



CONAHCYT
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



CENTRO DE INVESTIGACIONES
EN ÓPTICA, A.C.

AVANCES CIENTÍFICOS Y TECNOLÓGICOS EN MÉXICO I

TOMO I
BIOLOGÍA Y QUÍMICA



DECLARACIÓN LEGAL

EDITORES:

Cristina E. Solano Sosa
María Eugenia Sánchez Morales
Gloria Verónica Vázquez García
Amalia Martínez García
Alexandra Monsetrrat Garcia

ISBN GENERAL 978-607-8821-42-6
Fecha de otorgamiento 18-09-2024

Tomo I: Biología y Química ISBN 978-607-8821-43-3
Fecha de otorgamiento 18-09-2024

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



PREFACIO

En este compendio se presentan contribuciones de investigación y desarrollo tecnológico realizadas en diversas áreas de la ciencia, cuyo objetivo principal es contribuir a la difusión del quehacer científico y tecnológico que se realiza en México, así como 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) Ciencias sociales, III) Biotecnología y ciencias agropecuarias, IV) Físico matemáticas y ciencias de la tierra, V) Humanidades, ciencias de la conducta y divulgación científica, VI) Ingenierías, así como VII) Medicina y ciencias de la salud.

Octubre de 2024
León, Gto., México

Cristina E. Solano Sosa
María Eugenia Sánchez Morales
Gloria Verónica Vázquez García
Amalia Martínez García
Alexandra Monsetrrat García

TABLA DE CONTENIDO

RECUBRIMIENTOS POLIMÉRICOS BIFUNCIONALES: APLICACIÓN EN SALUD Y CATÁLISIS QUÍMICA	4
ORGANOCATÁLISIS ASIMÉTRICA EN LA SÍNTESIS DE TETRAHIDROCARBAZOLES QUIRALES (THC) Y SU ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA	14
VALIDACIÓN PARCIAL DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE B-CARIOFILENO EN ACEITE ESENCIAL DE PIMIENTA NEGRA (PIPER NIGRUM) MEDIANTE HPLC	22
CLASIFICACIÓN A NIVEL LABORATORIO DE SUELO PROVENIENTE DE TIRADERO A CIELO ABIERTO (TCA) DE UN MUNICIPIO DE PUEBLA-TLAXCALA.....	35
RELACIÓN DEL CONTENIDO DE PLOMO Y PH EN SUELOS DE ARARÓ MICHOACÁN	39
VALIDACIÓN DEL ESTADO DE QUIESCENCIA POR ESTRÉS NUTRICIONAL EN UN MODELO CELULAR DE ORIGEN CANCEROSO	44
TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO METANOLICO DE LAVANDULA OFFICINALLIS FRENTE A CEPAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	54
CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS HETERÓTROFAS Y DETECCIÓN DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE ENZIMAS EXTRACELULARES EN LAS SALINERAS CHIQUITAS (PUEBLA)	59
EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE RHAMNUS PURSHIANA: ACTIVIDAD HEMOLÍTICA, POTENCIAL ANTINFLAMATORIO Y ACTIVIDAD BACTERICIDA FRENTE A BACTERIAS MULTIFARMACORRESISTENTES	65
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PHYSALIS IXOCARPA SOBRE CEPAS MULTIFARMACORESISTENTES DE INTERÉS NOSOCOMIAL	76
RELACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS CON LA HETEROGENEIDAD AMBIENTAL EN ESPECIES DEL GÉNERO PROSOPIS EN EL ESTADO DE ZACATECAS.....	82
VIABILIDAD DEL MEDIO STUART PARA LA CONSERVACIÓN DE CEPAS DE TRABAJO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA QFB-UMSNH	86
PRESENCIA DE PARÁSITOS GASTROINTESTINALES EN HUMANOS Y CERDOS DE TRASPATIO EN COMUNIDADES RURALES, VERACRUZ, MÉXICO.....	92
EFFECTO DE LA INFECCIÓN CON LA BACTERIA DIARREOGÉNICA ESCHERICHIA COLI ENTEROPATÓGENA SOBRE LA ACTIVIDAD GABAÉRGICA EN EL ORGANISMO MODELO CAENORHABDITIS ELEGANS	100
FISIOLOGÍA E HISTOQUÍMICA DE LA PLANTA MEDICINAL JATROPHA DIOICA	105
IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO SELECTIVO PARA HIERRO TRIVALENTE A TRAVÉS DE UN QUIMIOSENSOR FLUORESCENTE A BASE DE RODAMINA B.....	112
ANÁLISIS SOBRE LA PRESENCIA DE GLAUCOMYS VOLANS EN LAS ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS EN MÉXICO.....	120
ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE PÉTALOS DE TAGETES ERECTA CONTRA MICROORGANISMOS Y SU TOXICIDAD EN ERITROCITOS HUMANOS	127
EL SUELO Y SU CAPACIDAD DE ADSORCIÓN EN LA RIBERA DEL LAGO DE CUITZEO	138
DETERMINACIÓN DE LA SUPERVIVANCIA DE LOS AISLADOS DE AZOTOBACTER SP. EN PRESENCIA DE HIDROCARBUROS.....	144

ESTUDIO DE LAS GLUCOSIDASAS SECRETADAS POR UN HONGO AISLADO DE UN CONSORCIO FÚNGICO.....	152
ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS MEDIOS DE CULTIVO PARA LA CONSERVACIÓN DE CEPAS DE TRABAJO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA QFB-UMSNH	162
MONITOREO Y EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA EN PRODUCTOS DE BELLEZA DE ACUERDO A LA NOM-089-SSA1-1994	168
CARACTERIZACIÓN DE LU2O3:EU3+ EMBEBIDO EN SIO2 Y FUNCIONALIZADO COVALENTEMENTE CON EL ACIDO 4-AMINOBENZOICO PARA SU EVALUACIÓN EN CELULAS MDA-MB-231	179
IMPORTANCIA DEL TIPO DE TEXTURA DEL SUELO EN MUNICIPIOS P'URHEPECHAS PRODUCTORES DE AGUACATE.....	191
DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y PERFIL BIOCLIMÁTICO DE LA ARDILLA CALLOSPERMOPHILUS MADRENSIS (MERRIAM, 1901) ENDÉMICA DE MÉXICO	197
ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO DEL AGUA DE LLUVIA CAPTADA EN LA ESCUELA DE NIVEL MEDIO SUPERIOR DE GUANAJUATO (ENMSGTO).....	202
ANÁLISIS DE ASPECTOS DE LA DINÁMICA POBLACIONAL DE ABIES RELIGIOSA EN EL CHICO ESTADO DE HIDALGO, MÉXICO	208
CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE NURITE (CLINOPODIUM MACROSTEMUM, MOC. & SESSÉ EX. BENTH.) ORIGINARIA DE MICHOACÁN, MÉXICO	213
CONSUMO DE HOJAS DE FICUS COMO UNA ESTRATEGIA DE AUTOMEDICACIÓN EN EL MONO AULLADOR DE MANTO (ALOUATTA PALLIATA)	224
APORTACIÓN HÍDRICA DE LAS PARTES VEGETALES CONSUMIDAS POR ALOUATTA PALLIATA EN DOS TEMPORADAS CLIMÁTICAS.....	234
ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE HAEMATOXYLUM BRASILETTO (PALO DE BRASIL) Y SU TOXICIDAD FRENTE A ERITROCITOS HUMANOS	242
EFFECTO DEL MATERIAL PARTICULADO EN LA RESPUESTA INMUNE PULMONAR CONTRA LA INFECCIÓN POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA EN UN MODELO MURINO	246
INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN EL TIEMPO QUE DEDICA ALOUATTA PALLIATA A INGERIR ALIMENTO	255
EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO ACADÉMICO AL IMPLEMENTAR AUXILIARES DIDÁCTICOS DE TICS EN LAS PRÁCTICAS DE QUÍMICA BÁSICA EN EDUCACIÓN SUPERIOR	265
PROTEÍNAS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA QUE PARTICIPAN EN LA CAPTACIÓN Y SON REGULADAS POR HIERRO. ANÁLISIS IN SILICO.....	280
PREVALENCIA Y AISLAMIENTO DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS (SARM) EN LAS FOSAS NASALES DE ESTUDIANTES DE LA FACULTAD DE QFB, UMSNH; UN ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	286
LA INACTIVACIÓN DEL RECEPTOR GABAÉRGICO UNC-49 ESTA INVOLUCRADA EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO EN C. ELEGANS	291
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE SENNA ALEXANDRINA (SEN), VALERIANA OFFICINALIS (VALERIANA), TAGETE LUCIDA (YERBANIZ) Y MENTHA PIPERITA (MENTA) SOBRE CEPAS MULTIFARMACORRESISTENTES	296
ESTUDIO DE LA DINÁMICA DE LA LIBERACIÓN ESPONTÁNEA DE ACETILCOLINA EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR EN RATAS WISTAR CON Y SIN DIABETES EXPERIMENTAL	310
CARACTERIZACIÓN DE LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA A PARTIR DE MÉTODOS BIOGÉNICOS EXTRACELULARES CON EL HONGO RHIZOPUS STOLONIFER PARA SU APLICACIÓN EN DESINFECCIÓN	318

ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD MOLECULAR PARA EL ÁCIDO PIRÚVICO POR EXPOSICIÓN A RADIACIÓN IONIZANTE CON RELEVANCIA EN EVOLUCIÓN QUÍMICA	330
SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS CARBONILADOS DE RE(I) CON LIGANTES FLUORESCENTES NITROGENADOS	336
ANÁLISIS DE LA VOLTAMETRÍA CÍCLICA GENERADA POR GEOBACTER SULFURREDUCTENS EN UNA CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANO CON SUERO DE QUESO COMO SUSTRATO	350
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS DE PLEUROCHAETE LUTEOLA (MUSGO) SOBRE PATÓGENOS GASTROINTESTINALES	357
DESARROLLO DE UN CANDIDATO A MATERIAL DE REFERENCIA DE OLEORRESINA DE CEMPASÚCHIL (TAGETES ERECTA L.) ENCAPSULADA CON ACEITE DE GIRASOL	361
COLUMNAS DE ADSORCIÓN DE LECHO FIJO EMPACADAS CON CARBÓN ACTIVADO PRODUCIDO A PARTIR DE RESIDUOS AGRÍCOLAS PARA LA REMOCIÓN DE CONTAMINANTES AGROINDUSTRIALES PRESENTES EN AGUA	367
EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE UN SHAMPOO ORGÁNICO CON QUITOSANO PARA EL TRATAMIENTO DE LA ALOPECIA, CASPA Y RESEQUEZADA EN EL CUERO CABELLUDO ...	380
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE BACTERIAS AISLADAS DE AGUA PARA CONSUMO EN CUAUTEPEC (TLACUILOTEPEC, PUEBLA, MÉXICO).....	384

RECUBRIMIENTOS POLIMÉRICOS BIFUNCIONALES: APLICACIÓN EN SALUD Y CATÁLISIS QUÍMICA

Eugenia Aldeco-Pérez¹, Manuel Alejandro Serna¹, Jorge Morales Hernández¹

¹Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica
ealdeco@cideteq.mx

RESUMEN

Los recubrimientos bifuncionales con aplicaciones médicas y químicas son ya una realidad en nuestra época: ya sea en forma de implantes, parches o bien, como un catalizador de reacción. De esta manera, se propone el desarrollo de materiales compuestos, conteniendo partículas metálicas dispuestas en un recubrimiento polimérico, con el fin de poder explorar sus propiedades antibacterianas, así como su potencial uso como catalizador químico heterogéneo. La catálisis ensayada fue la formación de triazoles vía química click, una reacción que produce economía atómica, entre otras ventajas ambientales. Aprovechando las propiedades mecánicas y de soporte de los polímeros, se utilizó una base de polímero orgánico inocuo soportando partículas metálicas de aleación de CuAgTi, las cuales actuarán como centro activo biológico y químico.

Los objetivos principales del trabajo, centrados en la acción catalítica y antimicrobiana, fueron cumplidos de manera satisfactoria en ambos aspectos. En términos de la acción catalítica, se evidenció que los materiales que incorporaban el polvo con un tiempo de molienda más corto exhibieron una mayor eficacia. Esto se atribuye a la combinación de cobre y plata, ambos utilizados en estas reacciones catalíticas, manteniendo la proporción adecuada, según se estableció inicialmente. Por otro lado, la acción en los materiales que incorporaban el segundo polvo fue menos eficiente, ya que la falta de proporcionalidad entre el cobre y la plata afectó los resultados, a pesar de la efectividad individual del cobre como catalizador en este tipo de reacciones.

Para la acción antibacteriana se compararon los materiales con ambos polvos para ver su comportamiento con bacterias de tipo Gram (-). Las pruebas mostraron un comportamiento parecido a tiempos de exposición bajos que fueron de 3 horas, la diferencia se observó en tiempos de 24 horas donde el material con menor tiempo de molienda presentó mayor porcentaje de actividad incluso a bajas concentraciones, debido a mayor cantidad de iones Ag liberados durante el proceso gracias a la proporción obtenida con el Cu, aunque esta variación solo se observó a concentraciones bajas. La estrategia de membranas bifuncionales se revela prometedora en contextos catalíticos y antimicrobianos. El diseño meticuloso de procesos y el control riguroso han permitido el cumplimiento de objetivos, sentando las bases para futuras aplicaciones y estudios más detallados.

INTRODUCCIÓN

Algunos metales de transición, tales como el titanio y el cobre, han sido utilizados como materiales biocompatibles en implantes y en parches de uso médico [1,2]. Particularmente, el cobre, en compuestos o en estado metálico, ha sido utilizado como catalizador de las reacciones conocidas como de ciclización mediante química click, la cual ha tomado relevancia internacional últimamente por el ahorro en energía, átomos y la selectividad química que produce [3-4]. La incorporación de materiales metálicos en un soporte polimérico, produce una superficie que puede tener varios usos: en el caso del cobre y la plata pueden comportarse como materiales antibacteriales, así como también ser catalizadores activos ante reacciones de ciclización, entre otras conversiones. El desarrollo tecnológico de estos recubrimientos como membranas, ha sido un área de interés en el sector farmacéutico, principalmente [5]

TEORÍA

La limpieza de las superficies ha sido una problemática real a solucionar en casos de contaminación por virus o bacterias, ya sea en ambientes hospitalarios o en nuestro hogar.

En química, el uso de catalizadores se ha convertido en la herramienta sintética y de diseño más utilizada, ya que optimiza tiempos, temperatura, economía atómica y selectividad de una reacción.

El desarrollo de un material que pueda tener ambas actividades, incluyendo el uso de metales abundantes en nuestro país, provocaría un valor agregado, pudiéndose comercializar tanto en el campo químico, en el médico, así como en el farmacéutico. El ejemplo más cercano a una aplicación sería un catalizador heterogéneo de fármacos, el cual, además de producir la reacción, actúe como agente antibacterial dentro del reactor, asegurando la transformación de la materia prima, así como inhibiendo el crecimiento bacteriano en la producción de algún compuesto de interés farmacéutico [6].

A la fecha, se cuentan con resultados preliminares que son alentadores para plantear este proyecto, se ha probado la actividad antibacteriana de partículas de Cu-Ti, mostrando gran actividad en poco tiempo de acción. Teniendo esto como base, y sabiendo que el cobre es por excelencia un metal antibacterial, [7] es como se plantea el uso de aleaciones de CuTiAg, así como la posibilidad de la bifuncionalidad como catalizador químico. La reacción química a catalizar es un ejemplo de las reacciones tipo click [8], en específico de ciclización entre un alquino y una azida, donde el producto principal será un triazol 1,4-sustituído. Los triazoles forman parte esencial de compuestos que actúan como fungicidas, entre otras propiedades biológicas.

PARTE EXPERIMENTAL

El proceso de síntesis de la membrana PVA/CuAgTi se llevó a cabo mediante una técnica convencional de casting (fundición) de membranas en solución, siguiendo los siguientes pasos:

Se seleccionó el alcohol polivinílico (PVA) debido a sus propiedades de solubilidad en agua, semicristalinidad, no toxicidad, transparencia, biocompatibilidad y biodegradabilidad. Se midieron 50ml de agua desionizada a temperatura ambiente en un vaso de precipitados de 100ml, aplicando una agitación de 700 rpm. Usando una relación peso/volumen se usó lo correspondiente a 2% de PVA (cristales) marca MEYER y se procedió a agregarlo en agua, con un tiempo de agitación de 2 a 3 horas a 700rpm para asegurar la disolución del polímero en su totalidad.

Para la obtención del recubrimiento en forma de membrana, se llevó a cabo un cuidadoso control de la viscosidad de cada solución de polímero utilizando un reómetro de la marca Brookfield. Durante este proceso, se aplicaron diferentes velocidades de agitación (5, 10, 15, 20 y 25 rpm), con el objetivo de alcanzar un torque del 4%, en donde se observa que a 10 y 15 rpm es donde se mantiene más Membrana compuesta PVA/Partículas Para la dispersión de las partículas de polvo, se empleó inicialmente el equipo de ultrasonido a una frecuencia de 60 Hz durante un periodo de 1 minuto. Lamentablemente, las partículas de "refuerzo" mostraron una tendencia a cohesionarse, dando lugar a agregados y aglomerados. En respuesta a este desafío, se optó por un enfoque menos convencional, el cual demostró una significativa reducción en la formación de aglomerados. La finalidad de la dispersión radica en la reducción del tamaño de estos conjuntos y agrupaciones a niveles adecuados. Por consiguiente, la dispersión se convierte en un factor de vital importancia para lograr un producto final uniforme y homogéneo, mejorando de manera significativa sus propiedades. En el contexto de los compuestos poliméricos, constituidos por una matriz de polímero y partículas, la creación de la interfaz polímero/partícula no desempeña un papel crucial en la determinación de las propiedades finales del sistema que se estudió en este trabajo.

La formación de esta zona específica se atribuye principalmente a la fisisorción de cadenas de polímero en la superficie de las partículas. En general, la preferencia por la adsorción de moléculas de polímero de elevado peso molecular resulta en la formación de una capa alrededor de las

partículas, generando una variación gradual en las propiedades físicas/mecánicas desde la superficie de las partículas hasta la masa del polímero.

La agregación/aglomeración de las partículas no solo reduce el área de interfaz polímero/partícula, sino que también ocasiona la formación de puntos débiles en la matriz polimérica debido a la cohesión relativamente tenue entre las partículas atrapadas dentro de estos conglomerados.

Además, la dispersión de las partículas en las muestras se observó mediante el uso de microscopios ópticos, que mostró la presencia de agregados/aglomerados de partículas con características similares a las antes mencionadas.

Preparación de polvos CuAgTi

Se generó una aleación a través del procedimiento de aleación mecánica mediante un molino de tipo Sacudidor (SPEX), con intervalos de molienda y reposo programados a una diferencia temporal de 30 minutos entre ellos. En cuanto a la composición, se mantuvo una proporción de 1:1 entre el cobre (Cu) y la plata (Ag). Siguiendo esta premisa, la aleación se configuró con un porcentaje en peso del 40% de Cu, 40% de Ag y 20% de Ti. Esta elección se fundamentó en el extenso análisis y estudio de Cu y Ag en relación con pruebas catalíticas y aplicaciones antibacterianas. A pesar de que el titanio (Ti) también desempeña un papel significativo en el ámbito de la salud y diversas aplicaciones biomédicas, su participación se limitó al 20% debido a la escasa investigación y conocimiento existente sobre sus aplicaciones catalíticas, especialmente en contextos como la química "click", que fue la química empleada para este análisis.

Preparación de molienda

El recipiente del molino se cargó al 75% de su capacidad utilizando esferas de acero de pequeño tamaño. La cantidad de bolas se cuantificó mediante pesaje en una balanza, y, con este valor como base, se estableció una relación de 10:1 en comparación con la cantidad de material destinado para la molienda. En total, el peso de las bolas ascendió a 173.6 gramos, correspondiendo a 17.36 gramos de material a someter a molienda. Para determinar la cantidad necesaria de cada elemento en el proceso de molienda, se realizó un cálculo proporcional basado en los porcentajes en peso establecidos en la aleación con respecto a los 17.36 gramos totales. Por lo tanto, las cantidades específicas para cada elemento fueron 6.944 gramos para Cu y Ag, y 3.472 gramos para Ti.

Antes de cerrar el molino y dar inicio al procedimiento, se procede a someter tanto el molino como las bolas y los polvos a un proceso de evacuación en una cámara de vacío durante un período de 5 minutos. Posteriormente, se realiza la inyección controlada de un gas inerte, en este caso argón Ar. Este protocolo, además de prevenir la oxidación de los polvos, reviste significativa importancia, dado que las partículas de menor tamaño de los polvos aumentan su propensión a la inflamación con la elevación de la energía y, consecuentemente, de la temperatura interna del molino.

En adición a estos pasos, se incorpora 1 mililitro de metanol con el propósito de evitar la formación de aglomerados que pudieran impactar adversamente en los resultados del producto final.

Pruebas de catálisis con química click.

Se llevaron a cabo pruebas de catálisis tanto para las dos muestras de los polvos CuAgTi como para concentraciones de este polvo incorporadas en una matriz polimérica de PVA al 2%, con concentraciones específicas de muestras M1=0.01%, M2=0.05%, y M3=0.1% para ambas muestras. En un matraz de bola de 50 ml se preparó la siguiente mezcla:

Se pesaron 50 mg de azida de sodio (NaN_3), utilizando una balanza, y se añadieron 0.084 ml de fenilacetileno (C_8H_8) mediante una pipeta graduada de 1 ml con escala de 1/10. Estos reactivos se utilizaron en una relación molar de 1:1.

Tanto para el catalizador como para el ácido ascórbico, se empleó una concentración del 5% molar. En este sentido, se utilizaron 2.5 mg de catalizador y una cantidad redondeada de 10 mg de ácido ascórbico. Para la evaluación de las membranas, se pesaron 10 ml de cada muestra. Con el fin de mejorar la solubilidad y siguiendo la teoría aplicada en la química click, se añadieron 2 ml de metanol (CH_3OH) y 2 ml de agua destilada, utilizando una pipeta graduada de 5 ml.

El procedimiento para llevar a cabo las reacciones se hizo de la siguiente manera:

Se procede a colocar el matraz de bola sobre una capa de arena, la cual tiene la función de distribuir de manera uniforme la temperatura a lo largo de toda la reacción. Se añaden inicialmente NaN_3 , el catalizador y ácido ascórbico, dado que el alquino debe ser el primer componente en entrar en contacto para iniciar la reacción. Posteriormente, mediante un agitador magnético de pequeñas dimensiones, se inicia el experimento con una velocidad de agitación de 600-700 rpm y una temperatura que no exceda los 60°C . Después de transcurridos 10 minutos desde el inicio del experimento, se incorporan los 2 ml de metanol y 2 ml de agua.

Se implementó un sistema de circulación de agua en un condensador ubicado en la boca del matraz, el cual va conectado a una bomba que hace el trabajo de circular agua fría sobre el condensador, este sistema se añade considerando que algunos solventes pueden evaporarse a temperaturas cercanas a las establecidas. Con esto, se logra que los vapores se condensen y retornen a la reacción. Cada experimento se lleva a cabo en un tiempo de 12 a 15 horas por cada muestra.

Lavado de productos

Se realizó de la siguiente manera:

Inicialmente, se procedió a la eliminación de los solventes presentes en el producto, a saber, metanol. Este proceso se llevó a cabo mediante el empleo de un rotavapor, a una temperatura de 70°C . La rotación mínima del equipo se estableció en 30 rpm con el fin de garantizar una extracción eficiente del solvente.

Posteriormente, se empleó un embudo de separación, donde se combinó el producto con 5 mililitros de cloruro de metileno (CH_2Cl_2). La mezcla fue agitada y se permitió un tiempo de reposo de 10-15 minutos para facilitar la separación en dos fases distintas. La fase de interés es aquella que exhibe una mayor transparencia, ya que indica una menor concentración del alquino.

La fase transparente se vierte en un recipiente, para añadir sulfato de sodio anhidro, este compuesto se usa para que absorba el exceso de agua que pueda quedar en nuestra fase, la cantidad necesaria de este compuesto sobre nuestra fase fue de 5 g aproximadamente y se deja actuar por 5 minutos. Posteriormente, sobre un matraz de bola se utiliza un filtro de gravedad y se coloca el sulfato de sodio con nuestro producto final, el cual se logra recuperar añadiendo de 15 a 20 ml de cloruro de metileno.

Para concluir el proceso de lavado, se somete la muestra a una última fase en el rotavapor, manteniendo una temperatura de 70°C y una velocidad de rotación de 30 rpm. Este paso tiene como objetivo eliminar completamente el cloruro de metileno (CH_2Cl_2), reduciendo el volumen resultante a un mínimo de 2 mililitros. Posteriormente, la muestra concentrada se transfiere a un vial para su posterior almacenamiento y se procede a enmarcar la muestra.

Pruebas de actividad antimicrobiana: preparación y esterilización de material

Medio de cultivo:

Se prepara pesando 14.2 gr de Agar Muller-Hilton (M-H) y mezclándolo con 400 ml de agua desionizada, se agita y se esteriliza usando un Autoclave el cual calienta a 121°C por 15 minutos. seguido de su combinación con 400 mililitros de agua desionizada. La mezcla resultante fue agitada de manera homogénea. Posteriormente, se procedió a la esterilización utilizando una autoclave, el cual fue configurado para alcanzar una temperatura de 121°C durante un periodo de 15 minutos. Se preparan en cajas Petri de dimensiones 60x15 mm, posteriormente, se vertió el medio de cultivo en las cajas y se procedió a extenderlo uniformemente sobre la superficie de cada una. Las cajas fueron dejadas en reposo hasta alcanzar la solidificación del medio. Una vez solidificadas, las cajas Petri fueron almacenadas y resguardadas en el congelador, quedando listas para su utilización en las pruebas antibacterianas.

Preparación de inóculo.

Se prepara medio de cultivo en un vial llenando a $\frac{3}{4}$, En dicho vial, se introdujo una cantidad de bacterias, obtenida mediante un asa bacteriológica directamente de cultivos previamente

desarrollados en el laboratorio de microbiología. Es esencial resaltar que la asa se calentó al punto de estar al rojo vivo utilizando un mechero, asegurando así la eliminación de posibles contaminaciones con otras bacterias o especies biológicas durante el proceso de inoculación.

La incubación se llevó a cabo durante un periodo de 15 a 16 horas en una incubadora mantenida a una temperatura de aproximadamente 36°C. Este periodo permitió el crecimiento y desarrollo óptimo de las bacterias en el medio de cultivo.

Pruebas antibacterianas

Se procedió a la preparación del inóculo en diversas diluciones, establecidas por el laboratorio de microbiología para abordar distintas concentraciones de bacterias (1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6). Para el presente proyecto, se optó por utilizar una concentración de bacterias de 1×10^6 usando *S. aureus* y *P. aeruginosa*. La veracidad de esta concentración se confirmó midiendo su absorbancia en el rango de 300 a 600 nanómetros mediante un espectrofotómetro UV-vis. Se buscó una absorbancia de 0.1 Amstrongs, indicando que la densidad bacteriana se correspondía con la concentración deseada. Se llevaron a cabo pruebas de evaluación de la acción antibacteriana del material a intervalos de 3 y 24 horas por duplicado siguiendo la norma ASTM E-2149, usando las siguientes muestras M1=Blanco, M2=0.01%, M3=0.05% y M4=0.1% de polvos con 14 horas de molienda para S.a y P.a, y para polvos con 12 horas de molienda.

Las muestras, cortadas en dimensiones de 1x1 centímetros, fueron reticuladas a 140°C durante 4 horas en el horno. Este proceso se implementó para evitar la disolución de las muestras debido al material base (PVA), haciendo más desafiante la solubilidad.

Se llevó a cabo la preparación de cajas Petri de tres divisiones, en las cuales se dispuso papel filtro y se colocaron las muestras correspondientes. Estas cajas fueron sometidas a una exposición de 20 minutos a luz UV como parte integral del proceso de evaluación.

Al finalizar el tiempo de exposición a la luz UV, se aplicaron 500 mililitros de PBS sobre cada papel filtro utilizando una micro pipeta de 1000 µl. Este procedimiento tuvo como objetivo crear una cámara húmeda, contribuyendo así a la supervivencia de las bacterias y asegurando que su viabilidad no se vea comprometida por factores ajenos al material en evaluación.

