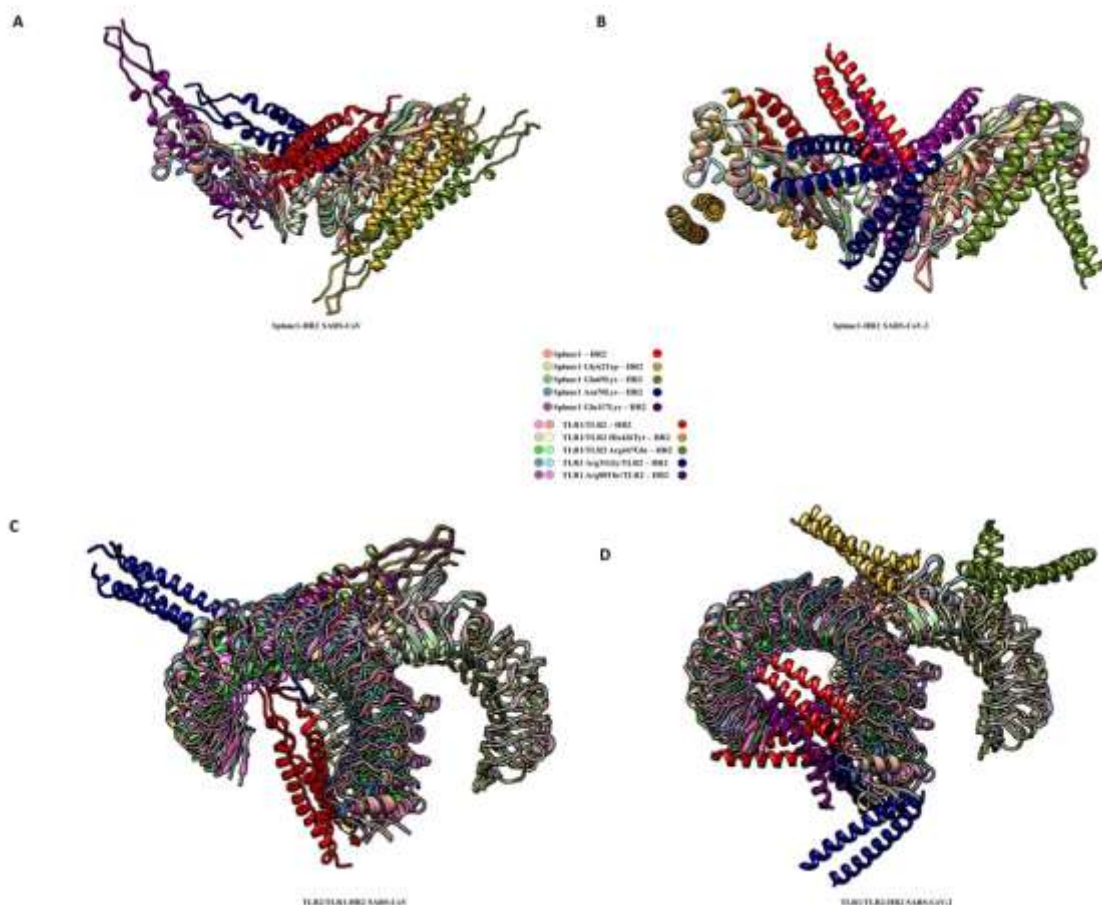


Figura 5. Interfaces de las interacciones entre las variantes de Splunc1 y TLR2/TLR1 con el dominio HR2 de SARS-CoV y SARS-CoV-2. Se muestran las diferentes interfaces de las interacciones entre las variantes seleccionadas para Splunc1 y TLR2/TLR1 con HR2 de SARS-CoV (A y C, respectivamente) y SARS-CoV-2 (B y D, respectivamente).

La base de datos BIOMUTA indicó que las variantes seleccionadas de Splunc1 se han asociado con cáncer de tiroides (Gly62Trp), esófago (Glu69Lys), páncreas y pulmón (Asn70Lys), así como con cáncer de melanoma (Glu117Lys). Asimismo, las variantes de TLRs se relacionaron con el cáncer de mama (TLR1 Arg31Gly), colorrectal (TLR1 Arg80Thr), cervical (TLR2 His426Tyr) y esofágico (TLR2 Arg447Gln). Los hallazgos aquí encontrados sugieren que las variantes seleccionadas causaron cambios conformacionales que resultaron en diferentes afinidades e interfaces en la interacción con HR2 tanto en el SARS-CoV como en el SARS-CoV-2. Sin embargo, las variantes de Splunc1 mostraron una mayor afinidad en el SARS-CoV-2 que en el SARS-CoV. Por lo tanto, a través del dominio HR2, tanto el SARS-CoV como el SARS-CoV-2 podrían unirse a TLR2/TLR1, lo que podría influir en la expresión de las variantes *splunc1* en las células del epitelio respiratorio, dependiendo de los SNPs en los TLRs. Además, los SNPs de Splunc1 podrían reconocer de forma diferencial el SARS-CoV y el SARS-CoV-2, lo que influye en la defensa inmunitaria del hospedero, teniendo en cuenta que las variantes de Splunc1 y TLRs están asociadas con diferentes tipos de cáncer, en particular Splunc1 Asn70Lys, que se asocia con el cáncer de pulmón.

Predicción de los puntos críticos en las interacciones entre las variantes de Splunc1 y TLR2/TLR1 con el dominio HR2 de SARS-CoV y SARS-CoV-2

Se evaluaron los puntos críticos en la interfaz de cada interacción (Fig. 6). Los resultados indicaron que solo Splunc1 o sus variantes (excepto Splunc1 Gly62Trp) mostraron puntos críticos (con una

región crítica  $\geq 1$ ) que interaccionaron con HR2 de SARS-CoV-2, pero no de SARS-CoV. Las interacciones de las variantes TLR2/TLR1 con HR2 carecieron de puntos críticos.

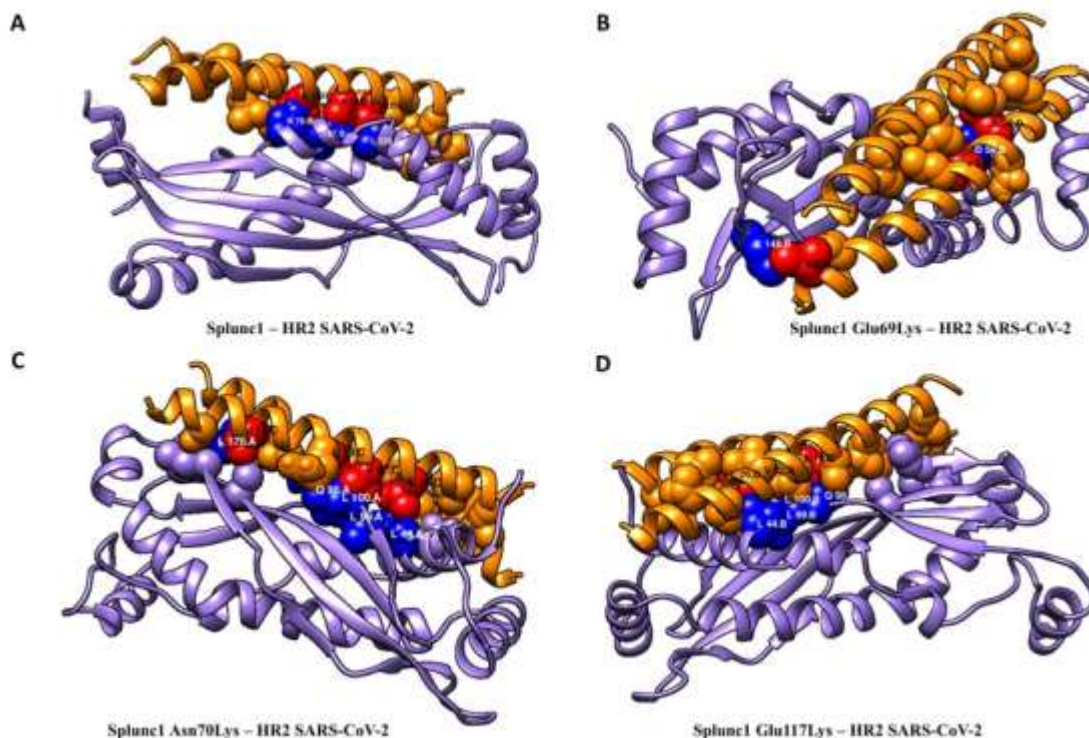


Figura 6. Puntos críticos predichos en las interacciones de HR2 en SARS-CoV-2 con variantes de Splunc1. Se muestran los puntos críticos para las interacciones de Splunc1 silvestre (A), Splunc1 Glu69Lys (B), Splunc1 Asn70Lys (C) y Splunc1 Glu117Lys (D) con el dominio HR2 de SARS-CoV-2.

Los puntos críticos son residuos de proteínas que contribuyen más a la  $\Delta G$  global en una interacción,<sup>23</sup> cuya distribución está en grupos dentro de una interfaz establecida<sup>24</sup> y son importantes en los complejos proteicos, ya que las mutaciones en estos residuos alteran su estabilidad.<sup>25</sup> Por lo tanto, las mutaciones en los puntos críticos de Splunc1 y HR2 podrían afectar el reconocimiento del SARS-CoV-2 y la respuesta inmune asociada.

Se ha demostrado que la predicción de interacciones es eficaz en la comprensión del sistema inmunológico para diseñar posibles terapias<sup>27</sup> y vacunas para varios patógenos como *Chlamydia trachomatis*,<sup>27</sup> *Leishmania* spp.<sup>28</sup> y diversos virus humanos,<sup>29</sup> incluido el SARS-CoV-2, donde se han estudiado los perfiles de puntos críticos de la proteína S y la interfaz del receptor ACE2.<sup>30,31</sup> Por lo tanto, los resultados aquí obtenidos pueden mejorar los tratamientos terapéuticos mediante la estimulación de TLR2, ya que el dominio S2 activa a este receptor,<sup>32</sup> lo cual es consistente con las predicciones realizadas, donde el complejo TLR2/TLR1 puede reconocer a S2, a través de la Interacción con HR2. Asimismo, la predicción de interacciones puede mejorar el diseño de vacunas contra SARS-CoV-2 utilizando el ARNm del dominio HR2 como alternativa a las vacunas de ARNm del dominio RBD.<sup>33</sup>

## CONCLUSIONES

En este estudio se propone que el SARS-CoV y el SARS-CoV-2 podrían ser reconocidos por el complejo TLR2/TLR1 a través del dominio HR2, lo que podría influir en la expresión de *splunc1* en las células del epitelio respiratorio, dependiendo de los SNPs en los TLRs. Sin embargo, el dominio

HR2 de SARS-CoV-2 podría ser mejor reconocido por Splunc1 y sus variantes que el de SARS-CoV. Lo anterior representa información valiosa para el desarrollo de una terapia eficaz y para la mejora del diseño de vacunas, ante la epidemia actual de Covid-19.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020;5(4):536-544. doi:10.1038/s41564-020-0695-z
2. Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet.* 2020;395(10223):507-513. doi:10.1016/S0140-6736(20)30211-7
3. Wang C, Horby PW, Hayden FG, Gao GF. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet.* 2020;395(10223):470-473. Doi:10.1016/S0140-6736(20)30185-9
4. Li Q, Guan X, Wu P, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel Coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med.* 2020;382(13):1199-1207. Doi:10.1056/NEJMoa2001316
5. WHO. COVID-19 Situation Report 2020. <https://covid19.who.int/>. Accessed July 7, 2021
6. Li T. Diagnosis and clinical management of severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection: an operational recommendation of Peking Union Medical College Hospital (V2.0). *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):582-585. Doi:10.1080/22221751.2020.1735265
7. Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol.* 2020;92(4):418-423. Doi:10.1002/jmv.25681
8. Ahmed SF, Quadeer AA, McKay MR. Preliminary identification of potential vaccine targets for the COVID-19 Coronavirus (SARS-CoV-2) based on SARS-CoV immunological studies. *Viruses.* 2020;12(3):254. Doi:10.3390/v12030254
9. Song W, Gui M, Wang X, Xiang Y. Cryo-EM structure of the SARS coronavirus spike glycoprotein in complex with its host cell receptor ACE2. *PLoS Pathog.* 2018;14(8):e1007236. Doi:10.1371/journal.ppat.1007236
10. Scialo F, Daniele A, Amato F, et al. ACE2: the major cell entry receptor for SARS-CoV-2. *Lung.* 2020;198(6):867-877. Doi:10.1007/s00408-020-00408-4
11. Hua R, Zhou Y, Wang Y, Hua Y, Tong G. Identification of two antigenic epitopes on SARS-CoV spike protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;319(3):929-935. Doi:10.1016/j.bbrc.2004.05.066
12. Shang J, Wan Y, Luo C, et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(21):11727-11734. doi:10.1073/pnas.2003138117
13. Xia S, Liu M, Wang C, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion. *Cell Res.* 2020;30(4):343-355. Doi:10.1038/s41422-020-0305-x
14. Bosch BJ, Martina BE, Van Der Zee R, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection inhibition using spike protein heptad repeat-derived peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(22):8455-8460. Doi:10.1073/pnas.0400576101
15. Elshabrawy HA, Coughlin MM, Baker SC, Prabhakar BS. Human monoclonal antibodies against highly conserved HR1 and HR2 domains of the SARS-CoV spike protein are more broadly neutralizing. *PLoS One.* 2012;7(11):e50366. Doi:10.1371/journal.pone.0050366
16. Virji M. Pathogenic neisseriae: surface modulation, pathogenesis and infection control. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(4):274-286. Doi:10.1038/nrmicro2097
17. Saferali A, Obeidat M, Bérubé JC, et al. Polymorphisms associated with expression of BPIFA1/BPIFB1 and lung disease severity in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2015;53(5):607-614. Doi:10.1165/rcmb.2014-0182OC
18. Zhou HD, Fan SQ, Zhao J, et al. Tissue distribution of the secretory protein, SPLUNC1, in the human fetus. *Histochem Cell Biol.* 2006;125(3):315-324. Doi:10.1007/s00418-005-0070-4



19. Thaikoottathil J, Chu HW. MAPK/AP-1 activation mediates TLR2 agonist-induced SPLUNC1 expression in human lung epithelial cells. *Mol Immunol*. 2011;49(3):415-422. Doi:10.1016/j.molimm.2011.08.005
20. Akram KM, Moyo NA, Leeming GH, et al. An innate defense peptide BPIFA1/SPLUNC1 restricts influenza A virus infection. *Mucosal Immunol*. 2018;11(1):71-81. Doi:10.1038/mi.2017.45
21. Beamer LJ, Carroll SF, Eisenberg D. Crystal structure of human BPI and two bound phospholipids at 2.4 angstrom resolution. *Science*. 1997;276(5320):1861-1864. Doi:10.1126/science.276.5320.1861
22. Bell JK, Mullen GE, Leifer CA, Mazzone A, Davies DR, Segal DM. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol*. 2003;24(10):528-533. Doi:10.1016/s1471-4906(03)00242-4
23. Ishii A, Matsuo A, Sawa H, et al. Lamprey TLRs with properties distinct from those of the variable lymphocyte receptors. *J Immunol*. 2007;178(1):397-406. Doi:10.4049/jimmunol.178.1.397
24. Bogan AA, Thorn KS. Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J Mol Biol*. 1998;280(1):1-9. Doi:10.1006/jmbi.1998.1843
25. Keskin O, Ma B, Rogale K, Gunasekaran K, Nussinov R. Protein-protein interactions: organization, cooperativity and mapping in a bottom-up Systems Biology approach. *Phys Biol*. 2005;2(2):S24-S35. Doi:10.1088/1478-3975/2/2/S03
26. Cukuroglu E, Gursoy A, Keskin O. HotRegion: a database of predicted hot spot clusters. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(Database issue):D829-D833. Doi:10.1093/nar/gkr929
27. O'Morain C, Montague S. Challenges to therapy in the future. *Helicobacter*. 2000;5 Suppl 1:S23-S31. Doi:10.1046/j.1523-5378.2000.0050s1023.x
28. Dhillon BK, Smith M, Baghela A, Lee AHY, Hancock REW. Systems biology approaches to understanding the human immune system. *Front Immunol*. 2020;11:1683. Doi:10.3389/fimmu.2020.01683
29. Brito RC, Guimarães FG, Velloso JP, et al. Immunoinformatics Features Linked to Leishmania Vaccine Development: Data Integration of Experimental and In Silico Studies. *Int J Mol Sci*. 2017;18(2):371. Doi:10.3390/ijms18020371
30. Cook HV, Doncheva NT, Szklarczyk D, von Mering C, Jensen LJ. Viruses.STRING: A virus-host protein-protein interaction database. *Viruses*. 2018;10(10):519. Doi:10.3390/v10100519
31. Lim H, Baek A, Kim J, et al. Hot spot profiles of SARS-CoV-2 and human ACE2 receptor protein protein interaction obtained by density functional tight binding fragment molecular orbital method. *Sci Rep*. 2020;10(1):16862. Doi:10.1038/s41598-020-73820-8
32. Jia H, Neptune E, Cui H. Targeting ACE2 for COVID-19 therapy: opportunities and challenges. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2021;64(4):416-425. Doi:10.1165/rcmb.2020-0322PS
33. Khan S, Shafiei MS, Longoria C, Schoggins J, Savani RC, Zaki H. SARS-CoV-2 spike protein induces inflammation via TLR2-dependent activation of the NF- $\kappa$ B pathway. Preprint. *bioRxiv*. 2021;2021.03.16.435700. Doi:10.1101/2021.03.16.435700
34. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N Engl J Med*. 2021;384(5):403-416. doi:10.1056/NEJMoa2035389

## **NIVEL DE ACEPTACIÓN DE CONSUMO DE UN PRODUCTO A BASE DE HARINA DE GRILLO (GRILLIDAE ACHETA DOMESTICUS), ANTIOXIDANTES Y FIBRA.**

Martha Liliana Palacios Jaimes, Imelda García Argueta, Marcela Hernández Sánchez

Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México  
[mlpalaciosmx@yahoo.com.mx](mailto:mlpalaciosmx@yahoo.com.mx)

### **RESUMEN**

Dentro de los nutrientes esenciales para el desarrollo de la vida humana se encuentran las proteínas. Estas son el componente principal de células y tejidos, además de ser utilizadas para diversas funciones del organismo, tales como crecimiento, desarrollo corporal, reparación y mantenimiento de tejidos, suministro de energía y otras actividades metabólicas. Las fuentes convencionales de proteínas han sido los productos cárnicos procedentes de animales de granja. Sin embargo, el aprovisionamiento y consumo de estas fuentes de proteína, causa un gran impacto ambiental sobre el planeta, que se acentuará en los próximos años con el aumento de la población total. Los insectos son de gran contenido proteico y desde la antigüedad se han utilizado para proveer los nutrientes necesarios para el desarrollo de la vida humana por muchas culturas, en algunas por la carencia de alimentos y en otras por ser considerados manjares. Los insectos contienen una elevada cantidad de proteína, incluso mayor que los animales de granja que comúnmente se consumen, una comparación clara es el aporte de 100 g de grillo seco que contiene 68.7 g de proteína y la carne de res contiene 27.4 g. Existen algunos alimentos a los cuales se les ha atribuido propiedades antioxidantes, como es el caso de algunos frutos secos como lo son: almendras, maní y nueces; antioxidantes que se les ha vinculado con la reducción en los niveles de colesterol total y lipoproteínas de baja densidad aumentados en sangre, cuando forman parte de la alimentación habitual, variada y saludable. La fibra dietética, que se encuentra principalmente en frutas, verduras, granos enteros y legumbres, es probablemente más conocida por su capacidad de prevenir o aliviar el estreñimiento. Pero los alimentos que contienen fibra también pueden brindar otros beneficios para la salud, como ayudar a mantener un peso saludable y reducir el riesgo de sufrir diabetes, enfermedades cardíacas y algunos tipos de cáncer. El presente trabajo consistió en un análisis de nivel de aceptación para el consumo de un producto a base de harina de grillo, antioxidantes y fibra, al cual se le realizó un análisis sensorial, aplicándose un cuestionario a 50 personas quienes evaluaron los atributos de este alimento tipo galleta en sus categorías de sabor, color, olor y textura; obteniéndose los siguientes resultados un 92.1% aprobaron el productos y estarían dispuestos a consumirlo, se observó una aceptación del 63% en color, 79 % de sabor, 77% de olor y un 91% de aceptación en la consistencia. Se concluye que este producto resulta ser aceptado por la población encuestada respecto a sus cualidades sensoriales, además de representar una opción saludable ya que contiene un contenido importante de proteína, antioxidantes y fibra.

### **INTRODUCCIÓN**

La alimentación es una actividad fundamental en nuestra vida. Por una parte, tiene un papel importantísimo en la socialización del ser humano y su relación con el medio que le rodea. Por otra, es el proceso por el cual obtenemos los nutrientes que nuestro cuerpo necesita para vivir. Los nutrientes son las sustancias químicas contenidas en los alimentos que el cuerpo descompone, transforma y utiliza para obtener energía y materia para que las células lleven a cabo sus funciones correctamente. Como no existe ningún alimento que nos proporcione todos los nutrientes en las cantidades que necesitamos (a excepción de la lactancia materna) es preciso desarrollar productos con macro y micronutrientes que proporcionen elementos tales como proteínas, antioxidantes y fibra que representen alternativas saludables para la población.

Los seres humanos han consumido insectos a lo largo de los siglos. Proveen nutrientes y su calidad nutricional puede ser mayor que la de los cereales y similar a la de los productos cárnicos. Según estudios paleontológicos, la entomofagia (nombre designado al consumo de insectos por humanos) se ha practicado desde el año 7500 a.C. En diversas regiones de América, Asia y África es muy común el consumo de insectos. Su valor nutritivo los convierte en un alimento complejo, su masa corporal está compuesta entre el 60 y 70 % por proteínas y el tipo de grasas que poseen son

polinsaturadas, algunas de fácil digestión, pudiéndose comparar con el valor nutricional del pollo, res o cerdo.

Hoy en día se han desarrollado productos alimenticios utilizando alimentos que poseen propiedades nutrimentales tales como proteínas, antioxidantes o ricos en fibra que pueden solucionar problemas de salud tales como hipertensión, diabetes, aterosclerosis, etc.

## TEORÍA

### 1. PROTEÍNAS

Las proteínas son macromoléculas las cuales desempeñan el mayor número de funciones en las células de los seres vivos. Forman parte de la estructura básica de tejidos (músculos, tendones, piel, uñas, etc.), durante todos los procesos de crecimiento y desarrollo, crean, reparan y mantienen los tejidos corporales; además desempeñan funciones metabólicas (actúan como enzimas, hormonas, anticuerpos) y reguladoras a saber: asimilación de nutrientes, transporte de oxígeno y de grasas en la sangre, eliminación de materiales tóxicos, regulación de vitaminas liposolubles y minerales, etc <sup>1</sup>. Existen veinte aminoácidos distintos, codificados en el material genético de los organismos, pueden combinarse en cualquier orden y repetirse de cualquier manera para dar lugar a estas macromoléculas. Una proteína típica está formada por unos cien o doscientos aminoácidos, lo que da lugar a un número muy grande de combinaciones diferentes. Y por si esto fuera poco, según la configuración espacial que adopte una determinada secuencia de aminoácidos, sus propiedades pueden ser totalmente diferentes, como consecuencia, realizar diferentes funciones. Tanto los carbohidratos como los lípidos tienen una estructura relativamente más simple comparada con la complejidad y diversidad de las proteínas. Prácticamente todos los alimentos contienen proteínas, aunque no en la misma concentración. En el medio no especializado y hasta en muchos textos de nutrición existe la idea, la cual es errónea, de que es importante el origen de la proteína, es decir, animal o vegetal. Si bien, las proteínas de origen animal son de mejor calidad, esto no quiere decir que las vegetales no se puedan aprovechar, o que su calidad se vea desmerecida.

Las proteínas se encuentran distribuidas de forma heterogénea en una amplia gama de alimentos. Nuestro aparato digestivo las hidroliza para obtener aminoácidos sueltos o pequeñas cadenas de dos o tres que el intestino puede absorber. Una vez en nuestras células, estas utilizan esos aminoácidos para sintetizar nuevas proteínas del tipo y en cantidad que le sean necesarias en cada momento. Las proteínas se presentan en mayor cantidad en carnes, pescados, huevos, lácteos, especialmente queso, frutos secos y legumbres. Por su parte, frutas y verduras apenas contienen proteínas <sup>2</sup>.

#### 1.1. INSECTOS COMO FUENTE DE PROTEÍNA

Del análisis químico se desprende que la carne de los insectos se compone de las mismas sustancias que la de los animales superiores. Algunos investigadores están convencidos de que los insectos pueden proporcionar gran parte de las calorías necesarias a las personas de países en donde el consumo de alimentos está muy limitado; es un medio de paliar el hambre en el mundo. Además, poseen una alta eficiencia nutricional, esto es, la capacidad para transformar el alimento que consume en peso de su propio cuerpo, capacidad semejante a la del pollo. Hay que tener en cuenta que gran parte de los insectos comestibles son vegetarianos estrictos. Son ricos en proteínas y en vitaminas, especialmente del grupo B, y con un alto contenido en minerales, especialmente sodio, potasio, fósforo y calcio <sup>2</sup>.

Las proteínas de los insectos presentan, además, una alta digestibilidad; sus cifras oscilan entre un 33% y un 95%. Hay que tener en cuenta que el límite por encima del cual se considera a un alimento como "concentrado proteínico" es el 60%. La eficiencia nutricional, a la que anteriormente se ha hecho referencia, es un factor de particular interés en el caso de los insectos. Disponen de una gran capacidad de transformación de los diversos alimentos que ingieren en tejidos corporales de mayor calidad nutricional <sup>3,4</sup>.

##### 1.1.1. Grillidae Acheta domesticus

Grillidae Acheta domesticus o también llamado grillo doméstico es un insecto perteneciente a la familia de los Ortópteros, es nativo del sudeste asiático y según estudios de rADN pudo haber sido introducido a Norte América desde Europa en el siglo XVIII. Este insecto hemimetábolo completa su ciclo de maduración en 2 meses; los jóvenes alcanzan la adultez en 30 días a 28-30 °C y los adultos



pueden vivir de 2 a 3 meses, son omnívoros y autorregulan su población mediante el canibalismo. Estos pueden cultivarse en densidades de hasta 2000 grillos por metro cuadrado <sup>5</sup>. En la tabla 1 se encuentra la composición del grillo *Acheta domesticus* según diferentes autores en las etapas de ninfa y adulto.

**Tabla 1.** Composición proximal de *Acheta domesticus* en porcentaje.

<i>Etapa</i>	<i>CP</i>	<i>EE</i>	<i>NFE</i>	<i>Cenizas</i>	<i>Referencias</i>
Adulto	66,6	22,1		3,6	Finke (2002)
Adulto	64,9	13,8		5,7	Bernard et al. (1997)
Ninfa	67,2	14,4	3,9	4,8	Finke (2002)

Nota. CP: Proteína Cruda; EE: Extracto Etéreo; and NFE: Extracto Libre de Nitrógeno.

Fuente: Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Situación de los insectos en la alimentación humana. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, España, 2016

Se observa que ésta especie de grillo contiene un importante porcentaje de proteína cruda, siendo mayor en la etapa de ninfa. En cuanto a las cenizas y el extracto libre de nitrógeno (que comprende en su mayoría a los carbohidratos digeribles), son porcentajes relativamente bajos en comparación con el de la proteína. El extracto etéreo se encuentra en mayor porcentaje en la etapa de adulto, etapa en la cual es más fácil su cosecha y se tiene mayor rendimiento en peso. En la especie de grillos *Acheta domesticus* el ácido graso saturado en mayor proporción es el palmítico (16: 00), y a su vez las cantidades de éste y el esteárico (18: 00) son mayores que en el aceite de pescado y de soya; por el contrario el ácido graso saturado mirístico (14:00) es mayor en el aceite de pescado. En cuanto a los MUFA, los grillos tienen una cantidad similar aunque mayor de ácido oleico (18: 1n9) que los aceites de soya y pescado, pero en el caso del ácido palmitoléico (16: 01) está más presente en el aceite de pescado. En los PUFA, se observa que los grillos contienen una cantidad considerable mayor de ácido linoleico (18: 2n6), aunque el aceite de soya tiene cantidad similar pero mayor de ácido linoléico (18:3n3); los grillos no contienen los ácidos grasos araquidónico (20:4n6), EPA (20: 5n3) y docosahexaenoico (22: 6n3) que sí están presentes en el aceite de soya, y el ácido dihomo-gamma-linoléico (20:3n6) no está presente en ninguno de los aceites ni en los grillos <sup>6,7</sup>.

## 2. ANTIOXIDANTES

En los últimos años del siglo XX se generó una verdadera revolución en el campo de las investigaciones relacionadas con el estrés oxidativo, sobre todo debido a la relación que se cree existe entre éste y el envejecimiento. Aunque este enigma aún no ha podido ser descifrado debidamente, no es menos cierto que si han salido a la luz otra serie de resultados, que permiten establecer que la mayoría de las enfermedades crónicas están muy implicadas con el desequilibrio entre los fenómenos de oxidación y reducción del cuerpo humano. El estrés oxidativo se puede definir como una perturbación del equilibrio entre prooxidantes y antioxidantes, con un desplazamiento a favor de los primeros, de modo tal que esta alteración da lugar a cambios en las biomoléculas y de hecho, a modificaciones funcionales en los lugares donde las mismas se encuentren en un momento dado. Puede decirse entonces que el estrés oxidativo es, en esencia, el efecto adverso que se produce en la sangre y los tejidos de los seres vivos cuando existe un incremento de la degradación de sus biomoléculas causado por radicales libres de oxígeno. Dicha lesión oxidativa, cuando se produce en moléculas de gran importancia biológica como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, puede conducir a la muerte celular. A medida que aumentan nuestros conocimientos en el campo de los radicales libres, se pone en evidencia su gran implicación en los mecanismos patogénicos de muchas enfermedades, sobre todo en las de tipo crónico.<sup>7</sup>

### 2.1 RADICALES LIBRES

Los radicales libres (RL) o más modernamente llamados especies reactivas de oxígeno (ERO) son átomos o moléculas que contienen uno o más electrones no apareados en el orbital más externo, lo que produce una gran reactividad en dicha estructura. De hecho, esto da lugar a que estos RL intervengan con gran eficacia y rapidez en un sinnúmero de procesos bioquímicos a nivel celular. Su

gran reactividad es al final de cuentas la causante de su toxicidad. Normalmente las ERO no son más que metabolitos fisiológicos, pero en ciertas condiciones o estados propios de la actividad del hombre en relación con su medio, la producción de estos compuestos puede incrementarse en forma considerable, rompiéndose entonces el equilibrio que debe existir entre estos y sus rivales o contrapartes los antioxidantes corporales.<sup>8,9</sup>

## 2.2 FUENTES ALIMENTICIAS DE ANTIOXIDANTES.

Las fuentes más comunes de los diversos antioxidantes son:

Betacarotenos: naranjas, zanahoria, mangos, calabaza, brócoli, boniato y calabacín

Luteína: presente en los vegetales de hojas verdes

Licopeno: toronja rosada, sandía y tomates

Selenio: cereales, leguminosas, pescado, pan integral y frutos secos

Vitamina A: leche, hígado, mantequilla y huevos

Vitamina C: papayas, fresas, naranjas y kiwi

Vitamina E: nueces y semillas, espinaca y la col rizada.<sup>9</sup>

Todas ellas de una u otra manera le ayudan a tu cuerpo a luchar contra los efectos de los radicales libres y de esta manera disminuir sus efectos.

### 2.2.1. ARÁNDANOS

Las bayas de arándano son muy nutritivas, ricas en fibra y libre de grasas y sodio. Su aporte calórico es relativamente bajo, de unas 30 calorías por cada 100 gramos. Además, cuentan con un buen contenido de provitamina A, vitaminas C y E y magnesio. En concreto, las vitaminas que se encuentran presentes dentro de los arándanos son la vitamina C, la niacina (B3) y la riboflavina (Vitamina B2), las cuales está en una proporción de 10, 0,4 y 0,05 miligramos por cada 100 gramos de frutos de arándano. Las sales minerales más abundantes dentro de la composición de los arándanos son el potasio, el fósforo y el calcio, las cuales se encuentran en una proporción de 80, 12 y 10 miligramos por cada 100 gramos de arándanos. Además, contiene diversas sustancias que le confieren sus grandes propiedades curativas: Taninos: catéquicos (5-12%) y proantocianidinas oligoméricas, Flavonoides: astragalina, hiperósido, quercitina e isoquercitina, Antocianos (0,1-0,5%): malvidina, cianidina, petunidina y heterósidos de delfinidina con distintos azúcares. Ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico: ácidos cafeico y clorogénico. Triterpenos: ácido usólico. Iridoides: asperulósido y onotropeína (ésta sólo aparece en los frutos sin pelar). Ácidos orgánicos (1%): ácidos quínico, málico y cítrico. Glúcidos (3-7%): polisacáridos como la pectina.<sup>9,10</sup>

## 3. FIBRA

La fibra dietética o también llamada fibra alimentaria no es una entidad homogénea y en sus distintas modalidades, constituye un importante componente de la dieta. La American Association of Cereal Chemist (2001) la define como: la fibra dietética es la parte comestible de las plantas o hidratos de carbono análogos que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado, con fermentación completa o parcial en el intestino grueso. La fibra dietética incluye polisacáridos, oligosacáridos, lignina y sustancias asociadas de la planta. Las fibras dietéticas promueven efectos beneficiosos fisiológicos como el laxante, y/o atenúa los niveles de colesterol en sangre y/o atenúa la glucosa en sangre. Existe una definición más actual que añade a la anteriormente citada el concepto de fibra funcional o fibra añadida incluyendo así otros hidratos de carbono absorbibles como son el almidón resistente, la inulina y algunos oligosacáridos y disacáridos<sup>6</sup>.

Los cereales, las legumbres, las frutas, las hortalizas y los frutos secos son la fuente más importante de fibra dietética en la dieta mediterránea. La fibra insoluble se encuentra, principalmente, en cereales y sus derivados (especialmente en su forma integral), leguminosas como los guisantes, frutos secos y algunas hortalizas (repollo, vegetales de raíz...) y frutas especialmente maduras. La fibra soluble es variable en la composición de los alimentos, aunque se encuentra de forma mayoritaria en frutas, verduras, hortalizas, legumbres y en algunos cereales como la avena y la cebada. En estos grupos de alimentos, la fibra soluble representa un porcentaje elevado respecto al total de fibra dietética presente en el alimento<sup>7</sup>.

### 3.1. AVENA

La avena (*Avena sativa* L.) es un cereal cuyo grano completo tiene un elevado contenido en fibra dietética soluble, en la que se incluye el beta-glucano, aportando también proteínas, lípidos, vitaminas, minerales y polifenoles, como las avenantramidas. Además, la avena no contiene gluten, de ahí que sea un cereal bien tolerado por la mayoría de las personas con celiaquía. Por su contenido en fibra y fitoquímicos, principalmente, diversos estudios clínicos han evaluado la eficacia del consumo de los cereales de grano completo, en la prevención y control de la enfermedad cardiovascular, diabetes, regulación de la presión arterial, control de peso, salud gastrointestinal, e incluso el cáncer. En concreto, en el caso de la avena numerosas investigaciones han mostrado un efecto positivo en la reducción del colesterol en sangre y, por tanto, en la reducción del riesgo de enfermedad coronaria, habiéndose atribuido este efecto al beta-glucano, más que a la fibra soluble en general. Por ello, se han realizado diversas declaraciones de propiedades saludables aprobadas por la legislación actual en relación con el consumo de productos/ alimentos elaborados con este cereal. Se considera que la avena y otros cereales de grano completo (trigo, maíz, arroz, cebada, centeno, quinoa, mijo) deben formar parte de una dieta equilibrada, habiéndose incluido en las guías alimentarias de numerosos países europeos, asiáticos y americanos<sup>7, 8</sup>.

#### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la aceptación de un producto a base de harina de grillo, antioxidantes y fibra, con diferentes niveles de azúcar.

#### **PARTE EXPERIMENTAL**

Se realizó un estudio experimental, transversal y prospectivo. Se efectuó un análisis descriptivo de las variables de interés y se establecieron diferencias en el nivel de aceptación de cada uno de los productos.

#### **UNIVERSO DE TRABAJO Y MUESTRA**

Se tomó una muestra a conveniencia de 30 participantes para llevar a cabo el estudio. De acuerdo con Anzaldúa-Morales Antonio el número mínimo para que tenga validez estadística en los datos recolectados es de 30 jueces consumidores para pruebas de aceptación.<sup>12</sup>

#### **INSTRUMENTO DE INVESTIGACIÓN**

Se utilizó la escala Likert que está compuesta por cuatro secciones:

Sección 1: Instrucciones y datos generales (número de folio, edad, sexo)

Sección 2: Análisis sensorial de la muestra A

Sección 3: Análisis sensorial de la muestra B

Sección 4: análisis sensorial de la muestra C.

#### **ANÁLISIS SENSORIAL**

El análisis sensorial se realizó empleando la técnica de aceptabilidad o nivel de agrado. En esta prueba a cada juez se le proporcionaron tres muestras del producto con diferentes porcentajes de azúcar en un plato desechable, se le pidió que respondiera un cuestionario en donde especificará el nivel de agrado.

#### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Después de obtener los resultados se analizaron mediante una prueba estadística ANOVA para determinar diferencias entre tres productos. Con el nivel de confianza de 95% y se consideró un valor estadísticamente significativo si la *p* es menor a 0.05. Además, se determinaron frecuencias para medir la aceptación del sabor, color, olor y textura del producto.

#### **DISEÑO DE ANÁLISIS**

Los datos recopilados durante el análisis sensorial fueron revisados, clasificados, resumidos y presentados a través de estadística descriptiva; por medio de cuadros y gráfica.

La base de datos fue analizada mediante un análisis de varianza (ANOVA) al 95% de confianza para identificar si existen diferencias significativas entre las muestras.

**RESULTADOS**

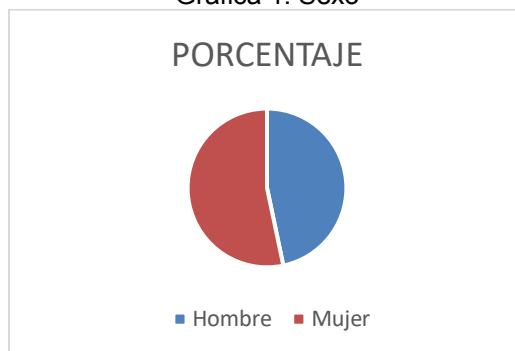
El 46.75 de los participantes en la evaluación sensorial fueron hombres y el 53.3% mujeres como se muestra en la tabla 1 y gráfica 1

Tabla 1. Porcentaje y frecuencias por

SEXO	Frecuencia	Porcentaje
Hombre	14	46.7
Mujer	16	53.3
Total	30	100

Fuente: Datos del instrumento

Gráfica 1. Sexo



Fuente: Datos tabla 1

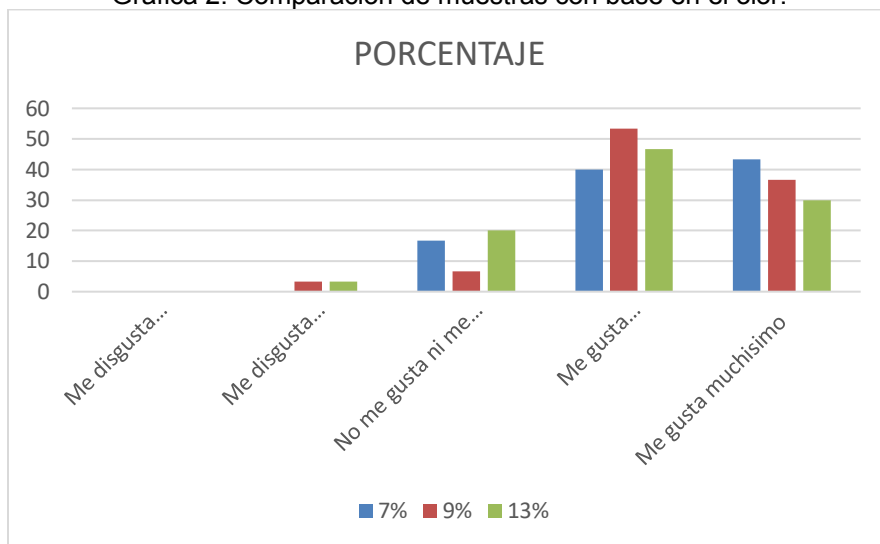
En cuanto a la valoración al olor del producto el 40% de los participantes reporto que la muestra con el 7% les gusto moderadamente el producto y al 43% les gusto muchísimo. El 53.3% de los participantes reporto que la muestra con el 9% de azúcar les gusto muchísimo. El 53% de los participantes reporto que la muestra con el 9% de azúcar les gusta moderadamente con base al olor y el 36.7% les gusto muchísimo. El 43.3% de los participantes reporto que la muestra con el 13% de azúcar les gusto moderadamente y al 30% les gusto muchísimo el olor de dicha muestra, como se muestra en la tabla 2 y grafica 2

Tabla 2. Nivel de aceptación de olor

OLOR	7%	9%	13%
Me disgusta muchísimo	0	0	0
Me disgusta moderadamente	0	3.3	3.3
No me gusta ni me disgusta	16.7	6.7	20
Me gusta moderadamente	40	53.3	46.7
Me gusta muchísimo	43.3	36.7	30
Total	100	100	100

Fuente: Datos del instrumento

Gráfica 2. Comparación de muestras con base en el olor.



Fuente: Datos tabla 2

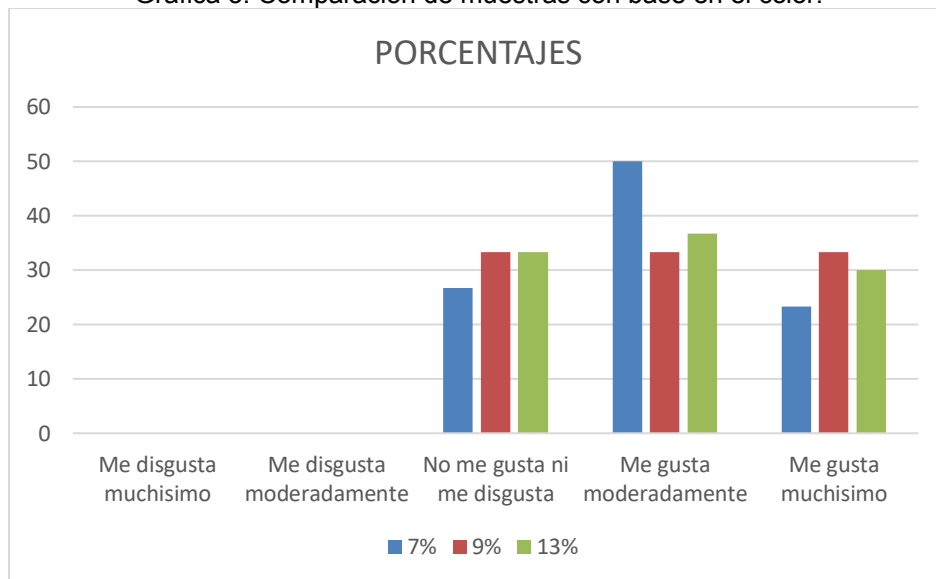
Con base en la evaluación del color, el 50% de los participantes reportó que la muestra con el 7% de azúcar les gustó moderadamente, con base en el color y al 23.3% les gustó muchísimo. El 33.3% de los participantes reportó que la muestra con el 9% de azúcar les gustó moderadamente y muchísimo dicha muestra el 36.7% de los participantes reportó que les gustó moderadamente la muestra con el 13% de azúcar y al 30% les gustó moderadamente con base en el color, como se muestra en la tabla 3 y gráfica 3.

Tabla 3. Nivel de aceptación de color.

COLOR	7%	9%	13%
Me disgusta muchísimo	0	0	0
Me disgusta moderadamente	0	0	0
No me gusta ni me disgusta	26.7	33.3	33.3
Me gusta moderadamente	50	33.3	36.7
Me gusta muchísimo	23.3	33.3	30
Total	100	100	100

Fuente: Datos del instrumento

Gráfica 3. Comparación de muestras con base en el color.



Fuente: Datos tabla 3

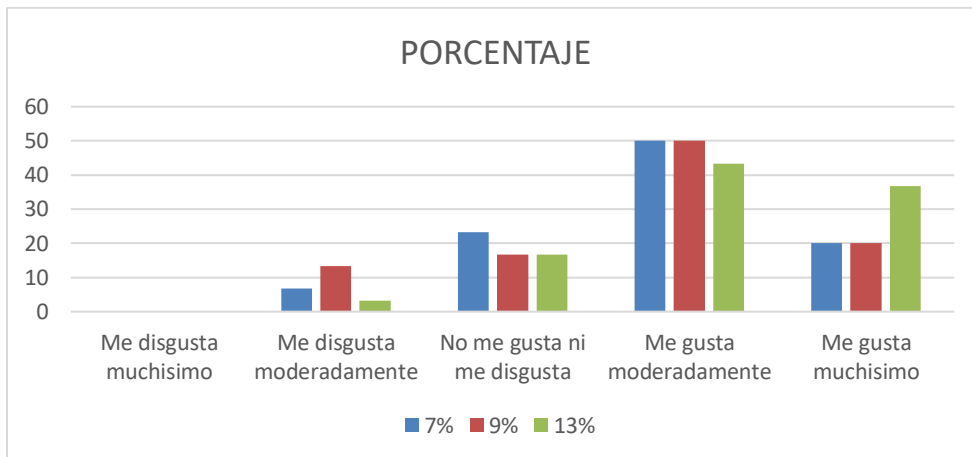
Con base en la textura del producto, el 50% de los participantes reporto que la muestra con el 7% y 19% de azúcar les gusto moderadamente. Así mismo el 20% reporto que les gustó muchísimo en dicha muestra. El 43.3% de los participantes reporto que les gusto moderadamente el producto y al 36.7% les gusto muchísimo, como se muestra en la tabla 4 y gráfica 4

Tabla 4. Nivel de aceptación de textura.

TEXTURA	7%	9%	13%
Me disgusta muchísimo	0	0	0
Me disgusta moderadamente	6.7	13.3	3.3
No me gusta ni me disgusta	23.3	16.7	16.7
Me gusta moderadamente	50	50	43.3
Me gusta muchísimo	20	20	36.7
Total	100	100	100

Fuente: Datos del instrumento

Gráfica 4. Comparación de muestras con base a la textura



Fuente: Datos tabla 4

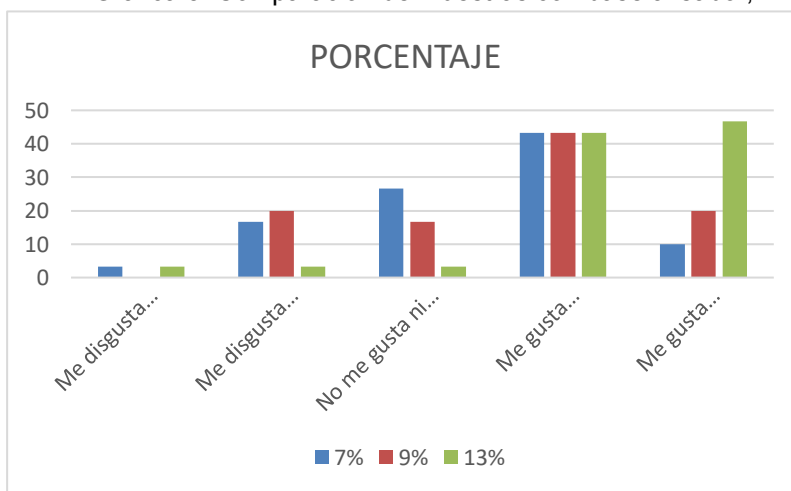
De acuerdo con la valoración del sabor del producto, el 43% de los participantes reporto que la muestra con el 7,9 y 13% de azúcar les gusto moderadamente con base en el sabor, sin embargo, el 46.7% reporto que la muestra con el 13% les gusta muchísimo. Para la muestra al 9% de azúcar el 20% de los participantes reportaron que les gustó muchísimo. Al 10% de los participantes les gustó muchísimo la muestra al 7% de azúcar, como se muestra en la tabla 5 y gráfica 5

Tabla 5. Nivel de aceptación de sabor.

SABOR	7%	9%	13%
Me disgusta muchísimo	3.3	0	3.3
Me disgusta moderadamente	16.7	20	3.3
No me gusta ni me disgusta	26.7	16.7	3.3
Me gusta moderadamente	43.3	43.3	43.3
Me gusta muchísimo	10	20	46.7
Total	100	100	100

Fuente: Datos del instrumento.

Gráfica 5. Comparación de muestras con base al sabor,.



Fuente: Datos tabla 5

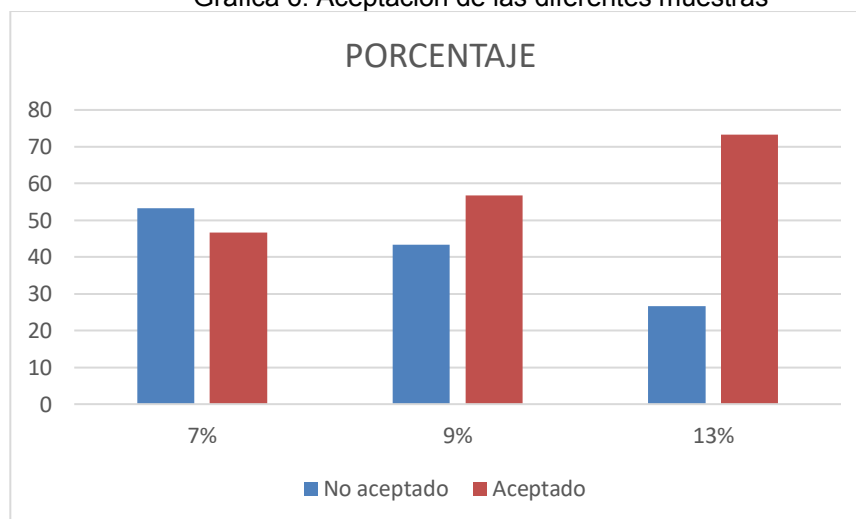
La muestra que contiene el 13% de azúcar es la más aceptada con el 73.3% y la muestra menos aceptada con el 53.3% es la que contiene el 7% de azúcar como se muestra en la tabla 6 y gráfica 6.

Tabla 6. Aceptación del producto

	7%	9%	13%
No aceptado	53.3	43.3	26.7
Aceptado	46.7	56.7	73.3
Total	100	100	100

Fuente: Datos del instrumento

Gráfica 6. Aceptación de las diferentes muestras



Fuente: Datos tabla 6

De acuerdo con todas las propiedades del producto se observa que el sabor es la propiedad con diferencias entre cada muestra, la textura, el color y el olor no presentaron diferencias significativas, de acuerdo con la tabla 7 y gráfica 7.

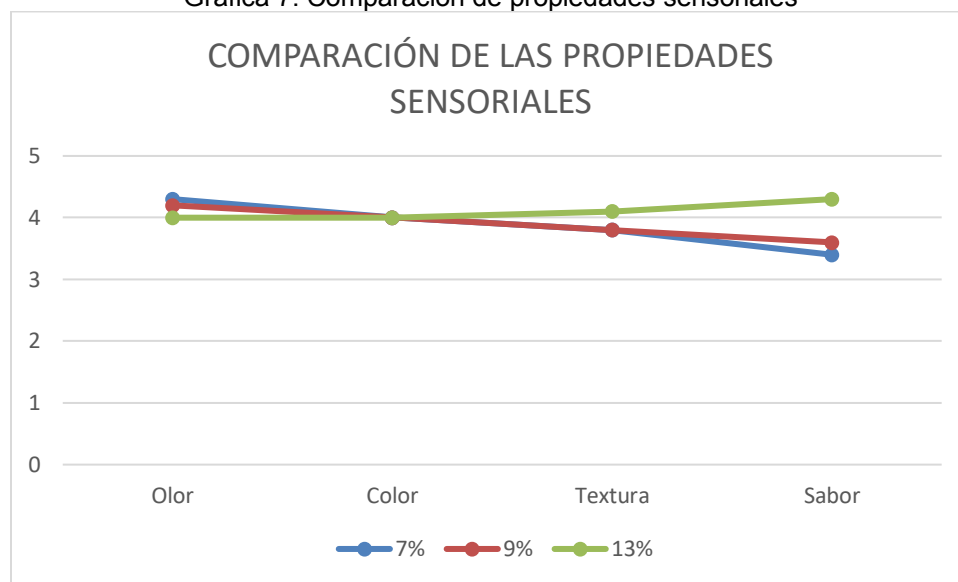
Tabla 7. Comparación de propiedades sensoriales

	7%	9%	13%
Olor	4.3	4.2	4
Color	4	4	4
Textura	3.8	3.8	4.1
Sabor	3.4	3.6	4.3

Fuente: Datos del instrumento



Gráfica 7. Comparación de propiedades sensoriales



Fuente: Datos tabla 7

Se muestra una diferencia significativa en el sabor, siendo la mas aceptada la que contiene el 13% de azúcar, al 95% de confianza ( $p=0.003$ ) (tabla 8)

Tabla 8. Prueba estadística ANOVA

		Suma de cuadrados	Media cuadrática	Significancia
Sabor	Entre grupos	12.067	6.033	0.003
	Dentro de grupos	86.033	0.989	
	Total	98.1		
Textura	Entre grupos	2.289	1.144	0.222
	Dentro de grupos	65	0.747	
	Total	67.289		
Color	Entre grupos	0.022	0.011	0.982
	Dentro de grupos	53.933	0.62	
	Total	53.956		
Olor	Entre grupos	0.956	0.478	0.44
	Dentro de grupos	50.2	0.577	
	Total	51.156		

Fuente: Datos del instrumento

Al hacer diferencias significativas en el análisis de varianza, se realizó la prueba de Tukey, encontrando que se muestra una diferencia significativa para el sabor entre las muestras al 7 y 13 % de azúcar, al 95% de confianza.

Tabla 9. Prueba estadística Tukey

Porcentaje de azúcar	Porcentaje de azúcar	Sig.
7%	9%	0.636
	13%	0.003
9%	7%	0.636

Fuente: Datos del instrumento

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De los 30 participantes en la evaluación sensorial el 53% fueron mujeres y 46.7% hombres por lo que no existe gran diferencia en cuanto al sexo entre los participantes.

Para el Olor se observa que la muestra con 7% de azúcar, les gusto aun 83.3% de los participantes, considerando que al 43.3% les gustó muchísimo y el 40% les gusto moderadamente la muestra por lo tanto se considera aceptada. Para la muestra al 9% se observó que al 90% de los participantes les gusto el olor no obstante el 53.3% les gusto moderadamente y al 36.7% les gustó muchísimo. Para la muestra al 13% se observó que al 76.7% de los participantes les gusta el olor de dicha muestra siendo esta la más baja en aceptación en cuanto al olor. Al 46.7% les gusto moderadamente y al 30% les gustó muchísimo la muestra. Solo el 3.3% de los participantes reporto que les disgusto moderadamente las muestras al 9 y 13% de azúcar.

A un 73.3% de los participantes, les gusto el color de la muestra al 7% de azúcar siendo la muestra que más les gustó en cuanto a dicha propiedad. Al 50% les gusto moderadamente y al 23.3% les gustó muchísimo. Dejando las muestras al 9 y 13% con los siguientes porcentajes 66.6% y 66.7%.

En cuanto a la textura del producto se observa que al 70% de los participantes les gustaron las muestras al 7 y 9% de azúcar por igual dejando la muestra al 13% de azúcar como la más alta con un 80% de agrado. Al 43.3% les gusto moderadamente y al 36.7% les gustó muchísimo mostrando así que el porcentaje de azúcar influye en la textura del producto. Al 6.7% les disgusto moderadamente la muestra con el 7% de azúcar, al 13.3% les disgusto moderadamente la muestra al 9% y al 3.3% les disgusto moderadamente la muestra con el 13% de azúcar.

Al 90% de los participantes les gusto la muestra al 13% de azúcar con base en el sabor, sin embargo, al 43.3% les gusto moderadamente y al 46.7% les gustó muchísimo. Al 53.3% de los participantes les gusto la muestra al 7% de azúcar, al 43.35% les gusto moderadamente y al 10% les gustó muchísimo, sin embargo, al 20% de los participantes no les gusto el sabor y al 63.3% de los participantes les gusto la muestra al 9% de azúcar, al 43.3% les gusto moderadamente y el 20% les gustó muchísimo.

Comparando las tres muestras al 7, 9 y 13% de azúcar se observa que la muestra al 7% de azúcar no fue aceptada por completo con un 53.3%. la muestra al 13% de azúcar fue la de mayor aceptación con un 73.3%.

Al comparar promedio en las diferentes propiedades del producto que fueron evaluadas se observan diferencias significativas únicamente en el sabor y al hacer la prueba de Tukey para profundizar las diferencias se observa que las muestras al 13% y 7% son las de mayor diferencia entre ellas.

Al observar comentarios que realizaron en el instrumento de investigación los participantes del estudio, se pudo notar que no todos tienen los mismos gustos, algunas personas prefieren sabores más amargos sin embargo la gran mayoría prefieren un balance entre lo amargo y dulce como fue la muestra al 13% de azúcar.

Este producto es recomendable para adultos jóvenes sanos.

No se cuenta con estudios de referencia para hacer una comparación.

## CONCLUSIONES

El sabor es la propiedad que muestra diferencia significativa en la aceptación del producto con diferentes porcentajes de azúcar. Con menor diferencias se encuentra la textura, percibiéndose una textura más dura a menor cantidad de azúcar que resulta en una menor aceptación. Se rechaza la hipótesis nula y existe diferencias en el producto a base de chilate y jarabe de Jamaica la formulación al 13% de azúcar fue la mejor aceptada. El producto a base de harina de grillo tiene una buena aceptación por parte de los consumidores, por lo que representa una opción saludable que lleve en

su formulación, alimentos ricos en proteína, antioxidantes y fibra a pesar de que no todas las personas, tienen los mismos gustos y algunos prefieren sabores más amargos la gran mayoría prefieren un balance entre lo amargo y dulce, como fue la muestra al 13% de azúcar.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alessandrini González, R. Nutrición, Estrés Oxidativo y Envejecimiento. Avances Médicos de Cuba, Centro Internacional de Restauración Neurológica, C. Habana, Cuba, p38-41, 2000 2.
2. Clemens R, van Klinken BJ. Oats, more than just a whole grain: an introduction. Br J Nutr. 2014.
3. Singh R, De S, Belkheir A. Avena sativa (Oat), a potential nutraceutical and therapeutic agent: an overview. Crit Rev Food Sci Nutr. P. 126-144 2013.
4. Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (2016, Marzo). Situación de los insectos en la alimentación humana. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, España. Extraído el 21 de Junio de 2016 desde [http://www.aecosan.mssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/gestion\\_riesgos/INSECTOS\\_ALIMENTACION\\_.pdf](http://www.aecosan.mssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/INSECTOS_ALIMENTACION_.pdf)
5. Arnaldos, G. Entomofagia. Universidad de Murcia, España. 2010. Extraído el 04 de Agosto de 2016 <https://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/23494/1/EFentomofagia.pdf>
6. Dávila, N. Elaboración de una barra alimentaria rica en Proteína, Fibra y Antioxidantes. Santiago de Querétaro, México. 2007. Extraído el 27 de Junio de 2016 desde <http://ri.uaq.mx/bitstream/123456789/2677/1/RI002519.pdf>
7. Borjas Mendoza, G.M. Desarrollo de una barra de cereal con miel y polen destinada para el mercado infantil. Zamorano, Honduras.2012. Extraído el 29 de Mayo de 2016 desde <http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1027/1/AGI-2012-T006.pdf>
8. La fibra dietética. Escudero Álvarez y P. González Sánchez. Revista Nutr. Hosp. 2006.
9. Turnes,J. Fuentes intracelulares de especies oxidantes en condiciones normales y patológicas. Antioxidantes y calidad de vida. 1994, 1: 16-19 3.
10. Stephens NG et al. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease : Cambridge Heart Antioxidant Study(CHIOS). Lancet 1996; 347: 781-786 4.
11. Reyes-Caudillo E, Tecante A, Valdivia-López MA. Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. Food Chemistry. 2008; 107 (2): 656-663. 2.
12. Anzaldúa-Morales Antonio. La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. Editorial Acribia.España.2005

## MORFOMETRÍA Y CUANTIFICACIÓN DE HUEVECILLOS EN *MACROBRACHIUM ACANTHURUS* (CAMARÓN PRIETO) EN EL CAMARÓN (MIXTEQUILLA, VERACRUZ)

Adriana Vargas Rosas, Osvaldo Téllez Acosta, María Teresa Núñez Cardona\*, Lucía Viridiana González López, Javier Iván Lozolla Ortiz y Nancy Carolina Torres Corona

Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Departamento El Hombre y su Ambiente (Licenciatura en Biología).

\*[mtnunez@correo.xoc.uam.mx](mailto:mtnunez@correo.xoc.uam.mx)

### RESUMEN

*Macrobrachium acanthurus*, es un recurso pesquero de valor alimenticio y económico lo cual está sustentado en la reproducción de la especie. Una hembra de *Macrobrachium*, puede tener más de 5,000 huevos y desovar de tres a cuatro veces al año, su estrategia de crecimiento poblacional es de tipo r y el número de crías es elevado. Después del desove, la incubación de los huevecillos dura de 18 a 20 días, dependiendo de la temperatura [1]. El objetivo del presente estudio fue determinar el número y peso promedio de huevos (hueva) en hembras ovígeras de *Macrobrachium acanthurus*, que habita en El Camarón (Mixtequilla, Veracruz). Los ejemplares del camarón prieto fueron colectados en los meses de mayo y junio, con trampas llamadas clarín, y separados por sexo y a las hembras se les removió (del abdomen), la masa de huevecillos y fue medido el peso húmedo de la hueva. Los huevecillos fueron conservados en frascos conteniendo alcohol al 70%, para posteriormente cuantificarlos (contador de células Sedgwick Rafter). Se tomó de cada ejemplar una submuestra (100 huevos) y se extrapoló el peso de la submuestra con el peso de la masa ovígera para obtener el número aproximado de huevos por ejemplar. Los resultados mostraron que el peso promedio de las hembras ovígeras fue de 2.24 para las de mayo y 5.41 g en las de junio; la talla (promedio) fue de 65 y 86 mm, respectivamente; el peso (promedio) de las huevas para las hembras de mayo fue de 0.205 g y 0.493 g para las de junio, en tanto que el número de huevecillos fue de 2470.833 y de 5425 (mayo y junio, respectivamente). Como es evidente, el peso y talla de las hembras ovígeras de junio fueron mayores que las de mayo, así como su peso promedio y el número de huevos; observaciones al microscopio óptico, de estos, revelaron tres estadios embrionarios principales: etapa de preclusión, etapa de abdomen segmentado y etapa previa a la eclosión. Los resultados aquí obtenidos coinciden con los realizados en Tabasco[1] donde fue reportado que las hembras de *M. acanthurus* alcanzan la madurez sexual a los 40 mm de longitud total y cuando su talla es de 70-75 mm, producen 5,500 huevecillos (promedio); para el río Huitzilapan fueron reportadas más hembras ovígeras en septiembre (113 a 5568 huevecillos) y tallas de 42 a 110.4 mm[2]. La información obtenida en el presente estudio permite establecer las épocas en que es posible coleccionar a *M. acanthurus* y evitar la pérdida de hembras ovígeras y por lo tanto el recurso.

### INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la historia de vida de los animales, su ciclo de vida y biología son de gran valor para su conservación, actualmente, debido a la contaminación, el cambio de uso de suelo y la sobreexplotación de la biota, entre otros factores, ponen en riesgo la conservación de especies, antes de que sean estudiadas y valoradas, ejemplo de estas es *Macrobrachium acanthurus* en la zona de El Camarón, Veracruz. Esta región cuenta con una gran cantidad de recursos de flora y fauna, que han sido poco estudiados, *M. acanthurus* ha soportado una intensa pesquería artesanal en todo el estado y es importante por su valor económico y nutricional[3]

Desde tiempos precolombinos, los langostinos han sido importantes en las culturas de Mesoamérica, en especial de los totonacos de Veracruz, lo cual se hace evidente por algunas piezas de cerámica con las que fueron representados.

Actualmente, *M. acanthurus* merece la atención para su estudio, ya que es parte de los recursos naturales, genéticos y económicos de Veracruz y en la región de El Camarón (La Mixtequilla, Veracruz) no es la excepción pues además de los servicios ecosistémicos que cumplen en los cuerpos de agua, este langostino es comercializado y forma parte de la dieta de sus habitantes.

## TEORÍA

*Macrobrachium acanthurus* pertenece al Phylum Arthropoda, Clase Crustacea, Orden Decapoda, Familia Palaemonidae y al Género *Macrobrachium*. A estos crustáceos se les conoce como langostinos, son considerados dentro los más diversos dentro del Orden Decápoda, son de amplia distribución geográfica (desde el Norte de Estados Unidos hasta el sur de Brasil) y batimétrica, se les encuentra tanto en ambientes marinos como estuarinos y dulceacuícola[4].

La sobrevivencia de cualquier especie en los ecosistemas depende de su éxito reproductivo por lo que, para estudiar su reproducción es importante conocer su madurez sexual, fecundidad y período de reproducción y para ello, en los crustáceos del género *Macrobrachium* debe analizarse la presencia o no de huevecillos[1].

De acuerdo con lo descrito para *M. tenellum*, especie muy parecida a *M. acanthurus*, en su ciclo reproductivo, se presentan cuatro estadios (Estadio I-juvenil; Estadio II o preovígera; Estadio III u ovígera; Estadio IV-postovígera); el Estadio III (dividido en cinco Subestadios) se caracteriza porque las hembras portan huevecillos en la parte ventral del abdomen, sus pleuras están pigmentadas y los pleópodos (con vellosidades características) es en donde se adhieren los huevecillos[1].

Las hembras del género *Macrobrachium* contienen entre 5,000 y 100,000 huevos en condiciones naturales y pueden desovar de dos a cuatro veces al año. Sus especies presentan interparidad esto es que tienen varias camadas al año; su crecimiento poblacional es de tipo r, debido a su número elevado de crías. La incubación de los huevecillos (que mantienen en el abdomen) se da entre 18-20 días, dependiendo de la temperatura. Las hembras limpian los huevecillos con su primer par de quelas y acomodan la masa de huevecillos que pudieran desprenderse[5].

El ciclo de vida de los langostinos, comprende un desarrollo larval con más de doce estadios y al menos uno requiere de agua salina para sobrevivir. Las hembras se alimentan, reproducen y desovan en agua dulce, pero las larvas deben estar en agua salina al inicio de su desarrollo. En algunas especies, tras la incubación, las larvas son liberadas río arriba y transportadas hacia la zona estuarina, en otras especies las hembras viajan río abajo para eclosionar en las bahías costeras o estuarios. Las larvas son planctónicas y cuando alcanzan las etapas juveniles migran desde la costa a las zonas altas de aguas dulces, contribuyendo con ello al flujo de energía convertida en biomasa, a lo largo de los diferentes hábitats por los que transitan[6].

## PARTE EXPERIMENTAL

El área de estudio se localiza en La Mixtequilla, perteneciente municipio de Ignacio de la Llave (parte central del estado de Veracruz), en la zona conocida como El Camarón, por donde fluye el río Blanco. Durante los meses de mayo y junio, a orillas de este río, fueron colectados los ejemplares del camarón prieto como se le conoce a *M. acanthurus* en esta región. Para ello fueron utilizadas trampas tipo clarín, estas son rectangulares (dimensiones de 33.5 X 28 cm) y cuentan con un embudo de entrada (figura 1). Durante la colecta del mes de junio (por la disponibilidad de equipo), se realizaron registros de las características físico-químicas del agua, mediante el uso de una sonda multiparamétrica (Hanna) y disco de Secchi (profundidad).



Los langostinos colectados, fueron separados por sexo; se hicieron mediciones de la talla y peso de las hembras ovígeras y se les removió (del abdomen), la masa de huevecillos (hueva), para medir su peso húmedo. Los huevecillos fueron conservados en frascos conteniendo alcohol al 70%, para posteriormente cuantificarlos (contador de células Sedgwick Rafter). Se tomó una submuestra de cada ejemplar (100 huevos) y se extrapoló el peso de esta con el peso de la masa ovígera, para obtener el número aproximado de huevecillos por ejemplar. Para determinar el desarrollo de la etapa larval de los huevecillos se hicieron observaciones al microscopio óptico y lo expuesto en otros estudios[1]

## RESULTADOS

En la tabla 1 se presentan la localización geográfica del área de estudio y los valores de las variables abióticas registradas durante el mes de junio de 2019. Miranda-Vidal y colaboradores[7], en temporada de lluvias, para áreas cercanas a la Mixtequilla, encontraron que la salinidad fue de 4.3 ppm, menor a la registrada en el presente estudio para esta temporada (7.14 ppm) lo cual probablemente se debe a los valores altos de temperatura. En cuanto al pH, no se observaron diferencias en lo reportado en estudios previos, lo que muestra que las condiciones ambientales del río Blanco en la zona conocida como El Camarón, son adecuadas para el desarrollo de *M. acanthurus*.

Tabla 1. Localización geográfica y variables fisicoquímicas del sitio de estudio (junio)

Latitud norte	Latitud este	Temperatura del ambiente (°C)	Temperatura del agua (°C)	pH	Salinidad (ppm)	Profundidad (m)	Penetración de la luz (cm)
18° 35' 12.4"	95°55' 27"	39°	32.5°	8.4	7.14	0.54	31

De 137 hembras colectadas, 12 fueron ovígeras (seis colectadas en mayo y seis en junio), en la tabla 2 se presentan los resultados del peso y talla y número de huevecillos (promedio) de los 12 ejemplares y en la figura 2 la disposición de estos en ejemplares de *M. acanthurus*.



Figura 2. Huevecillos y masa ovígera en ejemplares de *M. acanthurus*

Tabla 2. Peso, talla, peso de la masa ovígera y número de huevos (promedios) de las 12 hembras de *M. acanthurus*

Mes de colecta	Peso (g)	Talla total (cm)	Peso hueva (g)	No. Huevos
Mayo	2.243	6.517	0.205	2470.833
Junio	5.417	8.617	0.493	5425.000

El peso de la hueva en cada hembra fue diferente dependiendo del mes en el que fueron colectadas así, para las del mes de mayo, el peso menor de la masa ovígera fue de 0.09 g y el mayor de 0.34 g (el promedio fue de 0.20 g) en tanto que para las del mes de junio, la de menor peso fue de 0.24

g y la mayor de 1.15 g (promedio de 0.49 g); el peso promedio de la masa ovígera del total de ejemplares (las 12 hembras) fue de 0.34 g. En las tablas 3 y 4 se presentan los resultados del peso y talla de cada uno de los ejemplares así como el peso de su hueva.

Tabla 3. Talla y peso de los ejemplares y de las huevas, colectados en mayo

No de ejemplar	Peso (g)	Talla total (cm)	Peso de la hueva (g)
1	2.96	6.5	0.34
2	1.84	6.5	0.3
3	1.72	6.1	0.14
4	2.74	7	0.11
5	1.4	5.8	0.09
6	2.8	7.2	0.25
Promedio	2.24	6.51	0.205

Tabla 4. Talla y peso de los ejemplares y de las huevas, colectados en junio

No	Peso (g)	Talla total (cm)	Peso de la hueva (g)
1	5	8.7	0.28
2	4.8	8.4	0.42
3	7	9	1.15
4	3.9	7.8	0.24
5	5.7	9.1	0.35
6	6.1	8.7	0.52
Promedio	5.41	8.62	0.493

Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con los realizados en Tabasco[1] donde fue reportado que las hembras de *M. acanthurus* alcanzan la madurez sexual a los 40 mm de longitud total y cuando su talla está entre 70 a 75 mm, pueden producir alrededor de 5,500 huevecillos (promedio); para el río Huitzilapan fueron reportadas más hembras ovígeras en septiembre con un número de huevecillos mínimo de 113 y máximo de 5568 en tanto que sus tallas fueron de 42 a 110.4 mm[2]

De acuerdo con Granados-Beber [1], a medida que aumenta la longitud total de las hembras avanza su madurez sexual; en el presente estudio, la longitud, el peso y número de huevecillos (promedio) fueron mayores en las hembras colectadas en junio que en las de mayo, por lo que podría decirse que la etapa de madurez sexual de estas últimas fue menos avanzada.

En la figura 3A se aprecian huevecillos inmaduros (ovalados) de color amarillo que corresponde al Estadio III- *Subestadio*3 [1], no presentan pigmentación ocular por lo que es probable que el tiempo que transcurrió desde su fertilización a la captura de la muestra fue poco. En la figura 3B. Se observan los huevos con pigmentación ocular (Estadio III, *Subestadio* 4); en la figura 3C es evidente que los cuerpos son pequeños y curvos en los que se aprecia el telson (Estadio III-*Subestadio* 5).





Figura 3A. Huevecillos inmaduros sin pigmentación ocular (Subestadio 3)



Figura 3B. Huevecillos con pigmentación ocular (Subestadio 4)



Figura 3C. Etapa previa a la eclosión (presencia de telson) (Subestadio 5)

## CONCLUSIONES

Los valores registros de la variables fisico-químicas concuerdan con estudios realizados en la zona y ambientes donde crece *M. acanthurus*. El número de huevecillos (mínimo y máximo), presentes en las huevas de *M. acanthurus*, coincide con lo registrado por otros autores, para esta especie. La talla, peso y masa ovígera de las hembras colectadas en junio fueron mayores que los de las colectadas durante el mes de mayo, lo que indica que la madurez sexual de estas últimas fue menos avanzada. La información obtenida en el presente estudio es útil para establecer las épocas en que es posible colectar a *M. acanthurus* y sin comprometer a las hembras ovígeras y por lo tanto a este recurso biológico.

## BIBLIOGRAFÍA

1. A.A Granados-Berber, "Aspectos reproductivos del "camarón prieto" *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) en la cuenca del Río González, Tabasco, México (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae)". An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México. Vol. 11, 1, 1984, pp.1-22.
2. F. L. Álvarez, L. M. Mejía-Ortiz, J. Viccon-Pale, R. Román, "Fecundity and distribution of freshwater prawns of the genus *Macrobrachium* in the Huitzilapan River, Veracruz, Mexico". *Crustaceana*, Vol. 74, 1, 2001, pp. 69-77
3. R. M. Lorán-Nuñez, "Observaciones de la pesquería de langostino (*Macrobrachium* sp.) en el estado de Veracruz, México", *Cienc. Pesq.*, Vol. 25, 2, 2017, pp.31-34.
4. P. C. Choudhury, "Complete Larval Development of the Palaemonid Shrimp *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836), Reared in the Laboratory" *Crustaceana* Vol. 18, 2, 1970, pp. 113-132)
5. F. Díaz-Monge, M. Díaz, R. Rodríguez, en "Producción larval de camarón de río nativo, *Macrobrachium americanum* en laboratorio" (Informe). Centro de Estudios del Mar y Acuicultura, Guatemala City, 2001, pp, 88.
6. M. U. García-Guerrero, F. Becerril-Morales, F. Vega-Villasante, L. D. Espinosa-Chaurand. "Los langostinos del género *Macrobrachium* con importancia económica y pesquera en América Latina: conocimiento actual, rol ecológico y conservación". *Lat. Am. Aquat. Res.* Vol. 41,4, 2013, pp.651-675.
7. J. F. Miranda-Vidal, E. Barba-Macías, C. Trinidad-Ocaña, J. Juárez-Flores. 2016. "Diversidad de crustáceos en la cuenca baja del río Papaloapan, Veracruz, México". *Hidrobiológica*, Vol. 26, 3, 2016, pp. 475-482.