Para la configuración de la bacteria con membrana, se adoptaron dos enfoques, ambos formando un "sándwich", donde cada muestra recibió 50 µl de bacterias aplicados con una micro pipeta de 200 µl graduada en 50 µl:

1. Portaobjetos, bacterias, membrana.
2. Membrana, bacterias, portaobjetos.
3. En el caso de la muestra de control, únicamente se colocaron bacterias y portaobjetos.

Posteriormente, las muestras se llevaron a la incubadora de acuerdo a los tiempos predeterminados para la evaluación. Al concluir cada intervalo de tiempo, las muestras fueron retiradas de la incubadora y se procedió a sembrar en los medios de cultivo. Para esto, se adicionaron 2 mililitros de PBS/Tween con el fin de separar tanto las bacterias de la muestra como la muestra del portaobjetos según las configuraciones previamente establecidas. Utilizando la micro pipeta de 200 µl graduada en 20 µl, se recolectó una muestra tomada de áreas cercanas a la membrana y al portaobjetos para asegurar su representatividad. Esta muestra se colocó sobre la placa (medio de cultivo) y se distribuyó utilizando perlas de cristal. Posteriormente, se retiraron las perlas y las placas se llevaron a incubar por 24 horas. Finalmente, se procedió al conteo de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de cada muestra y su duplicado, para su análisis en el resultado final del experimento.

RESULTADOS

Se analizaron las dos aleaciones metálicas obtenidas, mediante DRX y EDS, y se compararon para saber si la molienda fue efectiva en el sentido de que los valores iniciales se conservaron o variaron

uno con otro, además de saber cuáles son los elementos más presentes, adicionalmente se podría lograr observar posibles formaciones de compuestos intermetálicos vistos en los picos de análisis por DRX. los valores de Cu y Ti experimentan un aumento, mientras que la concentración de plata permanece significativamente reducida. Este fenómeno puede explicarse considerando que los elementos empleados en la primera muestra se encontraban en forma de polvo fino, lo que contribuyó a preservar la proporción. En contraste, en la segunda muestra, solo el Cu y el Ti fueron introducidos en forma de polvo, mientras que la Ag se incorporó en granalla. Debido a las disparidades de tamaño y a la elevada maleabilidad de la plata, esta no logró reducir su tamaño a lo largo del proceso de molienda, y solo una fracción mínima.

Con respecto al análisis por DRX, aunque la proporción no se logró conservar de manera efectiva en la segunda muestra, se observa en la gráfica como los picos más característicos de cobre aparecen con más intensidad en la segunda muestra (línea verde) que en la primera (línea azul). Esto nos indica que en la primera muestra, el cobre aumenta su tamaño de celda, es decir, está permitiendo la entrada de otros elementos con su estructura, que por lo general es más fácil unirse en estas condiciones con Ti que con Ag, esto promueve a la posible formación de compuestos intermetálicos entre Cu y Ti, esto también se puede explicar debido al tener menor contenido de Ag en la mezcla, ya que la Ag no forma este tipo de compuestos con el Cu, si no se une a este de forma mecánica mediante fracturas y soldaduras en frío. Las diferencias entre estos dos materiales fueron examinadas en el contexto de un estudio de catálisis utilizando la química de clic. En relación con las pruebas contra bacterias, se llevó a cabo un análisis exclusivamente con la muestra sometida a 14 horas de molienda.

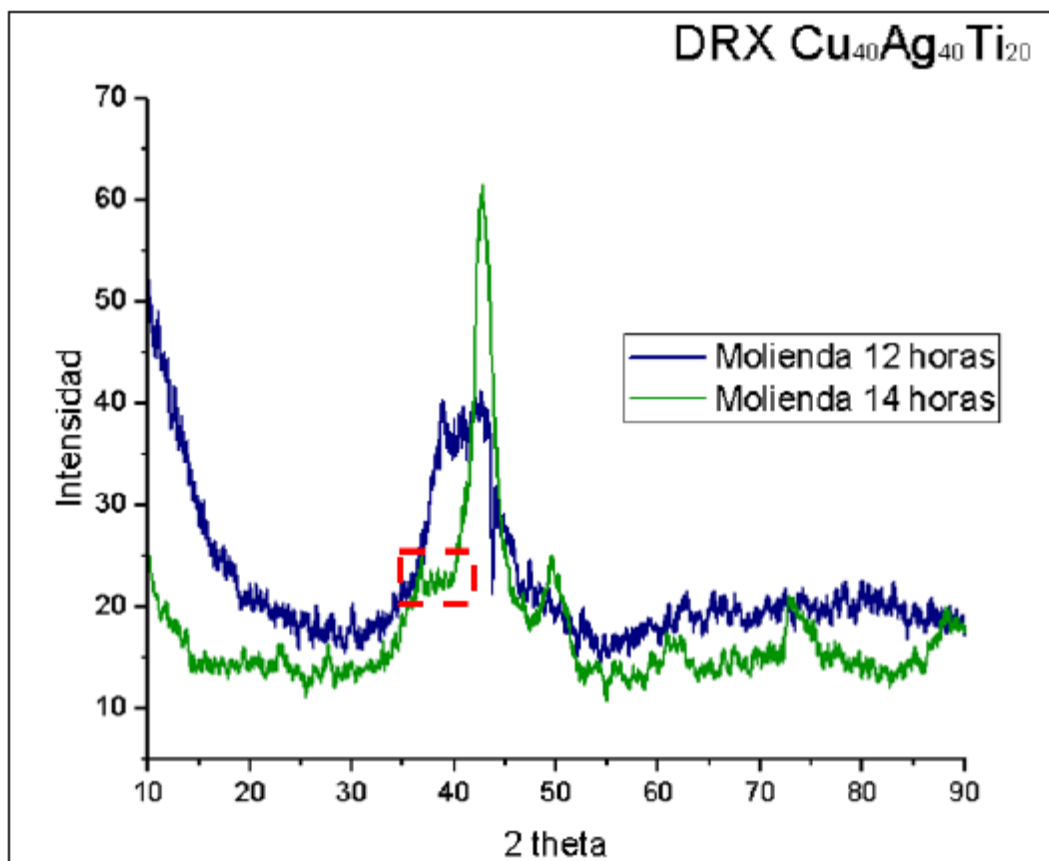


Figura 1. DRX de muestras obtenidas

La presencia de plata se evidencia en el primer pico característico de la primera muestra, aunque con baja intensidad debido a la unión mecánica con el cobre. Aunque en la segunda muestra no se distingue un pico tan característico de la plata como en la primera, en los picos consecuentes se pueden observar señales que corresponden a la plata y al titanio.

Dentro del recuadro rojo se visualiza una serie de picos con intensidad reducida; no obstante, al considerar su proximidad entre sí, se puede deducir que estos corresponden a los intermetálicos formados entre el cobre y el titanio.

El empleo del diagrama de fases, que representa las transformaciones y formaciones de compuestos a una temperatura de 780°C, se justifica debido a que, aunque los sistemas de este tipo han sido exhaustivamente estudiados y aplicados de manera independiente en diversas áreas que requieren alcanzar temperaturas de fusión, no se ha encontrado evidencia concluyente ni revisiones bibliográficas que aborden cómo se comportarían estos sistemas a temperaturas inferiores, incluso llegando a temperatura ambiente. El uso de esta referencia nos proporciona una herramienta visual para comprender y concebir el producto final a través de este método de síntesis, aportando una perspectiva valiosa para el diseño y la interpretación de resultados en condiciones térmicas más suaves

Microscopía electrónica de barrido y microscopía óptica

Se llevó a cabo un análisis de la morfología resultante de ambos polvos. Además, se procedió a examinar dos membranas que contenían un 0.05% de dichos polvos, con el objetivo de observar su incorporación al material de matriz y analizar la distribución homogénea en la misma. Este enfoque permitió evaluar de manera detallada la interacción y dispersión de los polvos en la matriz, proporcionando información valiosa sobre la estructura y uniformidad del compuesto resultante. A una magnificación de 100x, se evidencian distintos tamaños de partículas, y en términos generales, no se observa una morfología uniforme con tamaños de partículas idénticos. Este fenómeno se atribuye a la teoría del Aleado Mecánico previamente expuesta. Conforme se producen fracturas y soldaduras en frío, los tamaños de las partículas varían en función de la frecuencia de colisiones entre ellas, además de los diferentes comportamientos mecánicos de los elementos empleados, lo que igual implica ciertos aspectos a considerar al terminar la molienda

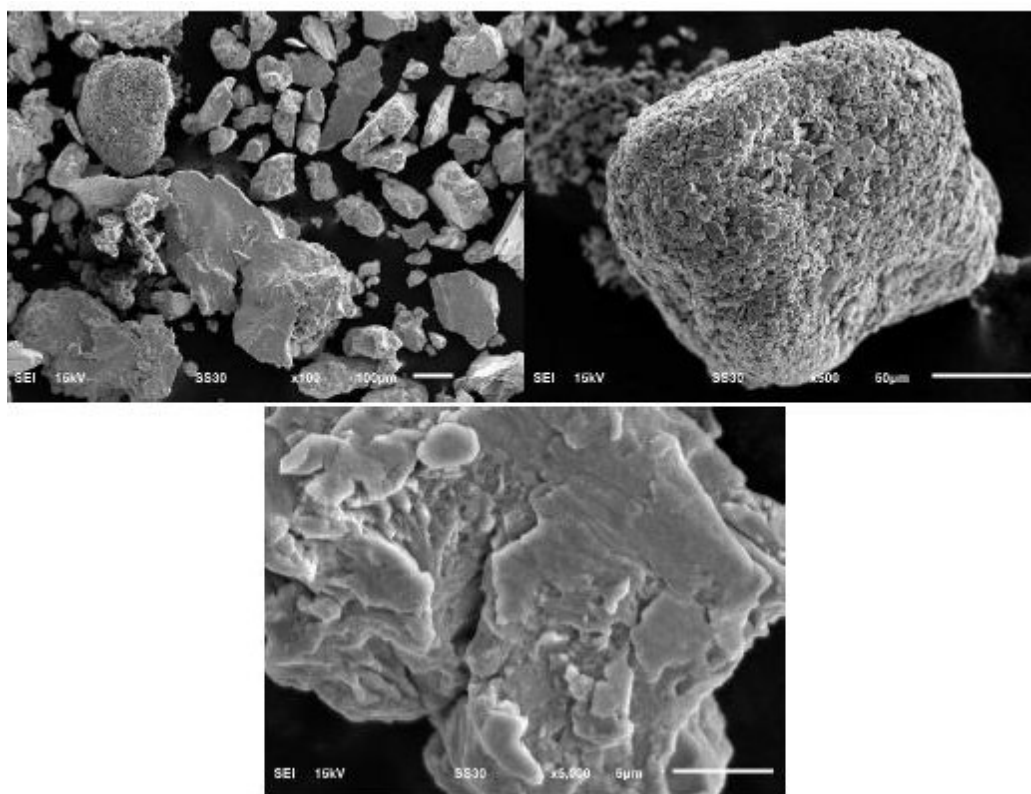


Figura 2. Micrografías SEM de primera molienda (12hrs) a 100x, 500x y 5000x

En un análisis más detallado a una magnificación de 500x, se observa que la superficie presenta cierta porosidad debido a la unión de las partículas metálicas entre sí. A medida que avanza el proceso, la deformación y la soldadura progresiva eliminan estas imperfecciones superficiales de las partículas, dando lugar a superficies más regulares y, por ende, una mejor soldadura, como se observa a una magnificación de 5000x. Este análisis microscópico revela la dinámica compleja y evolutiva de las partículas durante el proceso de Aleado Mecánico, destacando la influencia de las colisiones y la soldadura en la configuración final de las partículas y, por ende, en las propiedades del material resultante. Este comportamiento se asemeja en la segunda molienda de 14 horas, tal como se muestra en la siguiente figura 3.

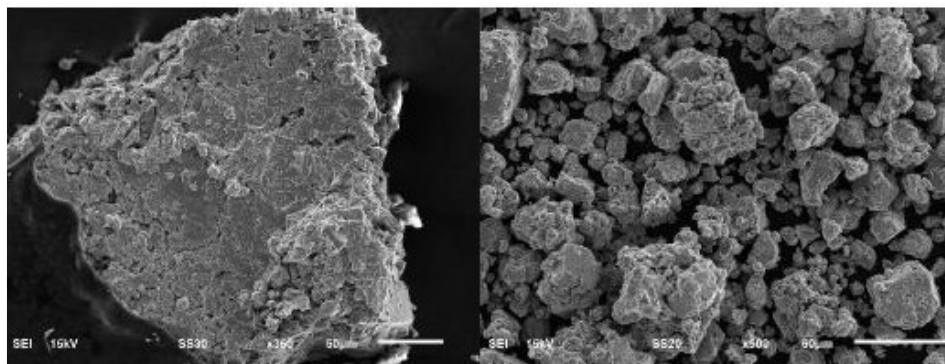


Figura 3. Micrografía SEM de segunda molienda (14hrs) a 350x y 500x

FT- IR de pruebas catalíticas.

Se llevaron a cabo análisis mediante espectroscopía FT-IR en dos muestras de ambas aleaciones (partículas y PVA al 2% con 0.1% de aleación), evaluando la transmitancia en un rango de 4000 a 400 Número de onda/cm-1, y comparándolas con el espectro de agua pura. Sin embargo, los resultados no mostraron bandas características de triazol ni de enlaces esperados como N=N o C-N. Esto podría atribuirse a dos posibles razones.

La primera, la cantidad limitada de material reactivo utilizada en los experimentos, combinada con el tiempo de prueba, podría resultar en una cantidad insuficiente de producto final para generar señales claras o intensas en los espectros. Una solución a este problema sería realizar una nueva prueba con una mayor cantidad de reactivos, siguiendo la estequiometría de la reacción. Además, se podría optimizar el proceso de lavado para garantizar la detección de posibles señales relacionadas con la presencia de alquino en los espectros obtenidos.

La segunda posibilidad es que la reacción no se haya llevado a cabo de manera adecuada o que haya sido prácticamente nula. Sin embargo, considerando las débiles, pero presentes señales, podría inferirse que el problema principal radica en la cantidad limitada de material utilizado.

Al señalar estas señales, las más destacadas se ubican en un rango de 2000 a 2100 cm-1, las cuales, según el estudio de Pacheco Gómez, J. O., et al., de 2020 titulado "Síntesis de triazol, a partir de alofuransa y teobromina", corresponden a enlaces N3. En relación con este trabajo, esto sugiere que la reacción se lleva a cabo, evidenciada por la separación del Na de estos nitrógenos. Además, entre 800 y 900 cm-1, según el estudio de Pacheco Gómez, deberían encontrarse enlaces de tipo C-N, indicando la unión del alquino con los enlaces de N de la azida. Se ha señalado que la reactividad del reactivo de azida en CuAAC depende tanto de las propiedades electrónicas del sustituyente como de la congestión estérica alrededor del grupo reactivo. En la química de coordinación, las azidas orgánicas suelen comportarse como donantes neutros de nitrógeno a través de su átomo de nitrógeno N1. Este comportamiento se propone también para la adición de azida al acetileno activado en el mecanismo CuAAC.

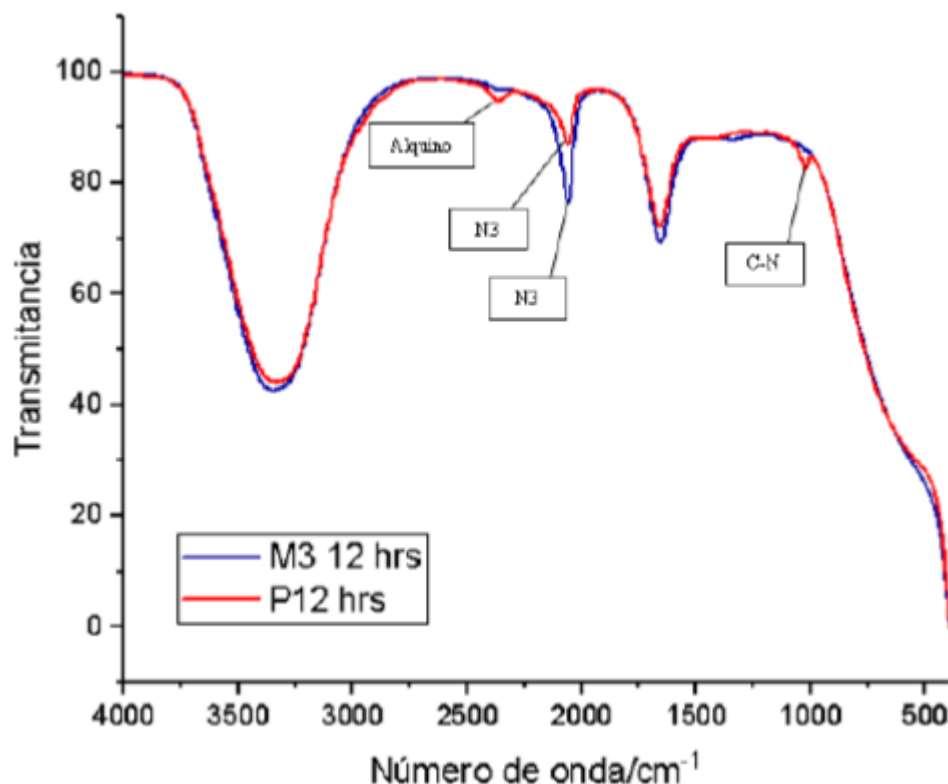


Figura 4. Espectro de FTIR

Es evidente que se ha producido una reacción de cicloadición azida-alquino catalizada tanto por el cobre como por la plata. Según varias fuentes literarias, ambos elementos generan selectivamente 1,4-triazol sustituido. Además, el ácido ascórbico, aunque facilita la conversión del cobre de Cu(II) a Cu(I), no influye en los estados de oxidación de la plata y, tomando en cuenta además que tenemos un material con menos contenido de esta. Por lo tanto, la exploración de otro agente reductor que funcione eficazmente para ambos metales se consideró como una alternativa para evaluar de manera más precisa esta forma de catálisis con estos elementos

Pruebas de actividad antibacteriana

Se evidencia que las membranas son altamente efectivas incluso a concentraciones bajas, mostrando una actividad antibacteriana superior al 95%, excepto el material en blanco. Este fenómeno se atribuye a la liberación de iones metálicos de la aleación, particularmente cobre y plata, que son solubles. Esta liberación facilita la entrada de iones de carga positiva en la célula bacteriana, generando daño al ADN mediante la producción de especies reactivas de oxígeno. Además, el titanio bloquea la entrada de nutrientes a la bacteria al interactuar con la membrana lipídica, resultando en una combinación letal para la bacteria. En contraste, las membranas blancas que solo contienen PVA al 2% muestran una menor actividad antimicrobiana. Además, se observa que la actividad antibacteriana de las membranas disminuye en un periodo prolongado de exposición contra la bacteria *S. aureus*, lo cual se puede asociar a la mayor susceptibilidad de esta bacteria al PVA, según reportes previos

En el caso de la bacteria *P. aeruginosa*, se observa una baja actividad en la membrana blanca en comparación con las membranas que contienen la aleación. A una concentración del 0.05% de aleación, se nota que un mayor contacto entre la bacteria y la membrana resulta en un mayor daño, con inhibición del crecimiento bacteriano que alcanza su punto máximo de actividad antibacteriana a las 24 horas, superando el 95%.

Para las otras dos concentraciones de aleación, se evidencia efectividad en todos los tiempos de exposición. Esto sugiere que, en el primer contacto, la mayoría de las bacterias experimentan muerte celular, ya que la actividad antibacteriana se mantiene por encima del 95% en ambos intervalos de tiempo. Este fenómeno se atribuye a la liberación de iones que inducen la muerte celular bacteriana. Además, estudios previos han indicado que la mayoría de las bacterias son más susceptibles al titanio debido a su toxicidad, y la combinación con otros metales puede alterar la morfología bacteriana, impidiendo la reducción de la actividad metabólica debido a la alta producción de especies reactivas de oxígeno

CONCLUSIONES

La actividad catalítica se evaluó con análisis de FTIR que indica cualitativamente que el recubrimiento cataliza la formación del triazol.

Los recubrimientos mostraron una actividad antimicrobiana hasta del 95% ante las dos cepas examinadas, lo cual significa que el material compuesto sí actúa como una superficie antibacterial.

La estrategia de membranas bifuncionales se revela prometedora en contextos catalíticos y antimicrobianos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Li, M. et.al Toward a Molecular Understanding of the Antibacterial Mechanism of Copper-bearing Titanium Alloys against *Staphylococcus aureus*. *Adv. Healthcare Mater.*, 2016, 5, 557-566.
2. Zhang, Z. et. al. A combination therapy for androgenic alopecia based on quercetin and zinc/copper dual-doped mesoporous silica nanocomposite microneedle patch. *Bioactive Materials*, 2023, 24, 81-95.
3. Klein, K.; Loza, K.; Heggen, M.; Epple, M. An Efficient Method for Covalent Surface Functionalization of Ultrasmall Metallic Nanoparticles by Surface Azidation Followed by Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (Click Chemistry). *ChemNanoMat*, 2021, 7, 12,1330-1339.
4. Hamzavi, S.F.; Gerivani, S.; Saeedi, S.; Naghdipari, K.; Shahverdizadeh, G. Preparation and characterization of a novel spherical cellulose-copper(II) oxide composite particles: as a heterogeneous catalyst for the click reaction. *Molecular Diversity*, 2020, 24, 1, 201-209.
5. Villareal Valdiviezo, G.; Múzquiz Ramos, E.; Farías cepeda, L.; Aplicaciones médicas de biopolímeros. *CienciAcierta*, 2020, 63.
6. Saleh, A.; Gupta, K. 2016. *Nanomaterial and Polymer Membranes*. Elsevier.
7. Paiva, E.; de Moraes, M.; de Godio, F.; Bebpu, M. Multilayer Biopolymer Membranes Containing Copper for Antibacterial Application, *J. App. Pol. Sc.*, 2012, 126, S1, E17-E24.
8. Jankovic, D.; Virant, M.; Gazvoda, M. Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition of Hydrazoic Acid Formed in situ from Sodium Azide Affords 4-Monosubstituted-1,2,3-Triazoles. *J. Org. Chem.*, 2022, 87, 6, 4018-4028.

ORGANOCATÁLISIS ASIMÉTRICA EN LA SÍNTESIS DE TETRAHIDROCARBAZOLES QUIRALES (THC) Y SU ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA

Clarisa Villegas Gómez, David Cruz Cruz.

Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato,
Noria Alta S/N Guanajuato, Gto. 36050, México.
clarisa.villegas@ugto.mx

RESUMEN

Los tetrahidrocarbazoles quirales (THC) son el grupo mas amplio y conocido de alcaloides del tipo indólico de origen natural. Debido a su actividad biológica y a su atractivo estructural, se ha dado importancia a descubrir nuevas vías sintéticas eficientes para la obtención de nuevos núcleos de THC quirales, esto con el fin de poder desarrollar estructuras novedosas de importancia farmacéutica. El descubrimiento de nuevos THC ha venido de la mano con el descubrimiento de nuevas actividades biológicas asociadas a este núcleo. Por otro lado, en los últimos años, la depresión, la ansiedad y trastornos del estado de ánimo han sido causa de morbilidad en países desarrollados, debido a esto, surge el interés en la investigación por el descubrimiento de nuevos fármacos que poseen actividad ansiolítica, sin toxicidad, dependencia y efecto de abstinencia. Con base en esto, el presente trabajo, muestra el primer estudio sobre la actividad ansiolítica de novedosos THC quirales. Estos nuevos compuestos se prepararon mediante una estrategia organocatalítica a través del modo de activación trienamina. Las especies de *orto*-quinodimetano, formadas *in situ* por la condensación del 2-metilindol acrilaldehído *N*-protegido con el catalizador derivado de éter de diarilsililprolinol estéricamente impedido, participan fácilmente en una reacción de cicloadición de Diels-Alder con el etilcianofenilacrilato, esto, con buenos rendimientos y excelente estereoselectividad.

Los THC fueron evaluados como ansiolíticos donde, las moléculas administradas por vía oral 1 h antes del experimento, con ratones Balb/c en la prueba del cilindro exploratorio, mostraron que se redujo considerablemente el comportamiento (similar a ansiedad) en un modelo dependiente de la dosis. Los E_{max} fueron: 72% (25 mg/kg, 1) y 83.4% (25 mg/kg, 2). Estos efectos fueron similares en comparación con los encontrados con 1.5 mg/kg de CNZ (clonazepam). Los valores para la DE_{50} fueron: 3.3 mg/kg y 7.7 mg/kg.

Aunque las acciones de tipo ansiolítico de estas dos moléculas no fueron comparables a los encontrados con CNZ, estas no afectaron de manera significativa la coordinación motora en ratones con dosis inferiores a 25 mg/kg.

Se desarrolló una metodología útil, rápida y eficiente para la síntesis enantioselectiva de THC's mediante el uso del modo de activación trienamina en organocatálisis. En la actividad biológica, nuestros resultados mostraron que las moléculas sintetizadas poseen propiedades ansiolíticas, siendo estas un referente para el descubrimiento de nuevos fármacos.

INTRODUCCIÓN

Los tetrahidrocarbazoles quirales (THC) son el grupo más amplio y conocido de alcaloides del tipo indólico de origen natural.¹ Debido a su actividad biológica y a su atractivo estructural, se ha dado importancia a descubrir nuevas vías sintéticas eficientes para la obtención de nuevos núcleos de THC quirales, esto con el fin de poder desarrollar novedosas estructuras de importancia farmacéutica.² Durante las últimas dos décadas, el descubrimiento de nuevos THC quirales ha venido de la mano con el descubrimiento de nuevas actividades biológicas asociadas a este núcleo, así como, con alcaloides derivados de THC utilizados desde tiempos ancestrales, para la cura de diversas enfermedades.³ Por ejemplo, la Dasycarpidona (I) y la Uleina (II) poseen actividad antiplasmodial *in vitro* contra *P. falciparum* y *T. Cruzi*.^{3,4} Del mismo modo, un nuevo fármaco sintético con núcleo de THC es el (*R*)-Ramatroban (III), utilizado en el tratamiento de la rinitis alérgica, asma y enfermedades tanto coronarias como arteriales.⁵ Por otro lado, la Fischambiguina B (IV)

posee una importante actividad inhibitoria contra *M. Tuberculosis*.⁶ Sin embargo, es de importancia mencionar que a pesar de que otros fármacos sintéticos tienen una estructura relativamente simple, tienen un potencial uso debido a que poseen un núcleo de THC, tal es el caso del ácido 1-etil-8-*n*-propil-1,2,3,4-tetrahydrocarbazol acético (**V**) el cual se descubrió como un nuevo agente antiinflamatorio, del mismo modo, el ácido 6-cloro-1,2,3,4-tetrahydrocarbazol-2-carboxílico (**VI**) fue descubierto como clínicamente activo en el tratamiento de la gota aguda.⁷ (Figura 1).

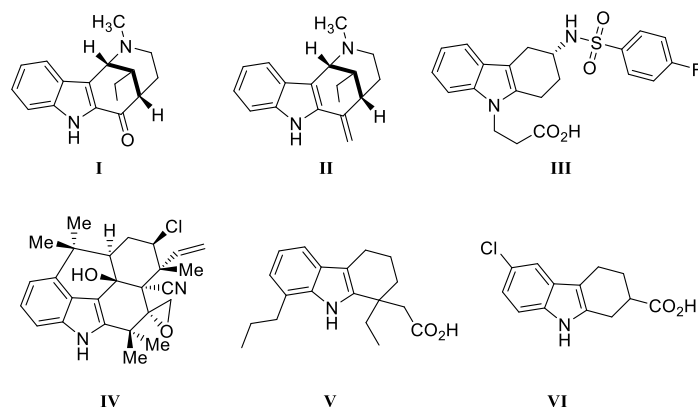
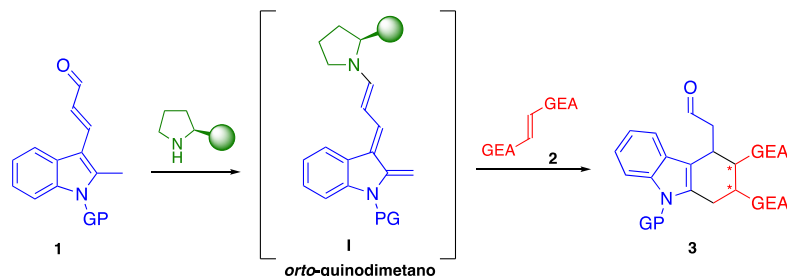
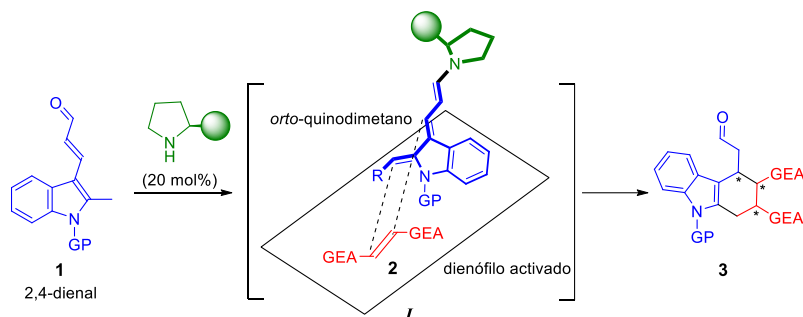


Figura 1. Ejemplos de THC con potente actividad biológica.