## AGRADECIMIENTOS

A la Sra. Yadira Reyes y a los señores Gaspar y Luis Yépez, habitantes de la Mixtequilla por el valioso apoyo para la colecta de los ejemplares de *M. acanthurus* y las facilidades para la realización del trabajo de campo. A la Dra. María del Carmen Monroy-Dosta (Coordinadora de la Licenciatura en Biología, UAM-X) por su invaluable apoyo y el préstamo de la sonda multiparamétrica para el registro de las variables ambientales.



## DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS HUELLAS LATENTES CONFORME AL TIEMPO, GÉNERO Y EDAD

Ismael Soto López, Mónica Cruz Hernández, Guadalupe López Olivares, Lidia Meléndez Balbuena,  
José Martín Hernández Giron, Cilthya Cecilia Ocaidí Gallardo Céspedes

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

[lsolo2015@yahoo.com](mailto:lsolo2015@yahoo.com)

### RESUMEN

El estudio de la composición química de las huellas latentes cada vez más se ha venido estudiando y sistematizando, principalmente para los aspectos físico y morfológico de las huellas que se originaron cuando se tocan o manipulan objetos o superficies, dando como consecuencia la impresión de la grasa y humedad de las crestas dactilares de superficie dérmica. Pero actualmente ya se están haciendo esfuerzos para lograr el análisis de la composición química de las huellas latentes, con métodos como la espectroscopía de Infrarrojo por Transformadas de Fourier, Masas o Difracción de RX, en cuyo caso pudiera llegarse a determinar grupos funcionales químicos con los cuales se pudiera determinar la antigüedad de la impresión, la edad y hasta el género del individuo.

### INTRODUCCIÓN

La hipótesis básica nace de “El principio de intercambio” enunciado por el criminalista francés Edmund Locard en el año 1929, el cual propone que “siempre que dos objetos entren en contacto transfieren parte del material que incorporan al otro objeto”, es decir, que ante un contacto existe evidencia de otro (5).

Los recientes avances sobre la composición química de huellas latentes se han centralizado en el desarrollo de nuevas técnicas y metodologías en la evaluación intrínseca de estos residuos, por eso se a propuesto que por medio de la espectroscopia infrarroja (FTIR-ATR ) podria ser útil para poder traducir la composición química de estas huellas en un patrón espectroscópico que resulte más fácil la identificación, datación y la diferenciación de género.

La búsqueda de métodos para la datación de las huellas latentes requiere de un enfoque diferente, y a pesar de que nuevas investigaciones están siendo focalizadas en la caracterización y alteración química de éstas a través del tiempo, el género y edad del individuo, aun hasta hoy no existen los argumentos científicos necesarios que puedan dar respuesta a esas preguntas.

#### Objetivo General

Sobre la base de estos antecedentes, el objetivo de este trabajo es tratar de presentar las evidencias de la diferencia que traduzca una huella latente en una huella química espectroscópica para lograr la identificación y diferenciación de un individuo según su género, edad y la posible datación de las mismas, y demostrar la utilidad que conlleva el desarrollo de estos estudios analíticos en el terreno de la investigación.

#### Objetivos Específicos

Tratar de determinar por espectroscopía de infrarrojo la posible diferencia del contenido químico de muestras obtenidas de individuos de diferente género y edad.

Por espectroscopía infrarrojo determinar los cambios químicos que sufren las huellas latentes obtenidas con respecto al tiempo.

### TEORIA

Una huella latente es una mezcla compleja de secreciones naturales y contaminantes medioambientales. La variabilidad observada en la composición química de residuos de huellas latentes puede considerarse el resultado final de dos etapas sucesivas: una primera etapa donde se genera un depósito por el simple contacto de la piel con una superficie, el cual tendrá una dada

composición química (composición inicial); y una segunda etapa causada por el tiempo transcurrido desde la etapa inicial hasta que el residuo es detectado y analizado.

En una etapa inicial, el depósito transferido hacia una superficie puede estar sujeto a la influencia de diversos factores: las características propias del donante, las condiciones bajo las cuales se desarrolla el contacto y la naturaleza del sustrato o superficie en cuestión. Mientras que las variables a considerar una vez transcurrido un tiempo determinado desde esa deposición inicial son: la naturaleza del sustrato, las condiciones medioambientales y las técnicas empleadas en el proceso de visualización y levantamiento de huellas latentes, aplicando la hipótesis del "Principio de intercambio", donde "siempre que dos objetos entren en contacto transfieren parte del material que incorporan al otro objeto".

Cuando la piel entra en contacto con una superficie u objeto, el sudor y el material presente en ella son transferidos, dando lugar a una huella latente y la composición química final de estos residuos es el resultado de la suma de la variabilidad en la composición inicial y la generada por la influencia del paso del tiempo.

Sin embargo, la composición química de un residuo de huella latente es mucho más compleja que la del sudor, siendo una mezcla de diversas sustancias de origen intrínseco (provenientes de la epidermis y de las glándulas secretoras de la dermis), compuestos derivados de medicamentos o metabolitos de drogas de abuso, y componentes extrínsecos como sangre, suciedad o contaminantes procedentes de cosméticos, alimentos, etc. (17). Pudiendo todos ellos variar significativamente entre individuos, en un mismo individuo en la sucesión de los días, o incluso en el transcurso de un día (26).

No obstante, es indiscutible que los componentes intrínsecos de estas impresiones forman en su conjunto, una emulsión compleja que comprende agua además de compuestos orgánicos e inorgánicos (24, 43).

Las proteínas y polipéptidos son los compuestos resultantes de la secreción sudorípara en la epidermis más abundantes, acompañados en menor proporción por ácido láctico, aminoácidos, urea, ácido úrico, creatinina, vitaminas, sustancias inorgánicas, etc. (9, 17)

Por lo contrario, los aminoácidos se han estudiado ampliamente mediante diversas técnicas analíticas, lo que ha permitido la identificación de muchos de ellos, caracterizando a la serina como el más abundante en esta matriz (43, 33, 13, 34, 12, 11, 4, 14).

Del mismo modo, se han identificado y cuantificado otras sustancias como ácido láctico, ácido úrico, creatinina, urea y fenol, al igual que el complejo vitamínico B (en particular la riboflavina, responsable de la fluorescencia emitida por los residuos de huellas latentes sometidos a iluminación láser) (11, 19), y una gran cantidad de compuestos inorgánicos como cloruro, potasio, sodio y magnesio, entre otros (18).

El sebo está conformado mayoritariamente por escualeno, ésteres, triglicéridos y fosfolípidos, y en menor medida por ácidos grasos, colesterol y esteroides (43, 12). Los ácidos grasos libres son los compuestos lipídicos más abundantes identificados en los residuos de huellas latentes (11, 12, 19, 22, 28, 3, 2, 21, 39, 23, 25, 41).

Triglicéridos y otros ésteres resultantes de la esterificación de ácidos grasos y alcoholes grasos han sido objeto en escasos estudios, y si bien se reconocen como parte de la composición química de residuos de huellas, no se cuenta con datos cuantitativos y pocos trabajos los han identificado (28, 3, 23, 16).

Finalmente, compuestos como colesterol y su precursor escualeno se registraron mediante diversas técnicas analíticas (12, 19, 28, 3, 23, 41, 7). Y dada la capacidad de éste último de reaccionar y

degradarse, fueron identificados productos de oxidación como hidroperóxidos y epóxidos de escualeno, en residuos de huellas digitales frescas (28, 29).

Del mismo modo, diversas proteínas expresadas en la epidermis durante el proceso de descamación, como la keratina 1, keratina 10 y cathepsina D, pueden ser transferidas a un sustrato durante el contacto con la capa cornea y por consiguiente, ser encontradas en huellas latentes (15). Sin embargo, son escasos los estudios donde se han identificado proteínas provenientes del proceso de descamación epidérmica en estos residuos.

Además de aquellos provenientes de las secreciones naturales, otros compuestos como medicamentos, drogas de abuso y sus diversos metabolitos deben ser considerados. Sulfonamidas y derivados anfetamínicos fueron identificadas en el sudor en concentraciones comparables a las plasmáticas, por lo que se sugiere que, una vez consumidas, ciertas sustancias pueden pasar a formar parte del metabolismo del organismo y de este modo estar presentes en huellas latentes (17); lo cual debe diferenciarse de aquellas drogas de abuso o medicamentos identificados en estas impresiones como consecuencia de una contaminación externa (36).

Por ello, una gran variedad de compuestos procedentes de fuentes externas al organismo tales como residuos de alimentos, drogas, suciedad, cosméticos, depósitos grasos, sangre, residuos de armas de fuego y explosivos, se han identificado en estos residuos (12, 28, 23, 41, 36). Siendo los productos cosméticos los que causan particular interés, debido a que muchos de ellos contienen compuestos lipídicos que están naturalmente presentes en las secreciones del organismo, dificultando así su diferenciación con componentes intrínsecos (17).

El efecto general del envejecimiento de un residuo de huella digital es la pérdida de agua y la consecuente pérdida de masa. Se ha evidenciado que el peso de una huella digital disminuye un 85% en el transcurso de 2 semanas, posiblemente debido a la pérdida de humedad y de componentes volátiles (28, 8, 42). Con el tiempo, una huella latente adquiere un aspecto viscoso y cambia su espesor inicial, tornándose más frágil y de aspecto irregular (40). De este modo, incrementa su susceptibilidad a la erosión física, a la vez que se convierte en menos receptiva a los procesos químicos de revelado como consecuencia de la pérdida de los componentes involucrados y la disminución del área superficial para la interacción con dichos reactivos (28).

Luego del depósito, la concentración de lípidos, como escualeno, colesterol, ésteres y ácidos grasos, disminuye significativamente en huellas latentes en función del tiempo como consecuencia de procesos de degradación y descomposición, que resultan en la producción de nuevos compuestos, en su mayoría pequeñas moléculas oxidadas (12, 22, 28, 2, 1, 29, 42).

Bajo condiciones anaeróbicas ocurren procesos de hidrogenación sobre dobles enlaces con la subsecuente disminución de la proporción de ácidos grasos insaturados y un incremento en la concentración de ácidos grasos saturados (36), mientras que una degradación aeróbica inicia un proceso de reacciones en cadena que resulta en la formación de compuestos oxidados con enlaces peróxido, aldehídos y cetonas (14).

Se reporta que los ácidos grasos saturados se mantienen relativamente estables en residuos de huellas digitales latentes, mientras que la concentración de los ácidos grasos insaturados disminuye notablemente en el tiempo (28, 2). Los ácidos grasos saturados y ésteres grasos de huellas digitales mantienen una relación constante durante un período de 60 días posteriores al depósito, detectando una marcada disminución en la concentración de ácidos grasos insaturados durante los primeros 30 días, y la aparición de ácidos grasos saturados de bajo peso molecular en los residuos más antiguos, lo cual se asoció a los procesos de degradación aeróbica y anaeróbica que sufren los ácidos grasos insaturados, que generan productos saturados y de menor tamaño (28).

Es evidente que la composición y caracterización química de los residuos de huellas latentes derivan del conocimiento indiscutible sobre los compuestos químicos que forman parte de las secreciones

naturales - sudorípara y sebácea principalmente -, responsables de que éstos se presenten en la superficie cutánea y que, por lo tanto, puedan ser transferidos hacia una superficie de contacto (9).

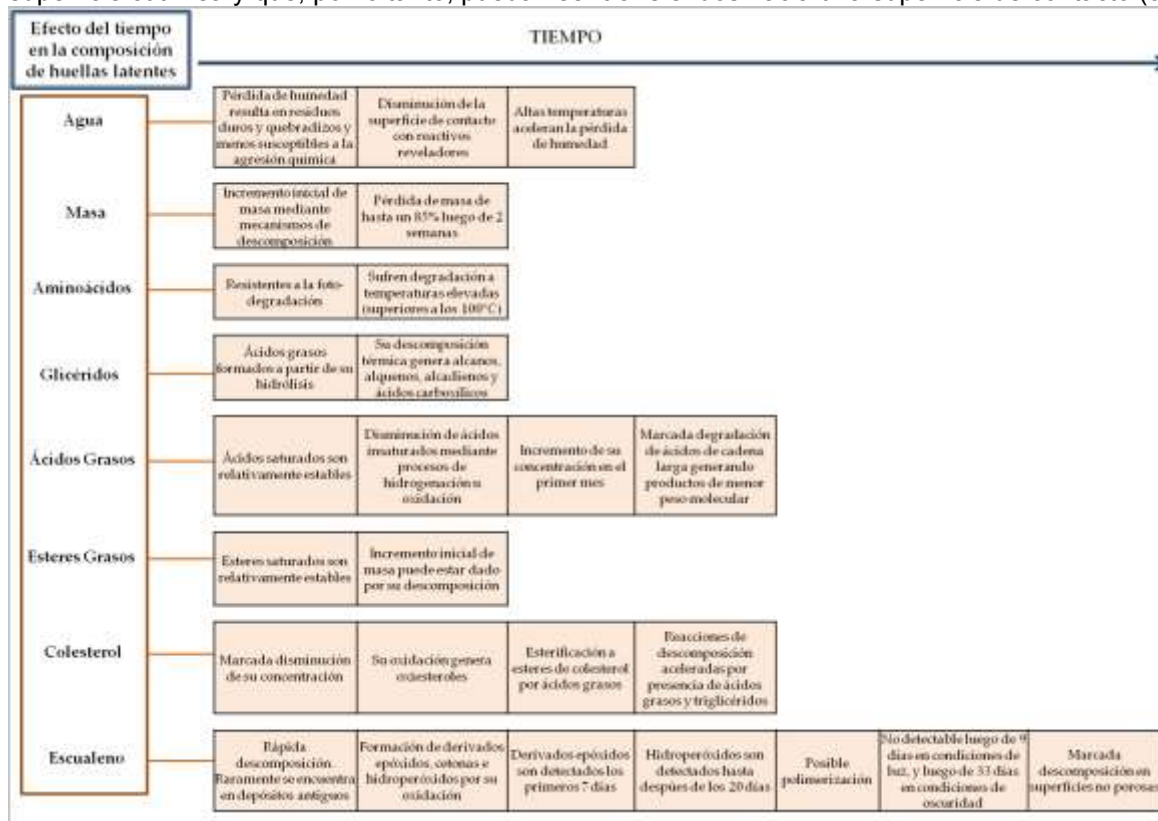


Figura 1. Efecto del tiempo en la composición química de huellas latentes

Sin embargo, hasta el momento no existen datos definitivos y concretos que describan de manera precisa la naturaleza química de estos depósitos. En parte, debido a las dificultades técnicas y metodológicas que se presentan al momento de abordar los diferentes estudios, pero sobre todo, por la gran diversidad de resultados obtenidos como consecuencia de la amplia gama de factores que afectan la composición final de estos residuos, haciendo que los datos disponibles no puedan ser extrapolables o generalizados (9, 6, 18) es por esto que se hace necesario seguir investigando y realizando pruebas como las que se proponen en este trabajo.

Del mismo modo, también se evidenciaron diferencias en las características químicas de residuos de huellas digitales de hombres y mujeres. Si bien en muchos estudios las variaciones dependientes del género no fueron estadísticamente significativas (26), autores plantearon la posibilidad de que algunos componentes químicos como urea y ácidos grasos, pueden ser útiles para diferenciar el sexo del donante (89, 6); y en recientes trabajos se indica una mayor concentración de ácidos grasos saturados en residuos de donantes masculinos (11) y mayores niveles de ciertos aminoácidos en residuos de donantes de sexo femenino (12, 8) y se plantea la posibilidad de diferenciar huellas dactilares de donantes femeninos y masculinos mediante el análisis de niveles de hormonas, como por ejemplo, estrógenos.

Dado que las secreciones orgánicas varían dependiendo de la edad de un individuo, no resulta sorprendente encontrar diferencias significativas en la composición química de residuos de huellas digitales de niños, adolescentes y adultos.

La principal diferencia en la composición química entre huellas de niños y adultos es que las de los niños contienen mayores concentraciones de sales y ácidos grasos libres no esterificados y volátiles,

mientras que en las de los adultos, se encuentran concentraciones elevadas de compuestos más estables, como ésteres de ácidos grasos de cadena larga (10, 44, 6, 20).

El sebo de los niños se caracteriza por presentar concentraciones relativamente altas de ácidos grasos libres de cadena larga y niveles significativos de colesterol y ésteres de colesterol. Estos compuestos generalmente disminuyen en abundancia con la edad, mientras que las concentraciones de ésteres grasos tienden a aumentar de manera constante durante la pubertad, momento en el que comienzan a disminuir nuevamente con el envejecimiento adicional (37,43, 38). Y si bien el colesterol total del sebo disminuye con la edad, la proporción de colesterol en su forma esterificada tiende a aumentar (6, 38, 31).

Un método capaz de estimar la edad de una huella digital de manera fiable y reproducible tendría considerables ventajas para investigaciones criminales, pero actualmente, mientras que una impresión representa un fuerte vínculo entre un lugar u objeto y una persona, no existen metodologías validadas para determinar con precisión el momento del contacto. Y la datación de huellas digitales sigue representando un área relativamente inexplorada en el campo de la investigación forense (9, 27).

La concentración de escualeno disminuye rápidamente en el tiempo, siendo indetectable en la mayoría de las huellas digitales antiguas (12, 14, 18, 19, 30), mientras se tornan evidentes compuestos derivados de su degradación, como epóxidos e hidroperóxidos (32). De este modo, impresiones digitales recientes tendrían mayores concentraciones de escualeno y epóxido de escualeno en comparación con aquellas de mayor antigüedad, las cuales tendrían concentraciones elevadas de hidroperóxidos, por lo que comparaciones y relaciones entre las concentraciones de estos compuestos podrían ser herramientas útiles para estimar la edad de una huella digital (34).

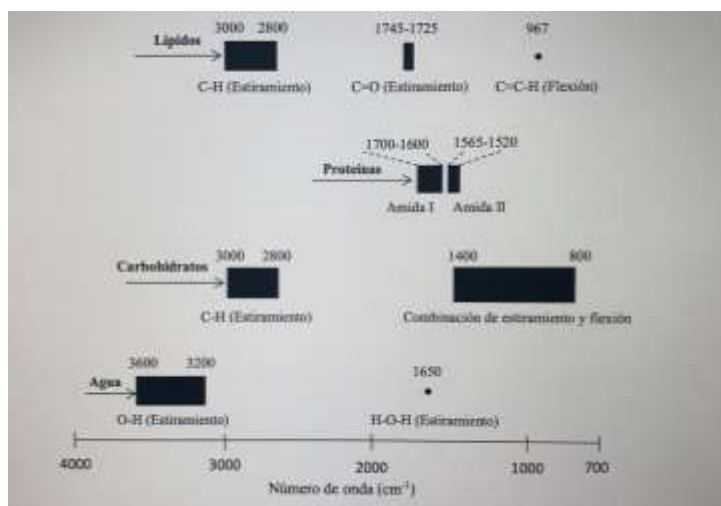


Figura 2. Longitud de grupos funcionales

Un buen parámetro de datación sería aquel que demuestre cambios reproducibles en el tiempo y que permita minimizar la variabilidad de los resultados causada por factores de influencia (33-40). Y el análisis de las proporciones de compuestos parece una opción propicia para hallar parámetros de envejecimiento, ya que pueden corregir la variabilidad entre muestras.

## PARTE EXPERIMENTAL

De manera preliminar se han venido tomando muestras tanto de hombres como de mujeres para determinar si existiera alguna diferencia química.

Como sustrato de las muestras se utilizan portaobjetos previamente lavados con detergente para material de vidrio de laboratorio para evitar la presencia de residuos de grasa y enjuaguados con agua bidestilada.

Utilizando guantes de latex, con el portaobjeto se toma la muestra directamente pasandolo por la mejilla limpia de la persona asegurando que ésta no se haya aplicado ninguna sustancia cosmética.

Las muestras se llevan directamente al análisis en el espectrofotometro de ATR-FTIR para determinar las bandas características en la huella espectral para cada grupo funcional de las moléculas características buscadas.

Se determinan diferencias para los grupos muestreados según se género y edad.

Los portaobjetos se almacenan por separado en cajas petri para su posterior análisis a los 3, 5, 10, 20, 30 y 60 días para determinar los cambios ocurridos en cada muestra.

## RESULTADOS

Hasta ahora se han podido demostrar diferencias evidentes en la composición química entre género y edades, las cuales se están procesando.

Usando espectroscopia Infrarrojo (FTIR-ATR) se comienzan a establecer los patrones espectroscópicos correspondientes a diferentes compuestos químicos.

Dentro de los compuestos químicos presentes en las huellas latentes se encontraron los siguientes patrones espectroscópicos: lípidos, aminoácidos, esteroides, alcoholes, colesterol, etc.

## CONCLUSIONES

Los lípidos y aminoácidos se sabe que están presentes en todas las huellas muestreadas por la técnica de espectroscopia infrarroja, se busca diferenciar colesterol, triglicéridos, urea, ácidos grasos saturados e insaturados, estrógenos, ésteres de colesterol para poder crear un patrón espectroscópico el cual nos ayudará a determinar tanto género como edad.

## BIBLIOGRAFÍA

1. J. Almog, H. Glasner, "Ninhydrin Thiohemiketals: Basic Research Towards Improved Fingerprint Detection Techniques Employing Nano-Technology". En: *Journal of Forensic Sciences* Volume 55, No 1, 2010. p. 215-220.
2. N.E. Archer, Y. Charles, J.A. Elliott. "Changes in the lipid composition of latent fingerprint residue with time after deposition on a surface". En: *Forensic Science International* Volume 154, 2005. p. 224-239.
3. K. G. Asano, C. K. Bayne, K.M. Horsman. "Chemical composition of fingerprints for gender determination". En: *Journal of Forensic Sciences* Volume 47, No 4, 2010. p. 805-807.
4. T. Atherton, R. Croxton, M. Baron. "Analysis of amino acids in latent fingerprint residue by capillary electrophoresis-mass spectrometry". En: *Journal of Separation Science* Volume 35, Issue 21, 2012. p. 2994-2999.
5. J.G. Barnes, "History". En: *The Fingerprint Sourcebook*. Washington DC: Office of Justice Programs, U.S. Department of Justice, 2011, Chapter 1. p. 1-22.
6. M.V. Buchanan, K. Asano, A. Bohanon. "Chemical characterization of fingerprints from adults and children". En: *Forensic Evidence Analysis and Crime Scene Investigation*, SPIE (International Society for Optical Engineering) Volume 2941, 1996. p. 89-95.
7. S. Bramble. "Separation of latent fingerprint residue by thin-layer chromatography". En: *Journal of Forensic Sciences* Volume 40, No 6, 1995. p. 969-975.
8. E. Brunelle, C. Huynh. "New Horizons for Ninhydrin: Colorimetric Determination of Gender from Fingerprints". En: *Analytical Chemistry* Volume 88, Issue 4, 2016. p. 2413-2420.
9. S. Cadd, M. Islam, P. Manson. "Fingerprint composition and aging: A literature review". En: *Science and Justice* Volume 55, Issue 4, 2015. p. 219-238.

10. S.J. Cadd, SM. Bleay, V.G. Sears. "Evaluation of the solvent black 3 fingermark enhancement reagent: Part 2 – Investigation of the optimum formulation and application parameters". En: *Science and Justice* Volume 53, Issue 2, 2013. p. 131-143.
11. R.M. Connatser, S.M. Prokes, O.J. Glembocki. "Toward Surface-Enhanced Raman Imaging of Latent Fingerprints". En: *Journal of Forensic Sciences* Volume 55, No 6, 2010. p. 1462-1470.
12. R.S. Croxton, M.G. Baron, D. Butler. "Development of a GC-MS Method for the Simultaneous Analysis of Latent Fingerprint Components". En: *Journal of Forensic Sciences* Volume 51, No 6, 2006. p. 1329-1333.
13. R.S. Croxton, M.G. Baron, D. Butler. "Variation in amino acid and lipid composition of latent DE PUIT, M., ISMAIL, M., XU, X. "LCMS Analysis of Fingerprints, the Amino Acid Profile of 20 Donors". En: *Journal of Forensic Sciences* Volume 59, No 2, 2014. p. 364-370.
14. B. Dent, S. Forbes, B. Stuart. "Review of human decomposition processes in soil". En: *Environmental Geology* Volume 45, Issue 4, 2004. p. 576-585.
15. V. Drapel, A. Becue, C. Champod. "Identification of promising antigenic component in latent fingermark residues". En: *Forensic Science International* Volume 184, Issue 1-3, 2009. p. 47-53.
16. B. Emerson, J. Gidden, J.O. Lay et al. "Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry of Triacylglycerols and Other Components in Fingermark Samples". En: *Journal of Forensic Sciences* Volume 56, No 2, 2011. p. 381-389.
17. A. Girod, R. Ramotowski, C. Weyermann. "Composition of fingerprints residue: A qualitative and quantitative review". En: *Forensic Science International* Volume 223, 2012. p. 10-24.
18. A. Girod, R. Romotowski, S. Lambrechts et al. "Fingermark age determinations: Legal considerations, review of the literature and practical propositions". En: *Forensic Science International*, Volume 262, 2016. p. 212-226.
19. B. Hartzell-Baguley, R.E. Hipp, N.R. Morgan et al. "Chemical composition of latent fingerprints by gas chromatography–mass spectrometry. An experiment for an instrumental analysis course". En: *Journal of Chemical Education* Volume 84, Issue 4, 2007. p. 689-691.
20. A. Hemmila, J. McGill, D. Ritter. "Fourier Transform Infrared Reflectance Spectra of Latent Fingerprints: A Biometric Gauge for the Age of an Individual". En: *Journal of Forensic Sciences* Volume 53, No 2, 2008. p. 369-376.
21. D.R. Ifa, N.E. Manicke, D. Al et al. "Latent fingerprint chemical imaging by mass spectrometry". En: *Science* Volume 321, 2008. p. 805.
22. A. Jacquat. "Evolution des substances grasses des empreintes digitales au cours du temps: analyse par TLC et GC–MS". Master Project, Institut de Police Scientifique, Lausanne University, 1999.
23. K. Koenig, A. Girod, C. Weyermann. "Identification of wax esters in fingermark residues by GC/MS and their potential use as aging parameters". En: *Journal of Forensic Identification* Volume 61, Issue 6, 2011. p. 652-676.
24. J.R. Lewellyn, L. Dinkins, "New use for an old friend". En: *Journal of Forensic Identification* Volume 42, Issue 5, 1995. p. 498-503.
25. A.Y. Lim, Z. Ma, J. Ma et al. "Separation of fingerprint constituents using magnetic silica nanoparticles and direct on-particle SALDI-TOF-mass spectrometry". En: *Journal of Chromatography B* Volume 879, 2011. p. 2244-2250.
26. S. Michalski, R. Shaler, F.L. Dorman. "The Evaluation of Fatty Acid Ratios in Latent Fingermarks by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) Analysis". En: *Journal of Forensic Sciences* Volume 58, No S1, 2013. p. S215-S220.
27. T. Mink, A. Voorhaar, R. Stoel et al. "Determination of efficacy of fingermark enhancement reagents; the use of propyl chloroformate for the derivatization of fingerprint amino acids extracted from paper". En: *Science and Justice* Volume 53, Issue 3, 2013. p. 301-308.
28. G.M. Mong, C.E. Petersen, TR.W. Clauss. "Advanced Fingerprint Analysis Project Fingerprint Constituents". Pacific Northwest National Laboratory, U.S. Department of Energy, 1999. Disponible en web: <http://www.osti.gov/scitech/servlets/purl/14172>.



29. K.A. Mountfort, H. Bronstein, N. Archer et al. "Identification of oxidation products of squalene in solution and in latent fingerprints by ESI-MS and LC/APCI-MS". En: *Analytical Chemistry*, Volume 79, Issue 7, 2007. p. 2650-2657.
30. C. Nixon, M.J. Almong, J.B. Baum et al. "Enhancement of Aged and Denatured Fingerprints Using the Cyanoacrylate Fuming Technique Following Dusting with Amino Acid-Containing Powders". En: *Journal of Forensic Sciences* Volume 58, No 2, 2013. p. 508-512.
31. D. Noble. "Vanished into thin air: the search for children's fingerprints". En: *Analytical Chemistry* Volume 67, 1995. p. 435A-438<sup>a</sup> OLSEN, R. "Chemical dating techniques for latent fingerprints: a preliminary report". En: *Identification News*, 1987. p. 10-12.
32. A.D. Reinholz, "Albumin development method to visualize friction ridge detail on porous surface". En: *Journal of Forensic Identification* Volume 58, Issue 5, 2008. p. 524-539.
33. C. Ricci, P. Ohiriyavityopas, N. Curum et al. "Chemical Imaging of Latent Fingerprint Residues". En: *Applied Spectroscopy* Volume 61, No 5, 2007. p. 514-522.
34. A. Richmond-Aylor, S. Bell, P. Callery et al. "Thermal Degradation Analysis of Amino Acids in Fingerprint Residue by Pyrolysis GC-MS to Develop New Latent Fingerprint Developing Reagents". En: *Journal of Forensic Sciences* Volume 52, No 2, 2007. p. 380-382.
35. S. Shenawi, N. Jaber, J. Almog et al. "A novel approach to fingerprint visualization on paper using nanotechnology: reversing the appearance by tailoring the gold nanoparticles' capping ligands". En: *Chemical Communications* Volume 49, Issue 35, 2013. p. 3688-3690.
36. A. Srivastava, R. Prasad. "Triglycerides-based diesel fuels". En: *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Volume 4, Issue 2, 2000. p. 111-133.
37. M.E. Stewart, D.T. Downing. "Proportions of various straight and branched fatty acid chain types in the sebaceous wax esters of young children". En: *The Journal of Investigative Dermatology* Volume 84, No 6, 1985. p. 501-503.
38. M.E. Stewart, D.T. Downing, "Unusual cholesterol esters in the sebum of young children". En: *The Journal of Investigative Dermatology* Volume 95, No 5, 1990. p. 603-6060.
39. H-W. Tang, W. Lu, C-M. Che et al. "Gold Nanoparticles and Imaging Mass Spectrometry: Double Imaging of Latent Fingerprints". En: *Analytical Chemistry* Volume 82, 2010. p. 1589-1593.
40. A. Van Dam, F.T. Van Beek, C.G. Aalders et al. "Techniques that acquire donor profiling information from fingermarks – A review". En: *Science and Justice* Volume 56, Issue 2, 2016. p. 143- 154.
41. C. Weyermann, C. Roux, C. Champod. "Initial Results on the Composition of Fingerprints and its Evolution as a Function of Time by GC/MS Analysis". En: *Journal of Forensic Sciences* Volume 56, No 1, 2011. p. 102-108.
42. R. Wolstenholme, R. Bradhaw, M.R. Clench et al. "Study of latent fingermarks by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging of endogenous lipids". En: *Rapid Communications in Mass Spectrometry* Volume 23, 2009. p. 3031-3039.
43. B. Yamashita, M. French. "Latent Print Development". En: *The Fingerprint Sourcebook*. Washington DC: Office of Justice Programs, U.S. Department of Justice, Chapter 7. p. 1-67.
44. A.Yamamoto, S. Serizawa, M. Ito et al. "Effect of aging on sebaceous gland activity and on the fatty acid composition of wax esters". En: *The Journal of Investigative Dermatology* Volume 89, No 5, 1987. p. 507-512.



## EFFECTO DEL CONSUMO DE MIEL DE ABEJA SOBRE LA TASA DE OVULACIÓN, ÍNDICE GONADAL, OVIDUCTAL Y UTERINO EN HEMBRAS HÁMSTER SIRIO DORADO

Demetrio Alonso Ambríz García, Alfredo Trejo Córdova, José Roberto Vázquez Avendaño, Bárbara Vargas Miranda y María del Carmen Navarro Maldonado.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa  
[deme@xanum.uam.mx](mailto:deme@xanum.uam.mx)

### RESUMEN

El aprovechamiento de los animales de bioterio como modelos experimentales, adquiere cada vez un mayor énfasis, de manera que pueda reducirse el número total de individuos utilizados. Este beneficio radica en poder estudiar y evaluar en ellos la respuesta a ciertos métodos, en este caso, para mejorar la reproducción animal. Un método no invasivo para aumentar la tasa ovulatoria en hembras consiste en suministrar en la dieta una alimentación flushing que proporcione energía al incorporar altas concentraciones de carbohidratos y proteína. La miel de abeja (*Apis mellifera*), tiene efectos estrogénicos derivados de algunos grupos fenólicos que contiene, además de tener una importante actividad energizante. Su efecto en el aumento de la tasa ovulatoria ha sido comprobado en ratas, al administrarse en el agua de bebida durante 3 ciclos estrales consecutivos. Este efecto fue 30% mayor cuando las hembras se encontraban desnutridas. El presente trabajo tuvo por objetivo evaluar el efecto de la miel en la dieta, durante un solo ciclo estral, en hembras hámster sirio dorado jóvenes nulíparas (2 meses de edad) con normopeso. Se utilizaron dos grupos de 6 hembras que se mantuvieron en condiciones de bioterio en ambiente controlado, con agua y alimento (nutricubos) a libertad. Se seleccionaron aquellas hembras que mostraron regularidad durante 3 ciclos estrales consecutivos, confirmado por la presencia de secreción vaginal postovulatoria cada 4 días. El Grupo Experimental (GE) recibió 1.2 g de miel (marca "Carlota") por cada 100 mL de agua de bebida durante cuatro días, mientras que el Grupo Control (GC) solo recibió agua. Los pesos promedio de las hembras del GC y GE fueron  $99 \pm 3$  g y  $104 \pm 6$  g, respectivamente. Posteriormente, las hembras de ambos grupos fueron sacrificadas, disecando los ovarios, oviductos y úteros. La tasa ovulatoria se determinó por el número de cuerpos lúteos presentes en los ovarios. Los ovarios, oviductos y úteros fueron pesados de manera independiente, relacionando sus pesos con el peso corporal para determinar el índice gonadal, oviductal y uterino. El GC obtuvo una tasa ovulatoria de 11.25 ovocitos vs. 14.2 en el GE, lo que representó un aumento del 26% ( $P < 0.05$ ). Los índices gonadal y oviductal fueron de 0.025 y 0.023 (GC) vs. 0.029 y 0.025 (GE), lo que representó una diferencia del 16% y 9%, sin haber diferencias estadísticas significativas ( $P > 0.05$ ). El índice uterino fue de 0.29 y 0.51, respectivamente, lo que representó una diferencia del 76% ( $p < 0.05$ ). Los resultados demuestran que la alimentación flushing a base de miel de abeja durante un solo ciclo estral, es suficiente para aumentar considerablemente la tasa ovulatoria (26% mayor que GC) y el índice uterino (76% mayor que GC) en hembras hámster jóvenes nulíparas.

### INTRODUCCIÓN

El aprovechamiento de los animales de bioterio como modelos experimentales, adquiere cada vez un mayor énfasis, de manera que, en concordancia con los requerimientos actuales de grupos proteccionistas pueda reducirse al mínimo el número total de individuos utilizados. Este beneficio radica en poder estudiar y evaluar en ellos la respuesta a ciertos métodos, en este caso, para mejorar la reproducción animal. Un método no invasivo para aumentar la tasa ovulatoria en las hembras consiste en suministrar en la dieta una alimentación flushing que proporcione energía, al incorporar altas concentraciones de carbohidratos y proteína. La técnica de flushing, también conocida como golpe nutricional o acondicionamiento, es una práctica de manejo ampliamente utilizada por el hombre y consiste en incrementar el nivel nutricional de energía, proteína y otros nutrientes, en la dieta de animales domésticos. Los efectos fisiológicos (fundamentalmente hormonales) de esta práctica producen un aumento de la tasa de ovulación, y por lo tanto, de la prolificidad (Banchemo et al., 2002). El flushing es naturalmente la estrategia que varias especies animales adoptan para detonar su actividad reproductiva de manera intensa. Se señala que el medio provee de los nutrientes necesarios para esto, a través de diferentes mecanismos en sincronización con otras

especies animales y vegetales, considerando los efectos propios del clima como la lluvia y la insolación, que a su vez se rigen por los movimientos de traslación y rotación.

Por otro lado, la tasa ovulatoria es la cantidad de óvulos liberados en cada estro o celo (Letelier *et al.*, 2008), por ejemplo: en las ovejas, las poblaciones de folículos son muy sensibles al aporte nutricional, por lo que la foliculogénesis y la tasa ovulatoria pueden ser fácilmente manipuladas a través de la nutrición, como una herramienta de manejo económica para mejorar la prolificidad (Scaramuzzi *et al.*, 2006). Se han establecido dos tipos de efectos de la nutrición en la tasa ovulatoria: el efecto estático que consiste en incrementar el peso vivo y la condición corporal de la hembra. Por ejemplo, en ovejas se alcanza un efecto estático con un peso crítico (para las razas Corriedale y Romney el peso crítico es de 42-43 kg y para la Merino de 37 kg) (Ganzábal *et al.*, 2003). Por otra parte, el efecto dinámico en la estimulación de la ovulación consiste en aumentar el nivel nutricional (cantidad y/o calidad) previo al servicio, monta o inseminación artificial. Este es un efecto conservado genéticamente, donde las hembras detectan, además de los cambios climáticos (factores abióticos) cambios importantes en la concentración de energía de la dieta y responden de manera inmediata con una mayor tasa de ovulación, aprovechando que se aproxima una época de bonanza nutricional. Este fenómeno está bien establecido en las abejas, donde luego del inicio del periodo de lluvias, ocurre la germinación de las semillas silvestres, el crecimiento de las plantas y posteriormente la floración, momento en que hay abundancia de néctar y polen para los polinizadores, entre ellos la especie referida, que acuden a recoger dichos alimentos y una vez llevados a la colmena, actúan como el detonante de la señal para aumentar de manera considerable la postura de huevos de la abeja reina, llegando en poco tiempo a cerca de dos mil huevos por días, superando con ello incluso, el peso corporal de la reina en un solo día. A este proceso se le conoce como el flujo de néctar (flush) y de ahí la derivación hacia lo que ocurre con otras especies animales en el flushing.

La miel de abeja (*Apis mellifera*), es un nutraceutico, que presenta efectos estrogénicos derivados de algunos grupos fenólicos presentes, además de tener una importante actividad energizante. Su efecto en el aumento de la tasa ovulatoria ha sido comprobado previamente por nuestro grupo de investigación, en ratas, al administrarse en el agua de bebida durante 3 ciclos estrales consecutivos. Este efecto fue 30% mayor cuando las hembras se encontraban desnutridas (Ambriz *et al.*, 2020). El presente trabajo tuvo por objetivo evaluar el efecto de la miel en la dieta, durante un solo ciclo estral, en hembras hámster jóvenes nulíparas (2 meses de edad) con normopeso.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 12 hembras hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) con una edad promedio de 2 meses. Las hembras fueron distribuidas en dos grupos: el Grupo Experimental (GE) n=6 que recibió 1.2 g de miel (marca comercial "Carlota") por cada 100 mL de agua de bebida durante cuatro días, mientras que el Grupo Control (GC) n=6, solo recibió agua (figura 1).



Figura 1. Hembra hámster con suplementación a base de miel.

Tomado de: <https://mascotafiel.com/lo-se-necesita-hamster/>

Ambos grupos se mantuvieron en condiciones de bioterio en ambiente controlado, con agua y alimento (nutricubos) a libertad. La regularidad en los ciclos estrales fue confirmada a través de su seguimiento durante tres semanas mediante citología vaginal exfoliativa. Se seleccionaron aquellas

hembras que mostraron regularidad durante 3 ciclos estrales consecutivos, confirmado por la presencia de secreción vaginal postovulatoria cada 4 días.

Los pesos promedio de las hembras del GC y GE fueron de  $99\pm 3$  g y  $104\pm 6$  g, respectivamente. Posteriormente, al consumo durante un ciclo de la miel, las hembras de ambos grupos fueron sacrificadas, disecando los ovarios, oviductos y úteros. La tasa ovulatoria se determinó por el número de cuerpos lúteos presentes en los ovarios. Los ovarios, oviductos y úteros fueron disecados, limpiados de cualquier detrito y pesados de manera independiente, relacionando sus pesos con el peso corporal para determinar el índice gonadal, oviductal y uterino.

Los valores fueron comparados a través de estadística descriptiva y los valores de cada grupo analizados a través de prueba t de Student con una significancia de 0.05

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 2, se muestra la tasa ovulatoria observada en cada grupo. El GC obtuvo una tasa ovulatoria de 11.25 ovocitos vs. 14.2 en el GE, lo que representó un aumento del 26% ( $P < 0.05$ ).

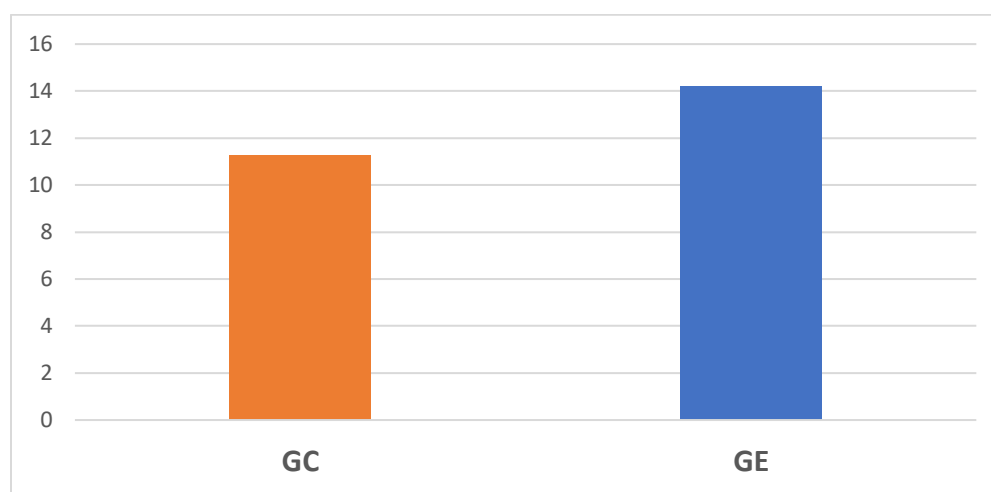


Figura 2. Tasa ovulatoria (número de ovocitos) observada en los grupos control y experimental.

Estudios realizados en ovejas Pelibuey han demostrado que la utilización de la jalea real secreción de las glándulas hipofaríngeas de las abejas nodrizas que cuidan de las crías en los primeros días de vida, contribuye con la estimulación ovárica y la disminución en el periodo estral de las ovejas (Sosa *et al.*, 2017). Como lo mencionan Mishima *et al.* (2005) y Mostafa *et al.* (2008), existe una modificación en el metabolismo ovárico, tendiente a aumentar la tasa ovulatoria, con la suplementación de la jalea real en la dieta de los ovinos. Esto también ha ocurrido cuando se ocupa miel para la suplementación, de manera que se convierte en un inductor de la ovulación a partir de un producto de la *Apis mellifera mellifera*, y como se ha descrito, se incrementan las funciones reproductivas en diferentes especies (Lewis, 2004; Kridil, 2006; Elnagar, 2010).

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos para los índices: gonadal, oviductal y uterino, en ambos grupos tratados. En los índices gonadal y oviductal, se observó una diferencia del 16% y 9%, respectivamente, sin diferencias estadísticas significativas ( $P > 0.05$ ).

El índice uterino fue de 0.29 y 0.51, respectivamente, lo que representó una diferencia del 76% ( $p < 0.05$ ). Esto podría estar relacionado con lo reportado por Kazu-Michi *et al* (2008) quienes reportaron que la jalea real tiene efectos estrogénicos mediados a través de la interacción con los receptores de estrógenos que dan por resultado cambios en la expresión génica y proliferación celular. Estos autores aplicaron a través de una inyección subcutánea estos componentes con actividad estrogénica (10-hidroxi-trans-2-ácido decenoico, 10-ácido hidroxidecanoico, trans-2-ácido decenoico y 24-metilencolesterol) a ratas inmaduras, como resultado se obtuvo una hipertrofia del epitelio luminal del útero, con lo cual se podría incrementar el peso del útero. En el caso de la miel también se sabe que contienen grupos fenólicos que compiten selectivamente por los receptores a estrógenos, induciendo con ello efectos derivados de esta hormona. Esta propiedad de competencia

selectiva por los sitios receptores ha sido que sea utilizada con éxito en oriente para combatir el cáncer de mama y cérvico uterino, que sean estrógeno-dependientes.

Tabla 1. Valores obtenidos para los índices: oviductal, gonadal y uterino, en ambos grupos.

	Índice gonadal	Índice oviductal	Índice uterino
Grupo control	0.025 <sup>a</sup>	0.023 <sup>a</sup>	0.29 <sup>a</sup>
Grupo experimental	0.029 <sup>a</sup>	0.025 <sup>a</sup>	0.51 <sup>b</sup>

## CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que la alimentación flushing a base de miel de abeja durante un solo ciclo estral, es suficiente para incrementar considerablemente la tasa ovulatoria (26% mayor que el GC) y el índice uterino (76% mayor que GC), en hembras hámster sirio dorado jóvenes nulíparas, todo ello gracias al efecto estrogénico propio de los grupos fenólicos de este nutraceutico. Con esto es posible aumentar la producción de ovocitos y embriones a favor de la reducción del número de individuos utilizados en la experimentación científica.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ambriz, G. D., Trejo, C. A., Vargas, M. B., y Navarro-Maldonado, M.C. 2020. Estimulación de la ovulación con miel, en ratas con un esquema de desnutrición. *Miscelánea científica en Mexico*. Tomo II. Biotecnologías y ciencias agropecuarias. Editorial Centro de investigaciones en Óptica.
2. Banchemo, G.; Vázquez, A.I.; Quintans, G. 2002. Alternativas de manejo para aumentar la tasa ovulatoria en ovejas Corriedale. En: INIA Treinta y Tres. Jornada anual de producción animal: resultados experimentales. Treinta y Tres: INIA. p. 32-36.
3. Elnagar S. A. 2010. Royal jelly counteracts bucks "summer infertility" *Animal Reproduction Science* 121:174–180
4. Ganzábal, G. Ruggia, A. y De Miquelerena, J. 2003. Jornada de Producción Ovina Intensiva. Serie de Actividades de Difusión N° 342:1-8.
5. Letelier C., Mallo F., Encinas T., Ros J.M., Gonzalez-Bulnes A. 2008. Glucogenic supply increases ovulation rate by modifying follicle recruitment and subsequent development of preovulatory follicles without effects on ghrelin secretion. *Reproduction Research*. 136(1): 65-72.
6. Kazu-Michi Suzuki, Yoichiro Isohama, Hiroe Maruyama, Yayoi Yamada, Yukio Narita, Shozo Ohta, Yoko Araki, Takeshi Miyata, Satoshi Mishima. 2008. Estrogenic activities of Fatty acids and a sterol isolated from royal jelly. *Evid Based Complement Alternat Med*. 5(3):295-302
7. Kridli R.T., Al Khetib S. 2006. Reproductive responses in ewes treated with eCG or increasing doses of royal jelly. *Animal Reproduction Science*. 92: 75-85.
8. Lewis R. 2004. *The Infertility Cure: The Ancient Chinese Wellness Program for Getting Pregnant and Having Healthy Babies*. Little Brown and Company; 303 p.
9. Mishima S., Suzuki K.M., Isohama Y., Kuratsu N., Araki Y., Inoue M., Miyata, T. 2005. Royal jelly has estrogenic effects in vivo and in vitro. *Journal of Ethnopharmacology* 101: 215–220.
10. Mostafa A.S. Abd-Allah S.M., Saddia A.Ali., Saffa N. 2008. Reproductive influence following oral royal Jelly administration on postpartum ewes. *Egyptian Journal of Basic and Applied Physiology*; 7, 1: 7-35.
11. Scaramuzzi, R.; Campbell, B.; Downing, J.; Kendall, N.; Khalid, M.; Muñoz-Gutiérrez, M. y Somchit, A. 2006. A review of the effects of supplementary nutrition in the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod. Nutr. Dev.*, 46: 339-54, 2.
12. Sosa-Pérez, G.; Pérez-Ruiz, E.; Pérez-Hernández, P.; Cortez-Romero, C.; Gallegos-Sánchez, J. 2017. Administración endovenosa de jalea real en la actividad ovárica y tasa ovulatoria de ovejas pelibuey. *Agroproductividad*: Vol. 10, Núm. 2, pp: 42-46.

## CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS EXTRAÍDOS DE MUSA PARADISIACA Y TRADESCANTIA SPATHACEA

Jazmín del R. Torres Hernández<sup>1</sup>, Ebelia Del Ángel Meraz<sup>1</sup>, Francisco E. Corvo Pérez <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ingeniería y Arquitectura, Posgrado en Ciencias en Ingeniería, Carretera Cunduacán-Jalpa de Méndez Km. 1, Colonia La Esmeralda, 86690, Cunduacán, Tabasco. <sup>2</sup>Universidad Autónoma de Campeche, Centro de Investigación en Corrosión, Av. Héroes de Nacozari 480, Col. Aviación, CP 24069, Campeche, Camp.  
ebelia.delangel@ujat.mx

### RESUMEN

Los extractos vegetales, debido a su origen natural, no contaminan, pueden ser extraídos por procesos de química verde y son amigables con el medio ambiente, son una mezcla compleja de diferentes compuestos, que algunas investigaciones los reportan como excelentes inhibidores para el control de la corrosión. En este trabajo se realizó la caracterización de compuestos que fueron extraídos de la cáscara de plátano (musa paradisiaca) y de la hoja de maguey morado (tradescantia spathacea) siendo estos compuestos de interés para aplicaciones futuras como inhibidores de corrosión. Los extractos frescos fueron deshidratados para mejorar el contacto con el solvente etanol-agua desionizada, utilizando el método de maceración y método soxhlet, de acuerdo con los resultados el método soxhlet, es más adecuado para la extracción de compuestos que el método de maceración. El análisis de los extractos se realizó por Cromatografía de Gas acoplada con Espectrometría de Masas (GC-MS). Los resultados mostraron que la hoja de tradescantia spathacea, tiene una mayor proporción de compuestos como el fenol ( $C_6H_6O$ ) y el 2 penta-decanona ( $C_{18}H_{36}O$ ). En el caso del extracto de maguey morado los compuestos en mayor proporción fueron el fenol y el benzothiazol ( $C_6H_6O$  y  $C_7H_5NS$ ). Con la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM-EDS), se realizó el análisis de la cáscara de plátano, reportando elementos de: carbono (47.08 %), nitrógeno (9.73 %), oxígeno (43.51 %), fósforo (0.07 %) y potasio (1.62 %). En el SEM-EDS de la hoja de maguey morado se encontraron elementos de: carbono (40.60%), nitrógeno (5.18%), oxígeno (43.36%), sodio (2.50%), fósforo (0.34%), potasio (1.26%) y calcio (6.76%), siendo estos elementos reportados como propiedades inhibidoras.

### INTRODUCCIÓN

El interés por el uso de extractos de plantas ha ido aumentando gracias a sus componentes naturales para diversas aplicaciones en la medicina, en la industria alimentaria, cosméticos y en otros campos de interés [1]. La mayor parte de las plantas de plátano contienen almidón en un porcentaje del 75%, considerando otros compuestos contenidos como los antioxidantes y fenoles [2], y la planta de maguey morado es utilizada en México para efectos medicinales como antibiótico, antisépticas o antiinflamatorias [3]. La extracción de los compuestos orgánicos de plantas o frutos que pueden ser: taninos, fenoles, antioxidantes, lignina son de interés para estudios de medicina y para aplicaciones como inhibidores de corrosión [4]. Una de las aplicaciones de interés es en la corrosión que afecta la economía, los gastos generados por el control y prevención de este problema es enorme y se estima que corresponden del 2% al 4% del producto interno bruto de un país industrializado. Los riesgos más prominentes, tanto económicos como ambientales y sociales, se presentan en las grandes instalaciones industriales, como centrales eléctricas o plantas de procesos químicos. La corrosión, en muchos casos, es la causante de las fallas en las plantas de procesos, disminuye la eficiencia de funcionamiento de los equipos y causa accidentes como incendios, explosiones y liberación de productos tóxicos a la atmósfera, al agua o a la tierra. Es casi imposible evitar la corrosión, sin embargo, es posible controlarla. Para precaver el daño por corrosión de tuberías, tanques de mezclado, tubos en espiral, y otras superficies metálicas, la formación de ácidos necesita ser inhibida por el uso de una solución efectiva de inhibidores de corrosión [5]. El objetivo de este trabajo es conocer los compuestos de los extractos para aplicaciones futuras de investigadores del área de interés.

## TEORÍA

Existen varios métodos de extracción como se muestran en la Figura 1, que dependen de las características físicas y químicas de la muestra, para la selección del método [6].

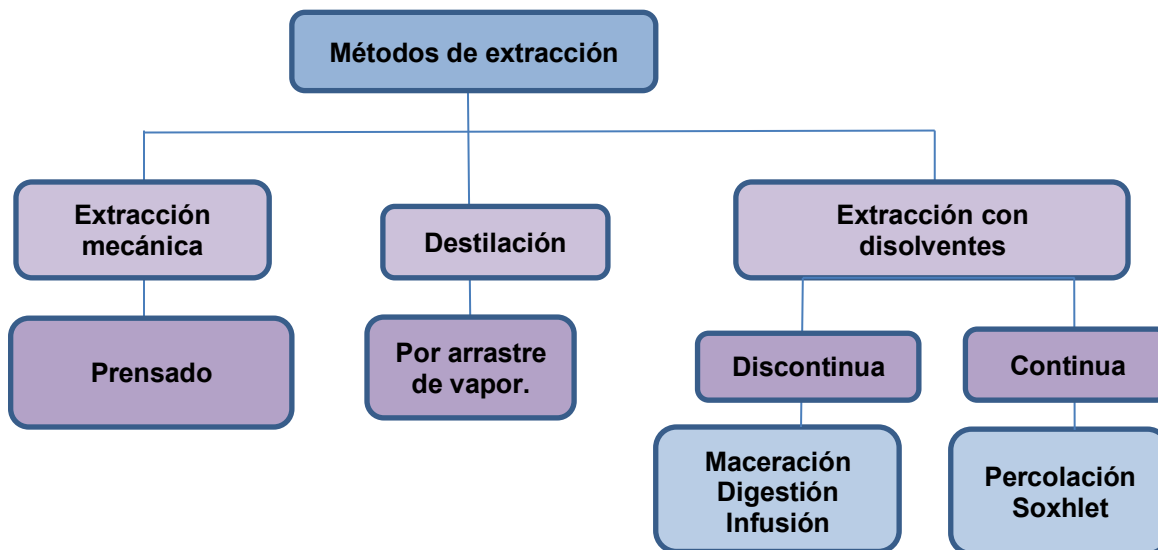


Figura 1. Métodos de extracción

La eficiencia de extracción depende del método utilizado, de acuerdo a las investigaciones existen, la extracción soxhlet, utilizada para la recuperación de los componentes [7].

La maceración es considerado fácil y económico, y de tiempos prolongados para asegurar la extracción, que también dependerán del solvente a utilizar.

as

La extracción con solventes orgánicos es eficiente y sencilla, se caracterizan por ser de baja toxicidad, seguro y eficiente. De acuerdo a otros estudios el mejor disolvente a utilizar es la mezcla etanol-agua, que permitirá extraer compuestos con mayor polaridad, mencionando considerando la existencia de metanol, acetona, agua como solvente [8].

## PARTE EXPERIMENTAL

Para el desarrollo experimental se realizó el proceso de secado de la cáscara de plátano (*musa paradisiaca*), y de maguey morado (*tradescantia spathacea*). Posteriormente se lavó la cáscara de plátano y maguey morado, con agua y jabón para eliminar suciedad y/o microorganismos presentes, después se realizaron cortes de aproximadamente 1cm x 4 cm, se llevó a un horno de secado a 50°C por 12 h, y luego se trituro en un mortero de ágata como se muestra en la Figura 2a y 2b. Posteriormente su uso la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido para identificar los elementos contenidos en cada uno de los extractos.



Figura 2a. Secado de la cáscara de plátano



Figura 2b. Secado del maguey morado



Por extracción soxhlet de compuestos de la cáscara de plátano y del maguey morado, se pesó 10 g de la muestra en una balanza analítica del material triturado y se colocó en un cartucho de papel filtro dentro del equipo soxhlet, mientras que en el matraz de fondo plano de 500 ml se colocó 100 ml de alcohol etílico ( $C_2H_5OH$ ) de 96° marca Meyer, y 20 ml de agua desionizada. Se montó el equipo para la extracción y se procedió a calentar la mantilla a 80 °C en un tiempo aproximado de 8 h. Después se realizó la recuperación del  $C_2H_5OH$  en el rotavapor modelo R52 a temperatura de 80° C para que el extracto quede libre de  $C_2H_5OH$  y evitar reacciones indeseables a futuro.

Se realizó la extracción etanólica por el método de maceración, se colocó en un vaso precipitado 10 gr de cada extracto por separado y se agregó 80 ml de alcohol etílico ( $C_2H_5OH$ ) de 96° marca Meyer con 10 ml de agua desionizada, se colocó en una parrilla para agitación constante por 8 h.

Posteriormente se analizó el extracto obtenido de las muestras con técnicas de Cromatografía de gas acoplada con Espectrometría de Masas (GC/MS) marca shimadzu modelo GCMS-QP2010 ultra, con columna capilar (5%-fenil-95% dimetilpolisiloxano) de 30 m x 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu$ m de espesor de película, con gas helio a 1.5 mL/min.

## RESULTADOS

En la Figura 3, se muestran los resultados obtenidos del SEM-EDS de la muestra *musa paradisiaca*, se encontraron elementos presentes como (Tabla 1): carbono (47.08%), nitrógeno (9.73%), oxígeno (43.51%), fósforo (0.07%) y potasio (1.62%). En la Fig. 4 se observa el SEM-EDS para *tradescantia spathacea*, se encontraron elementos como (Tabla 2): carbono (40.60%), nitrógeno (5.18%), oxígeno (43.36%), sodio (2.50%), fósforo (0.34%), potasio (1.26%) y calcio (6.76%).

Tabla 1. Micrografía SEM-EDS de la cáscara de plátano

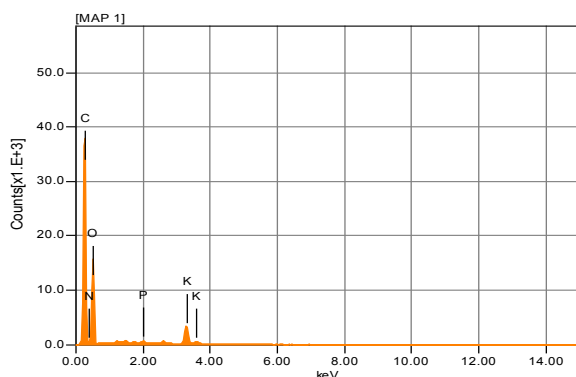


Figura 3. Micrografía SEM-EDS de la cáscara de plátano

Elementos	% Masa
C	45.08
N	9.73
O	43.51
P	0.07
K	1.62
Total	100

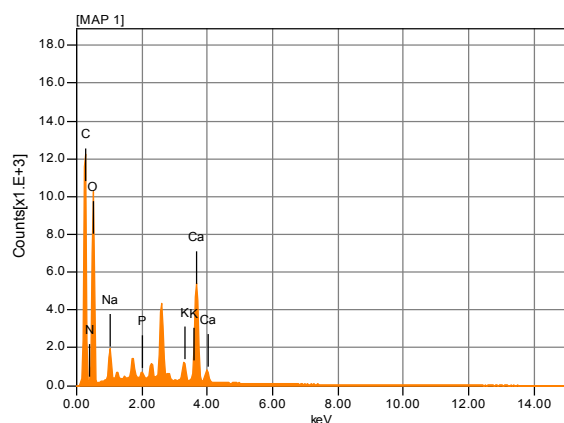


Figura 4. Micrografía SEM-EDS de la hoja de maguey morada.

Tabla 2. Micrografía SEM-EDS de la hoja de maguey morada.

Elementos	% Masa
C	40.60
N	5.18
O	43.36
Na	2.50
P	0.34
K	1.26
Ca	6.76
Total	100

En la Tabla 3 se muestra el resultado del análisis GC-MS de la cáscara de plátano por el método soxhlet, indicando la presencia de  $C_{18}H_{36}O$  (octadecanal, compuesto lineal),  $CH_3(CH_2)_{14}COOH$  (ácido palmítico, compuesto lineal) y  $C_6H_6O$  (fenol, compuesto cíclico).

Tabla 3. Analisis GC-MS de la cáscara de plátano plátano por el metodo soxhlet

Formula	Tiempo de retención	% Área
$C_{10}H_{22}O$	2.867	3.11
$C_3H_8O_3$	3.415	6.4
$C_6H_6O$	3.515	6.55
$C_4H_6O_3$	3.706	0.9
$C_6H_{10}O$	9.2	5.57
$C_{14}H_{22}O$	13.071	3.66
$C_{31}H_{48}O_2$	13.612	3.44
$C_{18}H_{36}O$	15.304	11.02
$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	16.786	6.33
$C_{18}H_{34}O_2$	18.54	4.18
$C_{21}H_{40}O$	20.319	2.88
$C_{20}H_{26}$	20.488	1.75

En la Tabla 4 se muestra el resultado del análisis GC-MS del maguey morado por el método soxhlet, indicando la presencia de  $C_6H_6O$  (fenol),  $C_7H_5NS$  (benzothiazol), y entre otros compuestos orgánicos, que contiene elementos como nitrógeno, oxígeno y azufre.



Tabla 4. Analisis GC-MS del maguey morado plátano por el metodo soxhlet

Formula	Tiempo de retención	% Área
C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	3.143	3.94
C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O	3.498	28.31
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	6.62	13.65
C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> NS	6.856	14.68
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O	6.92	1.1
C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	7.758	3.66
C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O	15.893	2.95
C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	17.193	3.58
C <sub>17</sub> H <sub>36</sub> N <sub>2</sub> O	19.313	4.76
C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	3.143	3.94

En la Tabla 5 se muestra el resultado del analisis GC-MS de la cáscara de platano por maceracion indicando la presencia de glicerina (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>), ácido tánico (C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>) entre otros compuestos.

Tabla 5. Analisis GC-MS de la cáscara de plátano por maceración

Fórmula	Tiempo de retención	% Área
C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	20.355	1.97
C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	15.252	0.54
C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	3.348	2.83
C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	15.765	0.76
C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> N <sub>2</sub> O	18.914	2.88
C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	6.959	2.19

En la Tabla 6 se muestra el resultado del analisis GC-MS del maguey morado por maceracion indicando la presencia de C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O (fenol), C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub> (ácido octadecanoico) ) entre otros compuestos.

Tabla 6. Analisis GC-MS del maguey morado por maceración

Fórmula	Tiempo de retención	% Área
C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O	3.472	6.95
C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	19.022	2.18
C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O	15.539	4.55
C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	18.311	17.35
C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	27.415	7.68
C <sub>18</sub> H <sub>38</sub>	16.447	3.53

## CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados el método soxhlet, es más adecuado para la extracción de compuestos. El análisis de los extractos se realizó por Cromatografía de Gas mostraron que la hoja de tradescantia spathacea, tiene una mayor proporción de compuestos como el fenol (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O) y el 2 penta-decanona (C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>O). En el caso del extracto de maguey morado los compuestos en mayor

proporción fueron el fenol y el benzothiazol ( $C_6H_6O$  y  $C_7H_5NS$ ). Siendo estos compuestos de interés para aplicaciones futuras como inhibidores de corrosión

#### BIBLIOGRAFÍA

1. R. Tambun E. Christamore, Y. F. Pakpahan, y B. Haryanto. "Banana peel utilization as the green corrosion inhibitor of Iron in NaCl médium", *Mater. Sci. Eng. C*. Vol. 420, 2 2015, pp 59-64.
2. V. V Angela, "Tannin extraction from green rejected bananas", *Rev. Lasallista*. Vol. 2, 2, 2005, pp 8-14.
3. A. R. -Munguía , y E. N. Azúara. "Antioxidant properties of purple maguery (Rhoeo discolor) antioxidant properties". *CYTA J Food*. Vol. 7,3, 2009, pp. 209–216.
4. O. A. Ogunleye , A.O. Arinkoola y O.A. Eletta. "Green corrosion inhibition and adsorption characteristics of Luffa cylindrica leaf extract on mild steel in hydrochloric acid environment". *Heliyon*.2020. Vol 6, 205, pp. 1-12
5. T. K. Bhuvaneswari. C. Jeyaprabha y P. Arulmathi. Corrosion inhibition of mild steel in hydrochloric acid by leaves extract of Tephrosia purpurea. *J. Adhes. Sci. Technol*. Vol 2,14, 2021, pp. 1-27.
6. M. Alan. y E.V Araceli. Plant Extracts as "Green Corrosion Inhibitors for Different Metal Surfaces and Corrosive Media: A Review". *Processes* Vol 8, 942, 2020, pp 2-27.
7. E. Andrés. G. Federico y R. Fernández. "Unconventionals extractions methods for samples treatment on the settled particles for phenanthrene and pyrene". *Rev.de la Fac. de Ing*. Vol. 27, 1, 2012, pp. 41-48.
8. F. J.Jiménez. L.J. Téllez y K. A Fernández."Use of organic solvents as grinding dispersants to obtain natural pozzolan nanoparticles" *Superf. Vacio*. Vol. 24,4 2011, pp.107-112.

## VERIFICACIÓN DE LA EFICACIA DE LA TÉCNICA DE PASTEURIZACIÓN ARTESANAL PARA LA ELIMINACIÓN DE *BRUCELLA SPP* DE LA LECHE DE CABRA UTILIZADA POR LOS PRODUCTORES DE LA COMUNIDAD DE XOCONOXTLE, YURIRIA, GTO.

Rodrigo Diaz Balcazar<sup>1</sup>, Patricia Yazmín Figueroa Chavez<sup>1</sup>, Guadalupe Gissela Marín Hernández<sup>1</sup>, Rafael Ángel Gutiérrez Gonzalez<sup>2</sup> y Lisset Ramirez Gutierrez<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Químico Farmacobiología, UMSNH., <sup>2</sup>Hospital Comunitario Yuriria, Gto, <sup>3</sup>CAISES, Yuriria, Gto.

[rodrigo.diaz@umich.mx](mailto:rodrigo.diaz@umich.mx)

### RESUMEN

La brucelosis es una enfermedad zoonótica causada por el género bacteriano *Brucella*, es de distribución mundial, actualmente en México en la mayoría de los estados se considera como endémico. La brucelosis en humanos es un problema serio de salud pública por el impacto económico que conlleva su tratamiento y las secuelas que puedan presentarse al no ser diagnosticados y tratados oportunamente, afectando la calidad de vida de las personas que presentan la enfermedad. Los microorganismos suelen encontrarse en abundancia en la placenta y la leche de las hembras infectadas, la transmisión se produce principalmente por la ingesta del producto contaminado (leche no pasteurizada) o el mantener un estrecho contacto con los animales infectados. El objetivo del trabajo es verificar la eficacia de la técnica de pasteurización artesanal para la eliminación de *Brucella spp* de la leche de cabra utilizada por los productores del Xoconoxtle, Yuriria, Gto. La metodología es de corte cuantitativo, cuasiexperimental, descriptivo, se recolectaron 26 muestras de leche de cabra para ser analizadas mediante las técnicas de seroaglutinación en placa (ring test) y cultivos bacterianos, se clasificaron en dos grupos: A) sin pasteurizar y B) pasteurizadas, posteriormente se sembraron en agar chocolate y ambiente de CO<sub>2</sub> para el aislamiento de *Brucella spp*, en ambos grupos y realizar pruebas de confirmación. Los resultados fueron: del grupo A el 46% fueron positivas y del B solo el 7.2% fueron positivas, en los cultivos del grupo A el crecimiento fue de más de 100 UFC/ml siendo un resultado significativo y el grupo B menor a 100 UFC/ml. Al aplicar la prueba estadística t de student se obtuvo un p valor de 0,000 menor al p valor de 0,05 en la prueba de la seroaglutinación y el p valor de 0,001 menor al p valor de 0,05 en el crecimiento y aislamiento. La conclusión del trabajo es que la técnica de pasteurización artesanal es eficaz para eliminar la presencia de *Brucella spp* de la leche de cabra utilizada.

### INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una de las zoonosis bacterianas más frecuentes en todo el mundo, en México ocupa el segundo lugar de importancia para la Secretaría de Salud. <sup>(1)</sup> Su incidencia se presenta entre 1.3 y 70.0 casos por cada 100 000 habitantes, <sup>(2)</sup> está zoonosis bacteriana afectan varias especies de mamíferos domésticos, los cuales a través de su leche contaminada llegar a infectar al ser humano.

<sup>(1)</sup> La brucelosis en humanos es un problema serio de salud pública por el impacto económico que conlleva su tratamiento y las secuelas que puedan presentarse al no ser diagnosticados y tratados oportunamente, afectan la calidad de vida de las personas que presentan la enfermedad.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), informa que el principal factor para contraer brucelosis es el consumo de leche y productos lácteos contaminados con el agente causal y además que no estén debidamente pasteurizados, al igual que la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización Panamericana de la Salud (OSP) exhortan hacer la búsqueda intencionada del agente causal de brucelosis.

Sin embargo, a pesar de las medidas que se implementan no se ha logrado controlar esta enfermedad. En este siglo el 58.2% de los casos se encuentran localizados principalmente en los estados del centro y en el norte del país. <sup>(1)</sup>

### TEORÍA

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), han sido reconocidas como el principal problema de salud pública en el mundo actual y dentro de estas se encuentra la brucelosis, que es una enfermedad infecciosa zoonótica de distribución mundial causada por bacterias del género

Brucella. Es considerada una enfermedad endémica en México y muchos países, afectando directamente la sanidad animal y su reproducción repercutiendo directa y negativamente en el sector de la agricultura y ganadería ocasionando pérdidas económicas bastantes elevadas. <sup>(3)</sup>

Los microorganismos causantes de la brucelosis humana son la *B. abortus* (procedente del ganado), la *B. melitensis* (está presente en las ovejas y cabras) y la *B. suis* (de los cerdos). De estos la *B. melitensis* y *B. suis* las especies más patógenas del género Brucella. <sup>(4)</sup>

Las bacterias pertenecientes al género Brucella morfológicamente corresponden a un cocobacilo pequeño Gram negativo, de 0.5-0.7µm de diámetro por 0.5-1.5µm de longitud, no presentan movilidad, son aerobios de lento crecimiento, no forman esporas y no poseen cápsula. Su metabolismo es oxidativo por tanto son oxidasa y catalasa positiva, utilizan nitratos como aceptores de electrones, no poseen gelatinasas y no son fermentadoras de hidratos de carbono. Estructuralmente, poseen una envoltura nuclear característica que consta de una membrana externa, una membrana interna y un espacio periplásmico intermedio. El citoplasma es rico en ARN, ADN y proteínas citosólicas de gran importancia diagnóstica. Dentro de los antígenos de la Membrana externa de Brucella se encuentran las moléculas ya caracterizadas que corresponden a dos grupos: lipopolisacárido (LPS) y de las proteínas de la membrana externa (OMPs) <sup>(5)</sup>

Las fuentes más comunes de la infección son los animales de granja (bovinos, cabras y cerdos) y la ingestión de leche y/o productos lácteos sin pasteurizar derivados de estas especies. Sin embargo, esta infección también puede contraerse por inhalación, en el caso de los niños y trabajadores de rastros, granjas y laboratorios. Otra vía de infección, son las abrasiones cutáneas, la autoinoculación y las salpicaduras conjuntivales, pero son menos frecuentes. Este microorganismo se ha transmitido también de persona a persona a través de la placenta y durante la lactancia materna. <sup>(6)</sup>

La fisiopatología de la Brucelosis inicia, cuando las bacterias del género Brucella, ingresan al humano susceptible por las vías antes mencionadas; se ha demostrado que luego de ser introducidas en el organismo las bacterias pasan con rapidez de la linfa a los ganglios linfáticos regionales y a la sangre donde rápidamente son fagocitadas por los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) que poseen la capacidad de destruir a las brucelas fagocitadas pero no en su totalidad y las bacterias que sobreviven en el interior de estas células se multiplican. <sup>(3)</sup>

Los síntomas en humanos son muy diversos y se pueden presentar en tres formas: <sup>(7)</sup>

- Forma aguda. Después de la incubación se expresan síntomas generales inespecíficos como malestar, debilidad física, pérdida de apetito, sudoración abundante y fiebre alta
- Formas localizadas. Se puede localizar en cualquier parte del organismo, principalmente en el sistema esquelético (columna vertebral) y en menor proporción y con mayor frecuencia afecta rodillas, cadera, artritis y/o bursitis, infecciones del tracto genitourinario y endocarditis, siendo esta última la mayor causa de muertes de los pacientes que la padecen
- Forma crónica resulta cuando la enfermedad permanece por un tiempo prolongado desde una forma asintomática, presencia de síntomas leves, recaídas hasta signos de infección activa.

### Estudio y aislamiento de Brucella spp.

Las técnicas que se utilizan para la identificación del género de Brucella comprende varias técnicas como: <sup>(8)</sup>

- Revisión de la morfología macroscópica
- Tinción Gram para observar morfología microscópica
- Catalasa y oxidasa
- Pruebas bioquímicas (Ureasa, nitritos y producción de H<sub>2</sub>S)
- Técnicas moleculares (PCR)

Su diagnóstico en humanos puede ser mediante:

- Rosa de bengala
- 2 mercapto-etanol
- Técnica de fijación del complemento
- ELISA competitivo.

Cómo las técnicas usadas son varias, el diagnóstico serológico, se basa en la realización de una prueba de aglutinación con el objetivo de descubrir anticuerpos contra la *Brucella* en la leche, suero de la leche, plasma seminal y suero sanguíneo. El diagnóstico bacteriológico, se basa en el aislamiento y el cultivo de bacterias a partir de órganos y/o materiales que son afectados por la bacteria, como feto abortado, placenta, bazo, estómago, leche, secreciones de la ubre no lactante etc. La prueba de anillo en leche o Ring Test (RT), es una técnica que logra identificar *Brucella* en estanques de leche como en suero, con el fin de buscar anticuerpos específicos. En la actualidad, uno de los retos en la tecnología de alimentos, es implementar métodos rápidos y sensibles para el diagnóstico confiable de enfermedades que se pueden transmitir a través de los alimentos, siendo la brucelosis una de las más importantes zoonosis asociada al consumo de productos y subproductos de origen animal<sup>(7)</sup>. La búsqueda de metodologías rápidas y estandarizadas pueden asegurar una buena calidad de los productos y representa una necesidad real.