Desde los últimos 20 años, se ha observado que la depresión, la ansiedad y los trastornos del estado de ánimo han sido causa de morbilidad en países desarrollados. Debido a esto, surge el interés en la investigación para el descubrimiento de nuevos fármacos o medicamentos que posean actividad ansiolítica, sin toxicidad, dependencia y/o efecto de abstinencia.⁸ Actualmente, se han reportado una serie de fármacos con este tipo de actividad, cabe señalar que se sigue en la búsqueda de nuevos compuestos y para ello los alcaloides de THC quirales son candidatos farmacológicamente importantes. Como consecuencia, durante las últimas décadas, los químicos orgánicos están centrando su atención hacia nuevas metodologías para sintetizar novedosos núcleos de THC. En este sentido, recientemente se ha desarrollado una nueva estrategia para la síntesis estereoselectiva de estructuras privilegiadas, la cual está enfocada principalmente en la catálisis vía modo de activación trienamina.⁹ De hecho, durante su conceptualización, se desarrolló una nueva metodología para sintetizar THC quirales mediante el uso de 2- metilindol acrilaldehído **1** (2,4-dienales) (Esquema 1).¹⁰ En esta estrategia, la condensación de una amina secundaria quiral con el aldehído **1** permite la formación del intermediario *orto*-quinodimetano **I**, que es una especie de trienamina activa con la capacidad de reaccionar con una variedad de dienófilos **2** y de ese modo, sintetizar diferentes derivados quirales de THC **3** (Esquema 2). Recientemente, diversas transformaciones asimétricas han sido reportadas a través de esta estrategia, así como, mediante la modificación de metodologías previas, sin embargo, cabe mencionar que estructuras con núcleos de THC quirales no han sido estudiados con anterioridad.¹¹



Esquema 1. Concepto general de síntesis de THC quirales via catálisis trienamina.



Esquema 2. Concepto general mecanístico en la síntesis de THC quirales via catálisis trienamina.

El propósito de este estudio es sintetizar nuevos THC quirales, que puedan ser importantes desde el punto de vista biológico y farmacológico, y que puedan considerarse como un miembro de los alcaloides del tipo indólico. De este modo, en el presente trabajo, reportamos la síntesis asimétrica de dos nuevos THC quirales, de una manera eficiente a través de una reacción de cicloadición de Diels-Alder. Adicionalmente, los THC resultantes mostraron una actividad biológica destacada, la cual contribuye de manera significativa en el campo medicinal.

PARTE EXPERIMENTAL

Síntesis de los compuestos 8a y 8b.

Los solventes utilizados en la elaboración de las materias primas y las reacciones fueron suministrados por Sigma-Aldrich y KARAL y se usaron sin ninguna purificación adicional. La reacción de cicloadición [4+2] a través del modo de activación trienamina, se llevó a cabo en viales de 4 mL, agitando a 70 °C con una barra magnética en ausencia de atmósfera inerte.

Los espectros de RMN se adquirieron en un espectrómetro Bruker 500, funcionando a 500 y 126 MHz para ^1H y ^{13}C , respectivamente. Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en ppm en relación con las señales del disolvente residual (CDCl_3 , 7.26 ppm para ^1H NMR y 77.00 ppm para ^{13}C NMR). Las siguientes abreviaturas se utilizan para describir los patrones de picos tal como corresponde para: *s* (singulete), *d* (doblete), *t* (triplete), *m* (multiplete).

La cromatografía en capa fina (CCF) se realizó utilizando placas de aluminio recubiertas con sílica gel y con indicador de fluorescencia a 254 nm. La purificación de los productos de reacción se llevó a cabo mediante cromatografía flash utilizando gel de sílice 60 y como eluyente diferentes solventes orgánicos a diferentes polaridades.

Los espectros de masas se midieron en un espectrómetro de masas maXis impact ESI-QTOF-MS (Bruker Daltonics)

Los excesos enantioméricos (ee) se midieron en un equipo HPLC integrado i-Series Plus con detector UV de 190 a 700 nm y unidad de desgasificación de 5 líneas y pulsación de 0.1 MPa con una precisión de caudal <0.06 %.

Se usaron reactivos y catalizadores disponibles comercialmente y distribuidos por Sigma-Aldrich, sin purificación adicional. Las muestras racémicas se prepararon a partir de una mezcla 1:1 de compuestos obtenidos usando catalizador (*S*) o (*R*), respectivamente.

El dienófilo **5** se preparó mediante el procedimiento descrito en la literatura.¹²

Pruebas de actividad biológica.

Animales.

Los ratones Balb/c se obtuvieron del bioterio de la División de Ciencias Naturales y Exactas (Universidad de Guanajuato, México) y se alojaron en jaulas con alimento y agua *ad libitum*. El

protocolo experimental fue aprobado por el Comité Institucional de Bioética en Investigación de la Universidad de Guanajuato (CIBIUG-P30-2019) previo al inicio de todos los experimentos. Tratamiento Farmacológico.

Los ratones se dividieron en cinco grupos ($n=8$, cada grupo) de la siguiente manera: el grupo I se seleccionó como grupo vehículo (solución salina), el grupo II recibió 1.5 mg/kg (p.o.) de clonazepam (CNZ), los grupos III-VI, son los administrados con los compuestos **8a** y **8b** (0.1, 1, 10 y 25 mg/kg p.o.). Los ratones recibieron el tratamiento 1 hora antes de cada experimento.

Prueba del Cilindro Exploratorio.

Los animales se colocaron individualmente en cilindros de acrílico (45 cm de altura por 20 cm de diámetro y con pared de 3 mm), colocados verticalmente, en una habitación libre de ruido. La cantidad de elevaciones se registró en video durante 5 min.¹³

En pruebas adicionales, los ratones fueron pre-tratados con 0.7 mg/kg de bicuculina (un antagonista del receptor GABAA), 0.5 mg/kg prazosin (bloqueante de los receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos), o 1 mg/kg ketanserina (bloqueante del receptor 5-HT₂) 15 min antes de la administración de las moléculas **8a** y **8b** (ED₅₀). Después de 45 min, se llevó a cabo la prueba descrita anteriormente.

Prueba Rotarod.

Para el presente experimento se eligieron ratones capaces de caminar sobre el rotarod (Panlab), ajustado a 4 rpm, durante 30 s. Los ratones fueron preentrenados 5 días antes del experimento. El tiempo empleado (seg) en rotarod se registró a los 60 y 120 min después de la administración del tratamiento.¹⁴

Análisis Estadístico.

Los resultados se expresan como la media $\pm$ error estándar de la media (SEM). Los resultados se analizaron mediante la prueba ANOVA y la prueba *post hoc* de Dunnett. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Síntesis enantioselectiva de THC quirales.

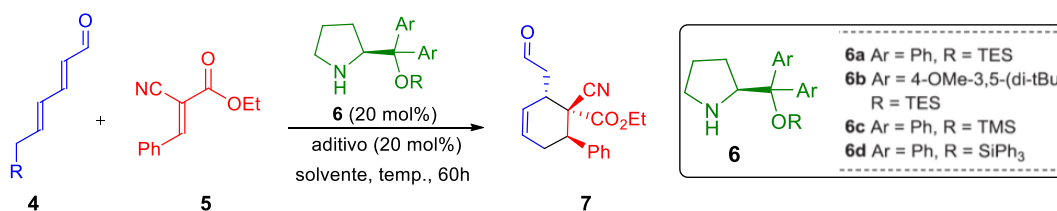
El presente trabajo inició con el análisis del primer reporte sobre la activación trienamina realizado por el grupo de investigación de Jørgensen y colaboradores.¹² Siguiendo esta estrategia, en el presente trabajo, se inició evaluando la reacción del 2,4-dienal **4** que al condensarse con una amina quiral secundaria **6a-b** formó el correspondiente intermediario trienamina, el cual, a través de una reacción de cicloadición de Diels-Alder con etilcianofenilacrilato **5** se obtuvo la formación del cicloaducto esperado **7** (Tabla 1).

Tomando en cuenta esta información, realizamos otra serie de reacciones mejorando las condiciones previamente mencionadas. Se llevó a cabo la misma reacción usando diferentes disolventes, con o sin aditivos y variando la temperatura (temperatura ambiente, 50 y 70 °C) (Tabla 1, entradas 1 a 4). Los resultados indicaron que las mejores condiciones fueron usando tolueno como solvente, sin aditivo, y a una temperatura de 70 °C. Del mismo modo, se realizó un seguimiento con diferentes organocatalizadores (Tabla 1, **6a-d**), encontrando que con el uso del catalizador de Hayashi-Jørgensen **6c**, la estereoselectividad mejoró (Tabla 1, entrada 3). Sin embargo, con el uso del catalizador **6d**, el cual está estéricamente más impedido, los resultados con respecto a la estereoselectividad fueron mucho mejores (98% ee y 96:4 dr), concluyendo que estas condiciones (Tabla 1, entrada 4) eran las más adecuadas para reproducir y verificar su viabilidad frente a otros sustratos, tal es el caso, que para el 2-metil indol acrilaldehído *N*-protegido **1**, se obtuvo de manera exitosa el cicloaducto **8** (Esquema 3).

Por lo tanto, bajo estas condiciones, se realizó la síntesis de dos estructuras de THC con diferentes grupos *N*-protectores, Boc (THC-**8a**) y bencilo (THC-**8b**) con rendimientos del 79 y 90 % y ee del 98 y 93 % respectivamente (Esquema 3).

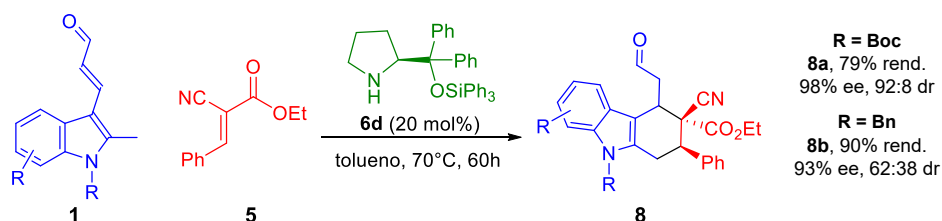
Tomando en cuenta estos resultados, donde, se logró satisfactoriamente la síntesis de dos THC quirales con excelentes estereoselectividades, se decidió realizar las pruebas de actividad biológica, tomando en cuenta que este tipo de núcleos de indol presentan buena actividad.

Tabla 1. Optimización de las condiciones de reacción.



Entrada	Cat.	T (°C)	Solvente	Aditivo	Rendimientos (%) ^d	dr	ee (%)
1 ^a	6a	50	CHCl ₃	oFBA	81	86:14	89
2 ^a	6b	50	CHCl ₃	oFBA	87	80:20	86
3 ^b	6c	70	tolueno	-	75	82:18 ^c	93 ^d
4 ^b	6d	70	tolueno	-	73	96:4 ^c	98 ^d

^aCondiciones previamente reportadas. ^bLas reacciones se llevaron a cabo en escala de 0.1 mmol de dienófilo, 0.2 mmol de aldehído y 0.02 mmol de catalizador por 60 h. ^cLos valores fueron calculados por ¹H RMN. ^dDeterminado con el producto purificado por HPLC en fase estacionaria quiral.



Esquema 3. Síntesis de THC quirales **8a** y **8b** vía catálisis trienamina.

Pruebas de actividad ansiolítica y efectos de coordinación motora.

Los hallazgos mostraron que las moléculas de THC, administradas por vía oral 1 h antes del experimento, con ratones Balb/c en la prueba exploratoria del cilindro (el cual se utiliza comúnmente para la detección de fármacos con acciones ansiogénicas o ansiolíticas en roedores), mostraron que se redujo considerablemente el comportamiento (similar al de la ansiedad) en un modelo dependiente de la dosis, (Figura 2A y B). Los E_{max} fueron: 72% (25 mg/kg, **8a**) y 83.4% (25 mg/kg, **8b**). Estos efectos fueron similares en comparación con los encontrados con 1,5 mg/kg de CNZ. (Figura 2 A y B). Los valores para la DE₅₀ fueron: 3.3 mg/kg (**8a**) y 7.7 mg/kg (**8b**). Por otro lado, las moléculas **8a** y **8b** mostraron una ligera disminución en el tiempo para el experimento rotarod, en una relación dosis-respuesta. Sin embargo, este efecto no fue significativo en comparación con el vehículo (Figura 2C), solo la molécula **8b** (100 mg/kg) (p < 0.05) redujo significativamente el tiempo en el rotarod a los 60 min-post-tratamiento. Sin embargo, esto fue un efecto parcial ya que los ratones recuperaron su coordinación motora 60 min más tarde (Figura 2D).

Aunque las acciones de tipo ansiolítico de estas dos moléculas no fueron comparables a los encontrados con CNZ, estas dos moléculas no afectaron de manera significativa la coordinación motora en ratones con dosis inferiores a 25 mg/kg (Figura 2).

El pretratamiento con 0.7 mg/kg de bicuculina, abolió parcialmente los efectos ansiolíticos de las moléculas **8a** y **8b**, mientras que el pretratamiento con ketanserina o yohimbina (bloqueante de los

receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos) no cambiaron los efectos del tipo ansiolítico de las moléculas **8a** y **8b** (Figura 3). Estos hallazgos sugieren la participación parcial de los sistemas GABAérgicos en las acciones de tipo ansiolítico de las moléculas **8a** y **8b**. Sin embargo, otros estudios confirmarán esta hipótesis.

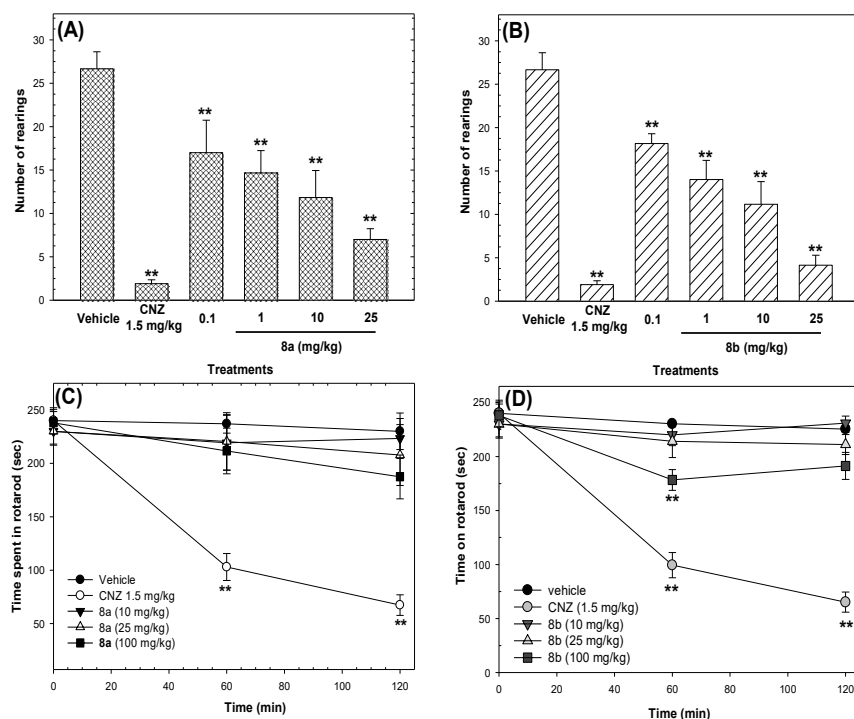


Figura 2. Efectos locomotores y de tipo ansiolítico de las moléculas **8a** y **8b**. Los efectos ansiolíticos de **8a** y **8b** (0.1-25 mg/kg p.o.) se evaluaron mediante la prueba exploratoria del cilindro, registrando el número de lecturas (A y B). Los efectos de **8a** y **8b** (10-100 mg/kg) sobre la locomoción en ratones se evaluaron con la prueba rotarod (C y D). A grupos adicionales se les administró 1.5 mg/kg de clonazepam (CNZ) como control positivo o vehículo (solución salina). Los datos son demostrativos de dos experimentos paralelos ($n = 8$). Los resultados representan la media $\pm$ error estándar (SEM). ** representa $p \leq 0.05$ en comparación con el grupo vehículo, utilizando ANOVA y prueba post hoc de Dunnett.

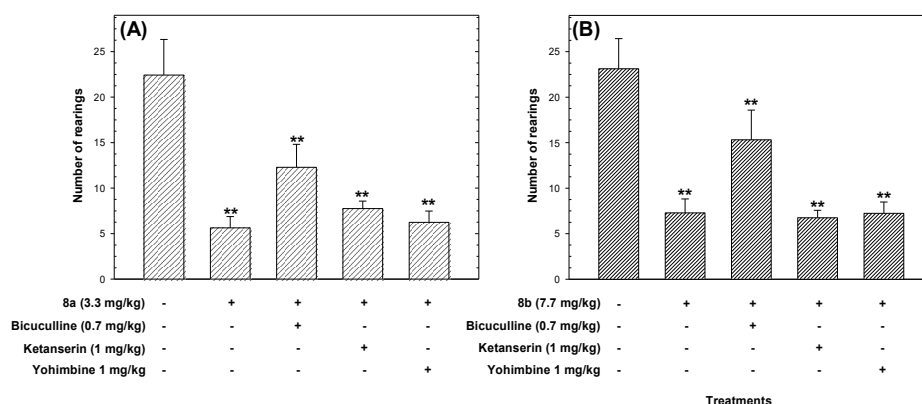


Figura 3. Posible mecanismo de acción de los efectos de tipo ansiolítico de las moléculas **8a** (A) y **8b** (B) en la prueba exploratoria del cilindro durante una exposición de 5 min. Las barras representan valores medios ($\pm$ SEM) para el grupo experimental. ** $P < 0.05$, en comparación con el grupo de vehículos.

CONCLUSIONES

Se desarrolló una metodología útil, rápida y eficiente para la síntesis enantioselectiva de dos THC's quirales mediante el uso del modo de activación trienamina en organocatálisis.

Por el lado, con respecto a la actividad biológica, nuestros resultados mostraron que las moléculas sintetizadas de THC quirales poseen propiedades ansiolíticas, siendo estas un referente en el área para el desarrollo o descubrimiento de nuevos fármacos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias al apoyo otorgado por CONAHCYT. Proyecto apoyado por Ciencia Básica y de Frontera 2023-2024 (proyecto: CBF2023-2024-266) y DAIP-UG (proyecto CIIC: 150/2024 y 090/2024).

BIBLIOGRAFÍA

1. a) J. Bonjoch, D. Sole, "Synthesis of Strychnine", Chem. Rev. Vol.100(9), 2000, pp. 3455-3482. b) H. J. Knölker, K. R. Reddy, "Isolation and Synthesis of Biologically Active Carbazole Alkaloids", Chem. Rev. Vol. 102(11), 2002, pp. 4303-4428.
2. a) F. Tan, H.-G. Cheng, "Catalytic asymmetric synthesis of tetrahydrocarbazoles", Chem. Comm. Vol. 55, 2019, pp. 6151-6164. b) M. M. Heravi, S. Rohani, V. Zadsirjan, "Fischer indole synthesis applied to the total synthesis of natural products", RSC Adv. Vol. 7, 2017, pp. 52852-52887.
3. M. Saito, M. Kawamura, K. Hiroya, K. Ogasawara, "First enantiocontrolled syntheses of (+)-uleine and (+)-dasycarpidone", Chem. Comm. Vol. 8, 1997, pp. 765-766.
4. M. Amat, M. Pérez, N. Llor, M. Martinelli, E. Molins, J. Bosch, "Enantioselective formal synthesis of uleine alkaloids from phenylglycinol-derived bicyclic lactams", Chem. Comm. Vol. 14, 2004, pp.1602-1603.
5. a) T. Ishizuka, T. Matsui, Y. Okamoto, A. Ohta, M. Scichijo, "Ramatroban (BAY u 3405): A Novel Dual Antagonist of TXA₂ Receptor and CRTh₂, a Newly Identified Prostaglandin D₂ Receptor", Cardiovasc. Drug Rev. Vol. 22, 2004, pp. 71-90. b) E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, "Asymmetric Chemoenzymatic Synthesis of Ramatroban Using Lipases and Oxidoreductases", J. Org. Chem. Vol. 77, 2012, pp. 4842-4848.
6. S. Mo, A. Kronic, B. D. Santarsiero, S. G. Franzblau, J. Orjala, "Hapalindole-related alkaloids from the cultured cyanobacterium *Fischerella ambigua*", Phytochem. Vol. 71, 2010, pp. 2116-2123.
7. T. T. T. Thuy, N. M. Cuong, T. Q. Toan, N. N. Thang, B. H. Tai, N. X. Nhiem, H.-J. Hong, S. Kim, S. Legoupy, Y. S. Koh, Y. H. Kim, "Synthesis of novel derivatives of murrayafoline A and their inhibitory effect on LPS-stimulated production of pro- inflammatory cytokines in bone marrow-derived dendritic cells", Arch. Pharmacol. Res. Vol. 36, 2013, pp. 832-839.
8. N. Sedláčková, V. Ponechalová, E. Ujházy, M. Dubovický, M. Mach, "Anxiolytic activity of pyridoindole derivatives SMe1EC2 and SMe1M2: behavioral analysis using rat model", Intersdiscip. Toxicol. Vol. 4, 2011, pp. 211-215.
9. T. J. Pawar, H. Jiang, M. A. Vázquez, C. Villegas, D. C. Cruz, "Aminocatalytic Privileged Diversity-Oriented Synthesis (ApDOS): An Efficient Strategy to Populate Relevant Chemical Spaces", Eur. J. Org. Chem. Vol. 2018 (16), 2018, pp. 1835-1851.
10. a) Y. Liu, M. Nappi, E. Arceo, S. Vera, P. Melchiorre, "Asymmetric Catalysis of Diels–Alder Reactions within Situ Generated Heterocyclic *ortho*-Quinodimethanes", J. Am. Chem. Soc. Vol. 133, 2011, pp. 15212-15218. b) Y. Liu, M. Nappi, C. E. Escudero-Adán, P. Melchiorre,

- "Multicatalytic Asymmetric Synthesis of Complex Tetrahydrocarbazoles via a Diels–Alder/Benzoin Reaction Sequence", *Org. Lett.* Vol. 14, 2012, pp. 1310-1313.
11. a) H. Jiang, C. D. Cruz, Y. Li, V. H. Lauridsen, K. A. Jørgensen, "Asymmetric Organocatalytic Thio-Diels–Alder Reactions via Trienamine Catalysis", *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 135, 2013, pp. 5200-5297. b) F. Portailer, F. Bourdreux, J. Marrot, X. Moreau, V. Coeffard, C. Greck, "Merging Oxidative Dearomatization and Aminocatalysis: One-Pot Enantioselective Synthesis of Tricyclic Architectures", *Org. Lett.* Vol. 15, 2013, pp. 5642-5645. c) C. Villegas, C. D. Cruz, R. Mose, K. A. Jørgensen, "Organocatalytic cascade reactions: diversity-oriented synthesis for the construction of hydroisoquinoline scaffolds", *Chem. Comm.* Vol. 50, 2014, pp. 6035-6038.
 12. Z.-J. Jia, H. Jiang, J. Li, B. Gschwend, L. Qing-Zhu, Y. Xian, J. Grouleff, C. Ying-Chun, K. A. Jørgensen, "Trienamines in Asymmetric Organocatalysis: Diels–Alder and Tandem Reactions", *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 133, 2011, pp. 5053-5061.
 13. I. Oliva, M. E. González-Trujano, J. Arrieta, R. Enciso-Rodríguez, A. Navarrete, "Neuropharmacological profile of hydroalcohol extract of *Valeriana edulis* ssp. procera roots in mice", *Phytother. Res.* Vol. 18, 2004, pp. 290-296.
 14. L. L. Coughenour, J. R. Mclean, R. B. Parker, "A new device for the rapid measurement of impaired motor function in mice", *Pharmacol. Biochem. Behav.* Vol. 6, 1977, pp. 351-353.

VALIDACIÓN PARCIAL DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE β -CARIOFILENO EN ACEITE ESENCIAL DE PIMIENTA NEGRA (*PIPER NIGRUM*) MEDIANTE HPLC

Frida Suhey Gámez Rodríguez, Liliana García Martínez, Pamela Torres Valdés
Alejandro Núñez Vilchis

Laboratorio de Instrumentación Analítica, Parque Biotecnológico UAQ, Facultad de Química,
Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas S/N Querétaro, Qro. C. P. 76010.
ptorres15@alumnos.uaq.mx*

RESUMEN

El β -cariofileno es un sesquiterpeno bicíclico natural que se encuentra como uno de los principales componentes de los aceites esenciales de diferentes plantas aromáticas, entre las que destaca la pimienta negra (*Piper nigrum*) [1]. El objetivo de este estudio fue desarrollar y validar parcialmente dos métodos analíticos para la cuantificación de β -cariofileno por HPLC en una matriz de aceite esencial de pimienta negra (*P. nigrum*) empleando la metodología de estándar externo y adición de estándar para contrastar el efecto matriz mediante la comparación estadística de ambas técnicas. En el análisis cromatográfico se utilizó una columna C-18 y una fase móvil compuesta por 95 % de acetonitrilo y 5 % de ácido acético (0.1 % v/v) con agua ultradestilada. Se utilizó un flujo de 1 ml/min. El LoD, LoQ, linealidad y robustez fueron algunos de los parámetros utilizados en la validación; encontrando que los límites oscilaban entre 14 y 45 $\mu\text{g/mL}$, la linealidad no estaba dentro de los criterios de aceptación y el método no era robusto. Por esta razón no se pudieron validar todos los parámetros en ambos procedimientos y no se contrastó el efecto matriz.

INTRODUCCIÓN

La pimienta negra (*P. nigrum*), originaria de la India, es una de las especias más ampliamente conocidas y utilizadas alrededor del mundo debido a su gran valor comercial, económico, nutricional y medicinal [1]. Su aceite esencial es extraído de la semilla y se emplea para prevenir el deterioro de los alimentos debido a sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas; este es rico en monoterpenos y sesquiterpenos, siendo el β -cariofileno (BCF) uno de ellos, presente en una concentración de 15.1 % [1,2].

El β -cariofileno es un sesquiterpeno bicíclico natural encontrado como uno de los principales componentes de los aceites esenciales de diferentes plantas aromáticas, entre los que se encuentra la pimienta negra (*P. nigrum*), marihuana (*Cannabis sativa*), romero (*Rosmarinus officinalis*), canela (*Cinnamomum spp.*), orégano (*Origanum vulgare L.*), menta (*Mentha piperita*), jengibre (*Zingiber officinale*), entre otros [3]. Se ha reportado que tiene diversas actividades biológicas debido a que es capaz de actuar sobre el hígado y los huesos, además de ser un modulador del sistema nervioso, puesto que es un endocannabinoide capaz de unirse al receptor CB2 sin tener efectos adversos o psicotrópicos en comparación con *Cannabis sativa*. Posee propiedades anticancerígenas, antioxidantes, y antimicrobianas [3-5].