La falta de higiene en la elaboración de productos alimenticios lácteos derivados de la leche es condicionante para elevar los casos de brucelosis en el ser humano. La inocuidad de los productos lácteos radica en la protección de estos contra la contaminación accidental no intencional, dado que están expuestos a la contaminación por agentes patógenos, químicos y biológicos<sup>(9)</sup>. Dentro de los procesos de control de la inocuidad de los productos lácteos, también se hace mención que la pasteurización es un factor determinante en la inocuidad y procesamiento de la leche. Desde el punto de vista sanitario, higiénico y técnico, se hace necesario pasteurizar la leche destinada a la producción de queso.<sup>(10)</sup>

#### **Técnica de pasteurización artesanal.**

La pasteurización es el medio para destruir las bacterias patógenas y las formas vegetativas de los microorganismos perjudiciales, así como la inactivación de enzimas de la leche mediante calor.<sup>(10)</sup>

La Pasteurización artesanal es la implementada por productores en la elaboración de alimentos de consumo humano, realizada en sus hogares, sin la utilización de procesos industrializados, que consiste en aplicar una temperatura entre 62 y 64 °C y mantenerla durante 30 minutos, después enfriar a temperatura entre 4 y 10 °C. Este proceso se aplica generalmente para pequeños volúmenes de leche (20-1000 litros).<sup>(11)</sup>

#### **PARTE EXPERIMENTAL**

El siguiente trabajo de investigación tiene un enfoque cuantitativo, cuasi experimental, descriptivo, los sujetos de estudio fueron los productores que utilizan la leche de cabra en la comunidad del Xoconoxtle de Yuriria, Gto. Para la recolección de las muestras se hizo un primer acercamiento en la comunidad donde se les explicó la metodología de la investigación, así mismo dejarles el contenedor especial para la recolección de las muestras de leche de cabra.

Metodología:

\*Comunidad:

1. Acercamiento a la comunidad
2. Explicación de la investigación
3. Recolección de la muestra por los productores
4. Recolección y transporte de las muestras por los investigadores

\*Laboratorio (Fase experimental):

1. Recepción y clasificación de las muestras.
2. Clasificación en grupo A (Sin pasteurizar) y grupo B (Pasteurizadas)

3. Aplicación de la pasteurización artesanal a las leches del grupo B.
4. Prueba del anillo o ring test en ambos grupos.
5. Siembra en medios de cultivo en ambos grupos.
6. Revisión de resultados de la prueba del anillo y cultivos.
7. Pruebas bioquímicas de identificación de *Brucella* spp.
8. Análisis e interpretación de resultados.

## RESULTADOS

Se recolectaron en total 26 muestras de leche de cabra en la comunidad del Xoconoxtle, Yuriria, Gto. Toda vez que se clasificaron y se hicieron las alícuotas dobles de las muestras para tener 26 muestras de leche sin pasteurizar (grupo A) y muestras de leche pasteurizadas artesanalmente (grupo B), quedando 1 A y 1 B, 2 A y 2 B, así sucesivamente para cada una de las muestras se procedió a realizar el análisis de estas.

El primer análisis que se hizo fue la prueba del anillo o ring test, en esta técnica se obtuvieron los siguientes resultados (gráfica 1), en el grupo A se obtuvo que el 46% de las muestras dieron positivo para la prueba del anillo y 54% resultaron negativas. Los resultados del grupo B y lo cual era de esperarse el 92.4% resultaron negativas y solo el 7.6% resultaron positivas.



La segunda técnica que se aplicó fue sembrar en el medio de cultivo (agar chocolate), cada una de las muestras de ambos grupos para poder comparar el crecimiento, ya que el grupo A y B son diferentes. Los medios de cultivo se incubaron en condiciones parciales de CO<sub>2</sub> a una temperatura de 36°C durante 24 horas y 48 horas, posteriormente se revisaron cada unos de los cultivos, donde se registro el tipo de morfología macroscópica de las colonias que crecieron, se tomo una colonia para realizar tinción Gram y observar la morfología microscópica de las bacterias de cada una de las muestras, por ultimo se hizo las pruebas bioquímicas y determinar así que género esta presente en las muestras.

En ambas muestras hubo crecimiento de bacterias, sin embargo, las características de cada una de ellas son totalmente diferente, en el grupo A) a las 24 horas hubo un crecimiento muy escaso, pero a las 48 horas el crecimiento fue significativo, dado que *Brucella* spp, es una bacteria exigente nutricionalmente hablando y requiere de condiciones de CO<sub>2</sub> y de factores de crecimiento, una de las pautas que se tomaron para analizar las diferencias de crecimiento fue el tiempo, dado que en las muestras pasteurizadas el crecimiento fue a las 24 horas. Al momento de hacer la comparación de los crecimientos en el grupo A esta el crecimiento característico de *Brucella* spp con más de 100 UFC/ml y el grupo B tuvo crecimiento también de más de 100 UFC/ml de bacterias contaminantes las cuales son inofensivas para el ser humano, era de esperar este crecimiento ya que hay ciertas especies de bacterias que resisten altas de temperaturas y son consideradas como ambientales. (Gráfica 2)



Por último, se hizo el análisis estadístico de los resultados para ver las diferencias significativas de ambas muestras, en la prueba del anillo (ring test) el p valor que se obtuvo fue de 0,000 es decir un p valor menor a 0,005 por lo cual hay diferencia significativa entre el grupo A y B. (Tabla 1)

Tabla 1. Prueba T student.

Tabla 18. Prueba de muestras relacionadas de prueba del anillo (ABA TEST) sin pasteurizar y pasteurizar

	Diferencias relacionadas					t	gf	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación tp.	Error tp. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
				Inferior	Superior			
Sin pasteurizar - pasteurizada	885	1.107	.217	457	1.332	4.074	25	.000

Fuente: Elaboración propia.

IC 95% p valor < 0.05

Fuente: Elaboración propia.

El tratamiento estadístico en la prueba de los medios de cultivo se obtuvo es p valor de 0,001 el cual también es menor al p valor de 0,005 indicando que hay diferencia significativa entre ambos crecimientos del grupo A y del grupo B. (Tabla 2)

Tabla 2. Prueba T student.

Tabla 19. Prueba de muestras relacionadas medios cultivos sin pasteurizar y pasteurizada,

	Diferencias relacionadas					t	gf	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación tp.	Error tp. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
				Inferior	Superior			
Cultivo Sin Pasteurizar - Cultivo Pasteurizada	1.167	.937	.271	.571	1.762	4.311	11	.001

Fuente: Elaboración propia.

IC 95% p valor < 0.05

Fuente: Elaboración propia.

**CONCLUSIONES**

Los resultados de la prueba del anillo o ring test en las leches sin pasteurizar (crudas) mostraron una positividad del 46%, lo que nos confirma que existe prevalencia oculta de brucelosis. Además, se encontró que en las leches no pasteurizadas (crudas) hubo un crecimiento mayor a 100 UFC/ml en el total de las 12 muestras que presentaron crecimiento, con las pruebas realizadas de aspectos de colonias macroscópicas y microscópicas, así como pruebas bioquímicas específicas se determinó al

agente causal de *Brucella* spp estaba presente en todas las muestras, para el caso de las leches pasteurizadas no fue *Brucella* spp la que creció en los cultivos.

Los resultados obtenidos fueron diferencias significativas, al tener un p valor de 0,000 en la prueba del anillo (ring test) y un p valor de 0,001 en los medios de cultivo, ambos resultados son menores al p valor de 0,05, por lo que se puede decir y aceptar la hipótesis de investigación, que el realizar el proceso de pasteurización artesanal a la leche de cabra, es eficaz para eliminar la presencia de *Brucella* spp de las leches.

## BIBLIOGRAFÍA

1. CENAPRECE. Programa de acción específico, Prevención de Control de la Brucelosis 2013-2018. México:, Secretaria de Salud; 2018.
2. Meztli Méndez Lozano LM. Brucelosis, una zoonosis presente en la población: estudio de series de tiempo en México. Salud Pública de México. 2015 Noviembre;: p. 519-527.
3. Ruiz-Rodríguez M. Manual para la vigilancia epidemiológica de la Brucelosis México DF: Secretaria de Salud; 2017. Disponible: [https://epidemiologia.salud.gob.mx/gobmx/salud/documentos/manuales/03\\_Manual\\_Brucelosis.pdf](https://epidemiologia.salud.gob.mx/gobmx/salud/documentos/manuales/03_Manual_Brucelosis.pdf)
4. Guzmán Hernández Rosa Lilia, Contreras-Rodríguez Araceli, Ávila-Calderón Eric Daniel, Morales-García M. Rosario. Brucelosis: zoonosis de importancia en México. Revista chilena de infectología. 2016. Disponible en: [https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182016000600007](https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182016000600007)
5. Adams, M.R. and Moss, Food Microbiology. 3rd Edition. Cambribge:RSC Publishing; 2008.
6. Jameson J. Larry. Harrison Principios de Medicina Interna. 19th ed. México: Mc Graw Hill; 2016.
7. Castro, Hugo Abel, Gozález Sofia Raquel, María Ines Prat. Brucelosis una revisión práctica.; 2016. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/535/53539208.pdf>
8. Prats. Microbiología y Parasitología médicas México: Panamericana; 2014.
9. Vargas T. Calidad e inocuidad de la leche y productos lácteos Venezuela: Foro: venezolano de la leche; 2005.
10. UAMVZ.UAZ. Manual de procedimientos del taller de procesos lácteos. Zacatecas, México; 2005.
11. Figueroa VC, M.G.,. Manual de BPM en producción de leche caprina México: SAGARPA; s.f.



**ABUNDANCIA DE ÁCAROS EDÁFICOS EN ÉPOCA DE LLUVIAS EN EL CERRO DEL ÁGUILA**

Mayra Silva Corona, Juan Carlos González Cortés, Margarita Vargas Sandoval, María Elena Granados García y María Alcalá de Jesús

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.  
[silcor\\_0322@hotmail.com](mailto:silcor_0322@hotmail.com)

Las comunidades de los ácaros son de gran importancia biológica ya que se ha señalado en investigaciones recientes que pueden ser bioindicadores de las condiciones del suelo, considerando que sus funciones son fundamentales pues intervienen en el buen funcionamiento de los ecosistemas edáficos, como es el reciclaje de nutrientes y fertilidad. Sin embargo, son muy pocos los trabajos de ácaros edáficos, ya que en su mayoría se estudian aquellos de interés médico y económico. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia y abundancia de ácaros edáficos en la época de lluvias (agosto), en el cerro del Águila (municipio de Morelia, Mich.). El muestreo se realizó a cada 50 metros de los 2050 a 2600 msnm. En cada punto, en un transepto de 50 m perpendicular a la pendiente, se tomaron 5 submuestras (una cada 10 m) y se homogenizaron para obtener una muestra compuesta por sitio. La extracción se realizó utilizando el método de Berlese-Tullgreen (modificado) y por flotación con sulfato de magnesio, utilizando 400 g de suelo y preservados en alcohol al 70%. Los organismos se montaron en laminillas con líquido de Hoyer y Bálsamo de Canadá en Xilol, para su identificación. Los resultados mostraron diferenciación en las abundancias, siendo el sitio No. 5 en el cual se presenta la mayor abundancia (140) y el sitio No. 4 donde se obtuvo la menor abundancia (18). Las abundancias mostraron correlación con la altitud, vegetación y uso de suelo.

**INTRODUCCIÓN**

En el ecosistema suelo se llevan a cabo muchos procesos importantes para todos los organismos vivos incluyendo a los seres humano. En este suelo viven cientos o miles de organismos, los cuales son denominados biota edáfica; responsable de mantener el equilibrio en el sistema edáfico. Como parte de esta biota tenemos representantes del *Phylum* Artrópoda, en particular a los ácaros, un grupo muy diverso dentro del suelo (Venegas *et al.*, 2012).

Los ácaros, a diferencia de otros queliceriformes, han desarrollado diferentes hábitos y modos de alimentación además de la saprofa y la depredación; esto les ha permitido poblar cualquier medio donde sea posible que se desarrolle la vida (Krantz y Walter, 2009).

La diversidad de los ácaros se ve reflejada en las relaciones que establecen con otros seres vivos (animales, plantas y hongos) entre las que destacan la foiesia, el comensalismo y el parasitismo (Pérez *et al.*, 2014).

Los ácaros constituyen sin duda alguna un grupo muy diverso de arácnidos representados en nuestro país por 2 625 especies clasificadas en 5 de los 6 órdenes (excepto Holothyrida): Opilioacarida, Mesostigmata, Ixodida, Trombidiformes y Sarcoptiformes (Pérez *et al.*, 2014).

La carencia de cobertura vegetal afecta directamente la densidad poblacional de ácaros Oribátidos, así como también a otros grupos del medio edáfico, debido a las modificaciones no benéficas de su lugar de permanencia, coincidiendo con los encontrados en el presente estudio, donde los sitios con mejor cobertura y/o diversidad vegetal, registraron las mayores abundancias (González *et al.*, 2003). El contenido y la composición de la MO en suelos, así como la actividad microbiológica, están influenciados por la altitud, la cual está asociada a diferencias en la vegetación, temperatura, humedad, precipitación y características de los suelos (Sánchez *et al.*, 2005).

Los ácaros Oribátidos son organismos integrantes de la mesofauna del suelo, facilitadores de la descomposición de la materia orgánica animal y vegetal, fragmentándolos y haciéndolos más accesibles a la acción de los microorganismos (Socarras, 2013).

Algunos investigadores han encontrado densidades altas de ácaros Oribátidos en plantaciones de pino, siendo atribuido a la alta proliferación de hongos miceliados bajo el suelo, de los cuales se alimentan (Covarrubias, 1993).

## ANTECEDENTES

Se realizó un estudio de la variación espacio-temporal de ácaros Crytostimata en la bahía de Chetumal Quintana Roo, México. Las colectas fueron realizadas durante la época de lluvias (agosto, septiembre y octubre) y en la época de secas (febrero, marzo y abril), se muestrearon tres puntos del litoral de la ciudad de Chetumal, Quintana Roo con vegetación contrastante: Parque del Renacimiento (pasto *Sorghum halepense*), la mega escultura (mangle blanco *Laguncuria racemosa*), la UQRoo (mangle botoncillo *Conocarpus erectus*), tomando tres muestras de suelo de cada sitio. Los resultados mostraron una mayor abundancia y diversidad de ácaros durante la época de lluvias con 511 individuos. Encontraron un total de 964 individuos, los cuales fueron agrupados en 13 familias y 26 géneros (Reyna, 2015).

Se realizó un estudio sobre la diversidad de la fauna de hojarasca en fragmentos de bosque de pino-encino con y sin manejo forestal, donde se tomaron muestras en dos épocas del año, en lluvias y secas, en el rancho Santa Elena, en el municipio de Huasca de Ocampo, Hidalgo, México. Se utilizaron 3 métodos: uno fue colecta directa en hojarasca, método indirecto con trampas pitfall y colecta con trampas mini-Winkler. En este estudio se mostró que ambos fragmentos presentaron mayores abundancias y riqueza en época de lluvias, esto porque quizá existen mejores condiciones de humedad y temperatura para la mayoría de los organismos edáficos (Téllez, 2006).

En otro estudio, se evaluó la evolución de la cubierta vegetal y la red trófica edáfica tras la incorporación de residuos orgánicos sobre una parcela quemada que se localizó en el paraje conocido como Monte de la Abadesa, en la cercanía de la ciudad de Burgos, sobre un área forestal poblada con *Pinus sylvestris* y *P. pinaster*. Dicha área sufrió un incendio en octubre de 2004 siendo repoblada en abril de 2005 con plántulas de *P. pinea* a los que se incorporaron materia orgánica exógena en el fondo del hoyo (F) y mezclado con el suelo en el propio hoyo (M) y una dosis de compost de 1,5 y 3 kg.pie<sup>-1</sup>. Los resultados mostraron que se restableció la cobertura vegetal, así como la abundancia y diversidad de los principales grupos edáficos para los tres métodos, dejando claro que esto permitió una recuperación eficiente del ecosistema forestal. (Gómez *et al.*, 2008)

Estudios en Buenos Aires, Argentina, compararon la eficiencia de dos métodos de extracción de artrópodos del suelo, (Berlese-Tullgreen y el de flotación con sulfato de magnesio), con el objetivo de cuantificar y detectar la información que se pierde si solo se utiliza el método de Berlese-Tullgreen. Las diferencias que se encontraron solo fueron en la abundancia, pero no en la riqueza de los grupos taxonómicos. También se encontró que el método de flotación con sulfato de magnesio, para la extracción de ácaros y colémbolos fue la más efectiva, esto debido al tipo de suelo que se estaba procesando, mientras que el embudo de Berlese-Tullgreen es mucho más efectivo para los artrópodos de mayor tamaño (Sandler *et al.*, 2010).

## PARTE EXPERIMENTAL

El área de estudio se ubica en el municipio de Morelia, Mich., en el cerro del Águila de la comunidad de Joyas de la huerta. Los sitios de muestreo fueron seleccionados utilizando las curvas de nivel de las cartas topográficas E14A23 Morelia y E14A22 Pátzcuaro (INEGI, 1998). El muestreo se realizó en el mes de agosto de 2019 (época de lluvia), haciendo un recorrido de los 2050 a 2600 m de altitud. El método de colecta fue el siguiente: en cada punto de altitud definido, se hizo un transepto de 50 m, perpendicular a la pendiente, con la ayuda de una barrena holandesa se tomaron 5 submuestras (una cada 10 m) las cuales se mezclaron para obtener una muestra compuesta por sitio altitudinal, para un total de 12 puntos. La muestra compuesta para cada punto altitudinal se colocó en bolsas de 2 Kg, se etiquetaron y se transportaron al laboratorio de Investigación de Edafología "Biol. Martha Bustos zagal", en la Facultad de Biología, de la Universidad Michoacana de san Nicolás de Hidalgo, para su revisión y análisis.

Las muestras colectadas fueron sometidas a dos pruebas de extracción de ácaros: por el Embudo de Berlese-Tullgreen (modificado) y Flotación con sulfato de magnesio.

Para la extracción utilizando el Embudo de Berlese-Tullgreen modificado, se pesaron 400 g de suelo, los cuales se colocaron sobre una malla en el embudo para reducir la pérdida del suelo hacia el recipiente colector. El conservador que se utilizó fue anticongelante, porque no se evapora al contrario que el alcohol al 70°, ya que las muestras de suelo se dejaron durante 15 días, expuestas a la luz del ambiente.

Se recuperó el suelo sobrante después de los 15 días, para pasarlo por el método de flotación con sulfato de magnesio, se utilizaron porciones de 50 g de suelo a los que se les agregó 150 ml de sulfato de magnesio, se agitaron durante 5 minutos y se dejaron reposar por 30 a 40 minutos. El sobrenadante se pasó por un tamiz de 244  $\mu\text{m}$ , el cual se enjuagó con alcohol al 70° y se recuperó en un frasco de 150 ml para preservar los especímenes. Los ácaros fueron extraídos del conservador y montados en laminillas con líquido de Hoyer (semipermanente) y Bálsamo de Canadá en xilol (permanente, pero solo viable para ácaros esclerosados).

## RESULTADOS

Método de Berlese-Tullgreen (Modificado).

Los resultados mostraron una extracción total de 513 ácaros edáficos, de los cuales se obtuvieron 417 ácaros por el método de Berlese-Tullgreen, esto es, el 81.28% de la abundancia total. La altitud en la que se presentó una mayor abundancia por este método fue a los 2,400 m con un total de 122 ácaros, el sitio se caracterizó por suelo cubierto de hojarasca de encino y arbustos de mediano tamaño, con una cobertura arbórea de aproximadamente un 80%. La altitud con menor abundancia fue a 2,600 m con un total de 14 ácaros, en este sitio se cultiva aguacate y algunos cultivos de maíz de temporal, el área está rodeada de bosque, pero aun así la abundancia fue baja.

Método de flotación en  $\text{MgSO}_4$

Con el método de Flotación con sulfato de magnesio, se pudieron extraer 96 ácaros, es decir, el 18.71% de la abundancia total. La mayor abundancia fue en 2 sitios: 2,550 m y 2,400 m con un total de 18 ácaros y por el contrario el sitio con menor abundancia fue a los 2,500 m, con 2 ácaros.

Cuadro 1. Comparación de abundancias absolutas y relativas de cada método.

Sitios de muestreo Agosto	Método de Berlese-Tullgreen (modificado)		Método de flotación en $\text{MgSO}_4$		Total	
	Altitud (m)	Número de individuos	%	Número de individuos	%	Total individuos/sitio
2600	14	2.72	5	0.97	19	3.70
2550	19	3.70	18	3.50	37	7.22
2500	34	6.62	2	0.38	36	7.01
2450	15	2.92	3	0.57	18	3.50
2400	122	23.78	18	3.50	140	27.29
2350	37	7.21	4	0.77	41	7.99
2300	84	16.37	16	3.11	100	19.49
2250	20	3.89	7	1.36	27	5.26
2200	16	3.11	4	0.77	20	3.89
2150	17	3.31	3	0.58	20	3.89
2100	24	4.67	9	1.75	33	6.43
2050	15	2.92	7	1.36	22	4.28
<b>TOTAL</b>	<b>417</b>	<b>81.28%</b>	<b>96</b>	<b>18.71%</b>	<b>513</b>	<b>100.00%</b>

Lo anterior indica que posiblemente al haber mayor humedad en el suelo los organismos tienen mayor posibilidad de moverse entre las partículas, además de que podemos suponer que en esta época son más activos, incluyendo su tasa de reproducción y el consecuente incremento de individuos.

### Grupos encontrados

Se encontraron organismos del suborden Oribatida, orden Mesostigmata, cohorte Astigmata y suborden Prostigmata. Teniendo que estos son los más comunes del suelo y tienen una grande tarea dentro de este.



Fig.1 Oribátidos



Fig. 2 Mesostigmata



Fig. 3 Astigmata



Fig. 4 Prostigmata

### CONCLUSIONES

Se encontró mayor abundancia en la altitud 2,400 m con un total de 140 ácaros y una menor abundancia en los 2,450 m con 18 ácaros, estas abundancias pueden estar asociadas a las preferencias de los organismos a ciertas condiciones de humedad, vegetación y temperaturas, así como a otros parámetros.

De acuerdo con la forma de extracción fueron eficientes los dos métodos, sin embargo, el método de Berlese-Tullgreen (modificado) obtuvo un número mayor de organismos (417) y el método de flotación por sulfato de magnesio un número menor (96), aunque cabe señalar que es indispensable el uso de ambos métodos, considerando que juntos complementan una extracción eficiente de la fauna edáfica.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Estrada Venegas E. G., Chaires Grijalva M. P., Acuña Soto J. A., Equihua Martínez A. (2012). Ácaros de importancia en el suelo. 1ra. Edición. Colegio de postgraduados. México.

2. Krantz, G. W. and D. L. Walter. 2009. A Manual of Acarology. Texas Tech University Press. pp.807.
3. Ortiz, T. M. P., Cornejo, C. G., Parra, G. M., León, R. P., & Rivas, G. Biodiversidad de ácaros en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85.
4. González, V., Díaz, M. & Prieto, D., 2003.- Influencia de la cobertura vegetal sobre las comunidades de la mesofauna edáfica en parcelas experimentales de caña de azúcar. *Revista Biología*, 17: 18-25.
5. Socarrás, A. (2013). Mesofauna edáfica: indicador biológico de la calidad del suelo. Instituto de Ecología y Sistemática. Pastos y Forrajes, Vol. 36, No. 1.
6. Sánchez, B., Ruiz, M., & Ríos, M. M. (2005). Materia orgánica y actividad biológica del suelo en relación con la altitud, en la cuenca del río Maracay, estado Aragua. *Agronomía tropical*, 55(4), 507-534.
7. Covarrubias, R. (1993). Comparación de fauna de microartrópodos, entre bosque nativo y plantaciones de "Pinus Radiata" de reemplazo, en biotopos equivalentes. *Acta Entomológica Chilena*, (18), 41-51.
8. Reyna, S. A. T., Pool, L. Q. C., & León, H. J. O. (2015). Variación espacio-temporal de ácaros (Cryptostigmata) en puntos estratégicos de la bahía de Chetumal Quintana Roo, México. *Cuerpo Editorial*, pp. 58.
9. Téllez Barraza, D. (2006). Diversidad de la fauna de hojarasca en fragmentos de bosque de pino-encino con y sin manejo forestal.
10. Gómez, C. O., Peña, M. F., Moradillo, C. R., González-Carcedo, S., Álvarez, F. L., & Villacorta, B. H. (2008). Evolución de la cubierta vegetal y la red trófica edáfica tras la incorporación de residuos orgánicos en las labores de restauración forestal de un área quemada. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales*, (25), 339-344.
11. Sandler, R. V., Falco, L. B., Di Ciocco, C., De Luca, R., & Coviella, C. E. (2010). Eficiencia del embudo Berlese-Tullgren para extracción de artrópodos edáficos en suelos argiudoles típicos de la provincia de Buenos Aires. *Ciencia del suelo*, 28(1), 1-7.

## LA PRESENCIA DE MACHOS INHIBE LA CONDUCTA DE CANIBALISMO DE LA HEMBRA HACIA SU CAMADA, EN EL HÁMSTER SIRIO DORADO

Demetrio Alonso Ambríz García, Alfredo Trejo Córdova, Roberto Vázquez Avendaño, Bárbara Vargas Miranda y María del Carmen Navarro Maldonado.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

[deme@xanum.uam.mx](mailto:deme@xanum.uam.mx)

### RESUMEN

La hembra hámster Sirio Dorado (*Mesocricetus auratus*), al igual que los machos de esta especie, prefieren naturalmente tener una vida solitaria. Siendo ocasionales los momentos en que la hembra tiene interacción social, por ejemplo durante el cortejo-apareamiento con el macho y, durante la lactancia (21 días en promedio) con las crías. En los bioterios, los hámsteres se crían en grupos en distintas fases de su desarrollo o incluso en vida adulta, por conveniencias de espacio, manejo y económicos, siendo muy frecuente observar el canibalismo de las crías por parte de la madre, aún y cuando ésta se encuentre en alojamiento individual. Esta conducta se ha estudiado ampliamente en esta especie, dado que es algo habitual, tanto el canibalismo parcial o total de la camada, señalándose como causas probables el estrés ambiental y social, el balance energético negativo de la lactancia, la carencia o restricción de agua, el espacio no confortable y otras. Esto puede representar la pérdida total o parcial de las camadas con la consecuente baja eficiencia en los sistemas de producción de estos animales para la investigación. Por otro lado, hemos reportado que la presencia de machos (propuesta de producción de hámster en sistema de poliandria) en hembras jóvenes nulíparas, y adultas múltiparas, inhibe este comportamiento de canibalismo de las hembras, sin embargo desconocemos si hembras que paren en espacios individuales y presentan canibalismo total, podrían revertir esta conducta en un siguiente parto-lactancia en presencia de machos (Navarro-Maldonado *et al.*, 2000). Así, el objetivo del presente trabajo fue investigar si las hembras que parieron en cajas individuales pequeñas y mostraron canibalismo con el 100% de las crías de camada en los primeros 5 días de nacimiento, podrían inhibir este comportamiento, si son colocadas en cajas medianas en presencia de machos. Para el presente estudio se utilizaron 5 hembras jóvenes (3 meses de edad y  $102 \pm 8$  g de peso) primigestas que parieron en cajas individuales y que presentaron canibalismo total de la camada. Permanecieron 2 semanas en la caja individual (20x30cm) para la involución uterina y el reinicio del ciclo estral. Posteriormente fueron introducidas en cajas medianas (30x45cm) en presencia de 5 machos adultos (5 meses,  $135 \pm 10$ g de peso) con fertilidad comprobada y que habían permanecido en grupo desde su destete, por lo que crearon jerarquización y armonía social. Recibieron agua fresca y alimento en abundancia. La cópula ocurrió a libertad. Se verificó la gestación por palpación abdominal de los productos a los 7-10 días del apareamiento. Se registró el número de crías al momento del parto y se continuó registrando hasta el día 21 en que ocurrió el destete. La mayor parte de las hembras (80%) no presentaron canibalismo. El promedio de crías nacidas fue de 8.5 y las crías destetadas 8, sin encontrar diferencias significativas entre número de crías nacidas y destetadas ( $P > 0.05$ ). Una de las hembras (20%) tuvo aborto y posteriormente infección uterina por lo que se descartó de la observación. El presente estudio comprueba que la presencia de los machos en el parto-lactancia de las hembras inhibe la conducta de canibalismo de ésta hacia su camada, aun y cuando en un evento anterior la hembra mostró canibalismo total. Como ya se señaló anteriormente. Los machos no participaron de la conducta de canibalismo.

### INTRODUCCIÓN

El hámster Sirio Dorado (*Mesocricetus auratus*), ha sido criado en el bioterio desde 1920, debido a que su producción es accesible y que la madurez sexual en las hembras ocurre entre las 4 y 6 semanas de edad. Las hembras presentan un ciclo estral de 4 días, fácilmente predecible por factores externos, como son observar en el orificio genital, la secreción vaginal postovulatoria. Su periodo de gestación es de 16 días. La hembra hámster, al igual que los machos de esta especie, prefieren naturalmente tener una vida solitaria, pero cuando está con varios machos, permanece en un punto fijo y cuando se va a aparear, se aísla y puede tener de 10 a 12 crías. En esta especie se

presenta el sistema de poliandria, donde una hembra receptiva puede estar en una caja del bioterio con varios machos (Flores *et al.*, 2015). En sistemas naturales es difícil que ocurra este esquema puesto que los machos en tránsito lo hacen de manera aislada, parte que previamente delimitaron su territorio. Regularmente en condiciones de bioterio el hámster se aparea con una sola hembra y cuando ésta se encuentra en presencia de más machos, presenta una notoria conducta apacible. De manera natural, la hembra hámster tiene una interacción social reducida, sólo durante el cortejo-apareamiento con el macho y, durante la lactancia (21 días en promedio) con las crías. Los motivos para que en los bioterios una hembra esté con varios machos, es que los hámsteres se crían en grupos en distintas fases de su desarrollo o incluso en vida adulta, por conveniencias de espacio, manejo y económicos, siendo muy frecuente observar el canibalismo de las crías por parte de la madre durante la lactancia, aún y cuando ésta se encuentre en un alojamiento individual.

En el bioterio se ha observado la conducta de canibalismo en el hámster, en sistemas de harem (o poliginea). De manera que, cuando un macho está con varias hembras, las crías no sobreviven, ocurriendo un canibalismo permisivo, al momento del parto, es decir alguna de las compañeras sujeta a la cría recién parida y de inmediato se la come (Flores *et al.*, 2005). Esta conducta se ha estudiado ampliamente en esta especie, dado que es algo habitual, tanto el canibalismo parcial o total de la camada, señalándose como causas probables el estrés ambiental y social, el balance energético negativo de la lactancia, la carencia o restricción de agua, el espacio no confortable, entre otras. Esto puede representar la pérdida total o parcial de las camadas con la consecuente baja eficiencia en los sistemas de producción de estos animales para la investigación.

Por otro lado, está reportado que, en hembras jóvenes nulíparas y adultas multíparas la presencia de machos (producción de hámster en sistema de poliandria) inhibe el comportamiento de canibalismo de las hembras (Navarro-Maldonado *et al.*, 2000). Sin embargo se desconoce si las hembras que paren en espacios individuales y presentan canibalismo total, podrían revertir esta conducta en un siguiente parto-lactancia en presencia de machos. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue investigar si las hembras que parieron en cajas individuales pequeñas y mostraron canibalismo con el 100% de las crías de la camada en los primeros 5 días de nacimiento, podrían inhibir este comportamiento si son colocadas en cajas medianas, en presencia de machos.

## MATERIAL Y MÉTODO

Para el presente estudio se utilizaron 5 hembras jóvenes de 3 meses de edad, con un promedio de  $102 \pm 8$  g de peso. Las hembras eran primigestas, es decir, hembras que parieron de vez primera en cajas de acrílico individuales y que presentaron canibalismo total de la camada. Permanecieron 2 semanas una caja individual de 20 x 30 cm, para la involución uterina y el reinicio del ciclo estral, donde recibieron alimento comercial (nutricubos Abene) a libre acceso y ocasionalmente se dio semillas de girasol, y además de ofrecérseles agua fresca *Ad libitum*. Las cajas tenían una cama de viruta que se cambió dos veces por semana. Las condiciones del bioterio presentaban una temperatura promedio 27 °C, humedad relativa 60 %, fotoperiodo 14 h luz por 10 h oscuridad (4am-6pm). Las hembras presentaron un ciclo estral regular de 4 días frecuentemente normal y fácilmente predecible por la presencia de signos externos, como es la secreción vaginal postovulatoria en el orificio genital (Figura 1).



Figura 1. Secreción vaginal postovulatoria en el orificio genital.



Posteriormente fueron introducidas en cajas medianas de 30 x 45 cm, en presencia de 5 machos adultos de 5 meses de edad, con un peso promedio de  $135 \pm 10$  g, con fertilidad comprobada y que habían permanecido en grupo desde su destete, por lo que habían creado jerarquización y armonía social. La cópula ocurrió a libertad y se verificó la gestación por palpación abdominal de los productos a los 7 y 10 días del apareamiento, donde se apreció un aumento del volumen abdominal, crecimiento de los pezones y finalmente la ocurrencia del parto. Se registró el número de crías al momento del parto y se continuó registrando hasta el día 21 en que ocurrió el destete.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinco hembra hámster Sirio Dorado (*Mesocricetus auratus*) jóvenes (3 meses de edad), tuvieron un promedio de  $102 \pm 8$  gr de peso (Tabla 1). En este trabajo se observó que la mayor parte de las hembras (80%) (Figura 2) no presentaron canibalismo en la presencia de machos en el parto-lactancia, inhibiéndose este tipo de conducta de las hembras hacia su camada, aún cuando en un evento anterior, una de las la hembras mostró canibalismo total (Figura 3). El promedio de crías nacidas fue de 8.5 y las crías destetadas fueron 8, sin encontrar diferencias significativas entre el número de crías nacidas y destetadas ( $P > 0.05$ ). Una de las hembras (20%) tuvo aborto y posteriormente infección uterina por lo que se descartó de la observación.

El papel de los animales en la investigación es esencial para el desarrollo de métodos nuevos más efectivos para diagnosticar y tratar enfermedades que afectan, tanto a humanos como a animales, siendo los modelos más utilizados en la experimentación las ratas, ratones (Fouilloux *et al.*, 2019) y el hámster (Flores *et al.*, 2015). Los animales recién nacidos de bioterio, tienen un gran potencial para la investigación en el área de la medicina y la genómica, sobre el desarrollo postnatal humano y enfermedades relacionadas (Zafar *et al.*, 2018; Kreikemeier-Bower *et al.*, 2020). Cuando se pierde el número de crías por comportamientos como el canibalismo, esto puede comprometer un modelo de estudio.

El canibalismo ha sido observado en diferentes especies del reino animal (Polis, 1981; Zafar *et al.*, 2018). Incluso fue una conducta de los animales de la prehistoria como el *Tyrannosaurus rex*, en el Cretácico Superior (Longrich *et al.*, 2010). Regularmente, se atribuye el concepto de canibalismo a la selección de parentesco, al conflicto sexual, la rivalidad entre hermanos y el cuidado de padres, sin embargo, hasta el momento es un evento complejo y con muchos aspectos inexplicables. Las investigaciones en animales han permitido en contexto entender por qué ocurre, mostrando en parte los beneficios y los costos biológicos de esta acción. Como posible explicación está que, las crías se encontrasen heridas, débiles o enfermas, por ejemplo, de una infección viral; por lo que el canibalismo puede detener la propagación del patógeno y así proteger al nido de la infección, lo que permite mantener la población saludable (Fouilloux *et al.*, 2019).

En los insectos, se sabe que un promotor del canibalismo es el conflicto sexual. Existen sistemas, en lo que las hembras invierten más energía en la producción de gametos (anisogamia) y la crianza de la descendencia. En condiciones de escasez de alimentos en que las hembras no pueden cazar o buscar alimento durante la gestación, consumir a las parejas masculinas después del apareamiento puede ser una fuente de alimento crucial que contribuya a la supervivencia de la madre y sus huevos fertilizados (Fouilloux *et al.*, 2019).

Figura 2. Resultados de canibalismo inicial y final.

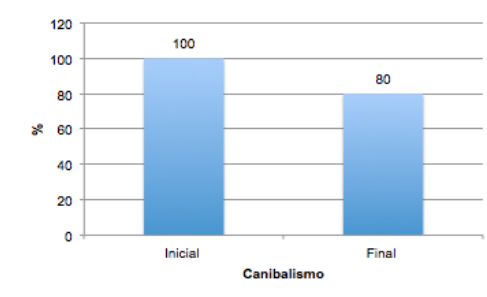


Tabla 1. Datos del peso corporal de hembras hámster Sirio Dorado.

Número de ejemplar	Peso (g)
1	115
2	101
3	104
4	96
5	95
Media $\pm$ DE	$102 \pm 8$





Figura 3. Hámster Sirio Dorado, *Mesocricetus auratus*.

En la crianza del hámster de bioterio, en un sistema de harem (un macho con varias hembras) las crías no sobreviven, ocurriendo un canibalismo permisivo, al momento del parto. Sin embargo, en el sistema de poliandria (una hembra con varios machos), las crías logran sobrevivir. En condiciones de bioterio, los machos hámster son sujetos a un ambiente en extremo monótono y, la dotación constante del recurso alimento y agua, hace que tengan permanentemente una conducta de aletargamiento (Flores *et al.*, 2015).

Estudios han demostrado que el canibalismo puede disminuir al reducir la manipulación de madre y crías, hasta los 10 días postparto, para evitar situaciones de estrés (Fernández y Celadilla, 1999). El canibalismo parcial o total de la camada en roedores, tiene otras causas en el estrés ambiental, ejemplo, la intensidad luminosa, misma que puede influir sobre la agresividad animal y la incidencia de esta conducta (Lane-Petter, 1968; Fall, 1974; Weihe, 1976; Zafar *et al.*, 2018).

Por otro lado, en un nivel inmediato, las hormonas de la gestación y el posparto estimulan el cuidado materno. La expresión de estas hormonas, cambia una vez que las hembras comienzan el ciclo reproductivo (Fedurek *et al.*, 2020). Por lo tanto, la duración del vínculo materno con las crías puede estar regulada por tales hormonas y, en ciertas hembras, la reanudación del ciclo reproductivo puede tardar semanas o meses después de la pérdida de una cría, lo que lleva a un cuidado materno prolongado incluso de las crías muertas. El cuidado materno implica costos energéticos y el cuidado *post-mortem* observado en otros mamíferos, contrasta con el canibalismo filial generalizado en peces y algunas especies de mamíferos, para lo cual existen explicaciones adaptativas, que puede ser la mejora de la condición física para el futuro sobre subsecuentes oportunidades reproductivas (Polis, 1981; DeSantis y Schmaltz 1984; Lindström, 2000).

Algunas otras explicaciones del canibalismo en mamíferos, señalan que puede deberse al estrés ambiental y al reinicio de apareamiento. Asimismo, como se mencionó anteriormente, el canibalismo materno puede ser causado por ambientes poco favorables para el desarrollo de las crías, especialmente cuando los recién nacidos son manipulados (Kreikemeier-Bower *et al.*, 2020), por la escasez del alimento o que las condiciones de los bioterios no sean las adecuadas, derivando en un comportamiento anormal (Lane-Petter, 1968). En ocasiones, se ha observado que las madres consumen a sus crías muertas considerándose adaptativo, con el fin de eliminar las condiciones no higiénicas de los nidos.

Ciertos estudios señalan que los cambios hormonales durante la última etapa de la gestación y la presencia de crías postparto, conducen a la interrupción o perturbación de la conducta materna, lo que a su vez conduce al abandono, la muerte y a la conducta de canibalismo de las crías en el nido. Asimismo, se ha estudiado que la alteración de la temperatura ambiente afecta el centro de reconocimiento de temperatura (hipotálamo) en el cerebro de las madres, lo que contribuye a la elevación del estrés posparto afectando el comportamiento materno hacia las crías recién nacidas. Las alteraciones de la homeostasis del hipotálamo afectan la capacidad de coordinación de hormonas y neurotransmisores (Martha *et al.*, 1983; Zafar *et al.*, 2018). Este proceso da como resultado una elevación del estrés, la ansiedad y la falta de saciedad, junto con una menor sensación de seguridad en las madres después del parto.

A pesar de que son varias las investigaciones sobre el canibalismo para abordar las cuestiones relacionadas con éste y la conducta de infanticidio después del parto, sigue siendo un cuestionamiento sin resolver, coincidiendo con que las causas más probables de dicho

comportamiento en roedores, sea porque las crías sean anormales o defectuosas. Otra posible explicación es la pérdida de nutrientes en la dieta por desnutrición, responsable de un alto porcentaje de muertes antes del destete (Fouilloux *et al.*, 2019). Otras investigaciones señalan que las jaulas y la iluminación conferida a los animales en los bioterios deben ser tomados en cuenta, observándose que la crianza de los roedores en cajas opacas, es la mejor opción (Zafar *et al.*, 2018).

## CONCLUSIONES

Este estudio demuestra que la presencia de los machos en el parto-lactancia de las hembras hámster Sirio Dorado, inhibe la conducta de canibalismo tanto de las hembras madres como de los machos acompañantes, hacia la camada, aun y cuando en un evento anterior las hembras que se encontraban en espacios aislados y solitarias, pudiesen haber desplegado un comportamiento de canibalismo total, lo cual sugiere que la presencia de los machos modifica esta conducta en las hembras para que ocurra la sobrevivencia de las crías.

## BIBLIOGRAFÍA

1. D: T: DeSantis, L. W. Schmaltz. The mother-litter relationship in developmental rat studies: cannibalism vs caring. *Dev Psychobiol.* May;17(3), 1984, pp. 255-62.
2. Fall. 1974.
3. P. Fedurek, P. Tkaczynski, C. Asimwe, C. Hobaiter, L. Samuni, A. E. Lowe, A. Gnahe D., K. Zuberbühler, R. M. Wittig y C. Crockford. Maternal cannibalism in two populations of wild chimpanzees. *Primates*, 61, 2020, pp.181-187.
4. C. Fouilloux, E. Ringler y B. Rojas. Cannibalism. *Cell Press, Current Biology Magazine.* 29, 2019, pp.1295-1297.
5. Fernández y Celadilla, 1999
6. C. Kreikemeier-Bower, P. Polepole, K. Pinkerton, L. Zhang. A simple method for short-term maintenance of neonatal mice without Foster mothers. *Journal Biological Methods.* 7(1), 2020, pp. 1-5.
7. W. Lane-Petter. Cannibalism in Rats and Mice. *Proc. Roy.Soc. Med.* 61 AÑO 1295-1296.
8. J. M. Lindström. Acetylcholine receptors and myasthenia. *Muscle Nerve*, 23, 2000, pp. 453-477.
9. N. R. Longrich, J. R. Horner, G. M. Erickson y P. J. Currie. Canibalismo en *Tyrannosaurus rex*. *PLoS ONE*, 5, 2010, pp. 13419.
10. M. Martha A, C. Kinsley, J. Broida, B. Svare. Infanticide exhibited by female mice: genetic, developmental and hormonal influences. *Physiol Behav.* 5, 1983, pp. 697-702.
11. G. N. Flores, J. L. Contreras M., M. C. Navarro M., A. Trejo C., D. Ambriz-García. Reproducción de hámster en sistema de poliandria. XII Encuentro Mujer Ciencia. 2015.
12. M. del C. Navarro-Maldonado, D. Ambriz-García, E. Mundo-Reyes, A. Trejo-Cordova, O. Hernández-Pérez y A. Rosaldo-García. Desarrollo embrionario temprano en el hámster Sirio Dorado, *Mesocricetus auratus* (Mammalia:Rodentia). *Acta Zool. Mex.* (n.s) 81, 2000, pp. 105-115.
13. G. A. Polis. The evolution and dynamics of intraspecific predation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 12, 1981, pp. 225-251.
14. E.M. Weber, B. Algers, J. Hultgren y I. A. S. Olsson. Pup mortality in laboratory mice—infanticide or not?. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55, 2013, pp. 1-8.
15. Weihe. 1976.
16. T. Zafar, A.Q. Naik y V.K. Shrivastava. Effect of cold stress on infanticide by female Swiss albino mice *Mus musculus*: a pilot study. *Journal of Animal Science and Technology*, 60, 2018, pp.7.

## ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN DE LOS REGISTROS GÉNERO *ARTIBEUS* (CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE) EN MÉXICO DEPOSITADOS EN BASES DE DATOS

Víctor Manuel Ramírez-Ramos<sup>1</sup>, Bárbara Vargas-Miranda<sup>2</sup>, Claudia Ballesteros-Barrera<sup>3</sup>, Rocío Zarate-Hernández<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Licenciatura en Biología, <sup>2</sup>Departamento de Ciencias de la Salud, <sup>3</sup>Departamento de Biología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col Vicentina, 09340. México, Ciudad de México.

E-mail: [cbs2143054257@izt.uam.mx](mailto:cbs2143054257@izt.uam.mx)

### RESUMEN

El género *Artibeus* está representado en México por *A. hirsutus*, *A. jamaicensis* y *A. lituratus*. Se distribuyen principalmente en zonas tropicales en ambas vertientes de México, Centroamérica y Sudamérica, en el caso de *A. hirsutus* es endémico mexicano y está restringido en la vertiente del Pacífico. Son principalmente frugívoros, cumpliendo un papel importante en la dispersión de semillas y mantenimiento y regeneración de selvas. Conocer la distribución potencial del género permitirá tener una proyección de la disponibilidad de áreas adecuadas para su conservación. El objetivo de este trabajo fue analizar la información de los registros del género *Artibeus* en México depositados en las bases de datos y generar información que nos permita conocer su distribución potencial. Los registros se obtuvieron de bases de datos digitales (SNIB, GBIF) y se anexó información proporcionada en la colección de ENCB-IPN y literatura consultada. La base de datos con los registros fue depurada eliminando datos duplicados, sin localidad y sin coordenadas. Se realizó un análisis de la información con la intención de conocer las localidades de colecta en entidades del país, esfuerzo de colecta por periodos, ejemplares depositados en colecciones nacionales y extranjeras y registros en ANPs federales y estatales. Los resultados mostraron que hay 1,013 registros para *A. hirsutus*, 10,102 de *A. jamaicensis* y 3,437 de *A. lituratus*, presentes en 13, 26 y 21 estados respectivamente. Los estados de mayor ocurrencia fueron Chiapas para *A. jamaicensis* y *A. lituratus* y Guerrero para *A. hirsutus*. Los ejemplares están depositados en colecciones nacionales e internacionales, donde el mayor número de ejemplares de *A. hirsutus* están en la Universidad de Kansas (197), de *A. jamaicensis* en la ENCB-IPN (1,379) y de *A. lituratus* en el Instituto Smithsonian (446). Los primeros ejemplares de *A. jamaicensis*, *A. lituratus* y *A. hirsutus* fueron colectados en 1800, 1798 y 1818 respectivamente. El auge de colecta para *A. jamaicensis* y *A. lituratus* fue en la década de los 70's y para *A. hirsutus* fue en los 60's. Los datos de colecta muestran presencia en ANPs para *A. jamaicensis* 38 federales y 30 estatales, *A. lituratus* 31 federales y 16 estatales y *A. hirsutus* 10 federales y 10 estatales. Esta información nos permitirá conocer la distribución potencial del género en México para contribuir con su conservación y protección de su hábitat.

### INTRODUCCIÓN

Los murciélagos son el segundo orden de mamíferos más diverso, solo superado por roedores. Existen documentadas 1,116 especies agrupadas en 18 familias (Wilson & Reeder, 2005). En México existen 55 especies de 37 géneros (Ceballos, 2014). La familia Phyllostomidae que comprende 55 géneros y 160 especies (Wilson y Reeder, 2005), contiene los murciélagos más diversos y distintivos, algunos endémicos de América y que se encuentra principalmente en las regiones tropicales de todo el continente. El género *Artibeus* (Stenodermatinae: Stenodermatini) está integrado por 12 especies taxonómicamente válidas de acuerdo con los cambios recientes en la sistemática y taxonomía de murciélagos neotropicales (Solari & Martínez-Arias, 2014).

En México se habitan tres especies del género: *Artibeus hirsutus*, *A. jamaicensis* y *A. lituratus*. En este trabajo se siguió la propuesta de Gonzáles & Arrollo-Cabrales (2013) y Ramírez-Pulido *et al.* (2014), de considerar a *Artibeus intermedius* como un sinónimo de *A. lituratus*. Estas especies se distribuyen en las zonas tropicales desde el sur de Sinaloa en la planicie costera del Pacífico y Tamaulipas en la vertiente del Golfo hasta la península de Yucatán, el norte de Bolivia y Argentina (Ortega & Castro-Arellano, 2001). Solo *A. hirsutus* es endémico de México, está distribuido en la vertiente del Pacífico, desde el sur de Sonora hasta el sur de Guerrero, penetrando las tierras bajas del Eje Volcánico Transversal hacia el estado de Morelos (Villa-R., 1976). Al ser especies comunes en las regiones tropicales de México, su densidad aparentemente no se ve afectada por

perturbaciones antropogénicas, por lo que no está en una categoría de riesgo, sin embargo, no existe información adecuada para conocer el estado de conservación de *A. hirsutus* (Ceballos, 2014).

Son principalmente frugívoros, cumpliendo un papel importante en la dispersión de semillas y polinización de muchas plantas que consumen (Tuttle, 1968; Gardner, 1977; August, 1981), también complementan su dieta con insectos, polen, néctar y hojas (Ortega & Castro-Arellano, 2001). En México el estudio de murciélagos se inició hace ya más de seis décadas, sin embargo, la información disponible sobre ecología, evolución, ecolocalización y otros aspectos aún es muy limitada y hoy conocemos solamente los aspectos más básicos de la historia natural de los parámetros poblacionales básicos, necesarios para proponer alternativas de conservación de sólo algunas especies (Medellín *et al.*, 2008). El objetivo de este trabajo fue analizar la información de los registros del género *Artibeus* en México depositados en las bases de datos y generar información que nos permita conocer su distribución potencial.

## METODOLOGÍA

Los registros de las especies se obtuvieron de bases de datos digitales públicas: Sistema Nacional de Información sobre la Biodiversidad de México (SNIB, <https://www.snib.mx/>) The Global Biodiversity Information Facility (GBIF, <https://www.gbif.org/>) Vernet (<http://vertnet.org/>) Bell Museum of Natural History, University of Minnesota (BMNH, <https://www.bellmuseum.umn.edu/mammals/>), y se anexó información proporcionada en la colección del Laboratorio de Cordados Terrestres, Departamento de Zoología, de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional (ENCB-IPN) así como de literatura consultada (Dalquest, 1951; Hall, 1959; Bhatnagar & Kallen, 1974; Estrada *et al.*, 1984; Ramírez-Pulido & Armella, 1987; Pozo & Escobedo, 1999; Ortega & Arita, 1999; Flores-Martínez *et al.*, 2000; Ortega & Arita, 2000; Chávez & González, 2001; Ortega & Arita, 2002; Ortega *et al.*, 2003; Cruz-Lara *et al.*, 2004; Vargas-Miranda, 2009; Sánchez-Hernández *et al.*, 2010; Cornejo-Latorre *et al.*, 2011; Arriaga-Flores *et al.*, 2012; García-Estrada *et al.*, 2012; Salame-Méndez *et al.*, 2012; Machain-Williams *et al.*, 2013; Sotomayor-Bonilla *et al.*, 2014; Lorenzo *et al.*, 2015; Del Real-Monroy & Ortega, 2016; Bolívar-Cimé *et al.*, 2017; Llaven *et al.*, 2017; Leiva-González *et al.*, 2019; Torres-Castro *et al.*, 2019).

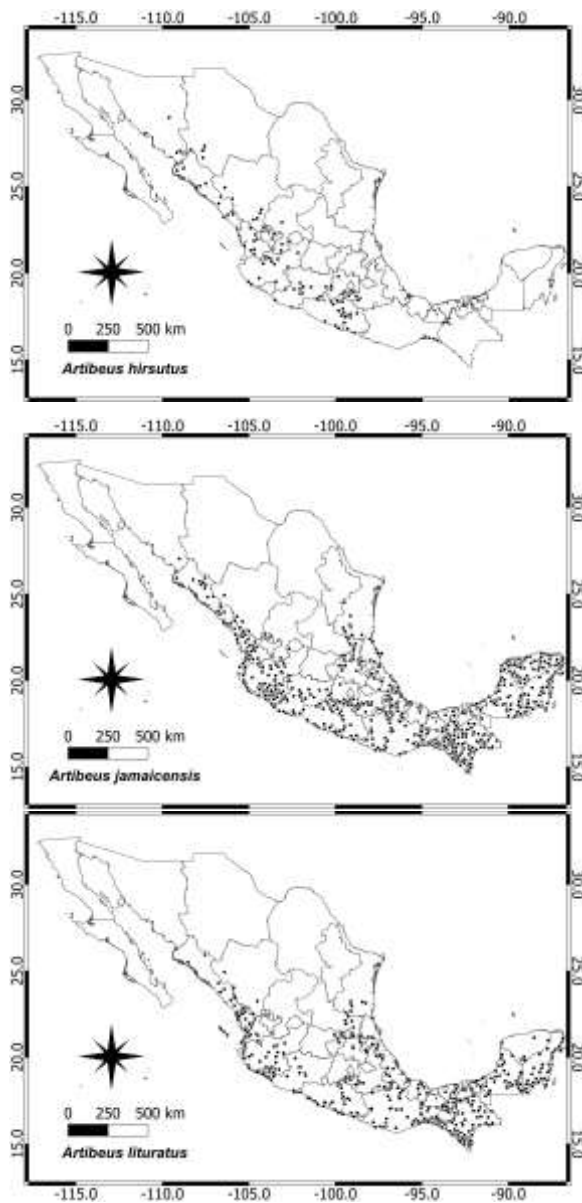
Las bases de datos que se compilaron fueron depuradas eliminando los registros duplicados, los que no tenían información correspondiente a localidad y sin coordenadas. En caso de contar con localidades estas fueron verificadas y georreferenciadas por medio de Google Earth, además las localidades fueron comparadas con los mapas de distribución conocida por cada especie publicados en distintas fuentes (Hall, 1981; Larsen *et al.*, 2007; Ceballos, 2014; Ballesteros-Barrera *et al.*, 2016; Del Real-Monroy & Ortega, 2016; Sánchez-Cordero *et al.*, 2020).

Se realizó un análisis de la información con la intención de conocer las localidades de colecta en los distintos estados del país, el esfuerzo de colecta por periodos, los ejemplares depositados en colecciones nacionales y extranjeras y los registros que se encuentran en Áreas Naturales Protegidas (ANP) federales y estatales dentro del territorio nacional. Para visualizar las localidades y crear los mapas de localidades de colecta (Figura 1) la información fue organizada para cada especie. Se utilizó un Sistema de Información Geográfica (QGIS Desktop 3.10.9 con soporte GRASS 7.8.3) se intersecaron las localidades obtenidas con una cobertura digital de los estados de la República Mexicana (INEGI, 2021) y se cuantificaron los registros por estado. Finalmente, para conocer las áreas que protegen a la especie, las localidades se intersecaron con los polígonos de las Áreas Naturales Protegidas de México Federales (SEMARNAT-CONANP, 2020). Se organizaron los datos de los ejemplares que están depositados en colecciones nacionales e internacionales, con los nombres y siglas de las instituciones, así como los nombres y siglas de sus colecciones para analizar cómo se ha ido generando el conocimiento de los sitios de presencia de la especie a lo largo del tiempo.

## RESULTADOS

Los resultados mostraron que hay 1,013 registros para *Artibeus hirsutus* colectados en 252 localidades (Figura 1); 10,093 registros de *A. jamaicensis* colectadas en 1,855 localidades. En cuanto a los registros de *A. lituratus* fueron 3,437 colectados en 850 localidades. El número de estados en que se registró estas especies fueron 13, 24 y 21 respectivamente. En el caso de *A. jamaicensis*, inicialmente se habían considerado 26 estados, no obstante, dos de ellos no corresponden con localidades acordes a la distribución potencial consultada (Coahuila: San Marcos y Pueblo Juárez, La Junta; Guanajuato: Mineral el Realito 4.3 Km S, 8.5 Km W y Mesas de Jesús 6.8 km N, 8.7 km

Figura 1.- Localidades de colecta de A) *Artibeus hirsutus*, B) *A. jamaicensis* y C) *A. lituratus* obtenidas de base de datos y literatura.



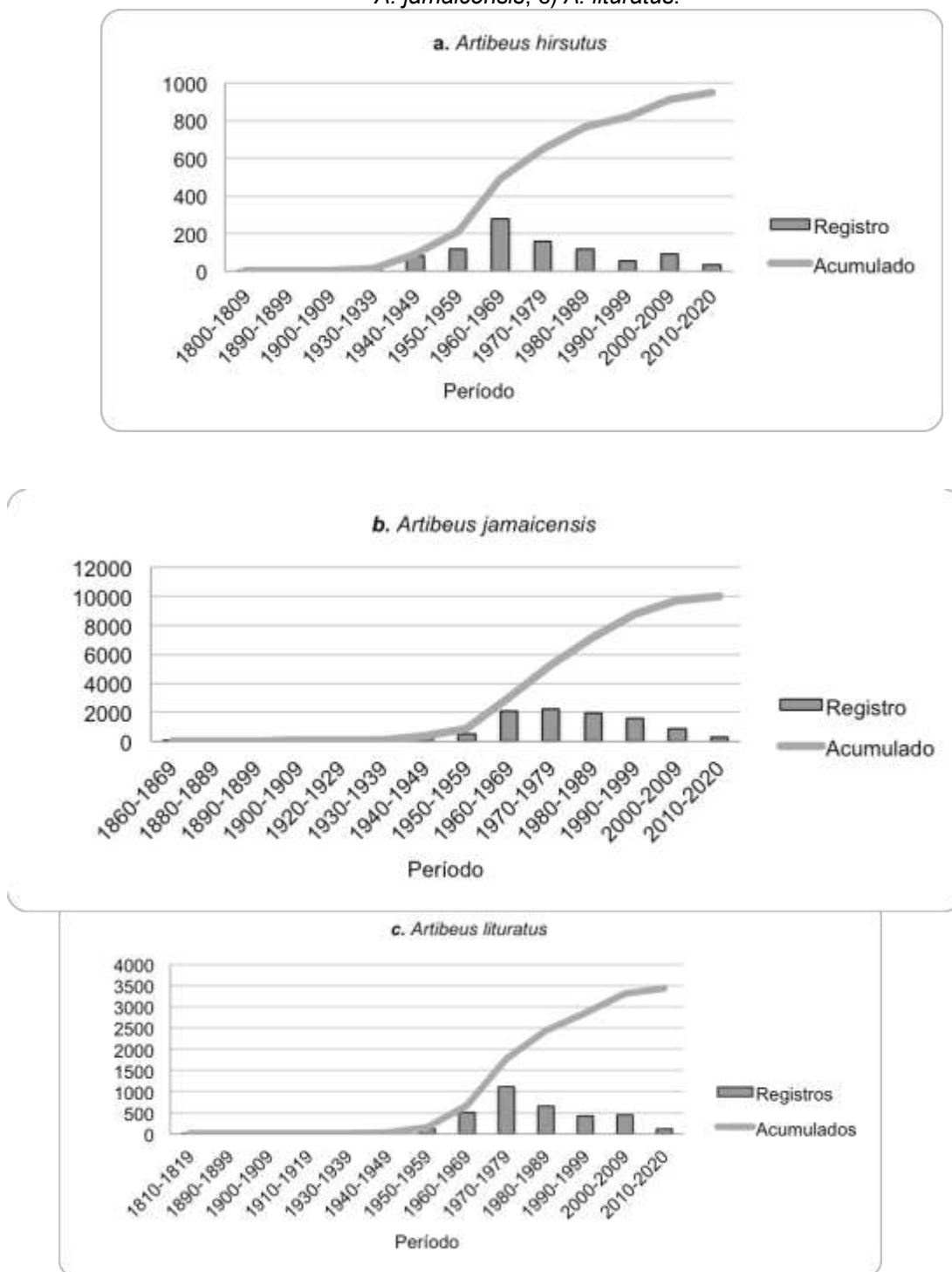
E). Los estados con mayor número de localidades de colecta fueron Guerrero para *A. hirsutus* y Chiapas para *A. jamaicensis* y *A. lituratus* (Cuadro 1). Ortega y colaboradores han reportado que el género *Artibeus* es una de los más abundantes de murciélagos neotropicales, debido a su alta movilidad se adapta fácilmente a cualquier tipo de hábitat y ocupa una alta variedad de refugios. Este género se distribuye en las vertientes del Pacífico y del Atlántico mexicano, donde las condiciones geográficas y climáticas propicia las selvas tropicales y la alimentación que requieren estas especies. Estos esfuerzos de investigación se ven reflejados tanto en el número de registros, como en los ejemplares en colecciones científicas, por lo cual sería conveniente utilizar estos registros de localidades en estudios de distribución potencial, para conocer su abundancia relativa dentro de los estados de la república y si fuera el caso para la conservación de estas especies.

La Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) resguarda en cuatro de sus colecciones el mayor número de ejemplares de *Artibeus hirsutus* los cuales suman 235 ejemplares. Para *A. jamaicensis* en conjunto de tres colecciones del Instituto Politécnico Nacional (2,233 ejemplares) y de *A. lituratus* también en dos colecciones de la UNAM (479 ejemplares). En colecciones extranjeras, la colección que resguarda mayor número de ejemplares de *A. hirsutus* es Biodiversity Institute and Natural History Museum, University of Kansas (197 ejemplares), de *A. jamaicensis* corresponde al Sam Noble Oklahoma Museum of Natural History, University of Oklahoma (770 ejemplares) y de *A. lituratus*, es el National Museum of Natural History, Smithsonian Institution (446 ejemplares).

Cuadro 1.- Número de localidades de colecta por estado: *Artibeus hirsutus*; *Artibeus jamaicensis*; *Artibeus lituratus*. Se señala el estado con el mayor número de localidades y el total por especie.

Estado	<i>A. hirsutus</i>	<i>A. jamaicensis</i>	<i>A. lituratus</i>
Aguascalientes	2	1	0
Campeche	0	84	57
Chiapas	0	360	240
Chihuahua	11	0	0
Colima	0	140	89
Durango	14	7	5
Guanajuato	0	0	1
Guerrero	72	122	56
Hidalgo	0	13	14
Jalisco	26	109	36
México	10	21	0
Michoacán	19	59	11
Morelos	20	34	14
Nayarit	8	81	55
Oaxaca	0	150	71
Puebla	3	48	16
Querétaro	0	21	17
Quintana Roo	0	140	63
San Luis Potosí	0	28	12
Sinaloa	24	48	13
Sonora	37	2	0
Tabasco	0	13	17
Tamaulipas	0	30	15
Veracruz	0	188	42
Yucatán	0	153	6
Zacatecas	6	3	0
Total	252	1855	850

Figura 2.- Representa el esfuerzo de colecta documentado en las bases de datos, evidenciando los periodos (décadas) donde hay más registros y el acumulado de los mismos: a) *Artibeus hirsutus*; b) *A. jamaicensis*; c) *A. lituratus*.



Algunos de los registros obtenidos en las bases de datos no contienen información adecuada para ubicarlos en alguna colección científica, por lo cual el número de registros en la base de datos y el número de registros de ejemplares en colecciones científicas no concuerdan.



El ejemplar tipo de *Artibeus hirsutus* (Andersen, 1906) corresponde a la localidad "La Salada Michoacán" (Hall, 1981) siendo la única especie del género endémica del país, sin embargo en las bases de datos revisadas no se dispone de este registro. La primera localidad de colecta, de acuerdo con la base de datos recopilada, corresponde para: *A. hirsutus* a "5 mi NW San Carlos, Sonora", sin nombre de colector registrado, en el año 1800, el ejemplar está depositado en la colección de mamíferos del Museum of Southwestern Biology, University of New Mexico, con el número de catálogo 214039 (<http://arctos.database.museum/guid/MSB:Mamm:214039?seid=1561925>). Para *A. jamaicensis* su primera localidad de colecta en México es: "Tehuantepec, Oaxaca", colectado por F. Sumichrast en el año 1868, depositado en el National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, bajo el número de catálogo 8671 (<http://n2t.net/ark:/65665/399f88262-c994-4a12-800b-99980859a5b5>). La primera colecta de *A. lituratus* corresponde a la localidad "21 mi from Hwy. 15 on road to Cosala, Sinaloa", colectado por S. M. Russell en el año 1818 y depositado en la colección del Museum of Vertebrate Zoology, University of California, Berkeley, con número de catálogo 167447 (<http://arctos.database.museum/guid/MVZ:Mamm:167447?seid=666594>).

La fundación de las instituciones nacionales con el acervo de ejemplares más importante, la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en 1910 y el Instituto Politécnico Nacional (IPN) en 1936 se crean las colecciones en sus respectivos institutos, ya que se da pie a las investigaciones y colectas de campo. Por su parte el Instituto de Biología de la UNAM es depositario de las Colecciones Biológicas Nacionales, como resultado de un legado patrimonial bien documentado desde fines del siglo XIX y oficialmente decretado por Emilio Portes Gil en agosto de 1929 (UNAM, 2021). La Colección Nacional de Mamíferos de este instituto fue formalmente fundada en 1947 y cuenta con el certificado de acreditación de la "American Society Mammalogists" al través de su "Systematics Collections Committee" (Cervantes, 2021).

La Colección de Mastozoología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas se inició en 1955, y fue considerada una de las más importantes en 1975. El crecimiento fue la exhaustiva actividad de colecta, producto de diferentes proyectos enfocados principalmente al conocimiento y al registro de la diversidad de mamíferos mexicanos en diferentes sitios de la república (López-Vidal y Elizalde-Arellano, 2006). Con la creación de estas colecciones y el apoyo a la investigación, el auge de colecta para *A. hirsutus* y *A. jamaicensis* fue en la década de los 60's mientras que para *A. lituratus* fue en los 70's (figura 2).

Los datos de colecta muestran que algunas localidades se encuentran en Áreas Naturales Protegidas (ANP) para *A. hirsutus*, 10 federales y 10 estatales (Cuadro 2); *A. jamaicensis*, 38 federales y 31 estatales (Cuadro 3) y *A. lituratus*, 31 federales y 16 estatales (Cuadro 4).

Se debe de considerar como zona prioritaria de conservación en primer lugar a estas ANP para mantener el estatus de las poblaciones del género en estas zonas que junto con un estudio mas amplio de su distribución potencial ayudarán a modificar o mejorar la gestión local y federal. Los pocos registros dentro de estas áreas no determinan un riesgo para las poblaciones de estas especies si no un llamado a la conservación de sitios de refugio existentes dentro de cada ANP. Con estudios posteriores se puede sugerir la ampliación o distribución de zonas prioritarias de conservación en caso de identificarse sitios con las condiciones adecuadas de desarrollo de acuerdo a los requerimientos específicos de la especie

## CONCLUSIONES

El análisis de la información de los registros del género *Artibeus* en México depositados en las bases de datos, nos permitió conocer su distribución potencial, en que colecciones nacionales e internacionales se encuentran y las décadas de mayor auge de colecta, así como los registros en ANP federales y estatales.



Cuadro 2.- Registros en Áreas Naturales Protegidas federales y estatales para *Artibeus hirsutus*.

Estatal: AMPH= Área Municipal de Protección Hidrológica, ASE= Área Silvestre Estatal, CER= Centro Ecológico Recreativo, MN=Monumento Natural, PE= Parque Estatal, PER= Parque Ecológico Recreativo, PESAyF= Parque Estatal Santuario del Agua y Forestal, RB= Reserva de la Biosfera, RBE= Reserva de la Biosfera Estatal, REcol= Reserva Ecológica, RE= Reserva Estatal, RP= Reserva Patrimonial, SAF= Santuario del Agua y Forestal, ZNP= Zona Natural Protegida, ZPA= Zona de Protección Ambiental, ZRE= Zona de Reserva Ecológica y Zona de Refugio de Aves Marinas Migratorias y Fauna y Flora Silvestre, ZSCE= Zona Sujeta a Conservación Ecológica.

Administración	Entidad	Nombre	Categoría	Registros
Estatal	Mex	Sierra del Laurel	ASE	
	Mex	Parque Ecológico Recreativo de Tenancingo	PER	1
	Mex	Grutas de la Estrella	PE	1
	Mex	Zona de Recursos Naturales Río Grande-San Pedro	ZSCE	2
	Gro	Bicentenario	PE	1
	Jal	Barranca del Río Santiago	AMPH	4
	Mich	Cañones de los Ríos Marqués - Cajones y Serranías Aledañas	ZPA	1
	Mor	La Sierra Monte Negro	RE	4
	Mor	Barrancas urbanas de Cuernavaca	ZNP	1
	Sin	Islas del municipio de Mazatlán	ZRE	6

Federal: APRN= Área de Protección de los Recursos Naturales Zona de Protección Forestal, APFF= Áreas de Protección de Flora y Fauna, APFFA= Áreas de Protección de Flora y Fauna Silvestres y Acuáticas, MN=Monumento Natural, PMN= Parque Marino Nacional, PN= Parque Nacional, RB= Reserva de la Biosfera, RIB= Reserva Integral de la Biosfera, ZP= Zona de Protección Forestal, ZPF= Zona de Protección Forestal y Refugio de la Fauna Silvestre, ZRZ= Zona de Reserva y Zona de Refugio de Aves Migratorias y de la Fauna Silvestre.

Administración	Entidad	Nombre	Categoría	Registros
Federal	Ags, Dgo, Jal, Nay, Zac	C.A.D.N.R. 043	APRN	16
	BC, BCS, Sin, Son	Islas del Golfo de California	ZRZ	6
	Mex	Z.P.F.T.C.C. de los ríos Valle de Bravo	APRN	8
	Gro	El Veladero	PN	1
	Jal	La Primavera	ZPF	6
	Col, Jal	Sierra de Manantlán	RB	1
	Mich	Barranca del Cupatitzio	PN	2
	Mich	Zicuirán-Infiernillo	RB	18
	Mor, CDMX	El Tepozteco	PN	1
	Son, Chih	Sierra de Álamos-Río Cuchujaqui	APFFA	13
Total	16	20	17	96

Cuadro 3.- Registros en Áreas Naturales Protegidas federales y estatales para *Artibeus jamaicensis*; se resalta aquella ANP federales y estatales en que existen más registros.

Estatad: AMPH= Área Municipal de Protección Hidrológica, ASE= Área Silvestre Estatal, CER= Centro Ecológico Recreativo, MN=Monumento Natural, PE= Parque Estatal, PER= Parque Ecológico Recreativo, PESAyF= Parque Estatal Santuario del Agua y Forestal, RB= Reserva de la Biosfera, RBE= Reserva de la Biosfera Estatal, REcol= Reserva Ecológica, RE= Reserva Estatal, RP= Reserva Patrimonial, SAF= Santuario del Agua y Forestal, ZNP= Zona Natural Protegida, ZPA= Zona de Protección Ambiental, ZRE= Zona de Reserva Ecológica y Zona de Refugio de Aves Marinas Migratorias y Fauna y Flora Silvestre, ZSCE= Zona Sujeta a Conservación Ecológica.

Administración	Entidad	Nombre	Categoría	Registros
Estatad	Ags	Sierra del Laurel	ASE	1
	Camp	Balam-Kin	ZSCE	1
	Camp	Balam-Kú	ZSCE	60
	Chis	Cerro Meyapac	ZSCE	1
	Chis	Cordón Pico El Loro-Paxtal	ZSCE	4
	Chis	El Zapotal	CER	13
	Chis	La Pera	ZSCE	4
	Chis	Laguna Bélgica	ZSCE	3
	Chis	Volcán Tacaná	ZSCE	6
	Mex	Cerro Colorado	RE	14
	Mex	Santuario del agua y forestal Subcuenca Tributaria Arroyo Sila	PESAyF	2
	Mex	Zona de Recursos Naturales Río Grande-San Pedro	ZSCE	7
	Jalisco	Bosque Mesófilo Nevado de Colima	PE	1
	Mich	Cañones de los Ríos Marqués	ZPA	10
	Mich	Volcán El Jorullo	RP	1
	Mor	Las Estacas	RE	2
	Nay	Sierra de San Juan	RBE	3
	Nay	Sierra de Vallejo	RBE	1
	Q_Roo	Santuario del Manatí Bahía de Chetumal	RE	1
	Q_Roo	Selvas y Humedales de Cozumel	RE	57
	Tab	Gruta del Cerro Coconá	MN	3
	Tab	Parque Estatal de la Sierra de Tabasco	RE	2
	Tamps	El Cielo	RB	37
	Ver	Metlac-Río Blanco	REcol	22
	Yuc	El Palmar	RE	3
	Yuc	Reserva Cuxtal	ZRE	4
	Yuc	Reserva Estatal Biocultural del Puuc	RE	23
	Yuc	Reserva Estatal Ciénegas y Manglares de la Costa Norte de Yucatán	RE	2
	Yuc	Reserva Estatal de Dzilam	RE	1
	Yuc	Reserva Estatal Geohidrológica Anillo de Cenotes	RE	13

Federal: APRN= Área de Protección de los Recursos Naturales Zona de Protección Forestal, APFF= Áreas de Protección de Flora y Fauna, APFFA= Áreas de Protección de Flora y Fauna Silvestres y Acuáticas, MN=Monumento Natural, PMN= Parque Marino Nacional, PN= Parque Nacional, RB= Reserva de la Biosfera, RIB= Reserva Integral de la Biosfera, ZP= Zona de

Protección Forestal, ZPF= Zona de Protección Forestal y Refugio de la Fauna Silvestre, ZRZ= Zona de Reserva y Zona de Refugio de Aves Migratorias y de la Fauna Silvestre.