Por lo regular, el estudio de compuestos terpénicos volátiles de productos naturales requieren métodos de ensayo y error que terminan siendo costosos e impredecibles, provocando que no haya gran sustento analítico; aunque métodos como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) se han caracterizado como uno de los pocos métodos analíticos que se presentan para analizar este tipo de muestras por los resultados precisos que aportan, son procedimientos que requieren mucho tiempo ya que presentan varios pasos para la preparación de muestras como la derivatización; además, puede darse la degradación de compuestos termolábiles, generando así, una dificultad en el control de calidad de productos que son fuentes de aceites esenciales. De hecho, la técnica de GC-MS no puede ser usada directamente para el análisis cualitativo y cuantitativo de BCF en productos herbales debido a que estos contienen constituyentes acuosos [4]. La necesidad de plantear y validar un método analítico eficiente y redituable para la separación y cuantificación de los componentes variables de la pimienta negra, como son los

sesquiterpenos, se volvió crucial por los numerosos beneficios encontrados en el uso de esta especie [6,7].

En la literatura, se han descrito diversas técnicas para cuantificar un analito en una muestra, entre las cuales se encuentra el estándar externo. Este método se utiliza comúnmente cuando se confía en que no habrá interferencia de componentes de la matriz en la disolución del analito. En este enfoque, la muestra se prepara por separado de la curva de calibración, que consta de estándares con concentraciones conocidas del analito [9,10]. En contraste, el método de adición estándar difiere del estándar externo al preparar tanto el estándar como la muestra de manera simultánea. En este procedimiento, se añade gradualmente una disolución estándar con concentración conocida a la muestra sujeta a análisis [10,11].

Las interferencias de la matriz pueden afectar las mediciones al introducir sustancias ajenas al material analizado o al obstaculizar la medición del material objetivo. Estas interferencias pueden conducir a resultados analíticos incorrectos. Por ello, se recurre al método de adición estándar, comparable al método de estándar externo, para la eliminación posterior de la interferencia.[11].

Los parámetros de calidad de un método analítico son de vital importancia para garantizar su idoneidad en la resolución de problemas analíticos. Estos parámetros indican hasta qué punto la concentración de un analito predicha por el método puede estar afectada por interferencias presentes en la muestra. Al validar un método analítico, se demuestra la confiabilidad de los datos obtenidos y se verifica la capacidad del método para cumplir con los requisitos de la aplicación deseada. El modificar la matriz de la cual se obtiene la muestra de β -cariofileno se ve reflejado en las variaciones de parámetros tales como límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y precisión aunado a la robustez que presenta el método [11-13].

PARTE EXPERIMENTAL

Disolución estándar de β -Cariofileno

La disolución stock se preparó disolviendo 12.5 mg de estándar de β -cariofileno (Sigma-Aldrich, pureza de 89.47 %) en una mezcla de acetona y acetonitrilo (20:80 v/v), aforando a 25 ml con la misma mezcla, obteniendo una disolución de concentración de 447 $\mu\text{g/mL}$ [6].

Disolución de la muestra

El aceite esencial de *P. nigrum* se adquirió de B. Nature. La disolución de la muestra se preparó diluyendo 45.45 μL de aceite en una mezcla de acetona y acetonitrilo (20:80 v/v) hasta 25 mL. Posteriormente, se transfirieron 2.5 mL de la disolución a un matraz de 10 mL esta fue la disolución de trabajo [14].

Curvas de calibración

Estándar externo

A partir de la disolución stock de β -cariofileno (447 $\mu\text{g/mL}$), se elaboró la curva de calibración por duplicado con 6 concentraciones diferentes del respectivo analito, en un rango de 0-50 $\mu\text{g/mL}$ [15]. Mediante los datos recabados, se obtuvo la concentración de la muestra a partir de la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración:

$$(1) y=mx+b$$

donde “y” representa la señal del instrumento analítico; “m” es la pendiente de la curva y “b” es el valor de la ordenada al origen; asimismo se calculó el coeficiente de correlación (r^2), el cual debe ser $r^2 > 0.99$ dentro del rango de calibración para asegurar mediciones confiables del compuesto objetivo [16].

Adición estándar

La curva de calibración se realizó por duplicado con 6 disoluciones de β -cariofileno (0-50 $\mu\text{g/mL}$). Se utilizó un volumen constante de muestra (200 μL) cuya concentración es desconocida, a la cual se le añadió un volumen variable de disolución estándar de β -cariofileno en un rango de 20 a 100 μL ,

aforando a 1 mL con la mezcla acetona:acetonitrilo, posteriormente se realizaron las mediciones instrumentales. La concentración de la muestra se determinó a partir de la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración, $y=mx+b$, donde “m” es la pendiente de la curva; “b” es el valor de la ordenada al origen, que refleja el área de un compuesto preexistente (en este caso, β -cariofileno), en la matriz (aceite esencial de pimienta negra). Cuando y es igual a cero (señal de la muestra sin estándar),

$$(2) \quad x = -b/m$$

se muestra la concentración negativa del compuesto preexistente en la matriz. El coeficiente de correlación obtenido en la curva debe ser $r^2 > 0.99$ dentro del rango de calibración para asegurar mediciones confiables del compuesto objetivo [16].

Condiciones analíticas de HPLC

Las condiciones analíticas para la cuantificación por HPLC fueron propuestas con base en las condiciones que se presentan en [6, 15]. Se utilizó una columna Agilent Eclipse XDB-C18 (5 μ m, 4.6 x 150 mm), 400 bar. La fase móvil consistió en 95 % acetonitrilo (Fase A) y 5 % ácido acético (0.1 % v/v) con agua ultra-destilada (Fase B). La corrida cromatográfica se realizó con un flujo de 1.0 mL/min, bajo una temperatura de 22°C. La longitud de onda utilizada para el análisis cuantitativo fue de 210 nm y el volumen de inyección de 20 μ L.

Validación de los métodos analíticos

Límite de detección

En el método de estándar externo, el límite de detección se determinó en función de la desviación estándar ($S_{d_{y/x}}$) del promedio de las intersecciones en la ordenada al origen (b) y el promedio de las pendientes de las curvas de calibración (m) por medio de la ecuación:

$$(3) \quad \text{LoD} = (3 \cdot S_{d_{y/x}}) / m$$

Por otro lado, para la metodología de adiciones estándar, se utilizó un método para estimar aproximadamente el LoD y el LoQ; el cual consiste en examinar cuidadosamente la altura del pico del analito en comparación con el ancho de la fluctuación del ruido basal justo antes y después del pico. Dado que la concentración del analito preexistente se había obtenido mediante la curva de calibración, se puede hacer la estimación de las concentraciones basadas en las alturas máximas presuntas que dan la relación señal-ruido (S/N). El LoD se calculó dividiendo la altura del pico entre el ancho del ruido, obteniendo la relación S/N; se multiplicó la concentración por 3 y se dividió entre S/N [16].

Límite de cuantificación

Se determinó el límite de cuantificación para la curva de estándar externo, en función de la desviación estándar ($S_{d_{y/x}}$) del promedio de las intersecciones de la ordenada al origen (b) y el promedio de las pendientes de las curvas de calibración (m) por medio de la ecuación:

$$(4) \quad \text{LoQ} = (10 \cdot S_{d_{y/x}}) / m \quad [6].$$

Para adición estándar, LoQ se obtuvo de acuerdo con la concentración del compuesto (calculada anteriormente con la curva de calibración), la cual se multiplicó por 10 y se dividió entre la relación S/N [16].

Linealidad

Para el estudio de la linealidad en el método de estándar externo, se preparó una curva de calibración con disoluciones estándar de β -cariofileno, que representaban el 80, 100, 120, 140 y 160% de la concentración original del stock [17].

Para determinar la linealidad por el método de adición estándar, se ejecutó un análisis usando sólo dos incrementos de la muestra. En este caso, se realizó una sola adición de volumen (20 μ L) de estándar de β -cariofileno (V_s) a una de las dos muestras, cuyo volumen aumentaba proporcionalmente en intervalos de 100 μ L (100-500 μ L), posteriormente se aforó a 1 mL. Se efectuaron las mediciones instrumentales en cada una de las disoluciones, de manera que, con las señales resultantes, se determine la concentración de analito en la muestra mediante la siguiente ecuación:

$$(5) \quad C_x = (S_1 C_s V_s) / ((S_2 - S_1) V_x)$$

siendo C_x , la concentración de la muestra; S_1 , la señal de la muestra diluida; S_2 , la señal de la muestra diluida más el patrón, y C_s , la concentración del stock. Después, se realizó una representación gráfica (curva de análisis) de la señal de la muestra diluida más el patrón en función de las diferentes concentraciones calculadas para la muestra [6,10].

Precisión

Para determinar la precisión, tanto en la metodología de estándar externo como en adición estándar, se utilizó un punto de cada curva de calibración y se realizaron tres inyecciones con el fin de medir la repetibilidad del método. Se evaluó la desviación estándar absoluta, desviación estándar relativa y el coeficiente de variación, siendo este último, el criterio de aceptación utilizado para la validación de dicho parámetro [18].

Para el estudio de la precisión intermedia se efectuaron valoraciones, preparando una disolución de concentración que representa el 80% de la concentración de la disolución de trabajo (447 $\mu\text{g/mL}$ de aceite esencial de *P. nigrum*) por tres analistas, obteniendo el coeficiente de variación resultante de las mediciones [17].

Robustez

Para la determinación de este parámetro, se realizó un cambio en el ancho de banda espectral. Se utilizaron las disoluciones tanto con muestra como con estándar, con las condiciones analíticas mencionadas en la sección "Curva de calibración", para corroborar el efecto significativo que tiene tal cambio en el desempeño del método de cuantificación. El ancho de banda espectral fue de 10, 7 y 5 nm, con una longitud de onda fija de 210 nm [19]. El criterio estadístico utilizado para comparar los resultados de ambas metodologías fue el coeficiente de variación ($CV \leq 5\%$) [15,20].

RESULTADOS

Identificación del analito de interés

Se llevaron a cabo 3 corridas cromatográficas para la obtención del pico correspondiente al β -cariofileno (figura 1), así también, se obtuvo el espectro UV-Vis del instrumento (figura 2) para ser comparado con el espectro UV-Vis teórico (figura 3) y corroborar la correcta identificación del analito de interés.

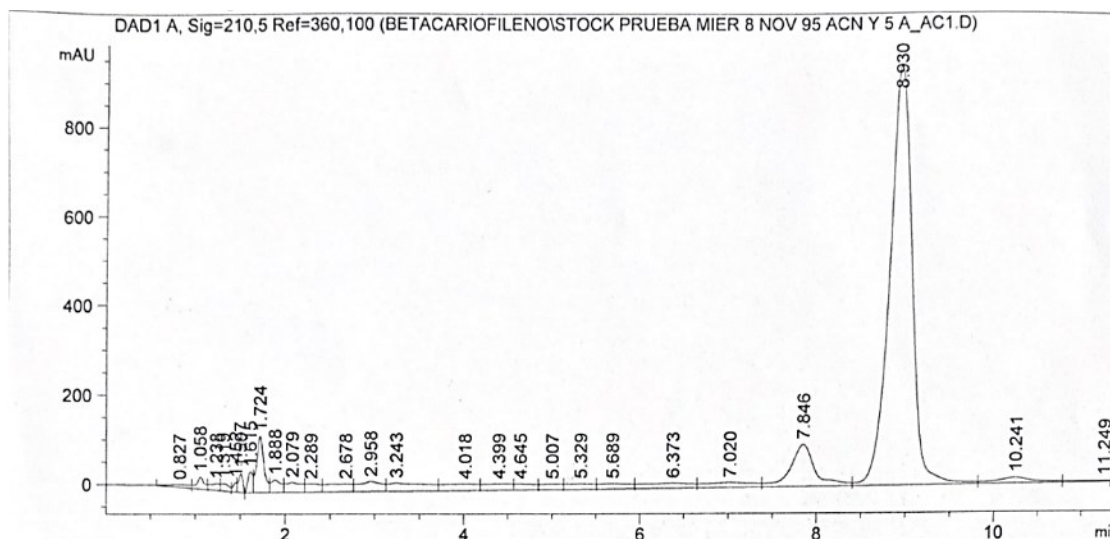


Figura 1. Identificación del tiempo de retención de β -cariofileno en cromatograma obtenido por HPLC

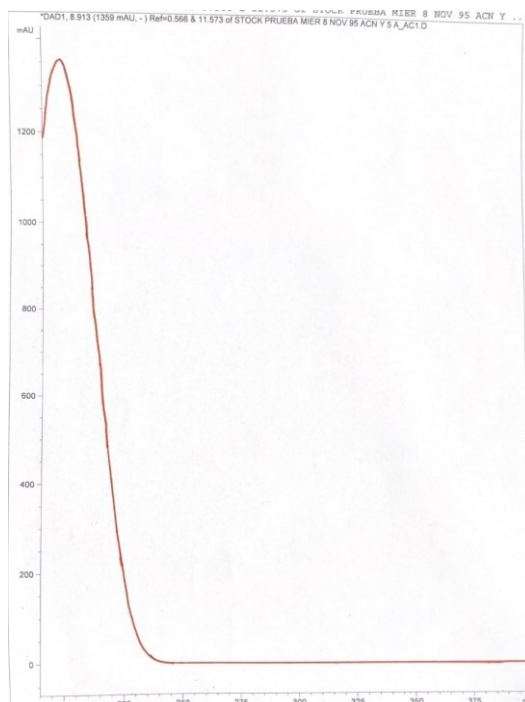


Figura 2. Espectro UV-Vis de β -cariofileno obtenido experimentalmente mediante HPLC

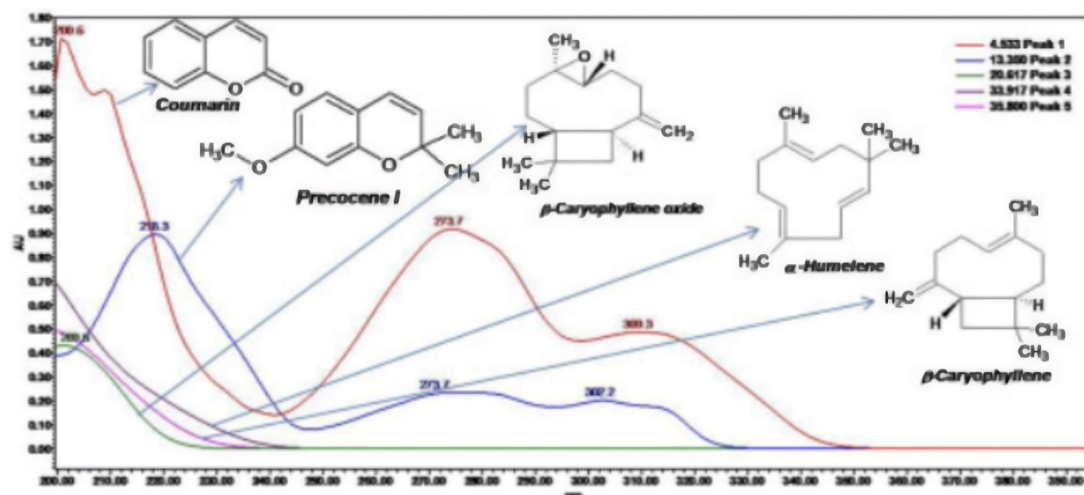


Figura 3. Espectro UV-Vis teórico de β -cariofileno [4].

Validación

La validación se realizó con base en la guía de validación de métodos analíticos descrita por [13], y se complementa con bibliografía adicional para atender a los parámetros de validación propuestos, empleando HPLC como medio para la separación e identificación del analito con un método de estándar externo, así como de adición estándar.

Límite de detección

Para el método de estándar externo el límite de detección se determinó de acuerdo con la curva de calibración construida, por medio de la ecuación (3). Donde se determinó un límite de detección para estándar externo de 14 $\mu\text{g/mL}$.

Con respecto al método de adición estándar, el límite de detección fue calculado con base en lo mencionado en el apartado “Límite de detección”. Obteniendo así un límite de detección para dicho método de 15 µg/mL.

Límite de cuantificación

La concentración de la muestra obtenida en el método de estándar externo fue de 514935 µg/mL; la curva de calibración para el método se representa en la figura 4. El método de adición estándar dio una concentración de la muestra de 354297 µg/mL; la curva de calibración correspondiente se representa en la figura 5.

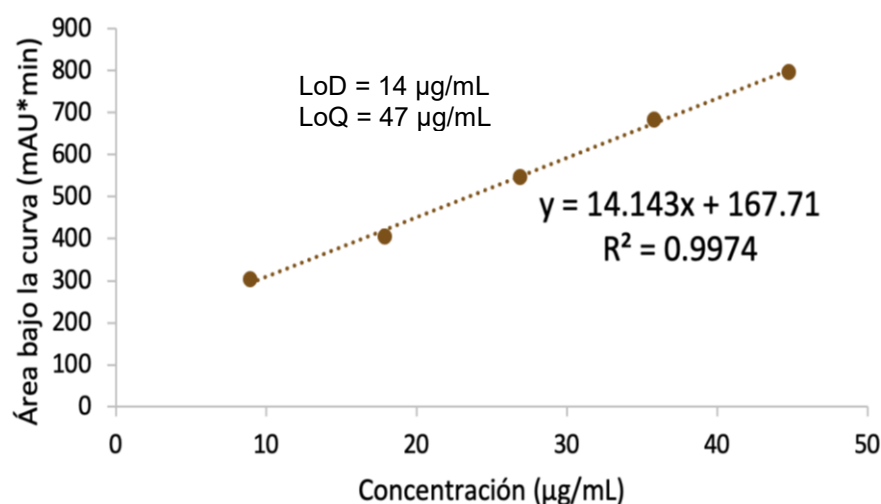


Figura 4. Curva de calibración de estándar externo [9-45 µg/mL] obtenida por medio de HPLC.

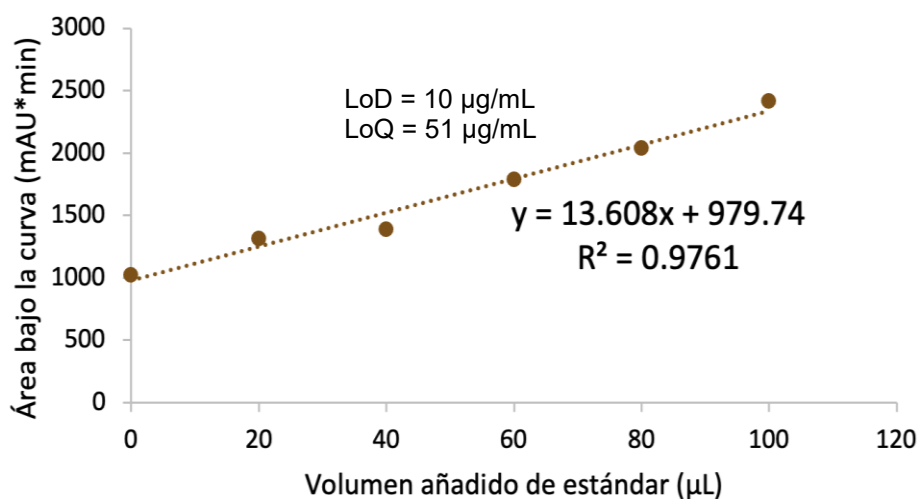


Figura 5. Curva de calibración de adición estándar (volúmenes añadidos de estándar de 20-100 µL) obtenida mediante HPLC.

Linealidad

En el método de estándar externo, los datos revelaron una asociación no lineal entre las áreas bajo la curva y las concentraciones en un rango del 80 al 160% de la concentración de la disolución stock (447 µg/mL). Los datos recabados para la linealidad en el método de estándar externo se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Datos recabados para la linealidad del método de estándar externo.

Porcentaje (%)	Concentración del stock (µg/mL)	Área bajo la curva (mAU*min)
80	358	11133.4
100	447	17707.8
120	537	17762.9
140	626	11605.7
160	716	23454.6

En lo que respecta al método de adición estándar, los datos revelaron una asociación no lineal entre las áreas bajo la curva y las concentraciones de las disoluciones. La ecuación de la recta obtenida fue $y = -19.579x + 3212.8$. Se obtuvieron concentraciones desde 32 µg/mL hasta 122 µg/mL con base en lo descrito en la ecuación (5). Los datos recabados para la linealidad en el método de adición estándar se presentan en la tabla 2.

Volúmen de muestra (µL)	Volumen añadido de estándar (µL)	Área bajo la curva (mAU*min)	Concentración de la muestra (µg/mL)	Concentración del stock (µg/mL)
100	0	1211.87	122	447
	20	2101.93		
200	0	376.8	39	
	20	812.653		
300	0	678.9	65	
	20	991.6		
400	0	5102.3	32	
	20	8720.8		
500	0	2091.6	80	
	20	2556.8		

Tabla 2. Datos recabados para la linealidad del método de adición estándar.

Precisión

Se llevó a cabo el estudio de la precisión del método de estándar externo, así como adición estándar, donde se realizaron 3 inyecciones el mismo día. Se obtuvo la desviación estándar absoluta, desviación estándar relativa, error estándar de la media y el coeficiente de variación [18]. Obteniendo para la repetibilidad un CV en el método de estándar externo de 0.564 %, y para adición estándar de 0.674 %. Los estadísticos para repetibilidad en el método de estándar externo se presentan en la tabla 3; los estadísticos para el método de adición estándar se presentan en la tabla 4.

Tabla 3. Estadísticos para el cálculo de repetibilidad del método de estándar externo.

Inyección	Área bajo la curva (mAU*min)	Media	Desviación estándar absoluta	Coeficiente de variación (%)
Inyección 1	889.931	889.769	± 5.013	0.564
Inyección 2	883.277			
Inyección 3	893.099			

Tabla 4. Estadísticos para el cálculo de repetibilidad del método de adición estándar.

Inyección	Área bajo la curva (mAU*min)	Media	Desviación estándar absoluta	Coeficiente de variación (%)
Inyección 1	1886.59	1900.017	± 12.808	0.674
Inyección 2	1912.1			
Inyección 3	1901.36			

En relación con la precisión intermedia, en ambos enfoques se registraron las señales correspondientes al 80 % de la disolución de trabajo (447 µg/mL) de aceite de *P. nigrum*. Esto permitió calcular la desviación estándar relativa, desviación estándar absoluta y coeficiente de variación. Los datos estadísticos para la precisión intermedia mediante ambos métodos se detallan en la tabla 5.

Tabla 5. Precisión intermedia del método de estándar externo.

Método	Analista	Área bajo la curva (mAU*min)	Media	Desviación estándar absoluta	Desviación estándar relativa	Coeficiente de variación (%)
Estándar externo	Analista 1	10954.1	18040.66	6237.656	± 0.346	34.576
	Analista 2	20468.7				
	Analista 3	22699.2				
Adición estándar	Analista 1	1096.27	1624.66	462.592	± 0.346	28.47
	Analista 2	1821.07				
	Analista 3	1956.64				

Robustez

El criterio estadístico utilizado para comparar los resultados de ambas metodologías fue el coeficiente de variación ($CV \leq 5\%$) [15]. De acuerdo con el método de estándar externo, se obtuvieron para cada ancho de banda espectral (5, 7 y 10 nm), diferentes coeficientes de variación presentados en las tablas 7, 8 y 9 respectivamente.

Tabla 7. Datos estadísticos para el parámetro de robustez del método de estándar externo con un ancho de banda espectral de 5 nm.

Ancho de banda espectral (nm)	Concentración del estándar (µg/mL)	Área bajo la curva (mAU*min)	Concentración de la muestra (µg/mL)	Coefficiente de variación (%)
5	9	303.606	60090	19.92
	18	405.584		
	27	547.502		
	36	683.326		
	45	797.519		

Tabla 8. Datos estadísticos para el parámetro de robustez del método de estándar externo con un ancho de banda espectral de 7 nm.

Ancho de banda espectral (nm)	Concentración del estándar (µg/mL)	Área bajo la curva (mAU*min)	Concentración de la muestra (µg/mL)	Coefficiente de variación (%)
7	9	320.292	11903	55.62
	18	914.294		
	27	853.346		
	36	981.702		
	45	1185.172		

Tabla 9. Datos estadísticos para el parámetro de robustez del método de estándar externo con un ancho de banda espectral de 10 nm.

Ancho de banda espectral (nm)	Concentración del estándar (µg/mL)	Área bajo la curva (mAU*min)	Concentración de la muestra (µg/mL)	Coefficiente de variación (%)
10	9	553.147	10894	8.62
	18	914.79		
	27	935.632		
	36	1928.421		
	45	1260.702		

Tabla 10. Datos estadísticos para el parámetro de robustez del método de adición estándar con un ancho de banda espectral de 5 nm.

Ancho de banda espectral (nm)	Concentración del estándar (µg/mL)	Área bajo la curva (mAU*min)	Concentración de la muestra (µg/mL)	Coefficiente de variación (%)
5	9	1024.384	59,516	28.94
	18	1312.61		
	27	1382.77		
	36	1788.21		
	45	2414.665		

Tabla 11. Datos estadísticos para el parámetro de robustez del método de adición estándar con un ancho de banda espectral de 7 nm.

Ancho de banda espectral (nm)	Concentración del estándar (µg/mL)	Área bajo la curva (mAU*min)	Concentración de la muestra (µg/mL)	Coefficiente de variación (%)
7	9	1389.695	66,950	33.77
	18	1464.21		
	27	1785.08		
	36	1854.075		
	45	2362.23		

Tabla 12. Datos estadísticos para el parámetro de robustez del método de adición estándar con un ancho de banda espectral de 5 nm.

Ancho de banda espectral (nm)	Concentración del estándar (µg/mL)	Área bajo la curva (mAU*min)	Concentración de la muestra (µg/mL)	Coefficiente de variación (%)
10	9	1380.685	69461	29.90
	18	1428.315		
	27	1835.08		
	36	2090.92		
	45	2287.135		

En las figuras 8 y 9, se observan los cambios generados en las señales para cada una de las concentraciones (estándar externo) y cada uno de los volúmenes añadidos (adición estándar) a diferentes anchos de banda espectral.

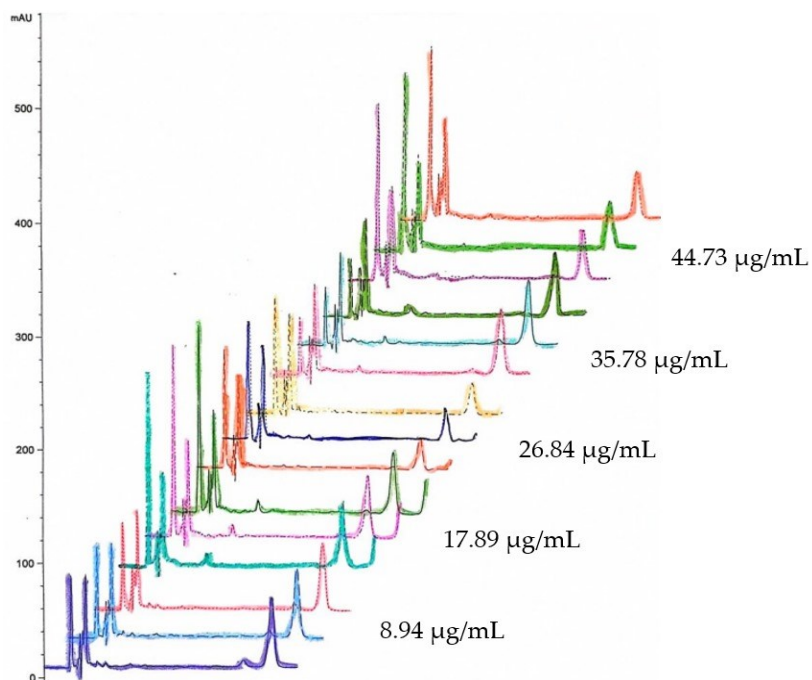


Figura 8. Cromatograma de la curva de calibración para el método de estándar externo a diferentes anchos de banda espectral (5, 7 y 10 nm).