Administración	Entidad	Nombre	Categoría	Registros
Federal	Ags, Dgo, Jal, Nay, Zac	C.A.D.N.R. 043	APRN	72
	Camp	Calakmul	RB	38
	Camp	Caribe Mexicano	RB	3
	Camp	Los Petenes	RB	15
	Camp, Tab	Laguna de Términos	APFF	62
	Camp, Yuc	Ría Celestún	RB	3
	Camp, Q_Roo, Yuc	Bala'an K'aax	APFF	4
	Chis	Cañón del Sumidero	PN	86
	Chis	El Triunfo	RB	27
	Chis	La Encrucijada	RB	31
	Chis	La Sepultura	RB	162
	Chis	Montes Azules	RIB	98
	Chis	Palenque	PN	19
	Chis	Selva El Ocote	RB	121
	Chis	Volcán Tacaná	RB	2
	Chis	Yaxchilán	MN	45
	Chis	Z.P.F. de La Concordia	ZP	1
	Col	El Jabalí	ZPF	8
	Col, Jal	Sierra de Manantlán	RB	119
	Mex	Z.P.F.T.C.C. ríos Valle de Bravo	APRN	35
	Gto, Qro	Sierra Gorda	RB	96
	Gro	Grutas de Cacahuamilpa	PN	15
	Hgo	Barranca de Metztitlán	RB	3
	Jal	Chamela-Cuixmala	RB	81
	Mich	Barranca del Cupatitzio	PN	1
	Mich	Zicuirán-Infiernillo	RB	7
	Oaxaca	Boquerón de Tonalá	APFF	1
	Oaxaca	Huatulco	PN	1
	Oaxaca	Lagunas de Chacahua	PN	34
	Pue, Oaxaca	Tehuacán-Cuicatlán	RB	33
	Pue, Ver	Cañón del Río Blanco	PN	9
	Q_Roo	Arrecifes de Cozumel	PMN	3

	Q_Roo	Porción N, franja costera oriental	APFF	2
	Q_Roo	Sian Ka'an	RB	61
	Q_Roo	Tulum	PN	4
	Q_Roo	Yum Balam	APFF	6
	Q_Roo, Yucatán	Ría Lagartos	RB	38
	Ver	Los Tuxtlas	RB	113
Total	22	68	20	1761

Cuadro 4.- Registros en Áreas Naturales Protegidas federales y estatales para *Artibeus lituratus*; se resalta aquella ANP federales y estatales en que existen más registros.

Estat: AMPH= Área Municipal de Protección Hidrológica, ASE= Área Silvestre Estatal, CER= Centro Ecológico Recreativo, MN=Monumento Natural, PE= Parque Estatal, PER= Parque Ecológico Recreativo, PESAyF= Parque Estatal Santuario del Agua y Forestal, RB= Reserva de la Biosfera, RBE= Reserva de la Biosfera Estatal, REcol= Reserva Ecológica, RE= Reserva Estatal, RP= Reserva Patrimonial, SAF= Santuario del Agua y Forestal, ZNP= Zona Natural Protegida, ZPA= Zona de Protección Ambiental, ZRE= Zona de Reserva Ecológica y Zona de Refugio de Aves Marinas Migratorias y Fauna y Flora Silvestre, ZSCE= Zona Sujeta a Conservación Ecológica.

Administración	Entidad	Nombre	Categoría	Registros
Estat	Camp	Balam-Kin	ZSCE	2
	Camp	Balam-Kú	ZSCE	65
	Jal	Bosque Los Colomos	AMPH	1
	Mich	Cañones de los Ríos Marqués	ZPA	2
	Tab	Cascadas de Reforma	RE	3
	Chis	Cordón Pico El Loro-Paxtal	ZSCE	8
	Tamps	El Cielo	RB	20
	Tab	Gruta del Cerro Coconá	MN	1
	Tab	Parque Estatal Agua Blanca	PE	1
	Tab	Parque Estatal de la Sierra de Tabasco	RE	1
	Yuc	Reserva Estatal Biocultural del Puuc	RE	10
	Q_Roo	Santuario del Manatí Bahía de Chetumal	RE	5
	Nay	Sierra de San Juan	RBE	2
	Chis	Sistema Lagunar Catazajá	ZSCE	1
	Mich	Volcán El Jorullo	RP	1
	Chis	Volcán Tacaná	ZSCE	4

Federal: APRN= Área de Protección de los Recursos Naturales Zona de Protección Forestal, APFF= Áreas de Protección de Flora y Fauna, APFFA= Áreas de Protección de Flora y Fauna Silvestres y Acuáticas, MN=Monumento Natural, PMN= Parque Marino Nacional, PN= Parque Nacional, RB= Reserva de la Biosfera, RIB= Reserva Integral de la Biosfera, ZP= Zona de Protección Forestal, ZPF= Zona de Protección Forestal y Refugio de la Fauna Silvestre, ZRZ= Zona de Reserva y Zona de Refugio de Aves Migratorias y de la Fauna Silvestre.

Administración	Entidad	Nombre	Categoría	Registros
Federal	Ags, Dgo, Jal, Nay, Zac	C.A.D.N.R. 043 Estado de Nayarit	APRN	46
	BC, BCS, Sin, Son	Islas del Golfo de California	ZRZ	154
	Camp	Calakmul	RB	55
	Camp	Los Petenes	RB	4
	Camp, Tab	Laguna de Términos	APFF	11
	Camp, Yuc	Ría Celestún	RB	1
	Chis	Cañón del Sumidero	PN	21
	Chis	Cascada de Agua Azul	ZPF	1
	Chis	El Triunfo	RB	10
	Chis	La Encrucijada	RB	22
	Chis	La Sepultura	RB	31
	Chis	Lagunas de Montebello	PN	4
	Chis	Metzabok	APFF	1
	Chis	Montes Azules	RIB	40
	Chis	Palenque	PN	7
	Chis	Selva El Ocote	RB	29
	Chis	Volcán Tacaná	RB	2
	Chis	Yaxchilán	MN	19
	Col	El Jabalí	ZPF	3
	Col, Jal	Sierra de Manantlán	RB	16
	Gto, Qro	Sierra Gorda de Guanajuato	RB	76
	Gro	Grutas de Cacahuamilpa	PN	1
	Jal	Chamela-Cuixmala	RB	12
	Jal	La Primavera	ZPF	1
	Mich	Barranca del Cupatitzio	PN	2
	Oaxaca	Lagunas de Chacahua	PPN	52
	Pue, Oaxaca	Tehuacán-Cuicatlán	RB	3
Q_Roo	Sian Ka'an	RB	4	
Tams	Sierra de Tamaulipas	RB	3	
Ver. de Ignacio de la Llave	Los Tuxtlas	RB	41	
Total	27	47	16	799

## BIBLIOGRAFÍA

1. A. Estrada, R. Coates-Estrada, C. Vasquez-Yanes y A. Orozco-Segovia, "Comparison of frugivory by howling monkeys (*Alouatta palliata*) and bats (*Artibeus jamaicensis*) in the tropical rain forest of Los Tuxtlas, Mexico, American Journal of Primatology, 7(1), 1984, 3-13.
2. A.L. Gardner, Feeding habits, Pp. 293-350, in: Biology of Bats of the New World Family Phyllostomatidae, Part II (R.J. Baker, J.K. Jones Jr., and D.C. Carter, eds.). Special Publications of the Museum, Texas Tech University, 1977, 13:1-364.

3. A. Salame-Méndez, A. Castro-Campillo, K. Olvera-Olvera, H. Serrano, F. Huerta-García, J. J. Esquivel-Florencio, y M. D. García-Suárez, "Evaluación estacional de fitoestrógenos en heces de machos del murciélago frutero jamaicano (*Artibeus jamaicensis* Leich, 1821)" *Therya*, 3(1), 2012, 13-31.
4. B. Bolívar-Cimé, R. Alfaro-Bates, J. J. Ortiz-Díaz, F. M. Clarke, y P. A. Racey, "Pollen movement by the bat *Artibeus jamaicensis* (Chiroptera) in an agricultural landscape in the Yucatan Peninsula, Mexico", *Mammal research*, 62(2), 2017, 189-193.
5. B. Vargas-Miranda, "Filogeografía de *Artibeus jamaicensis triomylus* y *Artibeus jamaicensis yucatanicus* (Chiroptera: Phyllostomidae) de México, Tesis de doctorado", Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. México, DF, 2009, 92 pp.
6. C. Ballesteros-Barrera, O. Aguilar-Romero, O. Téllez-Valdés y J. López-Jardines, "*Artibeus hirsutus* (murciélago). Distribución potencial, escala: 1:1000000. edición: 1" Unidad Iztapalapa, Universidad Autónoma Metropolitana, 2016.
7. C. Cornejo-Latorre, A. E. Rojas-Martínez, M. Aguilar-López y L. G. Juárez-Castillo "Abundancia estacional de los murciélagos herbívoros y disponibilidad de los recursos quiropterófilos en dos tipos de vegetación de la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán, Hidalgo, México", *Therya*, 2(2), 2011, 169-182.
8. C. Chávez, y G. C. González, "Diversidad y abundancia de murciélagos en selvas secas de estacionalidad contrastante en el oeste de México", *Revista Mexicana de Mastozoología (Nueva Época)*, 5(1), 2001, 27-44.
9. C. García-Estrada, A. Damon, C. Sánchez-Hernández, L. Soto-Pinto y G. Ibarra-Núñez, "Diets of frugivorous bats in montane rain forest and coffee plantations in southeastern Chiapas, Mexico", *Biotropica*, 44(3), 2012, 394-401.
10. C. Lorenzo, C. Kraker-Castañeda, y J. Bolaños-Citalán, "Los murciélagos filostómidos de Chiapas, México y Guatemala. El Colegio de la Frontera Sur, Museo de Historia Natural de la Universidad de San Carlos de Guatemala, Programa para la Conservación de Murciélagos de Guatemala, Estrategia de Conservación Murciélagos de Centroamérica", 2015.
11. C. Machain-Williams, M. López-Urbe, L. Talavera-Aguilar, J. Carrillo-Navarrete, L. Vera-Escalante, F. Puerto-Manzano y M. A. Loroño-Pino, "Serologic evidence of flavivirus infection in bats in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Journal of wildlife diseases*, 49(3), 2013, 684-689.
12. C. Pozo de la Tijera, J. E. Escobedo Cabrera, "Mamíferos terrestres de la Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an, Quintana Roo, México", *Revista de Biología Tropical*, 47(1-2), 1999, 251-262.
13. C. Sánchez-Hernández, M. D. L. Romero-Almaraz, A. Taboada-Salgado, J. A. Almazán-Catalán, G. D. Schnell, y L. Sánchez-Vázquez, "Five albino bats from Guerrero and Colima, Mexico. *Chiroptera Neotropical*", 16(1), 2010, 541-545.
14. C. V. Sánchez, A. Townsend, y P. Escalante, "El modelado de la distribución de especies y la conservación de la diversidad biológica. Enfoques contemporáneos para el estudio de la biodiversidad", 2001, 359-379.
15. D. E. Wilson, y D. M. Reeder (Eds.). *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference* (Vol. 1). 2005, JHU Press.
16. E. M. Leiva-González, D. Navarrete-Gutiérrez, L. Ruiz-Montoya, A. Santos-Moreno, C. Kraker-Castañeda y M. García-Bautista, "Analysis of the contribution of landscape attributes on the genetic diversity of *Artibeus jamaicensis* Leach, 1821" *Mammal Research*, 64(2), 2019, 223-233.
17. E. R. Hall, "The mammals of North America v. 1", United States of America: A Wiley Interscience, 1981.
18. F. A. Cervantes, "Colección Nacional de Mamíferos (CNMA)" 15 de junio de 2021, disponible en <http://www.ibiologia.unam.mx/cnma/>.
19. G. Ceballos (Ed.) "Mammals of Mexico", JHU Press, 2014, 720-723.
20. G. P. Guevara Hernández, "Análisis estadístico para mediciones obtenidas con un receptor de GPS civil (Doctoral dissertation)" 2012, disponible en <http://repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/5905>.

21. J. C. Arriaga-Flores, I. Castro-Arellano, A. Moreno-Valdez y A. Correa-Sandoval, "Temporal niche overlap of a riparian forest bat assemblage in subtropical Mexico", *Revista Mexicana de Mastozoología (Nueva Época)*, 2(1), 2012, 3-17.
22. J. J. Flores-Martínez, J. Ortega y G. Ibarra-Manríquez, "El hábito alimentario del murciélago zapotero (*Artibeus jamaicensis*) en Yucatán", *Revista Mexicana de mastozoología*, 4, 2000, 22-39.
23. J. López-Vidal, y C. Elizalde-Arellano, "Colección Mastozoológica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, 2006.
24. J. Ortega e I. Castro-Arellano, "*Artibeus jamaicensis*", *Mammalian Species*, 662, 2001, 1-9.
25. J. Ortega y H. T. Arita, "Defence of females by dominant males of *Artibeus jamaicensis* (Chiroptera: Phyllostomidae)", *Ethology*, 106(5), 2000, 395-407.
26. J. Ortega y H. T. Arita, "Structure and social dynamics of harem groups in *Artibeus jamaicensis* (Chiroptera: Phyllostomidae)", *Journal of Mammalogy*, 80(4), 1999, 1173-1185.
27. J. Ortega y H. T. Arita, "Subordinate males in harem groups of Jamaican fruit-eating bats (*Artibeus jamaicensis*): satellites or sneaks?", *Ethology*, 108(12), 2002, 1077-1091.
28. J. Ortega, J. E. Maldonado, G. S. Wilkinson, H. T. Arita, y R. C. Fleischer "Male dominance, paternity, and relatedness in the Jamaican fruit-eating bat (*Artibeus jamaicensis*)", *Molecular Ecology*, 12(9), 2003, 2409-2415.
29. J. Ramirez-Pulido, y M. A. Armella, "Activity patterns of neotropical bats (Chiroptera: Phyllostomidae) in Guerrero, Mexico", *The Southwestern Naturalist*, 1987, 363-370.
30. J. Ramirez-Pulido, N. González-Ruiz, A. L. Gardner, y J. Arroyo-Cabrales. (2014). List of recent land mammals of Mexico, 2014.
31. J. Sotomayor-Bonilla, A. Chaves, O. Rico-Chávez, M. K. Rostal, R. Ojeda-Flores, M. Salas-Rojas, y G. Suzán, "Dengue virus in bats from southeastern Mexico. The American journal of tropical medicine and hygiene", 91(1), 2014, 129-131.
32. K. P. Bhatnagar y F. C. Kallen. "Morphology of the nasal cavities and associated structures in *Artibeus jamaicensis* and *Myotis lucifugus*", *American Journal of Anatomy*, 139(2), 1974, 167-189.
33. L. E. Cruz-Lara, C. Lorenzo, L. Soto, E. Naranjo y N. Ramírez-Marcial, "Diversidad de mamíferos en cafetales y selva mediana de las cañadas de la selva Lacandona, Chiapas, México", *Acta Zoológica Mexicana*, 20(1), 2004, 63-81.
34. L. V. Ortiz, "Los procesos de formación y desarrollo de investigadores en la Universidad de Guadalajara – Una aproximación multidimensional. Colección de Graduados Serie Social y Humanística. Centro Universitario de Ciencias Sociales y Humanísticas", Universidad de Guadalajara, 2010, 14:167 p.
35. M.D. Tuttle, Feeding habits of *Artibeus jamaicensis*, *Journal of Mammalogy*, 1968, 49:78
36. M. Del Real-Monroy y J. Ortega, "Spatial distribution of microsatellite and MHC-DRB exon 2 gene variability in the Jamaican fruit bat (*Artibeus jamaicensis*) in Mexico", *Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde*. 84. 10.1016/j.mambio, 2016, 12.005.
37. M. Torres-Castro, D. Muñoz-Dueñas, S. Hernández-Betancourt, M. Bolio-González, H. Noh-Pech, R. Peláez-Sánchez y J. Sosa-Escalante, "Infección con *Toxoplasma gondii* (Eucoccidiorida: Sarcocystidae) en murciélagos de Campeche y Yucatán", *México. Revista de Biología Tropical*, 67(3), 2019, 633-642.
38. P. Larsen, S. Hooper, M. Bozeman, S. Pedersen, H. Genoways, C. Phillips, D. Pumo, y R. Baker, "Phylogenetics and Phylogeography of the *Artibeus jamaicensis* Complex Based on Cytochrome- b DNA Sequences", *Journal of Mammalogy*, 88, 2007, 712-727, 10.1644/06-MAMM-A-125R.1.
39. P.V. August, Fig fruit consumption by *Artibeus jamaicensis* in the Llanos of Venezuela. *Biotropica*, 1981, 13:70-76
40. R. García-Morales, D. T. Duran, E. S. A. Gómez, C. E. Moreno, y M. S. Akmentis, "Registro de leucismo en *Sturnira ludovici* y *Artibeus jamaicensis* (Phyllostomidae) en México. Chiroptera Neotropical", 18(1), 2012, 1101-1105.
41. R. J. Baker, "Bioinformatics, museums, and society: Integrating biological data for knowledge-based decisions", *Occasional Papers of the Museum of Texas Tech University* 187, 1998, 1-4.

42. R. Medellín, H. Arita, O. Sánchez, "Identificación de los murciélagos de México. Clave de campo. Segunda Edición. Instituto de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México, 2008.
43. S. Solari y V. Martínez-Arias, "Cambios recientes en la sistemática y taxonomía de murciélagos Neotropicales (Mammalia: Chiroptera)", *Therya*, 5 (1), 2014, 167-196
44. V. Llaven Macías, L. Ruiz Montoya, M. García Bautista, J. Lesher Gordillo y S. Machkour M'Rabet, "Diversidad y estructura genética de *Artibeus jamaicensis* (Chiroptera: Phyllostomidae) en Chiapas, México", *Acta zoológica mexicana*, 33(1), 2017, 55-66.
45. V. Sánchez-Cordero, N. P. Rodríguez, M. Moreno-Almeraya, M. Jiménez-Cruz, "*Artibeus jamaicensis* (murciélago frutero). Distribución Potencial en México", escala: 1:1000000. edición: 1. Instituto de Biología, UNAM, 2020.
46. W. W. Dalquest, "Mammals of the Mexican state of San Luis Potosi, Louisiana State University and Agricultural & Mechanical College, 1951.



## EFFECTO DEL SULFATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA SOBRE LA TRASLOCACION NUCLEAR DE DAF-16 Y LA EXPRESIÓN HSP-16 EN EL NEMATODO CAENORHABDITIS ELEGANS BAJO HIPOXIA QUÍMICA.

Leonardo Hernandez Hernandez<sup>1</sup>, Manuel de Jesus Gallegos Saucedo<sup>2</sup>, Diego Wenceslao Aguilar Ocampo<sup>3</sup>, Araceli Castillo Romero<sup>4</sup>, Rafael Cortés Zárata<sup>4</sup>, Ana Laura Pereira Suárez<sup>4</sup>, Abel Hernández Chávez<sup>1</sup> y Gabriela Camargo Hernandez<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Fisiología, CUCS-Universidad de Guadalajara, <sup>2</sup> Doctorado en Farmacología, CUCS-Universidad de Guadalajara, <sup>3</sup> Carrera Ingenieria en Alimentos y Biotecnología, CUCEI-Universidad de Guadalajara, <sup>4</sup> Departamento de Microbiología y Patología, CUCS-Universidad de Guadalajara, <sup>5</sup> Departamento de Ciencias de la Salud, CUALTOS-Universidad de Guadalajara.  
leohhdez@hotmail.com

### RESUMEN

La hipoxia ocurre en múltiples procesos fisiológicos y puede causar daño celular y muerte. Las células y los tejidos han desarrollado muchas estrategias para hacerle frente. Estas respuestas adaptativas, aunque no se comprenden del todo, parecen conservarse evolutivamente. Aun con estas respuestas, la hipoxia todavía puede tener efectos nocivos. Los esteroides neuroactivos han mostrado efectos protectores contra los procesos hipóxicos en mamíferos, pero su mecanismo de acción exacto a nivel celular no está claro. Recientemente, empleando un modelo de hipoxia química en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), demostramos que el Sulfato de Dehidroepiandrosterona (SDHEA) reducía el daño al sistema GABAérgico asociado con la hipoxia<sup>1</sup>. La respuesta de *C. elegans* a la hipoxia incluye sistemas reguladores y procesos celulares conservados evolutivamente en mamíferos. Entre ellos, tras el estrés oxidativo causado por la hipoxia, ocurren cambios transcripcionales por la translocación al núcleo del factor de transcripción DAF-16/FOXO, entre ellas, la expresión de las proteínas citoprotectores como la HSP-16.2<sup>2</sup>.

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto que ejerce el SDHEA sobre la translocación nuclear de DAF-16 y la expresión de HSP-16.2 en *C. elegans* bajo hipoxia química. Con este propósito *C. elegans* adultos sincronizados de las cepas TJ356 (expresando DAF-16 con GFP) y TJ375 (expresando HSP-16.2 con GFP) se cultivaron en placas con agar NGM con *E. coli* OP50 (NGM-OP50) como alimento. Establecimos para cada cepa, grupos no tratados (**CTL**), grupos hipóxicos (**HPX**) y grupos hipóxicos con SDHEA (**HPX+SDHEA**). Para la hipoxia se expusieron los gusanos a Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (16h/20°C). Posteriormente los gusanos fueron preparados para tomar imágenes de microscopia epifluorescente.

Después de la observación de los experimentos realizados sobre la cepa TJ356, se encontró que DAF-16 en los grupos hipóxicos presento una distribución nuclear del 80% y una distribución intermedia, entre nuclear y citoplasmática, del 20%; mientras que en el grupo **HPX+SDHEA** solo se observó distribución intermedia al 50%. En el caso de la Cepa TJ375, en el grupo **HPX** se observó que la expresión de HSP-16.2 aumento más del 100% relativo al CTL, pero en el grupo **HPX+SDHEA** no fue distinta del **CTL**. Estos resultados sugieren que con SDHEA la translocación nuclear de DAF-16 fue notoriamente menor a los grupos hipóxicos y no se aumentó la expresión de HSP-16.2, por lo que asumimos que no están involucrados en el mecanismo de acción del SDHEA en nuestro modelo, y probablemente la actividad neuroprotectora de SDHEA está asociada con su estructura química, como un antioxidante que rompe la cadena oxidativa.

### INTRODUCCION

Los cambios en los niveles de O<sub>2</sub> ocurren con frecuencia en la naturaleza. Así, en los sistemas vivos suelen sobrevenir suministros inadecuado de oxígeno, induciendo un desequilibrio entre el oxígeno que ingresa al interior de una célula y la demanda de oxígeno de la misma célula para producir energía. Esa condición se conoce como hipoxia, y aunque la hipoxia ocurre en múltiples procesos

fisiológicos, puede ser una causa primaria de daño celular y muerte <sup>1</sup>. En consecuencia, las células y los tejidos están habitualmente en riesgo y han desarrollado muchas estrategias para hacer frente a los niveles bajos de oxígeno que conducen a condiciones patológicas <sup>2</sup>. Estas respuestas adaptativas a la hipoxia, aunque no se comprenden del todo, parecen conservarse evolutivamente. A pesar de estas respuestas, la hipoxia todavía puede tener efectos nocivos.

Debe tener en cuenta que la sensibilidad de las células y los organismos a la lesión hipóxica varía ampliamente, especialmente el sistema nervioso central (SNC) podría sufrir daño grave. En el caso del sistema GABAérgico, se ha reportado que la hipoxia induce cambios en los mamíferos. Los esteroides neuroactivos han mostrado efectos protectores contra los procesos hipóxicos en mamíferos, pero su mecanismo de acción exacto a nivel celular no está claro. El neuroesteroide dehidroepiandrosterona (DHEA) y su éster sulfato (SDHEA) tienen supuestos mecanismos indirectos y directos subyacentes a sus efectos protectores. El mecanismo indirecto implica la conversión de DHEA en andrógenos o estrógenos. Los mecanismos directos incluyen interactuar con receptores de neurotransmisores, provocar neurogénesis a través de receptores de esteroides no clásicos o tener propiedades antioxidantes y actividades antiinflamatorias <sup>3</sup>. En cualquier caso, es complicado estar seguro de estos mecanismos de acción subyacentes, particularmente en estudios de mamíferos, debido a su amplia variedad de dianas en las vías de transducción de señales, además de los procesos de transporte y bioconversión.

## TEORIA

Recientemente, empleando al nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) examinamos los efectos de la SDHEA sobre el daño al sistema GABAérgico asociado con la hipoxia <sup>4</sup>. Para ello, empleamos un modelo de hipoxia química similar a los modelos de hipoxia física en el sentido de que la estabilización del HIF-1 resulta de la disminución del oxígeno disponible <sup>5</sup>, y que también presentan expresión de genes (dependientes o independientes de HIF-1) típico de la respuesta de células hipóxicas. Encontramos que en la cepa EG1285, gusanos que expresan GFP en todas las neuronas GABAérgicas, la hipoxia química causó un daño estructural severo en el axón de las neuronas GABAérgicas, que incluía rebordeado, tortuosidades y huecos. Además, el sistema GABAérgico se vio afectado funcionalmente, como lo demuestra la mayor frecuencia de la respuesta de encogimiento después del estímulo del toque de la nariz. Considerando que después del estímulo del toque de la nariz, normalmente se observa una respuesta (movimiento hacia atrás, seguido de una curva ventral profunda y un cambio de 180° en la dirección de la locomoción en el gusano) que depende del buen estado de las neuronas GABAérgicas en el cordón ventral <sup>6</sup>, una mayor frecuencia de esta anómala respuesta de encogimiento corporal es sintomática de una falla en el sistema GABA. La administración de SDHEA, por otro lado, redujo la gravedad del daño axonal inducido en las neuronas GABAérgicas por hipoxia química y, en consecuencia, redujo la ocurrencia de respuesta de encogimiento. Esto último indica que SDHEA confería protección contra el daño hipóxico por hipoxia en el sistema nervioso.

En condiciones de hipoxia se inducen cambios transcripcionales tras la activación del factor inducible por hipoxia (HIF-1). En *C. elegans* existe un homólogo de HIF-1 que induce la expresión de 67 de 110 genes alterados por hipoxia durante su desarrollo y vida adulta <sup>7</sup>. En los tejidos posmitóticos de *C. elegans*, la hipoxia desencadena un programa transcripcional que, entre otras acciones, reduce la fosforilación oxidativa, aumenta las tasas de flujo glucolítico, reduce la tasa metabólica o mejora la eficiencia de la eliminación de oxígeno ambiental <sup>8</sup> asegurando una producción óptima de ATP e integridad celular, pero aumentan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). En este sentido, existen vías que se activan en condiciones de estrés oxidativo e hipoxia sin requerir la función HIF-1. Cabe destacar la vía de señalización similar a la insulina (ILS) que involucra al factor de transcripción DAF-16 / FOXO que induce la expresión de proteínas antioxidantes como las proteínas de choque térmico, particularmente la de las proteínas pequeñas de choque térmico HSP16 <sup>9</sup>. El propósito de este trabajo fue determinar el efecto que ejerce el SDHEA sobre la translocación nuclear de DAF-16 y la expresión de HSP-16.2 en *C. elegans* bajo hipoxia química.

## PARTE EXPERIMENTAL

Cepas y condiciones de cultivo de *C. elegans*.

Se utilizaron las siguientes cepas: la cepa N2 del tipo Bristol (cepa salvaje); la cepa TJ375 [hsp-16.2::GFP (gpls1)]; y la cepa TJ356 zls356 [daf-16p::daf-16a/b::GFP + rol-6]. Todas las cepas se obtuvieron del Caenorhabditis Genetics Center (Minneapolis, MN, EUA). Establecimos para cada cepa, grupos no tratados (**CTL**), grupos hipóxicos (**HPX**) y grupos hipóxicos con SDHEA (**HPX+SDHEA**). Para la hipoxia se expusieron los gusanos a Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (16h/20°C). Posteriormente los gusanos fueron preparados para tomar imágenes de microscopía epifluorescente. Los nematodos fueron cultivados en cajas de petri con agar NGM, sembradas con la cepa OP50 de *Escherichia coli* como fuente de alimento. Para la exposición a Sulfito de Sodio y a SDHEA, se utilizará como vehículo Buffer M9. Los gusanos fueron mantenidos a 20°C de acuerdo a lo descrito por Brenner (Brenner, 1974). Todos los experimentos se realizaron en gusanos adultos de 1 día, sincronizados por edad de acuerdo con métodos estándar <sup>10</sup>.

Exposición al sulfito de sodio y a SDHEA

El modelo de hipoxia química se realizó según lo descrito por Jiang et al (2011). Los gusanos adultos se transfirieron a una placa de 24 pocillos con tampón M9, con un promedio de 30 animales por pocillo. Se añadió sulfito de sodio diluido con Buffer M9 a los pocillos para obtener una concentración final de 1 g/L. Esta exposición continuó durante 16 horas a 20°C, y luego los gusanos se transfirieron a placas de NGM-Agar con alimento y se dejaron reposar durante 24 horas a 20°C. Para el caso del SDHEA, este se añadió diluido con buffer M9 a los pocillos para obtener una concentración final de 100 µM. La exposición a SDHEA se aplicó simultáneamente con el sulfito de sodio en el grupo SS + SDHEA.

Microscopía de epifluorescencia.

Los animales se transfirieron a una almohadilla de agarosa al 2% con una gota de azida sódica 40 mM y posteriormente se colocó un cubreobjetos. Los gusanos se visualizaron en un momento similar después de la exposición, para medir de manera reproducible y comparable. Las imágenes de epifluorescencia se capturaron con un objetivo de 20X o 40X en un microscopio vertical Zeiss Axio Imager A2 (Carl Zeiss Microscopy, GmbH, Göttingen, Alemania) con un accesorio de epifluorescencia y una cámara digital. Todas las imágenes se tomaron con tiempos de exposición constantes utilizando los programas Axovision LE 4.9.1 SE64 (Carl Zeiss Microscopy, GmbH, GmbH, Jena, Alemania). Puesto que usamos cepas transgénicas de *C. elegans* que llevan genes reporteros de proteína fluorescente verde (GFP) y, dado que la GFP se excita en el rango de luz azul, se empleó un filtro de triple banda que permite visualizar ese rango de excitación. Las imágenes de epifluorescencia se procesaron con los programas Image J (NIH, Bethesda, MD).

Análisis de datos y estadísticas

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los datos presentados se expresan como media ± SEM. El número de determinaciones, *n*, se indica entre paréntesis. Cuando se hicieron comparaciones de medias de 3 o más grupos, los datos de los experimentos cuantitativos se analizaron mediante un ANOVA de una vía con análisis post hoc de Tukey si siguen la distribución normal y tienen la misma varianza. En caso contrario, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis con análisis post hoc de Dunn. En el caso de la comparación de medias de dos grupos se analizaron con una prueba *t* de Student pareada. Los valores reales de *p* se incluyen en las figuras, los asteriscos indican diferencias significativas. Las diferencias se consideraron significativas a *P* < 0,05. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el paquete de software SigmaPlot 11.0.

## RESULTADOS

La hipoxia está asociada con el estrés oxidativo <sup>11</sup> y la mayor parte de la resistencia endógena al estrés en *C. elegans* está mediada por dianas de un ortólogo del factor de transcripción FoxO, el DAF-16. De hecho, DAF-16 regula al alza la expresión de genes cuyos productos proteicos contrarrestan el efecto de las ROS, como la superóxido dismutasa (sod-3), la catalasa (ctl-1, 2), pequeñas proteínas de choque térmico (hsp-16, hsp-12.6) y otros <sup>12</sup>. En consecuencia, se examinó la localización de DAF-16 en gusanos vivos que expresan la proteína verde fluorescente (GFP)

fusionada con DAF-16 funcional [cepa TJ356<sup>13</sup>]. A las 16 h de exposición al sulfito de sodio, los gusanos se montaron para su observación y análisis bajo un microscopio de epifluorescencia. Tres investigadores clasificaron a cada gusano como citoplasmático, nuclear intermedio según la localización de la proteína de fusión DAF-16::GFP. Los gusanos se calificaron como “con localización citoplasmática” cuando no se observó fluorescencia nuclear, “con localización nuclear” cuando se encontró fluorescencia en la región del núcleo en todo el cuerpo desde la cabeza hasta la cola, o “con localización intermedia” cuando la localización nuclear no es completa, es decir, hay una localización nuclear visible pero no tan completa como la nuclear. Se contó el número de gusanos en cada nivel de translocación nuclear<sup>14</sup>. Al respecto, todos los gusanos CTL mostraron solo localización citoplasmática, mientras que el grupo SS presentó 20% y 80% de localización intermedia y nuclear respectivamente, en el grupo SS + SDHEA, por su parte, la localización citoplasmática e intermedia fue del 50% cada una (Figura 1A, B). Además, se determinó el número de núcleos con DAF-16::GFP translocado. En este caso, los gusanos del grupo SS + SDHEA mostraron una disminución significativa en el número de núcleos con DAF-16::GFP ( $75,4 \pm 11,2\%$ , prueba t pareada,  $P = 0,002$ ) con respecto al grupo SS (Figura 1C).

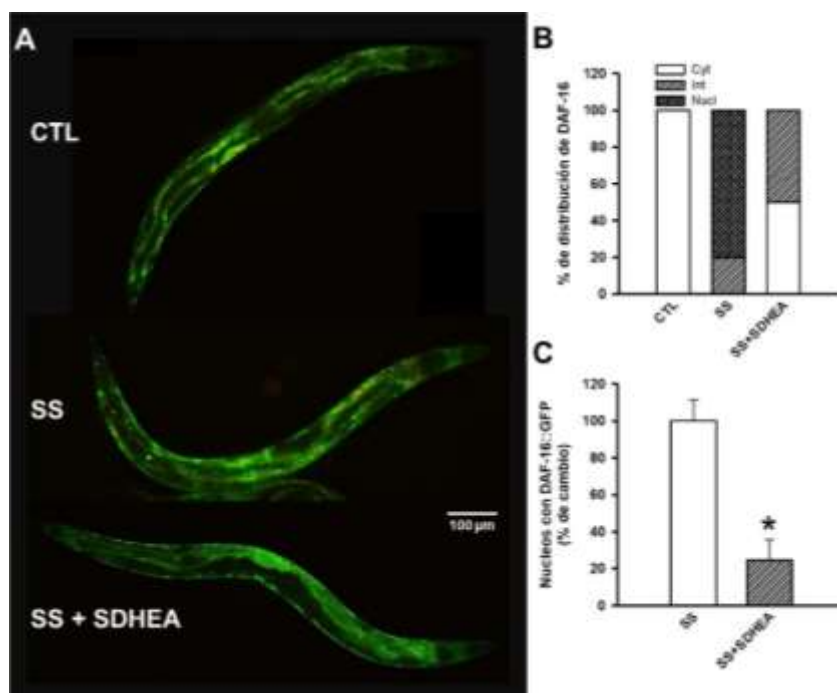


Figura 1. La translocación de DAF-16 inducida por hipoxia se reduce mediante el tratamiento con SDHEA. (A) Ensamblaje de microfotografías fluorescentes (40X) de gusanos TJ356 que expresan GFP fusionados con DAF-16 funcional. B) Porcentaje de gusanos en cada localización de DAF-16::GFP, a saber, citoplasmáticos (Cyt), intermedios (Int) o nucleares (Nucl), en cada grupo de estudio. La barra de escala representa 100  $\mu\text{m}$ . (C) Comparación entre gusanos hipóxicos tratados con SDHEA y gusanos hipóxicos en el número de núcleos con DAF-16::GFP ( $n = 10$  gusanos por grupo, \*  $P < 0,05$ )

Como se mencionó anteriormente, la translocación de DAF-16 induce la expresión de la proteína citoprotectora HSP-16.2. Esta pequeña chaperona se utiliza a menudo como un indicador de aumentos en el estrés oxidativo<sup>15-17</sup>, en consecuencia, abordando la pregunta sobre el mecanismo de acción de SDHEA, cuantificamos la expresión de hsp-16.2 utilizando la cepa transgénica TJ375 que tiene un promotor hsp-16.2 fusionado con un indicador de GFP. La expresión de hsp16.2 y, por lo tanto, la intensidad de GFP alcanza su punto máximo a las 15-18 h después de la exposición de estímulos<sup>18,19</sup>; en consecuencia, las mediciones se realizaron después de 16 h de exposición al sulfito de sodio. El grupo SS mostró una intensidad aumentada estadísticamente significativa de la fluorescencia de hsp-16.2::GFP ( $114\% \pm 28.5\%$ , ANOVA unidireccional,  $P = 0.022$ ) con respecto al

grupo CTL, lo que implica que la hipoxia aumenta la expresión de hsp-16.2 y, en consecuencia, aumenta la presencia de radicales libres y estrés oxidativo. Por el contrario, el grupo SS + SDHEA mostró una disminución en la expresión de hsp-16.2::GFP de  $14 \pm 14.5\%$  con respecto al grupo CTL, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $P = 0.949$ ), aunque mostró una menor expresión estadísticamente significativa de hsp-16.2::GFP en comparación con el grupo SS ( $P = 0.013$ ), lo que sugiere que SDHEA redujo el estrés oxidativo inducido por hipoxia (Figura 2A, B).

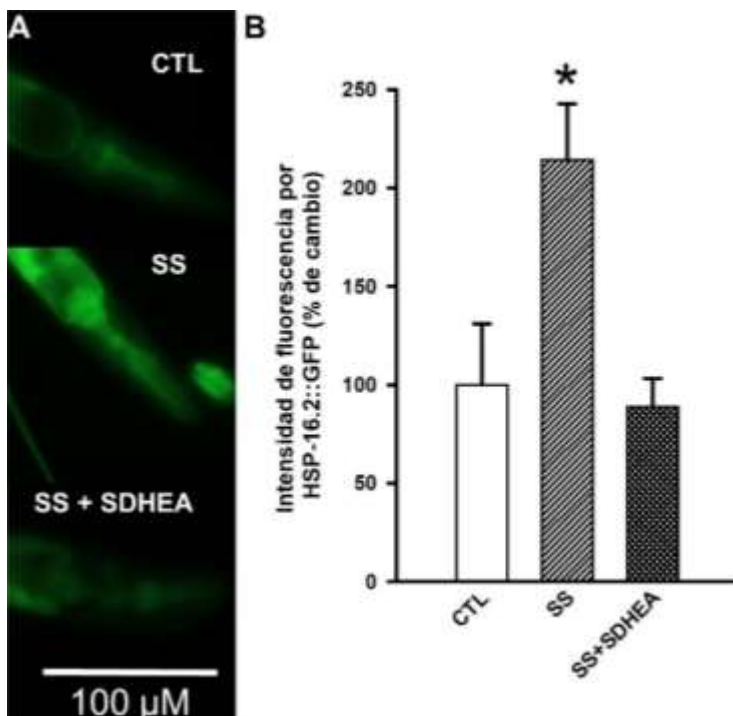


Figura 2. SDHEA disminuyó la expresión mejorada de HSP-16.2 observada en hipoxia. (A) Microfotografías de epifluorescencia representativas (20X) de gusanos TJ375 que expresan GFP fusionadas con la proteína de choque térmico HSP-16.2. La barra de escala representa 100  $\mu\text{m}$ . (B) Gráfico de intensidad de fluorescencia de HSP-16.2::FP ( $n = 10$  gusanos por grupo, \*  $P < 0,05$  frente al grupo CTL).

## CONCLUSIONES

Como en otros casos de estrés oxidativo, observamos que la hipoxia química elevó la translocación de DAF-16 y la expresión de HSP-16.2, confirmando que la hipoxia aumenta los niveles de ROS ya que la expresión de HSP-16.2 se correlacionó altamente con la aparición de ROS<sup>18-20</sup>. Por el contrario, SDHEA no pareció aumentar la translocación de DAF-16 ni la expresión de HSP16.2. Este hallazgo sugiere que SDHEA disminuyó la acumulación de ROS, pero no pudo estimular la producción de proteínas antioxidantes a través de las actividades transcripcionales de DAF-16. SDHEA no puede ingresar a las células y, en consecuencia, no puede afectar directamente a DAF-16. Entonces, SDHEA seguramente neutraliza solo el ROS extracelular.

Así, en nuestro estudio, SDHEA solo mostró actividad antioxidante, aparentemente como depuradora de ROS. No está bien documentado, ni para SDHEA ni para DHEA, pero esa actividad antioxidante podría estar asociada principalmente con una estructura esteroidal de anillos múltiples capaz de aceptar electrones o los grupos sulfato electrófilo por su fuerte capacidad de donación de hidrógeno. Esta suposición está en línea con los estudios *in vitro* que informan que la SDHEA actuó como un captador de radicales libres e inhibidor de la peroxidación de lípidos en un nivel inferior o similar que la DHEA<sup>21</sup>.

En conclusión, la actividad neuroprotectora de SDHEA durante la hipoxia depende de su capacidad como captador de ROS. Un efecto que está relacionado con su estructura química, probablemente actuando como un antioxidante rompedor de cadenas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Nystul, T. G. & Roth, M. B. Carbon monoxide-induced suspended animation protects against hypoxic damage in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9133-9136, doi:10.1073/pnas.0403312101 0403312101 [pii] (2004).
2. Fawcett, E. M., Hoyt, J. M., Johnson, J. K. & Miller, D. L. Hypoxia disrupts proteostasis in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* **14**, 92-101, doi:10.1111/accel.12301 (2015).
3. Allolio, B. & Arlt, W. DHEA treatment: myth or reality? *Trends in Endocrinology & Metabolism* **13**, 288-294, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1043-2760\(02\)00617-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1043-2760(02)00617-3) (2002).
4. Gallegos-Saucedo, M. d. J. *et al.* in *Desarrollo Científico en México* (eds Gloria Verónica Vázquez García *et al.*) 1211-1215 (Centro de Investigaciones en Óptica A.C. (607 -95228), León, Gto., México, 2019).
5. Jiang, B. *et al.* Sodium sulfite is a potential hypoxia inducer that mimics hypoxic stress in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Inorg Chem* **16**, 267-274, doi:10.1007/s00775-010-0723-1 (2011).
6. Pirri, J. K. & Alkema, M. J. The neuroethology of *C. elegans* escape. *Curr Opin Neurobiol* **22**, 187-193, doi:10.1016/j.conb.2011.12.007 (2012).
7. Shen, C. & Powell-Coffman, J. A. Genetic analysis of hypoxia signaling and response in *C. elegans*. *Ann N Y Acad Sci* **995**, 191-199 (2003).
8. Van Voorhies, W. A. & Ward, S. Broad oxygen tolerance in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Exp Biol* **203**, 2467-2478 (2000).
9. Camargo, G. *et al.* Inactivation of GABAA receptor is related to heat shock stress response in organism model *Caenorhabditis elegans*. *Cell Stress Chaperones* **21**, 763-772, doi:10.1007/s12192-016-0701-9 (2016).
10. Hope, I. A. *C. elegans: A Practical Approach*. 1 edition edn, Vol. 213 304 ( Oxford University Press, 1999).
11. Rodriguez, M., Snoek, L. B., De Bono, M. & Kammenga, J. E. Worms under stress: *C. elegans* stress response and its relevance to complex human disease and aging. *Trends in Genetics* **29**, 367-374, doi:10.1016/j.tig.2013.01.010 (2013).
12. Murphy, C. T. & Hu, P. J. Insulin/insulin-like growth factor signaling in *C. elegans*. *WormBook*, 1-43, doi:10.1895/wormbook.1.164.1 (2013).
13. Henderson, S. T. & Johnson, T. E. *daf-16* integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology* **11**, 1975-1980 (2001).
14. Oh, S. W. *et al.* JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 4494-4499, doi:10.1073/pnas.0500749102 (2005).
15. Hartwig, K., Heidler, T., Moch, J., Daniel, H. & Wenzel, U. Feeding a ROS-generator to *Caenorhabditis elegans* leads to increased expression of small heat shock protein HSP-16.2 and hormesis. *Genes Nutr* **4**, 59-67, doi:10.1007/s12263-009-0113-x (2009).
16. Wiegant, F. A. *et al.* Plant adaptogens increase lifespan and stress resistance in *C. elegans*. *Biogerontology* **10**, 27-42, doi:10.1007/s10522-008-9151-9 (2009).
17. Xiao, J., Rui, Q., Guo, Y., Chang, X. & Wang, D. Prolonged manganese exposure induces severe deficits in lifespan, development and reproduction possibly by altering oxidative stress response in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of environmental sciences (China)* **21**, 842-848 (2009).

18. Link, C. D., Cypser, J. R., Johnson, C. J. & Johnson, T. E. Direct observation of stress response in *Caenorhabditis elegans* using a reporter transgene. *Cell Stress Chaperones* **4**, 235-242 (1999).
19. Rea, S. L., Wu, D., Cypser, J. R., Vaupel, J. W. & Johnson, T. E. A stress-sensitive reporter predicts longevity in isogenic populations of *Caenorhabditis elegans*. *Nat Genet* **37**, 894-898 (2005).
20. Soti, C. & Csermely, P. Protein stress and stress proteins: implications in aging and disease. *J Biosci* **32**, 511-515 (2007).
21. van Rensburg, S. J., Daniels, W. M. U., van Zyl, J. M. & Taljaard, J. J. F. A Comparative Study of the Effects of Cholesterol, Beta-Sitosterol, Beta-Sitosterol Glucoside, Dehydro-epiandrosterone Sulphate and Melatonin on In Vitro Lipid Peroxidation. *Metabolic Brain Disease* **15**, 257-265, doi:10.1023/A:1011167023695 (2000).



## TÉCNICAS PARA DESCALCIFICACIÓN DE DIENTES Y HUESO DE MANDÍBULA DE RATA PARA ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Tomás Cruz Velasquez<sup>1\*</sup>, Manuel López Rodríguez<sup>2</sup>, Martha Eva Viveros Sandoval<sup>3</sup>, Rubén Abraham Domínguez Pérez<sup>4</sup>, Carlos Cortés Penagos<sup>3</sup> y Bertha Fenton Navarro<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Glicobiología. División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, UMSNH. Morelia, Michoacán. <sup>2</sup>Laboratorio de Histopatología. Unidad de Servicios Auxiliares para el Diagnóstico (USAD), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UMSNH. Morelia, Michoacán. <sup>3</sup>División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, UMSNH. Morelia, Michoacán. <sup>4</sup>Facultad de Medicina (Odontología), Universidad Autónoma de Querétaro. Santiago de Querétaro, Qro.

[\\*cruzvtomas12@gmail.com](mailto:cruzvtomas12@gmail.com), [\\*\\*bertha.fenton@umich.mx](mailto:bertha.fenton@umich.mx)

### RESUMEN

Los análisis histológicos de tejidos biológicos calcificados como dientes y huesos, siguen siendo difíciles debido a la dureza de estos tejidos. Los dientes son un tejido complejo, compuesto por un componente orgánico blando como la pulpa dental, y un componente mineralizado inorgánico duro circundante que incluye hueso alveolar, dentina, cemento y esmalte. La elección de las técnicas de procesamiento histológico óptimas para procesar tejidos tan complejos es fundamental para garantizar la preservación de la morfología reproducible con el mínimo de daño tisular. La evaluación histológica de tejidos altamente mineralizados generalmente requiere descalcificación como paso inicial para eliminar los iones/sales de calcio en el tejido calcificado, para incluirlo en parafina para seccionar y teñir los tejidos para el análisis histológico. Los métodos tradicionales de descalcificación implican sumergir los tejidos mineralizados en soluciones que contienen ácidos (inorgánicos u orgánicos) y, agentes quelantes. Sin embargo, la morfología del tejido calcificado es difícil de preservar después de la descalcificación con estos agentes, debido a que, la exposición a químicos agresivos puede dañar la estructura de los tejidos blandos y afectar negativamente la integridad celular. La elección de una solución descalcificante depende del propósito del estudio, por lo tanto, se deben considerar varios factores al decidir qué método utilizar, como el tiempo de procesamiento para la descalcificación y la conservación de los tejidos. El objetivo fue evaluar la eficacia de diferentes agentes de descalcificación en el tejido de la mandíbula y en dientes de ratas Sprague-Dawley. Se utilizaron dos métodos de descalcificación: uno con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 10% ( $C_{10}H_{16}N_2O_8$ ) y otro con ácido nítrico al 5% ( $HNO_3$ ). Análisis histológico con cortes histológicos ( $7\mu m$ ) teñidos con tinción hematoxilina-eosina (H-E). Los resultados fueron los siguientes: Con el ácido nítrico al 5% se obtuvo una descalcificación rápida en 48 horas, a diferencia del EDTA al 10% que se obtuvo con 30 días. Sin embargo, en los dientes y mandíbulas descalcificadas con EDTA 10% se observó una excelente conservación de la morfología del tejido. Por otro lado, el tejido descalcificado con ácido nítrico 5% presentó un daño notorio en todos los tejidos circundantes de dientes y hueso mandibular en el análisis microscópico. Se concluye que el mejor método con el que se obtiene el hueso y los dientes descalcificados completamente con una conservación óptima del tejido es el del EDTA al 10%.

### INTRODUCCIÓN

Se requieren procedimientos de descalcificación para preparar muestras histopatológicas de tejidos duros como huesos y dientes.<sup>1</sup> Cortar secciones delgadas uniformes, de  $5-7\mu m$  de espesor, es uno de los pasos más importantes en la preparación de buenas muestras histopatológicas. Debido a que las sales minerales que contienen principalmente fosfato de calcio se depositan en el hueso y el diente, es imposible preparar secciones delgadas incluidas en parafina mediante una microtomía estándar sin una descalcificación previa.<sup>2,3,4</sup> La descalcificación generalmente se realiza sumergiendo el tejido en diferentes fluidos de descalcificación que típicamente incluyen ácidos orgánicos e inorgánicos o un fluido neutro que contiene un agente quelante como EDTA, o una mezcla de soluciones.<sup>5</sup> En general, los líquidos de descalcificación neutros causan un daño mínimo en los tejidos y son excelentes para retener la morfología, pero requieren un tiempo relativamente



largo y en realidad solo son adecuados para pequeñas muestras calcificadas, mientras que los fluidos de descalcificación ácidos fuertes se utilizan para una descalcificación rápida, pero son más dañinos para el tejido orgánico. No existe un líquido de descalcificación universal que satisfaga todos los requisitos, incluida una descalcificación rápida, un manejo sencillo y un daño tisular mínimo.<sup>6</sup> La tinción con hematoxilina-eosina (H-E) es una de las principales tinciones en histopatología y la tinción más utilizada en el diagnóstico médico, la cual permite evaluar la morfología de las muestras de interés.<sup>7</sup> El propósito del presente estudio fue evaluar la eficacia de diferentes agentes de descalcificación en el tejido óseo de la mandíbula y en dientes de ratas Sprague-Dawley.

## TEORÍA

Es imprescindible realizar estudios en modelo animal para en el futuro poder desarrollar diseños experimentales del área odontológica en donde se involucren estructuras anatómicas como dientes y hueso mandibular. Los animales que se utilizan deben producir una similitud con las estructuras anatómicas y fisiológicas humanas. Estas similitudes también ayudarán a predecir la seguridad clara de los procedimientos o medicamentos en humanos.<sup>8</sup> Se comprueba que los animales seleccionados para la investigación odontológica tengan una estrecha relación con la anatomía y fisiología humana. Los animales más utilizados para la investigación odontológica con métodos más nuevos son las ratas, debido a que presentan estructuras dentales similares al humano, su pequeño tamaño facilita su manipulación, fácil almacenamiento y no causa destrucción en grande escala.<sup>9</sup> Los dientes son un tejido complejo, compuesto por un componente orgánico blando como la pulpa dental, y un componente mineralizado inorgánico duro circundante que incluye hueso alveolar, dentina, cemento y esmalte. La elección de las técnicas de procesamiento histológico óptimas para procesar tejidos tan complejos es fundamental para garantizar la preservación de la morfología reproducible con el mínimo de daño tisular. La evaluación histológica de tejidos altamente mineralizados generalmente requiere descalcificación como paso inicial para eliminar los iones/sales de calcio en el tejido calcificado, para realizar la inclusión en parafina, seccionar y teñir los tejidos para el análisis histológico. Los agentes descalcificantes ampliamente utilizados han sido el EDTA y el ácido nítrico a diferentes concentraciones.<sup>7</sup> Los efectos de los agentes descalcificantes están influenciados por la concentración de la solución, la temperatura, el tiempo de exposición y la tasa de penetración. La descalcificación ácida actúa a través de un sistema de difusión que forma sales de calcio solubles, mientras que la descalcificación del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) actúa uniendo los iones de calcio que forman reacciones EDTA-Ca estables.<sup>10</sup> El uso inadecuado de un agente descalcificante puede dañar la estructura tisular, a menudo observado por la pérdida de tinción citoplasmática y nucleica.<sup>10</sup>

## PARTE EXPERIMENTAL

Se utilizaron 4 ratas macho Sprague-Dawley de 14 semanas de edad ( $250 \pm 10$  g). Los animales se alojaron en condiciones de bioterio tomando en cuenta lo estipulado en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999,<sup>11</sup> Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Se mantuvieron bajo condiciones de luz-oscuridad (12h/12h), temperatura ambiente ( $20-25^{\circ}\text{C}$ ) y suministro de agua potable y alimento *ad libitum*. El protocolo del presente trabajo de investigación fue evaluado y aceptado por el comité de ética e investigación de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez", UMSNH. Después de una semana de aclimatación, las ratas se eutanizaron con pentobarbital sódico (100 mg/kg, I.P.). Se formaron dos grupos: grupo 1 (n=2) y un grupo 2 (n=2). Se utilizaron dos métodos de descalcificación: grupo 1 con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 10% pH 7, y grupo 2 con ácido nítrico al 5%. Posteriormente, se realizó un análisis histológico, para el cual se obtuvieron ambos maxilares de las 4 ratas y quedaron inmersos en formalina al 10% durante 48h. Los maxilares del grupo 1 se descalcificaron con EDTA 10% (pH 7) durante 30 días, realizando recambio de solución cada 10 días. Por otro lado, en el grupo 2 se descalcificaron los maxilares con ácido nítrico 5% durante 48h, con recambio de solución a las 24 horas. Para corroborar que las muestras habían cumplido su tiempo de descalcificación se obtuvieron radiografías de las mandíbulas empleando un aparato de rayos-X de uso odontológico (Corix 70 Plus-USV-MM), debido a que el método de rayos-X no daña

la muestra. Se utilizó un procesador de tejidos o Histokinete (Microm STP120-1) automatizado para emplear la técnica de inclusión en parafina, en el cual se procesaron los tejidos por fijación (formalina 10%), deshidratación (etanol), aclaración y la inclusión. Se obtuvieron bloques de parafina para realizar cortes de 7 $\mu$ m de espesor por cada hemimandíbula con un microtomo de rotación (MICROM HM 325). De cada hemimandíbula en parafina se desecharon aproximadamente los primeros 50 cortes hasta localizar el tejido óseo de interés y se obtuvieron 10 laminillas de muestra por cada hemimandíbula. Las muestras de tejido en laminillas se tiñeron con hematoxilina y eosina (H-E) y se fijaron con resina (Entellan®) para su posterior análisis microscópico (Leica DM 1000).

## RESULTADOS

Se realizó un análisis histológico con tinción de hematoxilina-eosina (H-E) en las muestras descalcificadas con EDTA 10% y ácido nítrico 5%. En las radiografías por rayos-X (Figura 1) se logra observar el tejido dentario y hueso completamente calcificados antes de iniciar el proceso de descalcificación (Figura 1B), mostrando zonas radiolúcidas y radiopacas. En la Figura 1C se observa un cambio notorio en donde las estructuras de dientes y hueso solo se observan muy tenuemente, corroborando así la completa descalcificación de los dientes y hueso mandibular, apto para continuar el proceso histológico.

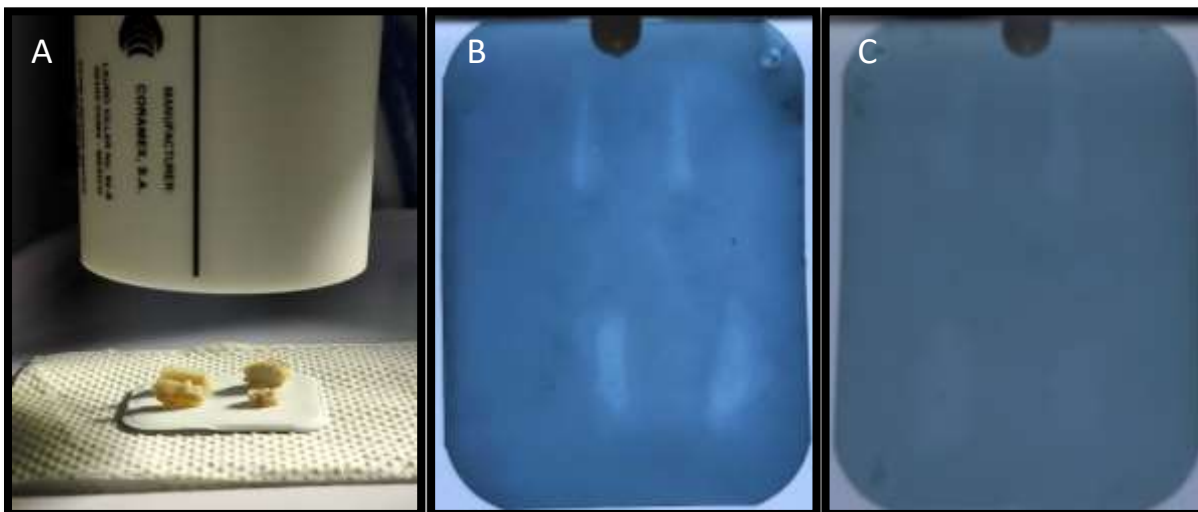


Figura 1. A) Obtención de radiografías con aparato de rayos-X de uso odontológico; B) radiografía con muestras de dientes y hueso no descalcificado; C) radiografía con muestras de dientes y hueso descalcificado y apto para ser procesado para un análisis histológico.

En las microfotografías obtenidas de la tinción de H-E (Figura 2), se logró observar que al utilizar el ácido nítrico 5% se obtiene una descalcificación rápida en 48 horas, a diferencia del EDTA al 10% que se obtuvo en 30 días. Sin embargo, en los dientes y mandíbulas descalcificadas con EDTA 10%, se observó histológicamente una excelente conservación de la morfología del tejido (Figura 2A). Por otro lado, el tejido descalcificado con ácido nítrico 5% presentó un daño notorio en todos los tejidos circundantes de diente y hueso mandibular en el análisis microscópico (Figura 2B), lo que impide valorar con detalle las zonas de la cresta alveolar (CA), ligamento periodontal (LP) y hueso trabecular (HT). Se observa un daño notorio en el tejido de la cresta alveolar en el grupo 2 en relación con el grupo 1 descalcificado con EDTA 10%.

Por lo tanto, el método de descalcificación con EDTA 10%, permitió ver a gran detalle la morfología y estructuras anatómicas tanto de diente como del hueso, con una conservación óptima del tejido, permitiendo un mejor análisis histopatológico. La tinción H-E demostró que diferentes soluciones descalcificantes afectaron la intensidad de tinción de las secciones del tejido. El método con EDTA

10% pH 7, dio como resultado el mejor brillo y uniformidad de tinción en relación con el ácido nítrico 5%. Como era de esperar, observamos una excelente conservación de la morfología del tejido celular con EDTA al 10%. El único inconveniente de este método es el tiempo necesario para lograr la desmineralización completa. Es probable que esto esté relacionado con la formación de un sistema tampón físico en el que los iones de calcio se eliminan de la capa externa a la capa interna mediante el agotamiento del tamaño del cristal de hidroxiapatita.<sup>10</sup> En general, la descalcificación con EDTA al 10% conserva mejor la integridad del tejido celular y estructural.

La elección de una solución descalcificante depende del propósito del estudio; por lo tanto, se deben considerar varios factores al decidir qué método utilizar. Si la estructura y la morfología del tejido son críticas, recomendamos usar EDTA al 10% a temperatura ambiente, mientras que, si el tiempo es una limitación, el ácido nítrico al 5% es la opción más rápida sin dejar de preservar la mayor parte de la integridad estructural; sin embargo, la tinción de los vasos sanguíneos podría verse comprometida.

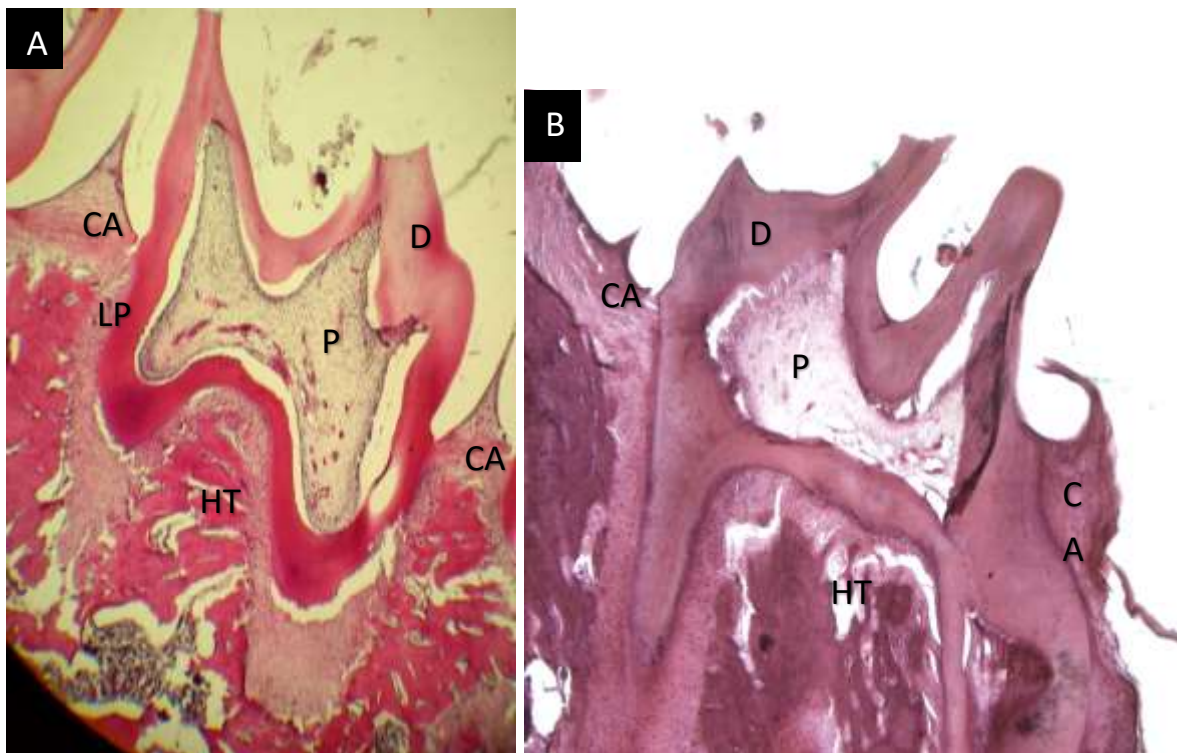


Figura 2. Microfotografías de cortes histológicos con tinción Hematoxilina-Eosina. A) Se muestran estructuras anatómicas de molar y hueso de rata descalcificado en EDTA 10% (*grupo 1*), donde se observa una conservación de todos los tejidos anatómicos de interés. B) Molar y hueso de rata descalcificado en ácido nítrico 5% (*grupo 2*), observándose daño notorio tanto en molar como hueso, especialmente en la cresta alveolar (CA).

## CONCLUSIONES

El mejor método con el que se obtiene el hueso y los dientes descalcificados completamente con una conservación óptima del tejido es cuando se utiliza el EDTA al 10%. Por lo tanto, el método de descalcificación con EDTA 10%, permitió ver a gran detalle la morfología y estructuras anatómicas tanto de diente y hueso mandibular de rata, favoreciendo un mejor análisis histopatológico. Por otro lado, la descalcificación con ácido nítrico al 5% con sus limitantes es una opción rápida viable cuando no se tiene el tiempo suficiente como para esperar 30 días para una descalcificación con EDTA 10%.

## BIBLIOGRAFÍA

1. H. Hatta, K. Tsuneyama, K. Nomoto, "A simple and rapid decalcification procedure of skeletal tissues for pathology using an ultrasonic cleaner with D-mannitol and formic acid", *Acta Histochemica.*, Vol. 116, 5, 2014, pp. 753-757.
2. I.B. Dimenstein, "Bone grossing techniques: helpful hints and procedures", *Ann. Diagn. Pathol.*, Vol. 12, 2008, pp. 191-198.
3. M.J. Klein, V.A. Memoli, "Orthopaedic specimen preparation: what pathologists should know and do", *Semin. Diagn. Pathol.*, Vol. 28, 2011, pp. 4-12.
4. K. Sanjai, J. Kumarswamy, A. Patil, L. Papaiah, "Evaluation and comparison of decalcification agents on the human teeth", *J. Oral. Maxillofac. Pathol.*, Vol. 16, 2012, pp. 222-227.
5. N.J. Hamlin, P.A. Price, "Mineralization of decalcified bone occurs under cell culture conditions and requires bovine serum but not cells", *Calcif. Tissue. Int.*, Vol. 75, 2004, pp. 231-242.
6. P.A. Adegboyega, S. Gokhale, "Effect of decalcification on the immunohistochemical expression of ABH blood group isoantigens", *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, Vol. 11, 2003, pp. 194-197.
7. H. Liu, R. Zhu, C. Liu, "Evaluation of decalcification techniques for rat femurs using HE and immunohistochemical staining", *BioMed. Res. Int.*, Vol. 2017, 2017, pp. 1-6.
8. D.K. Mayerholz, A.P. Beck, B. Singh, "Innovative use of animal models to advance scientific research", *Cell. Tiss. Res.*, Vol. 1, 2020, pp. 1-2.
9. S. Banu, J. Ramamurthy, "Role of animal models in periodontal research - A review", *Asian. J. Pharm. Clin. Res.*, Vol. 11(7), 2018, pp. 47-51.
10. F.M. Savi, G.I. Brierly, J. Baldwin, "Comparison of different decalcification methods using rat mandibles as a model", *J. Histochem. Cytochem.*, Vol. 65, 12, 2017, pp. 705-722.
11. SEMARNAT, "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio", *NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999*, 42(2), 2011, pp.1-58.

## ÍNDICE DE AUTORES

- Águila Martínez Israel 67  
 Aguilar Ocampo Diego Wenceslao 353  
 Alcalá De Jesús María 227, 329  
 Alpizar Negrete Ana Guadalupe 218, 234  
 Ambríz García Demetrio Alonso 43, 313, 334  
 Aparicio Fernández Xochitl 34  
 Ávila Rodríguez Mario 265  
 Ayala-Pérez Luis Amado 147  
 Ballesteros-Barrera Claudia 118, 339  
 Balleza-Ordaz José Marco 91  
 Baltazar Vera Juan Carlos 25  
 Barba Franco Joel de Jesús 34  
 Barba Peralta Ana Sofía 244  
 Bartolomé Camacho María Carmen 61  
 Bivián-Castro Eglá Yareth 49  
 Briseño Ramírez Jaime 244  
 Bustos-Martínez Jaime 72  
 Cabrera Sánchez Ingrid Magali 214  
 Calderón Vega Felicitas 25  
 Calixto Olalde Ma. Elena 218, 234  
 Camargo Hernández Gabriela 244, 353  
 Campos Guillén Juan 153  
 Cano-Asseleih Leticia Margarita 109  
 Cardoso Ávila Pablo Eduardo 67  
 Carreño-Loaiza Daniela 147  
 Casillas Corona Mariela 227  
 Castañeda Hernández Jesús 67  
 Castañeda Roldán Elsa Iracena 95  
 Castillo Romero Araceli 244, 353  
 Cerón Hernández Arizbeth 209  
 Chavez Karina V. 128  
 Contreras Bárbara José Roberto 209, 214  
 Cortés Penagos Carlos 360  
 Cortés Sol Albertina 138  
 Cortés Zarate Rafael 244, 353  
 Corvo Pérez Francisco E. 317  
 Cruz Hernández Mónica 305  
 Cruz Velasquez Tomás 360  
 Cuevas García Rogelio 209  
 Damas Solano Damara Benazir 153  
 De la Rosa Hernández Paola Monserrat 91  
 Del Ángel Meraz Ebelia 317  
 Del Valle Días Muñoz G. 259  
 Delgadillo Ruíz Eladio 25  
 Díaz Balcazar Rodrigo 323  
 Díaz-Godoy Raúl Venancio 163  
 Domínguez Pérez Rubén Abraham 360  
 Esparza Cepeda Luisa Fernanda 265  
 Fenton Navarro Bertha 360  
 Figueroa Chavez Patricia Yazmín 323  
 Flores Claros Carlos Arturo 101  
 Flores Martínez Alberto 199  
 Flores Muñoz Mónica 138  
 Flores Pedraza Nemesio 14  
 Flores Villavicencio Lérica Liss 199  
 Fuentes-Ramírez Rosalba 91  
 Galindo Rosario 91  
 Gallardo Céspedes Cilthya Cecilia Ocaidí 305  
 Gallegos Saucedo Manuel de Jesus 353  
 García Argueta Imelda 287  
 Garcia Diaz Diana 14  
 García Galván Keops Xeki 209  
 García López José Armando 83  
 García Pérez Martha Estrella 61  
 García Rosales Roberto 195  
 García Torres Alicia 218  
 García-Cardoso Karina Yunuen 147  
 Garrido Hernandez Aristeo 195  
 Godínez Orozco Jania 249  
 Godínez Pacheco Ramón 249  
 Gómez Torres Armando Miguel 14  
 González Cortés Juan Carlos 329  
 González García Samuel 72  
 González Hernández Gloria Angelica 181  
 González Hidalgo Beatriz 163  
 González López Lucía Viridiana 300  
 González Muñoz María del Pilar 265  
 Granados García María Elena 329  
 Granados Segoviano Iván Alberto 234  
 Guevara-Valencia Marina 109  
 Gutiérrez Gonzalez Rafael Ángel 323  
 Hamdan Partida Aída 72  
 Hernández Chávez Abel 353  
 Hernández Chávez Macaria 214  
 Hernández Giron José Martín 305  
 Hernández Hernández Leonardo 244, 353  
 Hernández Morales M.G. 259  
 Hernández Sánchez Marcela 287  
 Hernández Torres Daniel Germán 138  
 Higareda Mendoza Ana Edith 249  
 Jaime Ferrer Jesús Salvador 4  
 Juárez Portilla Claudia J. 138  
 Kashina Svetlana 91  
 Lara-Barrera Brandon 169  
 Lemus M 9  
 López Cerón Shanny Ivete 214  
 López Olivares Guadalupe 305  
 López Rodríguez Manuel 360  
 Lozano-Álvarez Juan Antonio 49  
 Lozolla Ortiz Javier Iván 300  
 Lugo Pérez Andrea Patricia 181  
 Maciel-Flores Cristhian Eduardo 49  
 Marañón Ruiz Virginia Francisca 34  
 Marín Hernández Guadalupe Gissela 323  
 Martínez Bernal Angélica 118  
 Martínez Flores Héctor Eduardo 61  
 Martínez Rodríguez Diana Esmeralda 265  
 Mata Sanromán Josué Alejandro 244  
 Meléndez Balbuena Lidia 305  
 Mendoza-Solis Esmeralda Concepción 147  
 Molina Jiménez Tania 138  
 Montero S. 9  
 Morales Lara Laura 95  
 Morales Ramírez Ángel de Jesús 101  
 Morales-González Gabriela 169  
 Muciño Cruz D. 259

- Muñoz Luna Laura Patricia 25  
Navarro Maldonado María del Carmen 43, 313, 334  
Navarro Segura Diana Laura 265  
Noriega Vargas Rogelio 214  
Núñez Cardona María Teresa 163, 169, 300  
Nuñez Cardoso María Teresa 72  
Orozco Guerrero Fernando 234  
Ortiz Burgos Selene 118  
Ortiz Salinas Rutilio 14  
Padilla Guerrero Enrique Israel 181  
Palacios Espinosa Juan Francisco 163  
Palacios Jaimes Martha Liliana 287  
Pardo Galván Marco Aurelio 249  
Patakfalvi Rita 67  
Pereira Suárez Ana Laura 353  
Pérez Méndez Martha Lizeth 199  
Pérez Moreno Víctor 153  
Pérez Téllez Alondra 118  
Pérez-Olivares Iztzel 175  
Pineda Calderón I. 259  
Piña Torres Iván Horacio 181  
Ponce Noyola Patricia 199  
Quezada Cabrera Erick Uriel 163  
Ramírez Cornejo Selenia 209  
Ramírez Estrada Abril Lizeth 209  
Ramírez Gutierrez Lisset 323  
Ramírez Ramírez Natividad 25  
Ramírez-Ramos Víctor Manuel 339  
Ramos Ramírez Lesset del Consuelo 95  
Rico Rodríguez Miguel Ángel 153  
Robredo-Ortiz Virginia Mishell 169  
Roces Dorronsoro E 9  
Rodríguez López Luis Rey 83  
Rodríguez Ontiveros Areli 153  
Rodríguez Rivera María Besamath 218  
Rodríguez Sánchez Isis 234  
Roldán Roldán Gabriel 138  
Romero Avalos Kathyryne Gabriela 128  
Rosas-Garduño Yoali 169  
Ruiz Guerrero Rosario 101, 195  
Saíto Quezada Verónica Mitsui 175  
Salazar García Luis Mauricio 199  
Salazar López Orpha Ithamar 72  
Salgado-Ugarte Isaías H 175  
Sánchez Enríquez Sergio 244  
Sánchez-Aguirre Oscar Antonio 109  
Santamaría Gonzaga Karen Jazmin 95  
Santiago Teodoro Maribel 83  
Silva Corona Mayra 329  
Solís González Gerardo 61  
Soto López Ismael 305  
Soto Víctor M. 128  
Tejeda Vega Samuel 14  
Téllez Acosta Osvaldo 300  
Tirado Torres David 25  
Torres Corona Nancy Carolina 300  
Torres Guzmán Juan Carlos 181  
Torres Hernández Jazmín del R. 317  
Torres Rodríguez Agustín Alfredo 83  
Torres-Magallanes JA 9  
Trejo Córdova Alfredo 43, 313, 334  
Trejo Martínez Mayret Aylin 83  
Uscanga Martínez Diana Isabel 138  
Valencia Hernández Juan Antonio 153  
Vargas Miranda Bárbara 118, 313, 339  
Vargas Rosas Adriana 300  
Vargas Sandoval Margarita 329  
Vargas-Miranda Bárbara 43, 334  
Vázquez Avendaño José Roberto 43, 313  
Vázquez Avendaño Roberto 334  
Vázquez Garcidueñas Ma. Soledad 274  
Vázquez Marrufo Gerardo 274  
Vázquez Rodríguez Guadalupe 25  
Vega y León Salvador 14  
Vega-Rodríguez Brenda Iliana 147  
Velazquez-Ponce Pedro 128  
Vergara Onofre Marcela 14  
Villafaña López Liliana 4  
Villagómez Castro Julio César 199  
Viveros Sandoval Martha Eva 360  
Zarate-Hernández Rocío 118, 339  
Zepeda Gurrola Reyna Cristina 274  
Zepeda Hernández Rossana C. 138



# EDITORAS

MARÍA EUGENIA SÁNCHEZ MORALES

GLORIA VERÓNICA VÁZQUEZ GARCÍA

AMALIA MARTÍNEZ GARCÍA

CRISTINA E. SOLANO SOSA

EVA LILIANA RAMOS GUERRERO



CENTRO DE INVESTIGACIONES  
EN ÓPTICA, A.C.

ISBN OBRA COMPLETA  
TRABAJOS CIENTÍFICOS EN MÉXICO



ISBN TOMO I  
BIOLOGÍA Y QUÍMICA