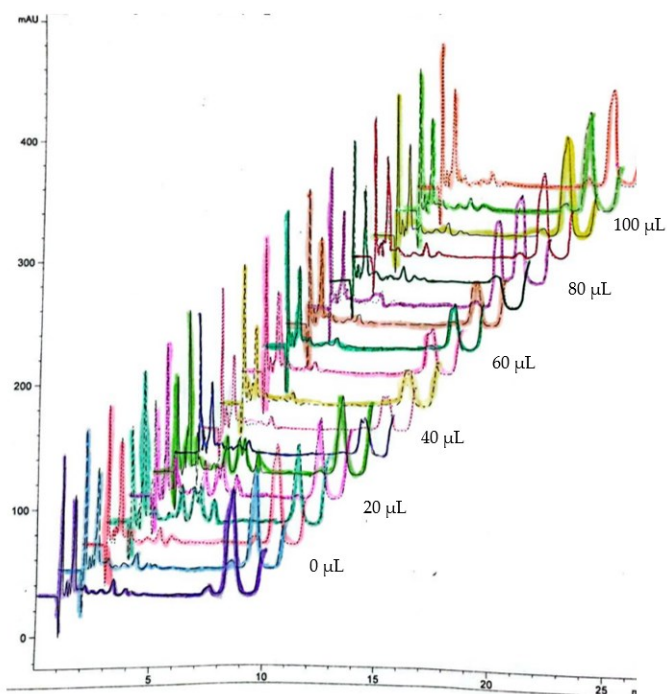


Figura 9. Cromatograma de la curva de calibración para el método de adición estándar a diferentes anchos de banda espectral (5, 7 y 10 nm).

CONCLUSIONES

En la presente investigación se desarrolló un método de cuantificación de β -cariofileno en una matriz de aceite esencial de pimienta negra (*P. nigrum*) tanto por el método de estándar externo, así como adición estándar. Se validaron parcialmente los parámetros de límite de detección, límite de cuantificación y repetibilidad para la metodología de estándar externo, mientras que, para el método de adición estándar sólo se validó la repetibilidad.

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. Francomano, F.; Caruso, A.; Barbarossa, A.; Fazio, A.; La Torre, C.; Ceramella, J.; Mallamaci, R.; Saturnino, C.; Iacopetta, D.; Sinicropi, M.S. β -Caryophyllene: A Sesquiterpene with Countless Biological Properties. *Appl. Sci.* 2019, 9, 5420. <https://doi.org/10.3390/app9245420>
4. Shah, S., Dhanani, T., Sharma, T., Singh, R., Kumar, S., Kumar, B., Srivastava, S., Ghosh, S., Kumar, R. & Juliet, S. Development and Validation of a Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array Detection Method for Simultaneous Identification and Quantification of Coumarin, Precocene-I, β -Caryophyllene Oxide, α -Humulene, and β -Caryophyllene in *Ageratum Conyzoides* Extracts and Essential Oils from Plants. 2019. doi: 10.1093/jaoacint/qs038
5. Maffei, M., E. Plant Natural Sources of the Endocannabinoid (E)- β -Caryophyllene: A Systematic Quantitative Analysis of Published Literature. 2020, 21, 6540; doi:10.3390/ijms21186540.
6. De Almeida Borges, V. R., Ribeiro, A. F., De Souza Anselmo, C., Cabral, L. M., & De Sousa, V. P. Development of a high performance liquid chromatography method for quantification of isomers β -caryophyllene and α -humulene in copaiba oleoresin using the Box-Behnken design. *Journal of chromatography B.* 2013, 940, 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.09.024>
7. Tankeu, S., Vermaak, I., Kamatou, G., & Viljoen, A. Vibrational spectroscopy and chemometric modeling: An economical and robust quality control method for lavender oil. *Industrial Crops and Products.* 2014, 59, 234-240. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.005>
8. Morin, Ph., Caude, M., Richard, H. & Rosset, R. Semipreparative separation of terpenoids from essential oils by high-performance liquid chromatography and their subsequent identification by gas chromatography—mass spectrometry. *Journal of chromatography A.* 1986, 363, 37-56. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)88991-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)88991-8).
9. Yazıcı, E., Bodur, S., Erarpat, S., Arslan, U. E., & Bakirdere, S. Assessment of external calibration, internal standard calibration and quadruple isotope dilution strategies for the determination of acrylamide in wastewater samples after LC-MS/MS quantification. *Microchemical Journal.* 2023, 190, 108741. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108741>
10. Skoog, D. A., Holler, F. J., Crouch, S. R., González, C. S., & Anzures, M. B. *Principios de análisis instrumental*, 6ta ed; Publisher: Cengage Learning. México. 2008; pp. 15-16.
11. Andersen J.E.T. The standard addition method revisited, *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2017, 89, 21-33. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.12.013>
12. IUPAC. Selectivity in Analytical Chemistry, *Pure & Applied Chemistry*, 2001, 73 (2), 1381-1386.
13. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biológicos de México A. C. *GUÍA DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS*. 2002.
14. Gomes, M. V., Da Silva, J., Ribeiro, A. F., Cabral, L. M., & De Sousa, V. P. Development and validation of a quantification method for α -humulene and trans-caryophyllene in *Cordia*

- verbenacea by high performance liquid chromatography. Revista Brasileira De Farmacognosia.* 2019, 29, 182-190. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.01.009>
15. De Oliveira, E. C., Müller, E. I., Abad, F., Dallarosa, J. B., & Adriano, C. *Internal standard versus external standard calibration: an uncertainty case study of a liquid chromatography analysis.* *Química Nova.* 2010, 33(4), 984–987.
 16. Hasegawa, K., Minakata, K., Suzuki, M., & Cyzyki, O. *The standard addition Method and its validation in forensic toxicology.* *Forensic Toxicology.* 2021, 39, 311-333. <https://doi.org/10.1007/s11419-021-00585-8>
 17. Caridad, M., Castiñeira, C., Fernández, C., Romero, J., Collazo, S., Merencio, A. *Determinación por CLAR de la Vitamina E en el “Pool” de Aceite de Hígado de Tiburón.* *Lat. Am. J. Pharm.* 2008, 27, 771-775.
 18. Torralvo, M. *VALIDACIÓN DE UN MÉTODO QUÍMICO ANALÍTICO DE HPLC EN R.* Trabajo de Grado para Optar por el Título de especialista en estadística aplicada. Fundación Universitaria los Libertadores Departamento de Ciencias Básicas especialización en estadística aplicada, Bogotá., D.C. Colombia, 2017.
 19. Faife, L. A. *Validación del Método Analítico por Cromatografía Líquida de Alta Presión para la cuantificación de Mupirocina 2 % ungüento en Laboratorio Ceguel en el periodo comprendido de Mayo a Noviembre,* Universidad Nacional Autónoma De Nicaragua, Managua, 2009.
 20. Centro Nacional de Metrología. *Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico.* 2017.

CLASIFICACIÓN A NIVEL LABORATORIO DE SUELO PROVENIENTE DE TIRADERO A CIELO ABIERTO (TCA) DE UN MUNICIPIO DE PUEBLA-TLAXCALA

Verónica Machorro Sánchez, Luis Ricardo Morales Juárez, Fernando Medina Pérez, Nephtali Aguibd Cervantes Zurita, Josefina Sánchez Aguilar y Eduardo Gonzáles Flores.

Tecnológico Nacional de México / Instituto Tecnológico de Puebla. Av. Tecnológico 420, Col. Maravillas, Puebla, Puebla. 72220. Laboratorio de Posgrado.
veronica.machorro@puebla.tecnm.mx

RESUMEN

Actualmente, se sabe que depositar residuos en una determinada superficie provoca varios tipos de contaminación (suelo, aire y agua). El impacto es más relevante cuando no se cuenta con algún tipo de control y manejo de la basura. Los espacios que quedan después de la contaminación ambiental son devastadores y desolados, ya que no se consideran aptos para sembrar o construir viviendas por los altos contaminantes tóxicos, biológicos e infecciosos. El objetivo de este trabajo es determinar el porcentaje de humedad, aireación y pH a nivel laboratorio, para clasificar el tipo de suelo y dar alternativa de solución a los pobladores. En la medida de los parámetros se aplicó la metodología de la NOM-021-RECNAT-2000. Obteniendo muestras de suelo de superficie y profundidad, en tres puntos diferentes, se codifican como: S1, P1, S2, P2, S3 Y P3 (S = superficie; P = profundidad; 1, 2 y 3 = área marcada). Resultados de % de humedad y aire S1 = 14.88 y 59, P1=17.27 y 49; S2=17.22 y 69, P2=17.23 y 59; S3=13.51 y 69 con P3=17.5 y 59. En promedio el suelo tiene 16.28 % de humedad con una variación de 1.8% y de aireación 61 % de con una variación de 7.5%. Por lo que un incremento en el agua del suelo reduce el estado de aireación por reducción del espacio de los poros llenos de aire disponibles para la difusión de gases. En cuanto al pH oscila entre 7 y 8, lo que implica que el suelo es medianamente alcalino. Conclusión por las características del suelo se recomienda sembrar árboles no frutales como el Ébano y Amapa rosa pueden crecer en suelos arcillosos y sus raíces suelen ser menos agresivas con el suelo.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día, existen más de 50 tiraderos a cielo abierto en los alrededores de la ciudad de Puebla, se sabe que depositar residuos en una determinada superficie provoca varios tipos de contaminación (suelo, aire y agua). El impacto es más relevante cuando no se cuenta con algún tipo de control y manejo de la basura. Los espacios que quedan después de la contaminación ambiental son devastadores y desolados, ya que no se consideran aptos para sembrar o construir viviendas por los altos contaminantes tóxicos, biológicos e infecciosos. La finalidad de este trabajo es determinar el porcentaje de humedad, aireación y pH a nivel laboratorio, para clasificar el tipo de suelo de un tiradero a cielo abierto y dar alternativa de solución a los pobladores.

TEORÍA

Las consecuencias ambientales de las inadecuadas prácticas con los residuos sólidos urbanos (RSU) pueden ser negativas para la salud de las personas, y de los ecosistemas naturales. Los modelos económicos producto de la globalización conllevan al aumento cada vez mayor del consumo de bienes materiales que generan rápidamente desechos, y su incremento ha multiplicado y diversificado la composición de estos en todas las regiones del mundo (Nováis y Márquez, 2020).

Los RSU, desprenden gases tóxicos como hidrocarburos ligeros (HCB), metano (CH_4), ácido sulfhídrico (H_2S), compuestos orgánicos volátiles (COV's), monóxido de carbono (CO), bióxido de carbono (CO_2), dióxido de azufre (SO_2), óxidos de nitrógeno (NOX), nitrógeno (N_2) e hidrógeno (H_2), dioxinas, furanos, óxidos metálicos y finalmente las cenizas, estas en su mayoría son metales pesados, que pueden entrar al suelo y al agua freática por percolación y lixiviación. La causa de esto son los residuos orgánicos presentes, que mediante su descomposición natural a través de bacterias y otros microorganismos conducen a un problema ecológico. Estos gases al no ser controlados son mucho más nocivos por las reacciones

ocasionadas en las primeras capas de la atmósfera, el CH_4 es un gas de efecto invernadero, que tiene un GWP (Global Warming Power) 32 veces superior al del CO_2 y es persistente en la atmósfera, ya que no se elimina como el CO_2 en la fotosíntesis de las plantas. Los residuos a cielo abierto también causan problemas de salinización al suelo, en primer instancia por el vertido de lixiviados, el cual tiende a ser alcalino en su formación, concentración anormal elevada de sales principalmente en los periodos de sequía, por ejemplo el sodio y otras sales contenidas en residuos se depositan por la evaporación de la humedad de los residuos sobre el suelo y el subsuelo, lo que conduce a la muerte de las plantas y a la pérdida de estructura del suelo por el transporte de las sales a áreas aledañas (Rueda et al, 2020).



Figura 1. Tiradero a cielo abierto. Imagen tomada de Telediario 2024. <https://www.telediario.mx/comunidad/tiraderos-a-cielo-abierto-de-puebla-autoridades-revisaran-50>

PARTE EXPERIMENTAL

En la medida de los parámetros se aplicó la metodología de la NOM-021-RECNAT-2000. Obteniendo muestras de suelo de superficie y profundidad, en tres puntos diferentes, se codifican como: S1, P1, S2, P2, S3 Y P3 (S = superficie; P = profundidad; 1, 2 y 3 = área marcada).



Figura 1. Análisis de muestras

RESULTADOS

En promedio el suelo tiene 16.28 % de humedad con una variación de 1.8% y de aireación 61 % de con una variación de 7.5%. Por lo que un incremento en el agua del suelo reduce el estado de aireación por reducción del espacio de los poros llenos de aire disponibles para la difusión de gases. En cuanto al pH oscila entre 7 y 8, lo que implica que el suelo es medianamente alcalino.

Tabla 1. Valores de la NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos.

Clasificación	pH
Fuertemente ácido	< 5.0
Moderadamente ácido	5.1 - 6.5
Neutro	6.6 - 7.3
Medianamente alcalino	7.4 - 8.5
Fuertemente alcalino	> 8.5

En promedio el suelo tiene 16.28 % de humedad con una variación de 1.8% y de aireación 61 % de con una variación de 7.5%. Por lo que un incremento en el agua del suelo reduce el estado de aireación por reducción del espacio de los poros llenos de aire disponibles para la difusión de gases. En cuanto al pH oscila entre 7 y 8, lo que implica que el suelo es medianamente alcalino.

Tabla 2. Resultados de humedad, aire y pH en muestras de suelo.

Muestras	% Humedad	% Aire	pH
P1S1	14.88	59	8.01
P1P1	17.27	50	8.15
P1S2	17.22	69	7.76
P1P2	17.23	59	8.02
P1S3	13.51	69	7.93
P1P3	17.55	60	7.97

CONCLUSIONES

Por las características del suelo se recomienda sembrar árboles no frutales como el Ébano (Figura 2) y Amapa rosa pueden crecer en suelos arcillosos y sus raíces suelen ser menos agresivas con el suelo. Es importante mencionar que reforestando con plantas afines al tipo de suelo, se puede recuperar áreas verdes aptas para la vida humana.



Figura 2. Ébano es de crecimiento lento, tolerante a temperaturas extremas y se adapta a cualquier tipo de suelo.

AGRADECIMIENTOS

Instituto Tecnológico de Puebla. Laboratorio de Posgrado

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Aguilera N., (1989). Tratado de Edafología de México, Tomo I, Facultad de Ciencias Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- [2]. Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales [SMARN]. (2002). NOM-021-RECNAT-200. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudios, muestro y análisis.
- [3]. José, Novais, & Márquez Cundú, José Salvador. (2020). LOS RESIDUOS SÓLIDOS URBANOS MUNICIPALES EN LUANDA, CARACTERIZACIÓN Y CONSECUENCIAS AMBIENTALES DE SU INADECUADA GESTIÓN. *Centro Azúcar*, 47(1), 33-42. Epub 01 de enero de 2020. Recuperado en 06 de junio de 2024, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2223-48612020000100033&lng=es&tlng=es.
- [4]. EFECTOS DE CONTAMINANTES EN SUELO POR UN VERTEDERO A CIELO ABIERTO EN TABASCO. (2020). *Journal of Energy, Engineering Optimization and Sustainability*, 4(1), 1-18. <https://doi.org/10.19136/jeeos.a4n1.3473>
- [5]. Morales, C. (2023) Tiraderos a Cielo Abierto de Puebla: Autoridades Revisarán 50, Telediario México. Available at: <https://www.telediario.mx/comunidad/tiraderos-a-cielo-abierto-de-puebla-autoridades-revisaran-50> (Accessed: 06 June 2024).

RELACIÓN DEL CONTENIDO DE PLOMO Y PH EN SUELOS DE ARARÓ MICHOACÁN

Mariela Casillas Corona¹, María Alcalá De Jesús¹, Marco Antonio Martínez Cinco¹, Juan Carlos González Cortes¹ y Tania Hernández Tafolla¹.

¹Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo.

mariela.casillas@umich.mx.

RESUMEN

La contaminación por metales en las zonas de la ribera del lago de Cuitzeo ha incrementado en los últimos años debido al crecimiento de la población y desechos urbanos; esto repercute en el medio ambiente y en la salud de la población humana. La presencia de algunos metales pesados en el suelo como el plomo presenta peligro para los habitantes al estar en contacto con ellos; la disponibilidad o absorción de este metal esta relacionada con algunas propiedades químicas del suelo como es el caso del pH; por lo cual este trabajo tiene como objetivo analizar el contenido de plomo y su relación con pH, así como su distribución en Araró, Michoacán. Se obtuvieron muestras de suelo de un estudio previo, se analizo el contenido de plomo por absorción atómica y el pH del suelo relación 1:2, la distribución fue mediante el programa ArcGIS. Los valores de pH varían de neutros (6.85) a medianamente alcalinos (10:29) con predominancia en los neutros y las concentraciones de Pb van desde 0.1 a 145 mg kg⁻¹ presentan relación directa a pH más bajos mayor es la concentración de Pb. En cuanto a la distribución el valor más alto de pH esta al poniente del área urbana de Araró cercano a la ribera del Lago de cuitzeo, al igual que los valores de pH de clase medianamente alcalina (7.81 a 8.1) al noroeste del área, la clase medianamente alcalina se localiza al centro-oeste, norte y noroeste; finalmente, la clase neutra se distribuye en la parte central, sureste lo que coincide con las concentraciones más altas de Pb que se ubican hacia el sureste (47 a 145 mg kg⁻¹), los valores más bajos de Pb (01 A 27 mg kg⁻¹) al norte. Las concentraciones mayores de Pb se localizan donde hay mayor concentración de la población humana, por lo que su concentración puede estar asociada a las actividades antrópicas y a los automotores, los valores alcalinos de pH se pueden asociar con la salinidad de la ribera del Lago. Existe una relación directa en cuanto al contenido de Pb con el pH en los suelos.

INTRODUCCIÓN

La contaminación por metales pesados (MP) presenta un riesgo para la salud humana y el medio ambiente, los estudios sobre contaminantes por MP han tenido mayor relevancia en agua que en los suelos urbanos. Algunos autores como Delgado *et al.* (2018) han reportado para la ciudad de Morelia contaminación de Fe, Li, Mn, Pb, V y Zn en polvos urbanos que atribuyen al tráfico vehicular y Aguilar-Espinosa, (2019) para Araró, municipio de Zinapécuaro, Michoacán reporta concentraciones de elementos como As y Pb que clasifica por origen natural y antropogénico lo que implica un riesgo para la salud de los habitantes de la localidad al estar expuestos.

La ribera del lago de Cuitzeo se ha visto afectada por la contaminación, los pobladores mencionan que además de las afectaciones que se reflejan en el medio ambiente también su salud se ve afectada por la contaminación y es más notorio en época de estiaje donde los polvos se levantan ocasionando infecciones de tipo respiratorias y dermatológicas, la contaminación reportada en la localidad de Araró, puede estar relaciona con el incremento de la población y los residuos de las actividades humanas; así mismo la organización de la salud humana menciona que la contaminación por Pb puede pasar desapercibida y darse cuenta hasta que algunos órganos estén totalmente dañados, además no existe un valor donde se pueda afirmar que el Pb no ocasiona daño a la salud por su exposición. Los MP y las propiedades edáficas de los suelos tienen una estrecha relación, ya que de estas depende la disponibilidad de estos elementos tóxicos La presencia de algunos MP en el suelo es de suma importancia para la población ya que al estar expuesta podría afectar su salud, motivo por el cual el objetivo de este trabajo fue analizar el contenido de Pb y su relación con el pH de los suelos, así como su distribución en Araró, Michoacán.

PARTE EXPERIMENTAL

El sitio de estudio es Araró municipio de Zinapécuaro, Mich. pertenece a una zona urbana que se localiza al oriente de la ribera del Lago de Cuitzeo (Figura 1). El clima es templado con precipitación que oscila de 600 a 800 mm, es una zona térmica templada con temperaturas medias anuales de 12 °C y 18 °C (Luna, 2014). Para la zona de estudio los suelos que se reportan son los siguientes: Luvisol, Feozem, Vertisol, Leptosol y Gleysol (Cabrera *et al.*, 2010).

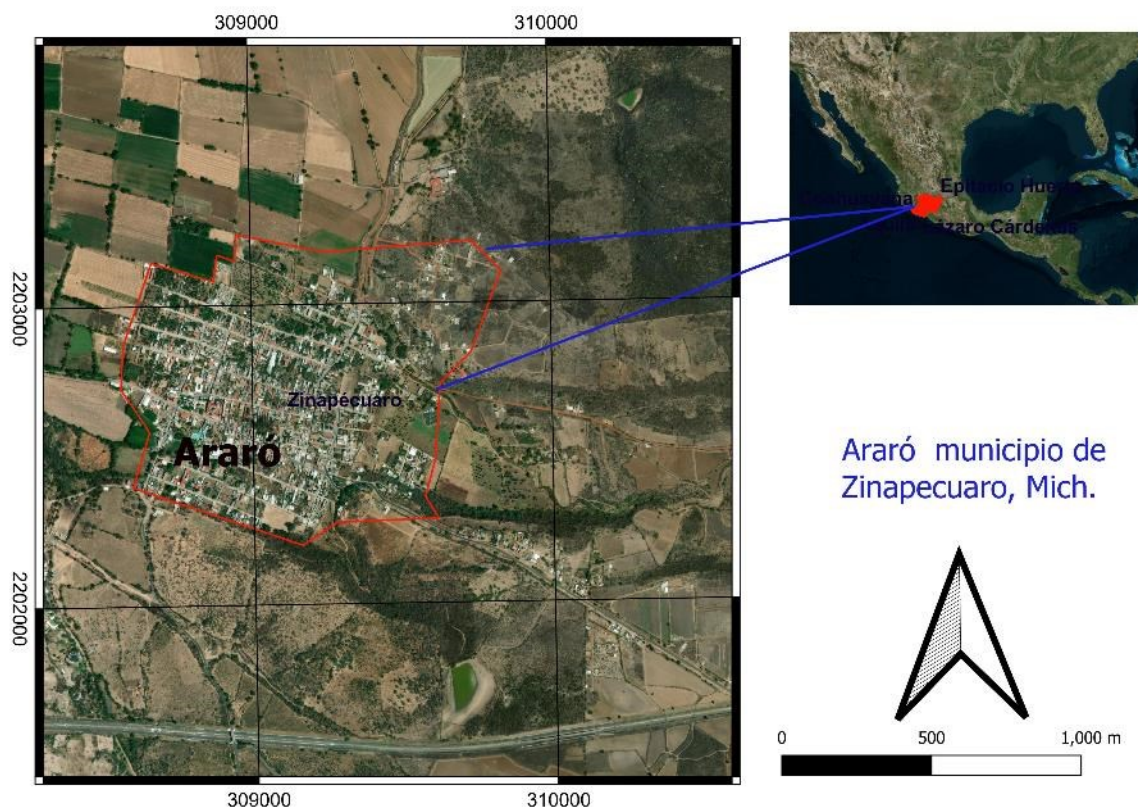


Figura 1. Localización del área de estudio Araró municipio de Zinapécuaro, Mich

METODOLOGÍA

Las muestras de suelo se obtuvieron de un estudio previo realizado por Grano (2020); se obtuvieron 27 muestras y estas se pasaron por un tamiz de 2 mm de diámetro para obtener la fracción de tierra fina. Con potenciómetro se les determinó el pH en agua relación 1:2 con base en la Norma Oficial de Suelos NOM-021-RECNAT-2000 (DOF, 2002).

La cuantificación de Pb se realizó mediante la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica (AAS) previa digestión en un espectrofotómetro Perkin Elmer Analyst 2000.

La distribución se realizó mediante el programa de ArcGIS.

RESULTADOS

Los resultados muestran que el pH de los suelos varía de neutros (6.85) a medianamente alcalinos (10.29) y predominan los neutros (Figura 2), lo que coincide con lo reportado por Casillas (2016) para la ribera del Lago de Cuitzeo. Se han reportado valores de 7.0 a 10 por Alfaro (2010) y Villalobos

(2008) para la cuenca del Lago de Cuitzeo. De acuerdo con Sánchez (2003) los pH antes indicados son favorables para la adsorción de algunos MP.

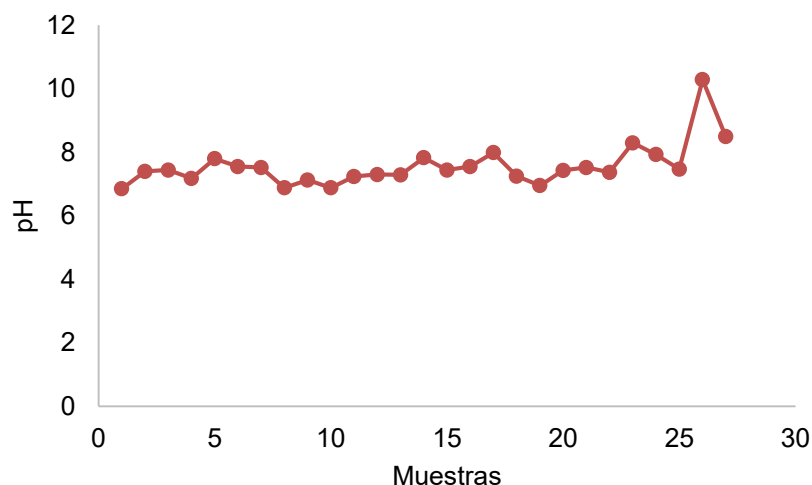


Figura 2. Valores de pH Araró municipio de Zinapécuaro, Mich.

Las concentraciones de Pb van de 0.1 a 145 mg kg⁻¹ (Figura 3), la mayoría de los suelos presenta valores mayores a los 40 mg kg⁻¹ que coincide con los valores de pH neutros por lo que se observa una clara relación entre contenido de plomo y valor de pH.

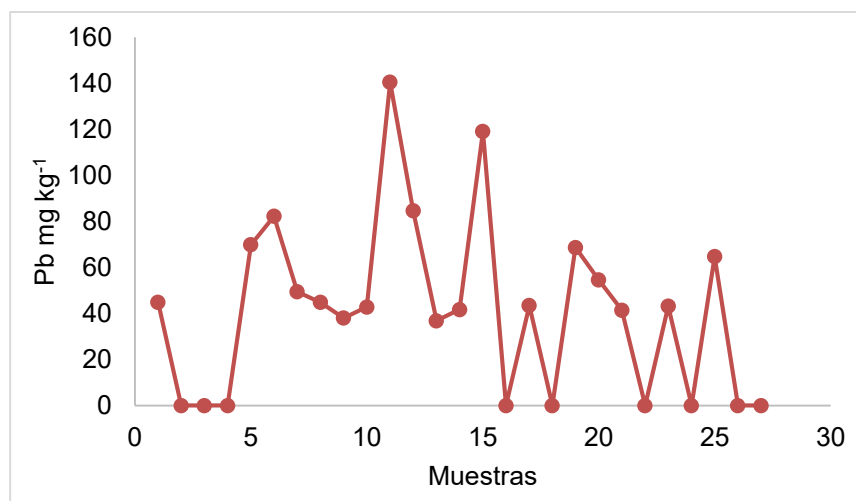


Figura 3. Valores de plomo Araró municipio de Zinapécuaro, Mich.

Distribución. La distribución del pH (Figura 4), indica que el Sitio 26 (color azul) es el de valor más alto de pH localizado al poniente del área urbana de Araró cercano a la ribera del Lago de Cuitzeo, al igual que el pH de clase medianamente alcalina (7.81 a 8.1) al noroeste del área de estudio. La clase medianamente alcalina (amarilla) se localizan al centro-oeste, norte y noroeste; finalmente, la clase neutra (café) se distribuye en la parte central, nor-este el centro, sur – sureste. Estos valores de pH se asocian a la salinidad propia de la ribera del lago.

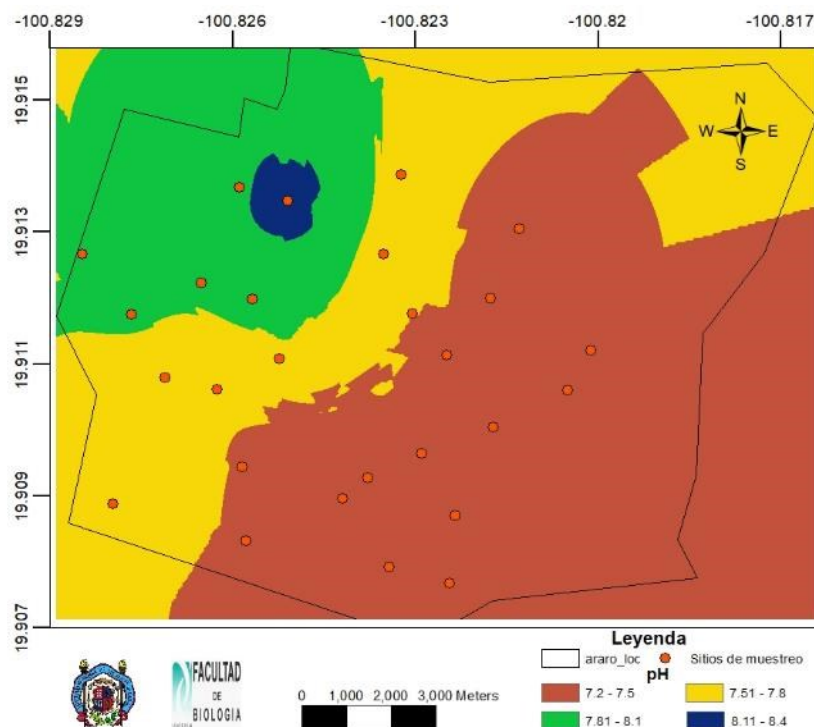


Figura 4. Distribución de pH en Araró municipio de Zinapécuaro, Mich.

Las concentraciones de plomo más altas se encuentran hacia el sureste de 47 a 161 mg kg^{-1} y los valores más bajos 0.1 a 27 mg kg^{-1} norte y sureste donde hay mayor concentración de la población humana por lo que su concentración pudiese derivar de actividades antrópicas y del tráfico vehicular (Figura 5).

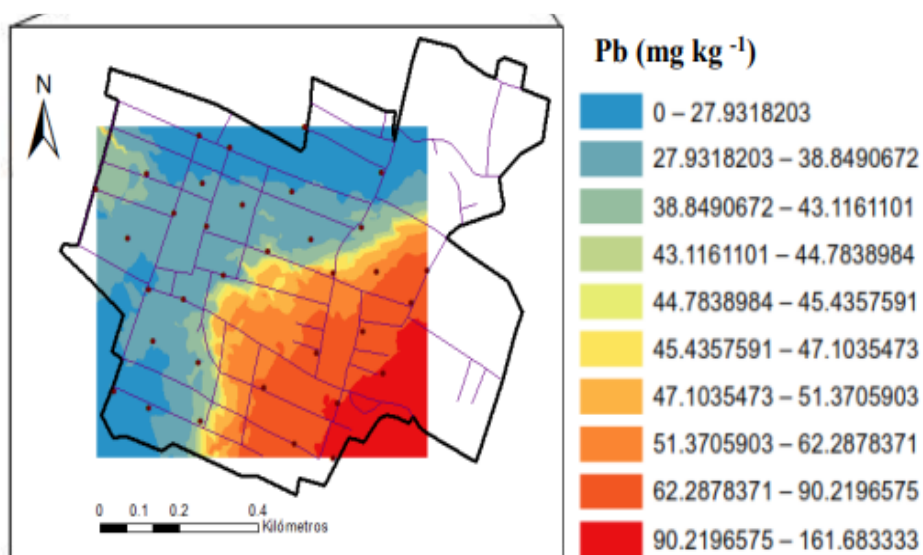


Figura 5. Distribución de plomo en Araró municipio de Zinapécuaro Mich.

En la distribución tanto de Pb como del pH se observa una relación al disminuir el pH el contenido del Pb aumenta por lo que nos indica de una mayor disponibilidad a pH ácidos.

CONCLUSIONES

Las concentraciones de Pb en los sitios muestra que existe contaminación por este metal en los suelos de Araró.

Los valores de pH que dominan son los neutros.

Las concentraciones de Pb altas coinciden con los valores de pH neutros y con las áreas urbanas más pobladas, por lo que los valores del Pb pueden estar asociada a las actividades antrópicas y a la presencia de automotores.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar-Espinosa, A. D. (2019). Análisis de fuentes de metales pesados en los suelos de una comunidad rural aledaña al lago de Cuitzeo, usando sistemas de información geográfica y estadística multivariada. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, México.
2. Alfaro R. (2010). Estudio de la movilidad y toxicidad de metales pesados y arsénico en agua y sedimentos del lago de Cuitzeo, Michoacán. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma del Estado de México.
3. Cabrera A., L. E. Medina, M. Alcalá, J. F. Sánchez y J. M. Ayala. (2010). Suelos. pp 42-45. In: Cram S., L. Galicia, I. Israde-Alcántara. Atlas de la cuenca del lago de Cuitzeo: Análisis de su geografía y entorno socio ambiental.
4. Casillas, C. M. (2016). Metales pesados y su Impacto en las enfermedades de la población humana del municipio de Copándaro, Michoacán. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
5. Delgado, C., I. Israde A., F. Bautista, A. Gogichaishvili, C. Márquez, R. Cejudo e I. González. (2018). Distribución espacial de Fe, Li, Pb, Mn, V, y Zn en suelos urbanos de Morelia, Michoacán, México. Rev. Int. Contam. Ambie., pp 427-440.
6. DOF (2002) NOM-021-RECNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis.
7. Grano, D., N. (2020). Análisis de riesgo probabilístico de daño a la salud por ingesta de arsénico en polvos en una población de la rivera del Lago de Cuitzeo. Tesis de Licenciatura. UMSNH.
8. Luna M. I. (2014). Periódico Oficial del gobierno constitucional del estado de Michoacán de Ocampo. H. Constitucional del Municipio de Copándaro Michoacán. Tomo CLIX. Núm.15.
9. Sánchez B., M. I. 2003. Determinación de metales pesados en suelos de Medina del campo (Valladolid). Contenidos extraíbles, niveles fondo y de referencia. Tesis de Doctorado. Universidad de Valladolid.
10. Villalobos-Castañeda B., R. Alfaro-Cuevas, R. Cortés-Martínez, V. Martínez-Miranda y L. Márquez-Benavides. (2008). Distribution and Partitioning of iron, zinc, and arsenic in surface sediments in the grande river mouth to Cuitzeo lake, México. Springer Science. Eviron Monit Assess 2010. 166:331-346. DOI: 10.1007/10661-009-1005-7.

VALIDACIÓN DEL ESTADO DE QUIESCENCIA POR ESTRÉS NUTRICIONAL EN UN MODELO CELULAR DE ORIGEN CANCEROSO

Miroslava Ramírez Gutiérrez, Damaris Yahaira Martínez Maldonado, Ana Edith Higareda Mendoza, Marco Aurelio Pardo Galván

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
mapardo@umich.mx

RESUMEN

En los últimos años ha surgido una nueva perspectiva para explicar la persistencia del cáncer, donde se propone que las células cancerosas pueden entrar en un estado de quiescencia, es decir, un estado reversible de nula o lenta proliferación. En este estado son capaces de sobrevivir a los tratamientos quimioterapéuticos, incluso cuando se administran en altas dosis. Una vez retirado el tratamiento, las células quiescentes reanudan su crecimiento y proliferación, pero siguen siendo sensibles a la quimioterapia. Se han identificado diferentes mecanismos por los cuales las células cancerosas pueden entrar en este estado de resistencia, incluyendo la diapausa embrionaria y la tolerancia persistente a las drogas (DTP). Es importante destacar que la quiescencia es un estado natural que también se observa en células normales. Sin embargo, en el contexto del cáncer, puede conferir a las células la capacidad de resistir a los fármacos. Además, se ha observado que este estado puede estar presente en diferentes zonas del tumor, especialmente en aquellas con menor vascularización. La necesidad de comprender mejor la resistencia a los fármacos en el cáncer ha impulsado la creación de modelos celulares que repliquen las condiciones observadas dentro de un tumor. Por lo anterior, en el presente estudio se utilizó la línea celular B16-F10 de origen melanómico primario para establecer un cultivo celular en estado de quiescencia. Para ello, se probaron diferentes concentraciones de Suero Fetal Bovino (SFB) en medio DMEM, las cuales fueron 10% (control), 0.5% y 0.1%. Se determinó la dinámica celular por medio de curvas crecimiento en cultivos con las distintas concentraciones de SFB y se evaluó la reversibilidad del proceso al realizar cambio de medio al 10% de SFB. Se determinó la viabilidad y muerte celular por medio del ensayo con Azul de Alamar y la tinción con Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio. Se observó que la tasa proliferativa disminuyó en la condición de 0.1% comparada con su control de 10% SFB; en contraste, en la condición de 0.5% SFB las células se mantuvieron en un estado altamente proliferativo. Después de inducir estrés celular con la concentración de 0.1% SFB y realizar el cambio a la concentración original de 10% SFB, se observó la reversibilidad del estado quiescente al reanudar una alta tasa proliferativa. En todas las condiciones de cultivo se observó que estos se mantenían viables sin indicios de muerte celular. Por lo que se puede concluir que la condición de DMEM suplementado con 0.1% de SFB induce el estado de quiescencia en la línea celular B16-F10 confirmado por los principales criterios de este estado celular.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad de gran importancia a nivel mundial. Según la OMS, aproximadamente 10 millones de personas mueren cada año a causa de esta enfermedad. A pesar de años de investigación, el cáncer aún no tiene una cura definitiva, y se aborda con diferentes tratamientos como la quimioterapia, radioterapia y la inmunoterapia. Sin embargo, un problema persistente en todos los tipos de cáncer es la resistencia y recurrencia después de los tratamientos, lo que ha generado controversia entre los investigadores.

Recientes investigaciones han demostrado que, dentro de un tumor, esta resistencia es dada por una población de células que se encuentran en un estado inactivo o de lenta proliferación, lo que les confiere protección ante los fármacos que están dirigidos al ciclo celular. Este estado de inactividad se debe a la vascularización caótica tumoral, que se refiere a la formación de vasos sanguíneos nuevos y anormales dentro del tumor, lo cual, tiene como consecuencia una distribución desigual de nutrientes, en donde las células cancerosas pueden adoptar este fenotipo que se conoce como "quiescencia". Una aportación importante en la investigación de la quiescencia en células tumorales es el descubrimiento de que estas células pueden ser activadas por señales ambientales, como la

inflamación, el estrés por fármacos o nutricional. La quiescencia en células tumorales es un fenómeno complejo que tiene implicaciones importantes para el tratamiento y la prevención del cáncer. Por ello, el objetivo de esta investigación es desarrollar un modelo celular en estado quiescente que nos permita comprender los mecanismos moleculares que subyacen a la resistencia a la terapia en tumores malignos y, a partir de ello, desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para atacar las células tumorales quiescentes.

TEORÍA

Generalidades del cáncer

El cáncer es una enfermedad compleja que se caracteriza por la proliferación anormal de células, que se dividen, crecen y pueden propagarse incontrolablemente en cualquier parte del cuerpo. Este crecimiento descontrolado se debe a una alteración del sistema de regulación que controla y limita la división celular (NCI, 2021). Las terapias contra el cáncer se han diversificado en los últimos años, incluyendo fármacos u otras sustancias que bloquean el crecimiento y la diseminación del cáncer al interferir en las moléculas específicas ("blancos moleculares") que participan en estos procesos (NCI, 2022). Sin embargo, a pesar de los innumerables avances que se han obtenido de las investigaciones realizadas, tanto in vitro como in vivo, no se ha logrado una comprensión completa de los mecanismo de evasión que tiene el cáncer para sobrevivir (Sánchez, et al., 2022).

Uno de los tipos de cáncer que ha tomado gran importancia en los últimos años es el melanoma, debido a su alta incidencia global (GLOBOCAN, 2023). El tratamiento del melanoma depende del estadio en el que se encuentre la enfermedad. En los primeros estadios, la quimioterapia es un tratamiento efectivo, ya que puede destruir las células cancerosas que se han diseminado por el cuerpo. Sin embargo, en los estadios más avanzados, la quimioterapia suele utilizarse en combinación con otros tratamientos, como la cirugía o la radioterapia (Herrera-González, 2010).

Quimioterapia

La quimioterapia busca detener la proliferación y multiplicación de células tumorales para evitar la invasión y metástasis del cáncer. Aunque es una terapia común, su principal limitación es la falta de especificidad, ya que afecta tanto a células sanas como a tumorales al interferir con la síntesis de ADN, ARN y proteínas, o al alterar la función de moléculas preformadas. Esta acción no distingue entre células normales y anormales, atacando a todas las que están activamente dividiéndose (Arul, et al., 2017; Guillen y Molina, 2019).

Durante el tratamiento, se suele usar una combinación de quimioterapéuticos para prevenir la resistencia del cáncer, promoviendo la citotoxicidad tanto en células en reposo como en división. Sin embargo, después de múltiples exposiciones al fármaco, algunas células cancerosas pueden desarrollar resistencia, lo que causa la recurrencia del cáncer. Esta resistencia puede explicarse por la hipótesis de Goldie-Coldman, que sugiere que las células cancerosas adquieren mutaciones espontáneas que las hacen resistentes a los fármacos (Amjad, et al., 2023).

Resistencia

Aunque se ha estudiado mucho sobre cómo las células desarrollan resistencia a la quimioterapia, aún no se comprende completamente su origen. Sin embargo, se ha clasificado la resistencia en dos tipos:

1. Resistencia intrínseca: Los tumores no responden a la quimioterapia desde el inicio del tratamiento (Cervantes, 2018; Arul, et al., 2017).
2. Resistencia adquirida: Después de una respuesta inicial positiva, las células tumorales desarrollan resistencia y el tumor vuelve a crecer (Cervantes, 2018; Arul, et al., 2017).

Las células cancerosas pueden adquirir aberraciones genómicas, lo que complica su tratamiento. A pesar de los estudios, no se han identificado genes específicos responsables de la resistencia a los medicamentos (Fu y Chen, 2022; Hata, et al., 2016).

Incluso después de la remisión, pueden quedar células cancerosas residuales que adquieren resistencia y provocan la recaída del cáncer. Estas células son a menudo indetectables y persisten durante el tratamiento, adaptándose a su microambiente tumoral (Sharma, et al., 2010).

El microambiente del tumor, que influye en la disponibilidad de nutrientes, afecta la proliferación de las células cancerosas. Sela y colaboradores (2022) describieron las diferentes zonas de distribución de nutrientes que existen en el tumor y cómo esto afecta a la proliferación de las células:

- Zona periférica: Alta vascularización, acceso a muchos nutrientes y oxígeno, células altamente proliferativas.
- Zonas no vascularizadas: Lejos de los vasos sanguíneos, células necróticas por falta de nutrientes y oxígeno.
- Zona intermedia o quiescente: Acceso limitado a nutrientes y oxígeno, células en proliferación lenta o pausada (quiescencia).

Esta heterogeneidad en las células cancerosas dificulta su tratamiento, ya que las terapias eficaces para una zona pueden no funcionar en otra. Es crucial desarrollar tratamientos que se adapten a esta diversidad celular.

Quiescencia

La quiescencia celular es un estado reversible de baja o nula proliferación en el que las células pueden reactivar su división cuando reciben el estímulo adecuado. A diferencia de un estado pasivo, la quiescencia es un proceso activo y heterogéneo (Liu, et al., 2022). Existen diferentes profundidades de quiescencia, determinadas por el tiempo que las células permanecen en entornos estresantes. La quiescencia más profunda requiere una estimulación más fuerte para reactivar la división celular debido a su menor sensibilidad a señales mitogénicas (Van-Velthoven y Rando, 2019; Yao, et al., 2022).

La dinámica de división celular puede oscilar entre proliferación y quiescencia. En ambientes favorables, las células tienden a proliferar, pero en algunos casos optan por una división binaria: una célula hija entra rápidamente al ciclo celular mientras que la otra permanece en quiescencia. Las células cancerosas, al igual que otras células, pueden entrar en un estado de quiescencia, conocido como quiescencia asociada al cáncer (QAC). Este estado complejo puede ser inducido por varios factores, como la quimioterapia, la radioterapia, la falta de nutrientes o señales ambientales adversas (Sharma, et al., 2010). La QAC es un estado de latencia activa en el que las células cancerosas pueden detener su crecimiento y división en respuesta a diversos factores, manteniendo la capacidad de reactivarse y contribuir a la recurrencia del cáncer. El microambiente tumoral y mecanismos moleculares específicos juegan un papel crucial en este proceso (Suh, et al., 2017; Walcher, et al., 2020).

PARTE EXPERIMENTAL

Línea celular y condiciones de cultivo

Para este trabajo se utilizó la línea celular B16-F10, de origen primario melanómico extraído del tejido de piel de ratón (ATCC; CRL-6475), en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM; Gibco™). La línea celular fue descongelada en un frasco de 75 cm², para mantener en fase de crecimiento exponencial a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ (NuAire, Plymouth, MN, EE. UU.). Para el mantenimiento del cultivo se hicieron cambios de medio de cultivo y/o resiembra cada tercer día hasta alcanzar un 80% de confluencia.

Medios de cultivo

Se prepararon Medios Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM; Gibco™) suplementado con diferentes concentraciones séricas a 10%, 0.5%, 0.1% (SFB; Gibco™).

Inducción del estado de quiescencia

Se inoculó con 3.9x10⁴ células/cm² en cajas petri 35x10 mm con medio DMEM suplementado con

SFB al 10%, esperando fase de adherencia y fase lag, durante un periodo de 24 h. Posteriormente, se reemplazó el medio de cultivo con las diferentes concentraciones séricas de 0,1%, 0,5% y 10% (los controles fueron los establecidos en 10% SFB). Pasadas 24 y 48 h, se tomaron desprendieron las células (10%, 0.5% y 0.1% SFB) y se colocaron en una cámara de Neubauer para observarse y contarse en un microscopio óptico (LEICA DM IL, Wetzlar, Alemania), determinando el porcentaje de células viables. Posteriormente, se utilizó la ecuación de Monod para determinar la cinética de crecimiento en cada condición y los tiempos de duplicación.

Ensayo con Azul de Alamar

Se estableció el cultivo en placas de 96 pocillos a una densidad celular de 6.3×10^3 células/pocillo en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM; Gibco™) con 10% de Suero Bovino Fetal (SFB; Gibco™). Transcurridas 24 h, se hizo el cambio de medio a las diferentes concentraciones de SFB (10%, 0.5% y 0.1%), para hacer el análisis de viabilidad después de 48 h de interacción con su respectivo medio.

Se agregó 5% del reactivo de Azul de Alamar a cada pocillo que contenía 100 μ L (relación volumen-volumen), el cual se incubó durante 3 h a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ (NuAire, Plymouth, MN, EE. UU.). Se midió a una absorbancia de 570 nm y 600 nm en un espectrofotómetro de microplacas para que emitiera fluorescencia en respuesta a la reducción química del medio de crecimiento resultante de la actividad celular.

Determinación de necrosis y apoptosis por tinción con Bromuro de Etidio y Naranja de Acridina Las células adherentes se tiñeron con una mezcla de 5 μ g/ml de naranja de acridina y 5 μ g/ml de bromuro de etidio en PBS durante 5 minutos, posteriormente se retiró la solución y se visualizó mediante microscopía de epifluorescencia (LEICA DM IL FLUO, Wetzlar, Alemania). Las imágenes fueron procesadas por el programa ImageJ, seleccionando cuadrantes representativos del cultivo. Se contaron las células viables (núcleos verde normales), apoptótica tempranas (núcleos verdes condensados) y apoptóticas tardías (núcleos rojos condensados).

Análisis estadístico

Los resultados de múltiples experimentos se expresan como una media $\pm$ el error estándar (ES). El análisis de la prueba t de Student se utilizó para evaluar las diferencias entre las medias. Se aceptó que un $P < 0,05$, con respecto a los experimentos de control, era estadísticamente significativo.

RESULTADOS

La quiescencia se caracteriza por una proliferación celular lenta o nula, reversibilidad del estado y mantenimiento de la viabilidad celular. En este estudio, se evaluaron estos criterios para la inducción del estado quiescente en la línea celular B16-F10. Para inducir la quiescencia, se utilizaron diferentes concentraciones séricas de Suero Fetal Bovino (SFB) (0.1% y 0.5%) en la línea celular. Esta metodología se basó en investigaciones previas (Fingar, *et al.*, 2004; Sela, *et al.*, 2022).

Lenta o nula proliferación

Para inducir el estado quiescente en la línea celular B16-F10, se evaluó la dinámica celular en concentraciones de SFB de 0.5% y 0.1%, utilizando como control la concentración de 10% SFB recomendada por ATCC (2023). La evaluación se realizó durante un periodo de 3 días, monitoreando el comportamiento celular en los cultivos a las 24 horas y 48 horas de interacción con su respectivo medio. Los resultados obtenidos demostraron que la concentración de 0.1% de SFB ralentizó significativamente el tiempo de duplicación de la línea celular B16-F10 a 33 horas ($t_D = 33$ h). En contraste, los cultivos en concentraciones de 0.5% y 10% de SFB exhibieron un crecimiento exponencial, llegando a saturación a las 24 horas y con un tiempo de duplicación de 12 horas. Es importante destacar que el cultivo celular control de 10% de SFB cuadruplicó la población inicial en 3 días, mientras que las células en condiciones de 0.1% solo duplicaron su crecimiento en el mismo periodo (Fig. 1). Estos resultados comprueban el primer criterio de quiescencia en donde la concentración de 0.1% de SFB induce efectivamente el estado quiescente en la línea celular B16-

F10, caracterizado por una proliferación celular lenta o nula.

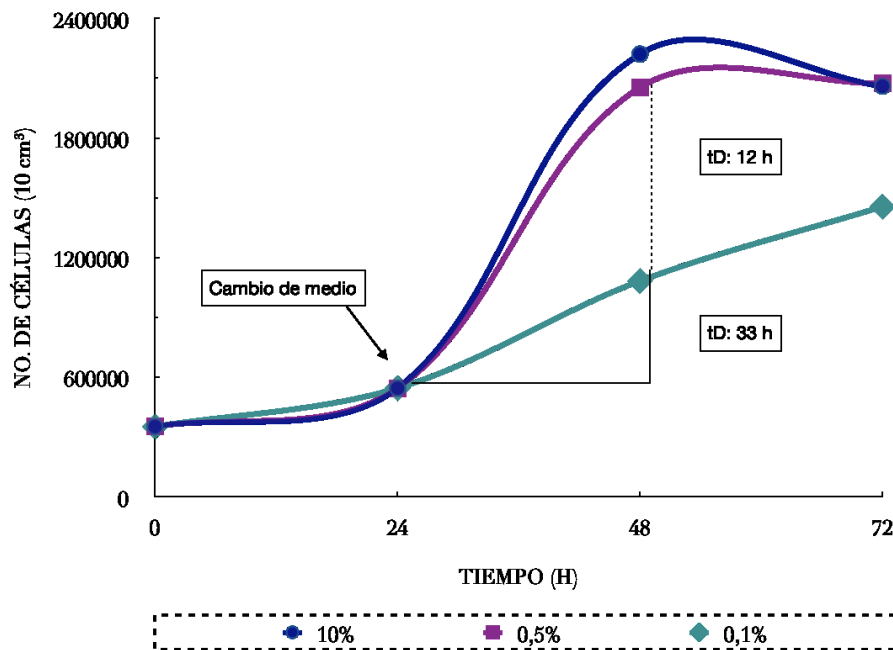


Figura 1. Comportamiento de la línea celular B16-F10 a diferentes concentraciones de SFB (10% control, 0.5% y 0.1%).

Con el objetivo de obtener una perspectiva complementaria sobre la inhibición de la proliferación en los cultivos, se realizó un análisis del recuento celular en cada condición, tomando como referencia la población celular del cultivo con 10% de SFB. Este análisis confirmó una inhibición significativa de la proliferación en la condición de 0.1% de SFB, alcanzando un 51% menos de células en comparación con el control en las primeras 24 horas (Fig. 2).

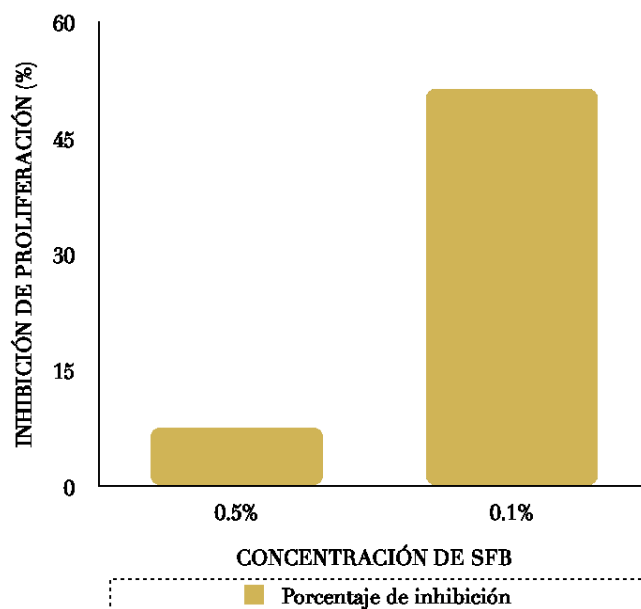


Figura 2. Porcentaje de inhibición en la proliferación de la línea B16-F10.

Reversibilidad del estado quiescente

El comportamiento celular en la concentración de 0.1% de SFB confirmó la ralentización del crecimiento, cumpliendo así uno de los criterios esenciales para la quiescencia. Sin embargo, un aspecto crucial del estado quiescente es la reversibilidad. Para evaluarlo, se mantuvo la línea celular en la concentración de 0.1% de SFB y posteriormente se realizó un cambio de medio a una concentración de 10% de SFB. El cambio de 0.1% a 10% de SFB actuó como un estímulo suficiente para que el cultivo retomara su crecimiento de forma exponencial. Tras haber mantenido a la línea B16-F10 en condiciones de limitación de nutrientes, esta retomó su crecimiento ante el estímulo de suficiencia, evidenciando un cambio de pendiente y acortando su tiempo de duplicación de 33 h a 16 h a las 24 h de haber realizado el cambio de medio (Fig. 3).

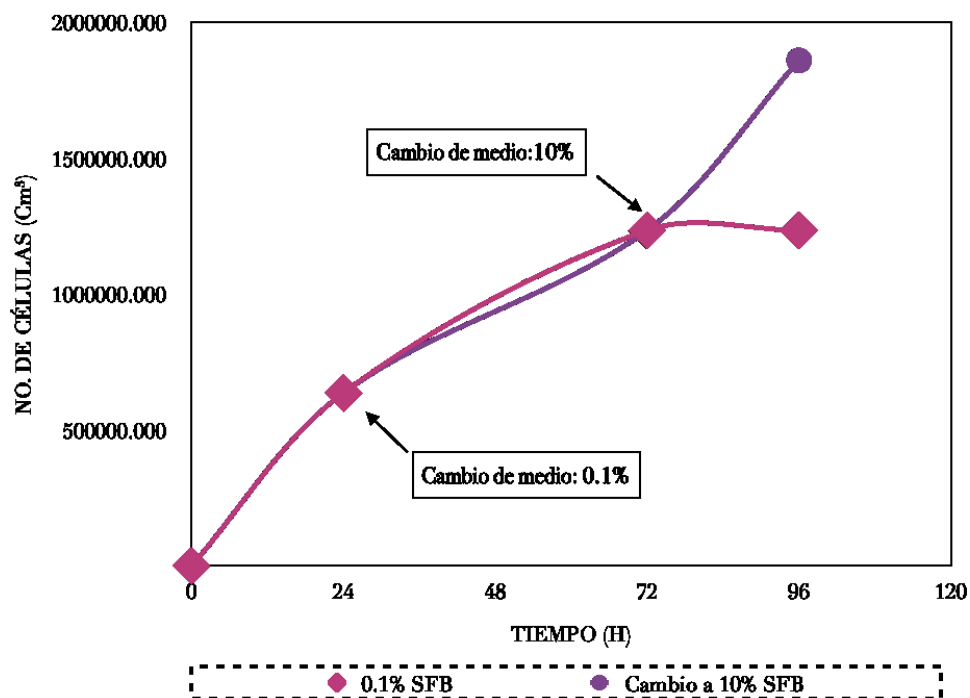


Figura 3. Respuesta de la línea celular B16-F10 a el cambio de concentración de SFB.

Viabilidad celular

Para determinar la viabilidad de los cultivos, tercer criterio de quiescencia, se realizó el análisis con el reactivo de Azul de Alamar y, de manera independiente, la tinción con Bromuro de Etidio y Naranja de Acridina, a las 48h de haber realizado el cambio de medio de cultivo a sus respectivas concentraciones.

Ensayo con Azul de Alamar

Para evaluar la viabilidad celular como parte de los criterios de quiescencia, se analizó la actividad metabólica de la línea B16-F10 en diferentes concentraciones de SFB mediante el ensayo con Azul de Alamar. Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos, realizando un cambio de medio a las 24 horas para permitir la adhesión y la fase lag. Posteriormente, transcurridas 48 horas desde el cambio de medio, se añadió el reactivo Azul de Alamar en una proporción del 5% (v/v) y se incubó durante 3 horas, se midió la actividad metabólica utilizando un espectrofotómetro de microplacas a longitudes de onda de 570 nm y 600 nm. Los resultados obtenidos demostraron la presencia de actividad metabólica en las células con limitación de nutrientes (0.1% de SFB), lo que confirma su viabilidad celular (Fig. 4).

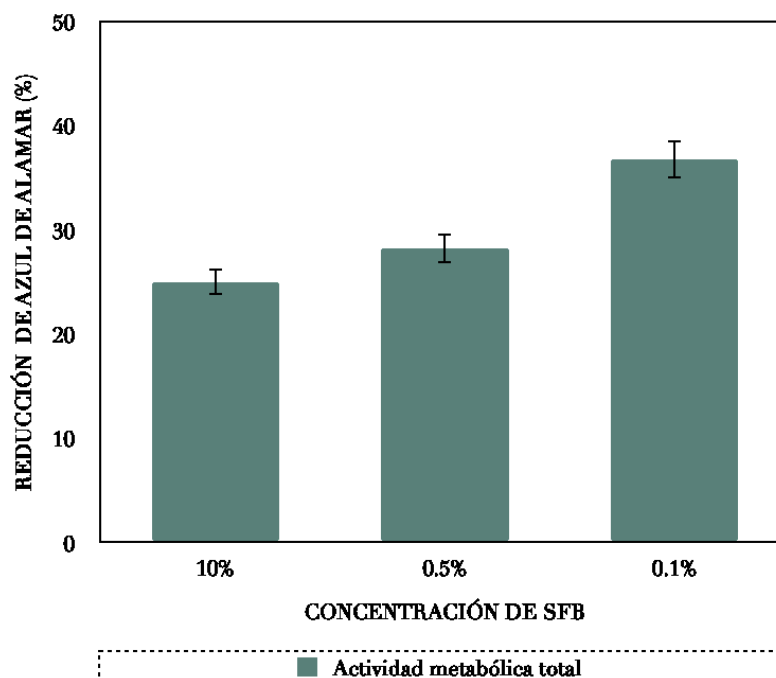


Figura 4. Actividad metabólica de la línea B16-F10 en diferentes concentraciones de SFB.

Tinción con Naranja de Acridina y bromuro de etidio

Con el fin de verificar la viabilidad y el estado óptimo de los cultivos, se realizó una tinción con Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio. Donde, transcurridas 48 horas desde el cambio de medio, se retiró el medio de cultivo y se realizaron lavados con PBS (1X). Posteriormente, se añadieron los reactivos a los cultivos y se observaron bajo un microscopio óptico con fluorescencia a una resolución de 40x. Los resultados de la tinción con Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio confirmaron la presencia de cultivos viables y óptimos en la concentración de 0.1% de SFB. En estas observaciones, se evidenció una predominancia de células sanas sin indicios de compromiso con procesos de muerte celular (Fig. 5).

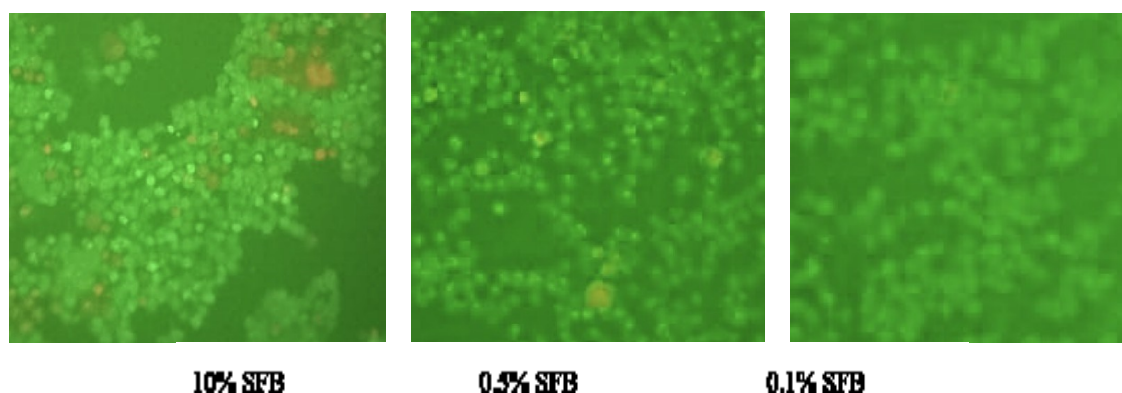


Figura 5. Viabilidad celular de la línea celular B16-F10 por tinción de NA+BrEt en las diferentes concentraciones de FBS.

Para determinar el porcentaje de células necróticas o en proceso de muerte celular, se contaron las células de acuerdo a lo descrito anteriormente por Fingar (2004); sanas (núcleos verde normales), apoptótica tempranas (núcleos verdes condensados) y apoptóticas tardías (núcleos rojos condensados). Los cultivos en condiciones de 10% y 0.5% presentaron porcentajes normales de acuerdo a su condición de crecimiento, es decir, el estado de saturación por confluencia y

senescencia, mientras que el cultivo en condición de 0.1% de SFB presentó las mejores características (Fig. 6).

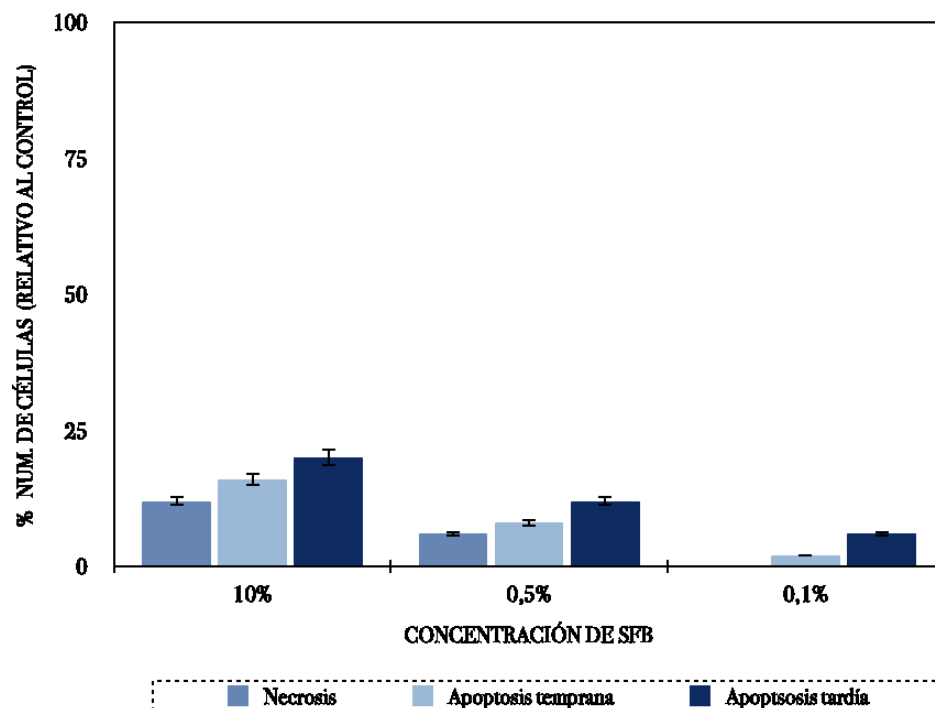


Figura 6. Porcentaje de células necróticas, apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías.

CONCLUSIÓN

Los resultados presentados en este trabajo nos permiten concluir que con la condición de crecimiento celular en 0.1% de SFB, hemos logrado validar el estado de quiescencia por estrés nutricional en un modelo celular canceroso, a través de los criterios de ralentización de la proliferación, reversibilidad del estado ralentizado, y la viabilidad celular medida por actividad metabólica y apoptosis.

BIBLIOGRAFÍA

1. M. T. Amjad, A. Chidharla, A. Kasi, "Cancer Chemotherapy", StatPearls Publishing, 2023.
2. M. Arul, A. C. Roslani, S. H. Cheah, "Heterogeneity in cancer cells: variation in drug response in different primary and secondary colorectal cancer cell lines in vitro". In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, Vol. 53, 5, 2017, pp. 435-447.
3. A. Cervantes, "Resistencia a la quimioterapia: mecanismos y vías de modulación". Investigación sobre el cáncer en España: de la Biología Molecular a la clínica, 2018, pp. 93-99.
4. L. Fu, Z. S. Chen, "Redox signaling-governed drug-tolerant persister cancer cell: a key spark of treatment failure". Signal Transduction and Targeted Therapy, Vol. 7, 1, 2022, p. 89. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00940-0>
5. Globocan, "Cancer Today". Recuperado el 25 mayo del 2024. <https://gco.iarc.fr/today/>
6. N. E. H. González, A. Y. A. Flores, "Melanoma en México". Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas, Vol. 15, 3, 2010, pp. 161-164.
7. P. Guillén, G. Molina, "Qué es, cómo funciona y tipos de quimioterapia". SEOM, Vol. 20.

Recuperado el 24 de mayo del 2024 de <https://seom.org/guia-actualiza-da-de-tratamientos/que-es-como-functiona-y-tipos-de-quimio-terapia>

8. A. N. Hata, M. J. Niederst, H. L. Archibald, M. Gomez-Caraballo, F. M. Siddiqui, H. E. Mulvey, ..., J. A. Engelman, "Tumor cells can follow distinct evolutionary paths to become resistant to epidermal growth factor receptor inhibition". *Nature medicine*, Vol. 22, 3, 2016, pp. 262-269.
9. B. Liu, X. Wang, L. Jiang, J. Xu, Y. Zohar, G. Yao, "El flujo de fluido extracelular induce una quietud superficial a través de señales físicas y bioquímicas". *Fronteras en biología celular y del desarrollo*, Vol. 10, 2022, pp. 792719. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.792719>
10. M. D. J. Sánchez, P. Sánchez, Z. E. Ayala, P. J. Sánchez, M. Santos, "Una mirada al cáncer desde la perspectiva molecular". *Revista Finlay*, Vol. 12, 2, 2022, pp. 208-220.
11. Y. Sela, J. Li, S. Maheswaran, R. Norgard, S. Yuan, M. Hubbi, M. Doepner, J. P. Xu, E. S. Ho, C. Mesaros, C. Sheehan, G. Croley, A. Muir, I. A. Blair, O. Shalem, C. V. Dang, B. Z. Stanger, "Bcl-xL Enforces a Slow-Cycling State Necessary for Survival in the Nutrient-Deprived Microenvironment of Pancreatic Cancer". *Cancer research*, Vol. 82, 10, 2022, pp. 1890–1908. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-22-0431>
12. S. V. Sharma, D. Y. Lee, B. Li, M. P. Quinlan, F. Takahashi, S. Maheswaran, ... J. Settleman, "A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations", *Cell*, Vol. 141, 1, 2010, pp. 69-80.
13. H. N. Suh, M. J. Kim, Y. S. Jung, E. M. Lien, S. Jun, J. I. Park, "Quiescence Exit of Stem Cells by Wnt/ β -Catenin Is Indispensable for Intestinal Regeneration", *Cell reports*, Vol. 21, 9, 2017, pp. 2571–2584. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.118>
14. C. T. Van Velthoven, T. A. Rando, "Stem cell quiescence: dynamism, restraint, and cellular idling". *Cell stem cell*, Vol. 24, 2, 2019, pp. 213-225.
15. L. Walcher, A. K. Kistenmacher, H. Suo, R. Kitte, S. Dluczek, A. Strauß, A. R. Blaudszun, T. Yevsa, S. Fricke, U. Kossatz-Boehlert, "Cancer Stem Cells-Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies". *Frontiers in immunology*, Vol. 11, 2020, pp. 1280. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01280>.
16. G. Yao, J. Dhawan, A. R. Barr, "Cellular dormancy—State determination and plasticity". *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, Vol. 10, 2022, p. 984347.

TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO METANOLICO DE LAVANDULA OFFICINALLIS FRENTE A CEPAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA

Daniel Paulino Villarreal-Lerma¹, David Gilberto García-Hernández¹, Catalina Leos-Rivas¹, Catalina Rivas-Morales¹ y Michel Stéphane Heya².

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas¹. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Salud Pública y Nutrición².
daniel.villarrealrm@uanl.edu.mx

RESUMEN

Durante su ciclo de vida las plantas sintetizan diferentes metabolitos que se pueden clasificar en primarios y secundarios, estos últimos han cobrado interés en los últimos años debido a sus diversas aplicaciones en materia de salud. Estas sustancias generadas bajo condiciones de estrés poseen distintas actividades biológicas dentro de las que se encuentra la actividad antimicrobiana, es por ello que, en el presente trabajo, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto metanólico de lavanda (*Lavandula officinallis*) frente a cepas bacterianas con múltiples resistencias a fármacos de interés clínico. Para la obtención del extracto se realizó una maceración estática de la materia vegetal en metanol, para posteriormente eliminar el solvente en un rotavapor mediante presión reducida. Para la obtención del CMI se siguió la técnica de microdilución en microplaca de 96 pozos propuesta por la CLSI (M07-A9) 2012. Una vez llevadas a cabo las diluciones, se procedió a incubar la microplaca durante 22 horas a 37 ± 1 °C y finalmente se llevó a un lector de microplaca (Biotek ELx800, USA) configurado a una longitud de onda del filtro a 630 nm. Los datos obtenidos se procesaron por medio de una fórmula en una base de datos y se obtuvieron las respectivas CMIs para cada cepa; Para *Acinetobacter baumannii* ATCC 15308 fue de 500 ppm, para *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 fue de 125 ppm, para *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 fue de 1000 ppm, para *Escherichia coli* ATCC 25922 fue de 250 ppm, *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-44 fue de 250 y para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 fue de 62.5 ppm. El extracto metanólico de lavanda presentó su mayor actividad contra *P. aeruginosa* a una concentración de 62.5 ppm, sin embargo, se demostró que posee actividad por debajo de las 1000 ppm sobre las 5 cepas multifármacorresistentes, lo que nos demuestra que hay potencial en el aprovechamiento de los extractos de plantas en la lucha contra las bacterias resistentes a antibióticos por lo que se debe seguir con futuras investigaciones cuyo fin sea obtener sustancias antibióticas a partir de plantas medicinales.

INTRODUCCIÓN

Las plantas representan un recurso valioso en un sinnúmero de campos de investigación que van desde lo terapéutico hasta lo arquitectónico, sin embargo, el uso terapéutico de estos organismos nos acompaña desde antes de percibirnos como humanos. Kate Kelly (2009) menciona que los neandertales ya empleaban plantas con el fin de curar enfermedades, constanding estos tratamientos de infusiones, alimentos o ungüentos tópicos. Estos usos medicinales no se quedaron en estas épocas, si no que trascendieron, pues incluso en el México precolombino había culturas que empleaban medicina natural para tratar y sanar enfermedades. No fue sino hasta la llegada de los españoles que se comenzó registrar su uso de la forma en la que lo conocemos, puntualmente tras la llegada de Fray Bernardino de Shagún quien se interesó por aquellas leyendas de plantas capaces de curar enfermedades y fue este mismo interés lo que lo llevó a publicar un libro recopilatorio en 1548 llamado "Historia general de las cosas de la Nueva España". (Sembrando vida, 2020)

En tiempos actuales, la Organización Mundial de la Salud (OMS) refiere a la medicina tradicional como un fenómeno mundial que día con día cobra fuerza. La organización refiere que 170 de los 194 países que la conforman han reportado el uso de hierbas medicinales con el fin de tratar diversos padecimientos (WHO, 2024). México se encuentra dentro de los países que reportan el uso de

plantas medicinales como tratamientos terapéuticos, contando en su haber con 4500 plantas medicinales registradas hasta el momento. (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2022).

Un factor muy importante que se debe considerar antes de pretender explotar un recurso es su capacidad de ser renovable, por lo cual la investigación de los efectos terapéuticos de plantas fácilmente cultivables representa una idea tanto atractiva industrialmente como sustentable. Una planta con un cultivo fácil de llevar a cabo y con un potencial medicinal muy estudiado la lavanda. *Lavandula angustifolia* es la que cuenta con más estudios en lo que a efectos medicinales se refiere. El aceite esencial obtenido a partir de esta planta presenta actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antioxidante y antiproliferativa (Nikšić *et al*, 2017). Por otra parte, el extracto hidroalcohólico también presenta actividad antiinflamatoria, analgésica, antimicrobiana, ansiolítico, antifúngica, entre otros. (Husseini *et al*, 2016), (Prado *et al*, 2018).

Es por ello la comunidad científica ha optado por indagar en dichas plantas y encontrar aquellos compuestos biológicamente activos que les confieren dichas propiedades terapéuticas. La primera rama de la ciencia involucrada es la botánica que cual funge como un puente entre aquellos conocimientos tradicionales adquiridos por milenios de investigación empírica y los combina con los conocimientos del presente. Parte de estos conocimientos es la fitoquímica, la cual a su vez es una rama de la química que se encarga de desvelar la composición molecular de los organismos vegetales. Mediante la fitoquímica se determinan los compuestos químicos presentes en las plantas, principalmente se buscan aquellos denominados “metabolitos secundarios”. Dichas sustancias cuentan con numerosos efectos biológicos dependiendo de su empleo; uno de los más destacables es la actividad antimicrobiana que presentan algunos de estos como los flavonoides.

Como se mencionó anteriormente, la OMS respalda el uso de la herbolaria tradicional en lo referente al tratamiento de diversas dolencias, sin embargo, la comunidad científica encuentra en ella una nueva fuente de compuestos de gran peso en la creciente lucha contra los organismos resistentes a fármacos. En el año 2016 la OMS creó la lista de patógenos prioritarios en donde se incluían a bacterias que representaban un alto riesgo por contar con mecanismo que les permitía crecer en presencia de antibióticos a los cuales antes eran sensibles. Esta resistencia se puede dividir en dos clasificaciones, múltiples resistencias a fármacos (MDR) o ampliamente resistentes a fármacos (XDR). En México, estos organismos representan un alto riesgo para los pacientes que se internan en un centro de salud, pues algunos de ellos son los principales causantes de infecciones asociadas a al área de la salud.

A raíz de la problemática antes mencionada, se realizó este trabajo en el que se buscó determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto de *Lavandula angustifolia* sbsp. *officinallis* frente a las siguientes cepas MDR: *Acinetobacter baumannii* ATCC 15308, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-44, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

PARTE EXPERIMENTAL

Procesamiento de la muestra.

Se adquirió la materia vegetal en la casa comercial Pacali® secado se trituro en un molino para grano. La masa del material vegetal fue de 100 g tanto para la corteza como para la parte aérea y se sometieron a maceración con metanol en un matraz Erlenmeyer durante una semana. Posteriormente se filtró y se extrajo el solvente mediante presión reducida con el uso de un rotavapor. Una vez que la cantidad del solvente fue mínima, el extracto se colocó en un recipiente previamente pesado y se colocó en un horno de secado a 40 °C durante una semana.

Tamizaje fitoquímico.

Para determinar los metabolitos secundarios presentes en las muestras se realizaron diversas pruebas cualitativas en una porción del extracto suspendido en metanol con una concentración de 2,000 ppm. Dichas pruebas cuantitativas fueron obtenidas de Verde-Star (2016)

Preparación del cultivo bacteriano.

Posteriormente se suspendió una colonia bacteriana de cada una de las cepas estudiadas en caldo Mueller-Hinton (M-H), para posteriormente ser utilizadas después de 18 h de incubación a 37°C, esto con el fin de que el cultivo se encuentre en fase logarítmica. Una vez cumplido el tiempo de incubación, se tomó una alícuota de 100 µL y se pasó a otro tubo de caldo M-H adicionado con rojo fenol como indicador de pH en el cual se estandarizó el cultivo al tubo 0.5 de la escala McFarland midiendo su densidad óptica mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 625 nm, con esto se obtiene un estimado de 3×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

Evaluación de la actividad antimicrobiana (Método de microdilución en microplaca)

Para determinar la actividad del extracto, se resuspendió en metanol a una concentración de 2 000 ppm. Una vez que se estandarizó la solución bacteriana, se procedió a realizar una técnica de microdilución basada en el estándar M07-A9 volumen 32 propuesto por el CLSI en el año 2012.

En una microplaca de 96 pocillos con fondo plano se realizaron las microdiluciones por triplicado utilizando las primeras 6 columnas y las filas A, B, C para el tratamiento, mientras que las filas F, G, H se utilizaron para el blanco. Las columnas 10, 11 y 12 se utilizaron para realizar el control de crecimiento de la bacteria mientras que la columna 7 se utilizó para el desecho. El orden por seguir para realizar el ensayo fue el siguiente:

- Se colocaron 100 µL del medio M-H en los pocillos donde se harán las microdiluciones (Fig 1).
- Posteriormente se agregaron 200 µL del extracto en la columna número 1, teniendo un mayor volumen en la primera columna. (Fig 2)
- Una vez agregado el medio, se cambió la puntilla de la micropipeta y se procedió con las microdiluciones tomando 100 µL de la primera columna y depositándolo a la segunda columna, repitiendo esto en cada fila y entre cada columna. Después de realizada la dilución de la columna 6, se tomaron 100 µL y se depositaron en la columna 7 con el fin de mantener el mismo volumen en todos los pocillos. (Fig 3)
- Finalmente se agregaron 100 µL del cultivo bacteriano a todos los pocillos del tratamiento y se llevó a incubar durante 20 horas a 37°C. Ya transcurrido el tiempo de incubación se procedió a la lectura de resultados, para lo cual se usará un lector de microplaca ELX 800 BioTek, USA configurado a 630 nm.

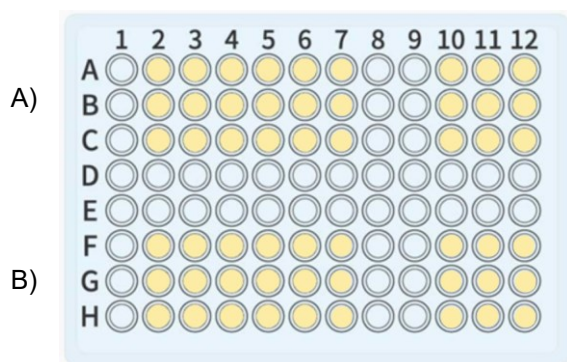


Fig 1. Primer paso del ensayo para obtener la CMI. Siendo A) tratamiento de *L. officinallis* y B) Blanco.

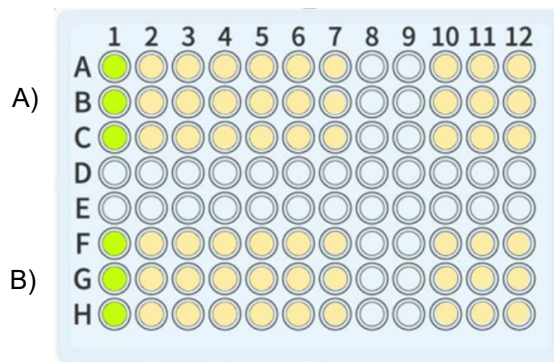


Fig 2. Segundo paso del ensayo para obtener la CMI. Siendo A) tratamiento de *L. officinallis* y B) Blanco.

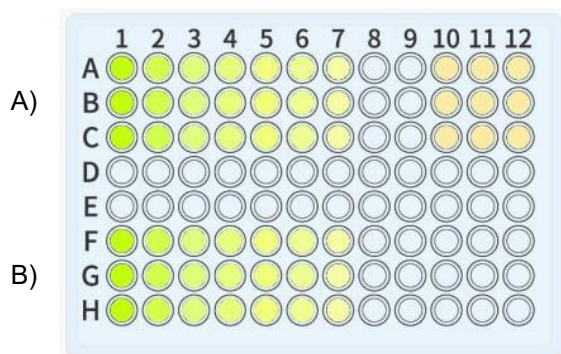


Fig 3. Tercer paso del ensayo para obtener la CMI. Siendo A) tratamiento de *L. officinallis* y B) Blanco.

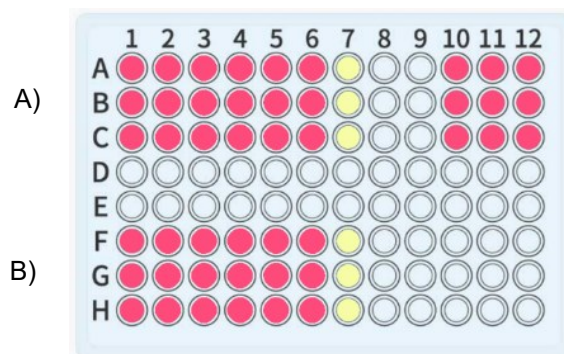


Fig 4 Cuarto paso del ensayo para obtener la CMI. Siendo A) tratamiento de *L. officinallis* y B) Blanco.

RESULTADOS

Bacteria	Concentración Inhibitoria (ppm)	Mínima	% de inhibición
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	62.5		98.7 ± 0.37
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	62.5		79.94 ± 8.38
<i>E.coli</i> ATCC 25922	125		92.86 ± 2.58
<i>S. aureus</i> ATCC BAA-44	125		84.63 ± 1.67
<i>A. baumannii</i> ATCC 15308	250		83.05 ± 4.23
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	500		86.69 ± 3.92

Tabla 1:Concentración mínima inhibitoria y porcentaje de inhibición (± desviación estándar).

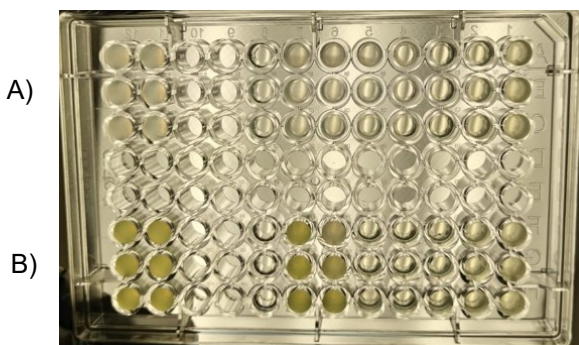


Figura 1. Tratamiento A) *S. aureus* y Tratamiento B) *P. aeruginosa*

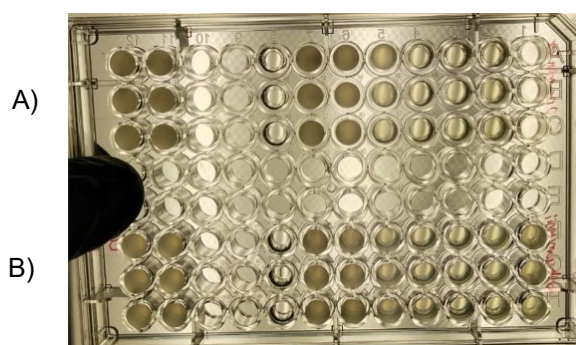


Figura 2. Tratamiento A) *K. pneumoniae* y Tratamiento B) *A. baumannii*

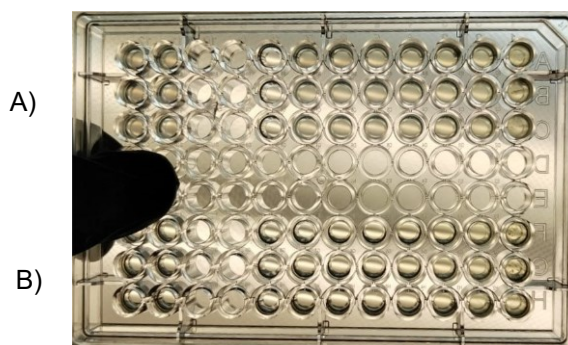


Figura 3. Tratamiento A) *E. faecalis* y Tratamiento B) blanco

Resultado del tamizaje fitoquímico.

Prueba Química	<i>L. officinalis</i>
Liberman-Burchard	(+) Esteroles
Cumarinas	(+)
Baljet	(+)
Quinonas	(+)
Saponinas	(-)
Shinoda	(+)
Taninos	(+)
Antrona	(+)
Dragendorff	(-)

Tabla 2: Resultado del tamizaje fitoquímico.

CONCLUSIONES

L. officinalis presentó inhibición frente a todas las bacterias evaluadas a diferentes concentraciones, la menor CMI fue para *P. aeruginosa* a 62.5 ppm con una inhibición del 98.07%. El extracto de esta planta puede considerarse una buena alternativa para el tratamiento de infecciones por el grupo de bacterias estudiadas, que representan un alto impacto a nivel nosocomial, por lo que se sugiere seguir con las investigaciones en su toxicidad para su implementación a nivel medicinal.

BIBLIOGRAFÍA

- Antiproliferative, antimicrobial, and antioxidant activity of *Lavandula angustifolia* Mill. essential oil. JHSCI [Internet]. 2017 Apr. 24 [cited 2024 Jun. 10];7(1):35-43.
- CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
- Husseini, Y., Sahraei, H., Meftahi, G. H., Dargahian, M., Mohammadi, A., Hatef, B., Zardooz, H., Ranjbaran, M., Hosseini, S. B., Alibeig, H., Behzadnia, M., Majd, A., Bahari, Z., Ghoshooni, H., Jalili, C., & Golmanesh, L. (2016). Analgesic and anti-inflammatory activities of hydro-alcoholic extract of *Lavandula officinalis* in mice: possible involvement of the cyclooxygenase type 1 and 2 enzymes. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(1), 102-108. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.10.003>.
- Kelly, K. (2010). The scientific revolution and medicine: 1450-1700. Infobase Publishing.
- Prado, H. J., & Rizzo, I. (2011). Actividad antifúngica de extractos vegetales empleados en la Medicina tradicional argentina.
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2022). México, Segundo lugar mundial en registro de plantas medicinales.
- Sembrando Vida. (2020). Plantas medicinales: Nuestro patrimonio. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/bienestar/sebrandovida/articulos/plantas-medicinales-nuestro-patrimonio>.
- Verde-Star, M.J., García-González, S. & Rivas-Morales, C. (2016). Metodología científica para el estudio de plantas medicinales. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A. & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 1-40.
- World Health Organization: WHO. (2024). La OMS pone al día la lista de bacterias farmacorresistentes más peligrosas para la salud humana. Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news/item/17-05-2024-who-updates-list-of-drug-resistant-bacteria-most-threatening-to-human-health>.

CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS HETERÓTROFAS Y DETECCIÓN DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE ENZIMAS EXTRACELULARES EN LAS SALINERAS CHIQUITAS (PUEBLA)

Miriam Pulido-Flores, María Teresa Núñez -Cardona *, Adriana Vargas-Rosas y Patricia Castila Hernández

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento El Hombre y su Ambiente. Laboratorio de Ecología Microbiana.

*mtnunez@correo.xoc.uam.mx

RESUMEN

En los últimos años se han estudiado a las bacterias que habitan ambientes extremos, especialmente para utilizarlas, por ejemplo, en procesos biotecnológicos; estas han resultado ser ideales para una serie de aplicaciones en la biotecnología industrial por su facilidad para crecer en ambientes con altas o bajas temperaturas, pH ácidos o alcalinos y alta salinidad, proporcionando un menor costo de producción, una disminución en la utilización de energía y una fácil recuperación de los productos que requieren condiciones especiales¹. Por ejemplo, las amilasas son útiles para la producción de jugos de frutas, panificación, jarabes de glucosa y bebidas alcohólicas², las gelatinasas (proteolíticas), se producen detergentes, ablandadores de carnes y tratamientos para quemaduras³; las ADNasa contribuyen en procesos biogeoquímicos⁴. El objetivo del presente estudio fue aislar bacterias heterótrofas a partir de muestras de agua de los estanques de las Salineras Chiquitas y determinar su capacidad de producir enzimas extracelulares (amilasa, gelatinasa, ADNasa, lipasa). Las Salineras Chiquitas se ubican en el municipio de Zapotitlán Salinas en el estado de Puebla (18°18'–18°19' N, 97°28'–97°30' W), en este lugar la sal se obtiene por evaporación en una serie de estanques que no superan los 10 cm de profundidad, la producción de sal se remonta a la época prehispánica y actualmente es una fuente de recursos económicos para los habitantes de la región. Para el análisis microbiológico y el aislamiento de bacterias productoras de enzimas extracelulares, se colectaron muestras de agua con frascos de vidrio estériles los cuales fueron introducidos cerrados y abiertos en el interior del cuerpo de agua. A partir de estas se hicieron diluciones seriadas (solución salina al 0.08%) y fueron inoculadas cajas Petri conteniendo agar nutritivo, después de 24-48 h de incubación a 28°C se cuantificaron las unidades formadoras de colonias (UFC) y estas fueron aisladas al azar y sembradas en viales conteniendo agar nutritivo para su análisis posterior. Los aislados bacterianos provenientes de uno de los estanques fueron sembrados hasta obtener cultivos puros y se determinó su capacidad para producir amilasa, ADNasa (fórmula comercial), lipasa y gelatinasa⁴. Las UFC registradas en cuatro estanques fueron 2.2×10^2 , 4.7×10^2 , 1.0×10^3 , 1.1×10^3 ; en dos resultaron ser incontables. De un estanque se obtuvieron 22 cultivos puros, 18 con forma bacilar (todos Gram positivos); tres cocos Gram positivo y uno Gram negativo. Todos los cultivos produjeron gelatinasa, el 82% amilasa, el 59% ADNasa y 50% lipasa. Siete bacilos esporulados Gram positivos produjeron a las cuatro enzimas. De acuerdo con las descripciones de la literatura, es probable que estos pertenezcan al género *Bacillus*, el cual ha sido reportado en ambientes extremos como las Salineras Chiquitas y podrían considerarse como potencialmente útiles para la obtención de compuestos bioactivos que pueden ser utilizados en el sector salud y alimentario, entre otros.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias extremófilas son organismo que habitan en condiciones fisicoquímicas extremas como, por ejemplo, altas o bajas temperaturas, altas presiones, niveles de radiación y anoxia, así mismo existen microorganismos que habitan lugares con altas concentraciones de sal⁵. Los organismos que requieren altas concentraciones para su crecimiento óptimo de sal se les denomina organismos halófilos, aunque existen otros organismos llamados halotolerantes, que pueden habitar en ambientes salinos en un rango de concentración de este mineral, sin embargo, no es necesario para su crecimiento¹.

En los últimos años se ha estudiado a las bacterias halófilas y halotolerantes que habitan ambientes salinos, para diferentes procesos biotecnológicos y la producción de fármacos, como por ejemplo, los antibióticos; además han resultado ideales para una serie de aplicaciones en la biotecnología industrial debido a las ventajas de tolerar altas o bajas temperaturas, pH ácidos o alcalinos y alta salinidad, proporcionando un menor costo de producción, una disminución en la utilización de energía y fácil recuperación de los productos que requieren condiciones extremas¹.

Estas bacterias halotolerantes forman parte a varios géneros, como *Bacillus*, *Halobacillus*, *Halomonas*, entre otros, que se caracterizan por tener un crecimiento rápido, bajas demandas nutricionales y la capacidad de utilizar una variedad de compuestos como única fuente de carbono y energía. Estos organismos han resultado útiles para aplicaciones comerciales al producir enzimas hidrolíticas como amilasa, lipasa y proteasa (gelatinasa)⁶.

La enzima amilasa es utilizada en diversas industrias como en la producción de zumos de frutas, panificación, jarabes de glucosa y bebidas alcohólicas. Esta enzima, producida por los microorganismos, tienen la capacidad de hidrolizar el almidón en dextrina y pequeños polímeros de glucosa, resultando ser una de las enzimas más utilizadas en el primer lugar en el mercado mundial². Las bacterias halotolerantes productoras de enzimas como las proteasas (galatinasa) son requeridas para las industrias de detergentes; en la industria del curtido para depilar las pieles y cueros de animales en lugar de utilizar un tratamiento con sulfuro de sodio; otras aplicaciones son en tratamiento de quemaduras y heridas purulentas; también actúa como agente trombolítico al tratar coágulos sanguíneos, etc³.

En cuanto a la enzima extracelular ADNasa, que producen microorganismo como las bacterias, tiene como función catalizar la hidrólisis del ácido desoxirribonucleico (ADN) rompiendo los enlaces fosfodiéster. Por ello se considera que la ADNasa tiene como finalidad en la utilización del ADN, debido a que las bacterias pueden producir ADNasas para utilizar el ADN extracelular como fuente de carbono, nitrógeno y fósforo; de igual forma son requeridas estas enzimas en el ciclo de nutrientes en el medio ambiente. Otra finalidad que tiene la enzima es el de causar virulencia, degradando así las trampas extracelulares del ADN de los neutrófilos. Así mismo las bacterias utilizan las ADNasas como un recurso para competir con otras bacterias por espacio o recursos⁷.

Se ha reportado que la enzima extracelular lipasa resulta ser un biocatalizador que podría ser útil para la producción de productos químicos finos. También se conoce que esta enzima halófila todavía pertenece activa a 50°C, resultando ser útil para lo que se requiere en la producción industrial⁸.

TEORÍA

Las bacterias halófilas son microorganismos extremófilos que habitan en una variedad de concentraciones de sal, en hábitats donde no es posible que habite otra forma de vida⁹, tales ambientes pueden encontrarse en lagos salados, salmueras de aguas profundas, estanques de evaporación de salinas, entre otros⁵.

Debido a que estos microorganismos tienen la capacidad a las adaptaciones que han adquirido durante su proceso de evolución, pueden sobrevivir en ambientes extremos. Dentro de las adaptaciones celulares, está la producción de osmoprotectores, que consiste en aumentar la actividad del citoplasma osmótico con la síntesis y acumulación de solutos compatibles, para ajustarse al ambiente que rodea a estos microorganismos o alcanzar el estado de equilibrio al aumentar las altas concentraciones de sal para que coincida su citoplasma con las concentraciones altas de sal ambiental, logrando evitar una pérdida excesiva de agua debida a la saturación de NaCl¹⁰.

Se han reportado la presencia de phyla como Actinobacterias y Proteobacterias a algunos organismos halófilos o también halotolerantes⁵. También se han reportado en un trabajo, donde recolectaron tomas de agua y sedimento en el lago Aran-Bidgol en Irán, donde caracterizaron cepas selectivas debido a la función de su capacidad para producir más enzimas hidrolíticas y fueron secuenciadas y comparadas del gen 16S rRNA, los aislados se identificaron como miembros de los

géneros: *Halobacillus*, *Bacillus*, *Thalassobacillus*, *Salinicoccus*, *Nesterenkonia*, *Marinococcus*, *Staphylococcus*, *Halomonas*, *Idiomarina*, and *Salicola* ⁶. En cuanto en la producción de ADNasa se reportaron en un estudio llevado a cabo en el Reino unido, por tomas de muestra de sedimentos, agua de mar y algas en el océano, la mayoría de los aislados que fueron capaces de producir ADNasa pertenecían al género *Bacillus* (28%) y todos fueron identificados como termófilos⁷. Mientras que un estudio llevado a cabo en diferentes ubicaciones en los manantiales del valle de Shahdara, Islamabad en Paquistán, recolectaron muestras de agua dulce, el cual encontraron aislados bacterianos, productores de la enzima amilasa, con forma celular bacilos grampositivos y positivos para tinción de esporas; además caracterizaron mediante pruebas morfológicas y bioquímicas los aislados, permitiendo identificar como *Bacillus* y *Clostridium spp.*; así mismo identificaron con secuenciación del gen 16S rRNA los cuales tenían los aislado el 97 % de similitud con *Paraclostridium benzoelyticum*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus tequilensis* ². Otro estudio llevado a cabo en la Universidad Islámica Internacional de Malasia, aislaron bacterias halófilas de una muestra de salsa de pescado fermentada. Donde crecieron bacterias halotolerantes moderadas, las cuales crecieron de un 5 al 10 % de NaCl, donde se observaron la formación de esporas para poder de resistir una amplia gama de tensiones fisiológicas; las endosporas son producida por algunas especies de bacterias Gram positivas al estar expuestas a condiciones ambientales duras, como en ambientes con altas concentraciones de sal. En este estudio aislaron una bacteria halotolerante productora de proteasa, *Bacillus vietnamensis sp.* una bacteria aeróbica, moderadamente halotolerante, formadora de endosporas de salsa de pescado vietnamita³.

PARTE EXPERIMENTAL

Para cada sitio muestreado se midieron variables ambientales como temperatura del agua con un termómetro, la salinidad con un refractómetro, la profundidad de los estanques con un metro. Se colectaron muestras de agua de seis estanques de las Salineras Chiquitas, para ello se utilizaron frascos de vidrio estériles (tomando en cuenta la coloración de cada estanque), se utilizó 0.1 mL de las muestras, donde se inocularon en cajas Petri conteniendo agar nutritivo. Se cuantificaron las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de cada uno de los seis sitios. Posteriormente en el medio de agar nutritivo, se hicieron aislamientos de las colonias al azar y registros de las formas celulares mediante observaciones al microscopio óptico, previa tinción de Gram.

Para determinar la capacidad de los cultivos puros (donde se utilizaron colonias puras de uno de los seis sitios muestreados) para producir enzimas extracelulares como ADNasa, amilasa, lipasa y gelatinasa, se llevó a cabo la inoculación en agares de prueba con su respectiva identificación para cada enzima. Se sembraron los cultivos puros en caldo nutritivo y posteriormente se inocularon en los agares de prueba. Se colocaron en la incubadora a 28°C por un día; una vez hubo crecimiento en los medios de cultivos, se coló en ADNasa un reactivo (ácido clorhídrico), así también para amilasa (lúgól) y gelatinasa (cloruro de mercurio), con la finalidad de observar si dio positivo a cada prueba observando un halo trasparente alrededor de cada colonia sembrada en los agares de prueba.

RESULTADOS

En agar nutritivo, las UFC/mL fueron de 2.2×10^2 , 4.7×10^2 , 1.0×10^3 , 1.1×10^3 y en dos muestras, las UFC fueron incontables (Tabla 1).

Tabla 1. Variables ambientales y UFC/mL por cada sitio muestreado

Sitios	Temperatura	Salinidad	Coloración del agua	Profundidad del estanque	UFC /mL
1B	34°C	90%	Café	3.2 cm	Incontable
1C	33°C	80%	Café	1.8 cm	1.05×10^3
1D	28°C	100%	Café	-	Incontable

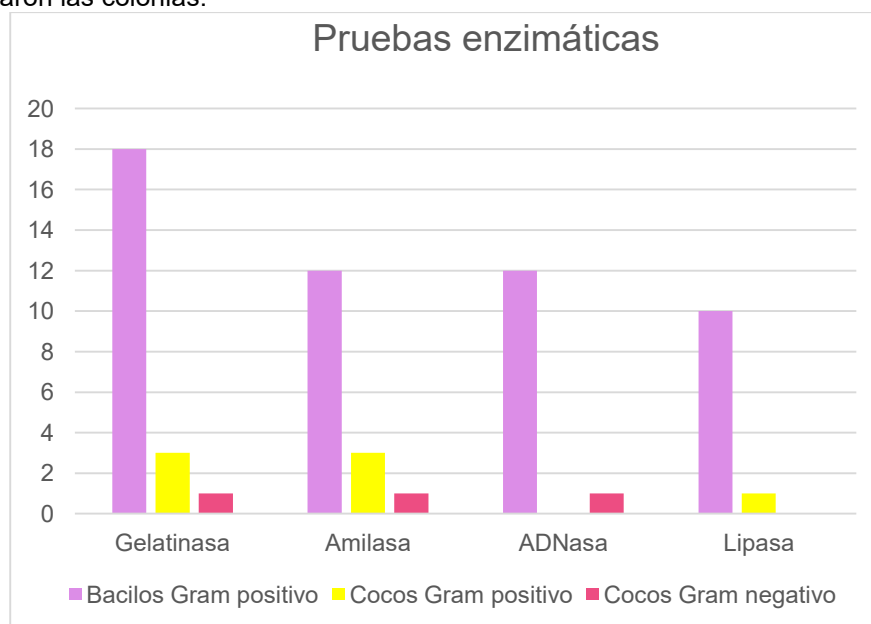
2A	34°C	90%	Amarilla	6.2 cm	4.7x10 ²
3B	33°C	100%	Naranja claro	-	1.13x10 ³
3D	31°C	100%	Naranja intenso	-	2.2x10 ²

A partir del agar nutritivo (de un estanque) se obtuvieron 22 cultivos puros, la mayoría de color blanco (64%), 82% presentaron forma bacilar y 18% de cocos, 45% presentaron producción de endoesporas; 95% obtuvieron respuesta a tinción de Gram positivos y 5% Gram negativos. En cuanto a la producción de enzimas extracelulares (Gráfica 2) todas las 22 colonias aisladas (el 100%) produjeron la enzima gelatinasa; para la producción de amilasa fue de 82%; en cuanto a ADNasa se obtuvo 59%; mientras que para la producción del enzima lipasa produjeron la mitad de las colonias aisladas. Al analizar la producción enzimática con respecto a la forma celular podemos observar en la Tabla 2 y en la Gráfica 1 que todas las bacterias Gram positivas produjeron gelatinasa, de igual forma los cocos Gram positivos y el coco Gram negativo. Con respecto a la producción de amilasa todos los cocos Gram positivo y Gram negativo producen esta enzima y gran parte de los bacilos Gram positivos, de igual forma para la enzima ADNasa, aunque disminuyo un poco más el numero de bacilos que la producen. Para la enzima lipasa disminuye aún más las colonias de bacilos Gram positivos que producen esta enzima, y solo se puede apreciar que uno de los tres cocos Gram positivo registrados tiene la capacidad de producir esta enzima.

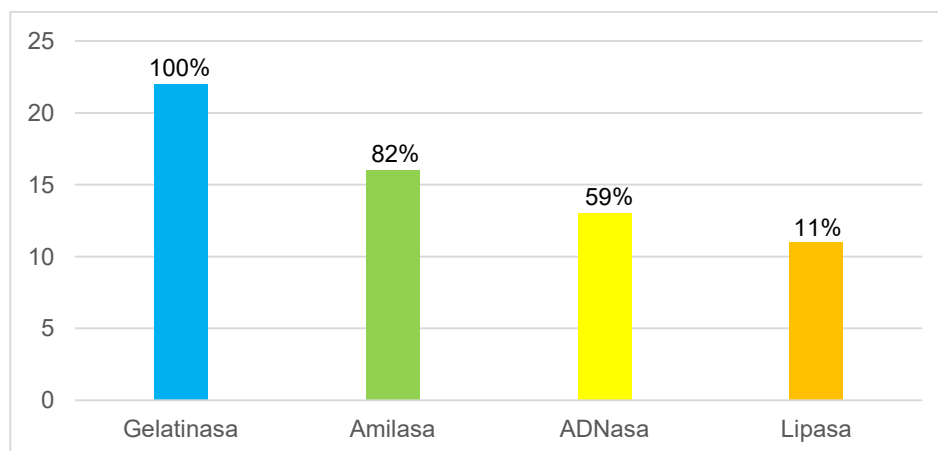
Tabla 2.

	Total de colonias aisladas	Gelatinasa	Amilasa	ADNasa	Lipasa
Bacilos Gram positivo	18	18	12	12	10
Cocos Gram positivo	3	3	3	0	1
Cocos Gram negativo	1	1	1	1	0

Gráfica 1. Respuesta a las pruebas enzimáticas en los diferentes formas celulares y tinción de Gram que presentaron las colonias.



Gráfica 2. Respuesta de las pruebas enzimáticas desde una perspectiva general



CONCLUSIONES

Existe la presencia de microorganismo como las bacterias heterótrofas habitando en los estanques de las Salineras Chiquitas, en Zapotitlán, Puebla. Fue posible aislar de estos estanques, donde se produce la sal, bacterias halotolerantes, ya que estas bacterias fueron capaces de crecer en un medio de agar nutritivo con concentraciones mínimas de sal.

La mayoría de las bacterias aisladas de uno de los estanques de las Salineras Chiquitas presentaron características del género *Bacillus*, como la formación celular de bacilos Gram positivo y la producción de endosporas, el cual es común en ambientes salinos. También se piensa que estas bacterias pueden pertenecer a tal género debido a que tienen la capacidad de producir enzimas hidrolíticas como amilasa, lipasa, ADNasa y gelatinasa, las cuales se ha reportado la existencia especies pertenecientes al género *Bacillus* que tienen la capacidad de producir estas enzimas extracelulares y que han resultado de mucha importancia para la producción industrial.

BIBLIOGRAFÍA

1. M. Costa, M. Cerletti, "Halófilos: la vida en la sal", Instituto de Investigaciones Biológicas, Vol. 30, 176, 2021, pp. 38-43.
2. S. Afridi, N. Ali, M. Niaz, S. I. Hussain, F. U. Farman, B. C. Kim, "Molecular characterization and production of bacterial amylases from Shahdara Spring, Pakistan", Applied ecology and environmental research, Vol. 18, 2, 2020, pp. 2611-2620.
3. N.S.S. Abd, A. Amid, D.J. Noraini, N.A.A. Shukor "Isolation and identification of halophilic bacteria producing halotolerant protease", Galeri Warisan Sains, Vol. 1,1, 2017, pp. 07-09.
4. M. L. Flores, A. I. Zavaleta, Y. Zambrano, L. Cervantes, V. Izaguirre, "Bacterias halófilas moderadas productoras de hidrolasas de interés biotecnológico", Ciencia e Investigación, Vol.13, 1, 2010, pp. 42-46.
5. A. Velásquez, M. Quintero, E. Jiménez- Vergara, L. Blandón, J. Gomez-León, "Microorganismos marinos extremófilos con potencial interés en estudios de bioprospección ". Revista de la Facultad de Ciencias, Vol. 7,2, 2018, pp. 9-43.
6. H. Babavaliana, M. A. Amoozegarb, A. A. Pourbabaec, M. M. Moghaddama, F. Sha, "Isolation and Identification of Moderately Halophilic Bacteria Producing Hydrolytic Enzymes from the Largest Hypersaline Playa in Iran ", Microbiology, 2013, Vol. 82, 4, pp. 466–474.
7. A. S. M. Al-Wahaibi, E. Lapinska, N. Rajarajan, S. Dobretsov, R. Upstill-Goddard, J. G. Burgess, "Secretion of DNases by marine bacteria: a culture based and bioinformatics approach ", Frontiers in Microbiology, Vol. 10, 969, 2019, pp. 1-12.

8. R. Waditee-Sirisattha, H. Kageyama, T. Takabe, "Halophilic microorganism resources and their applications in industrial and environmental biotechnology ", AIMS Microbiology, Vol. 2, 1, 2016, pp. 42-54.
9. T.P. Thompson, BF Gilmer, "Exploring halophilic environments as a source of new antibiotics ", Critical Reviews in Microbiology, Vol. 50, 3, 2023, pp. 1-30.
10. H. Santhaseelan, V.T. Dinakaran, H.U. Dahms, J.M. Ahamed, S.G. Murugaiah, M. Krishnan, J.S. Hwang, A.J. Rathinam "Recent Antimicrobial Responses of Halophilic Microbes in Clinical Pathogens ", Microorganisms Vol. 10, 41, 2022, pp. 1-19.

EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE RHAMNUS PURSHIANA: ACTIVIDAD HEMOLÍTICA, POTENCIAL ANTINFLAMATORIO Y ACTIVIDAD BACTERICIDA FRENTE A BACTERIAS MULTIFARMACORRESISTENTES

Ana Karen Torres-Acosta¹, David Gilberto García-Hernández¹, Raymundo Alejandro Pérez-Hernández¹, David Mizaël Ortiz-Martínez¹ y Aldo Rodrigo González-Luna¹

¹ UANL, facultad de Ciencias Biológicas.
anakaren.torresacosta@yahoo.com.mx

RESUMEN

El interés en las plantas medicinales se ha convertido en un campo de investigación de gran relevancia debido a varios factores, entre ellos, la necesidad de encontrar tratamientos efectivos para enfermedades emergentes, terapias alternativas y complementarias, así como la búsqueda de recursos más sustentables y respetuosos con el medio ambiente. *Rhamnus purshiana*, comúnmente conocida como cáscara sagrada es una planta con propiedades medicinales importantes. Su corteza se ha utilizado tradicionalmente como laxantes naturales debido a su contenido de compuestos llamados antraquinonas, que estimulan el movimiento intestinal. En este trabajo, se evaluó su actividad bactericida frente a bacterias tanto Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*) como Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*) así como su porcentaje hemolítico y anti-deznaturalizante esto para lograr evaluar su potencial para ser complemento al uso de fármacos. Para las pruebas microbiológicas se utilizó la técnica descrita por la CLSI (2012) micro-dilución (Concentración mínima inhibitoria) donde se obtuvo que *E. coli* presentó una CMI de 250 ppm con un 95.82% de actividad inhibitoria de crecimiento, *P. aeruginosa* a 1000 ppm con 75.47%, *K. pneumoniae* a 62.5 ppm con 90.71%, *A. baumannii* a 62.5ppm con 80%, *E. faecalis* a 250ppm con 94.25% y *S. aureus* a 125 ppm con 94.60%. Mientras que en las pruebas hemolíticas se utilizó la metodología descrita por Espinoza-Mijangos¹ que determina el grado de toxicidad de la planta estudiada utilizando diferentes concentraciones del extracto. Se obtuvo que a una concentración de 62.5 ppm tiene un porcentaje de hemólisis de 5.77%. En la metodología para la determinación de la actividad anti-desnaturalizante se utilizó la técnica de Ghumre et al. (2017) con algunas modificaciones la cual consiste en reportar de manera visual la presencia de proteínas coaguladas después de los tratamientos con PBS (Buffer de solución salina) a una concentración de 1000-31.25 ppm en comparación con un estándar de diclofenaco sódico bajo las mismas concentraciones, realizando por triplicado todos los ensayos. Donde los ensayos mostraron una actividad igual y superior al control de diclofenaco sódico a partir de 125 ppm. Basándonos en los resultados obtenidos, el extracto metanólico, la cáscara sagrada presentó actividad siendo en contra de *E. coli* la que muestra mayor actividad inhibitoria reportando un 95.82%; en las pruebas hemolíticas reveló que a una concentración de 62.5 ppm posee una toxicidad de 5.77%; la actividad anti-desnaturalizante reportó que la cáscara sagrada tiene mayor actividad anti-deznaturalizante en comparación con el estándar de diclofenaco a una concentración de 125 ppm.

INTRODUCCIÓN

En un contexto global donde la resistencia a los antibióticos representa una creciente amenaza para la salud pública, la búsqueda de alternativas terapéuticas eficaces se ha vuelto imperativa. En este marco, las plantas medicinales emergen como una valiosa fuente de fitocompuestos con actividad antibacteriana. Históricamente, diversas culturas han empleado extractos vegetales para el tratamiento de enfermedades, y en la actualidad se revalúa su potencial para combatir patógenos resistentes a los fármacos convencionales. Este enfoque no solo recupera prácticas etnomedicinales ancestrales, sino que también ofrece nuevas perspectivas para enfrentar infecciones refractarias a los tratamientos antibióticos tradicionales. *Rhamnus purshiana* es una planta con propiedades medicinales significativas. Sus cortezas se han utilizado tradicionalmente como laxantes naturales debido a su contenido de antraquinonas, compuestos que estimulan la motilidad intestinal. Esta planta ha sido fundamental en la fitoterapia y ha sido empleada durante siglos para tratar el estreñimiento y promover la salud digestiva. Su relevancia radica en su capacidad para proporcionar

alivio del estreñimiento de manera natural y eficaz, ofreciendo una alternativa a los laxantes sintéticos. En el presente trabajo se utilizará *Rhamnus purshiana*, comúnmente conocida como cáscara sagrada, para poder evaluar su actividad bactericida frente a bacterias tanto Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*) como Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*) y con los resultados obtenidos podemos prospectar el extracto como candidato como complementos de fármacos

PARTE EXPERIMENTAL

Material biológico

Tabla 1. Las cepas fueron proporcionadas por el laboratorio de química analítica donde se encuentran preservadas

Cepas bacterianas			
Gram positivas		Gram negativas	
<i>Staphylococcus aureus</i>	BAA-44	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	700603
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	<i>Acinetobacter baumannii</i>	15308
		<i>Escherichia coli</i>	25922
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853

Material vegetal

Tabla 2. La materia vegetal fue adquirida de la franquicia comercial PACALLI.

Materia orgánica
<i>Rhamnus purshiana</i> (Cascara sagrada)

Activación de las cepas:

Las cepas de bacterias a utilizar se obtuvieron del Laboratorio de Química analítica, se preparó caldo nutritivo para posteriormente vaciar una cantidad de 3 ml en tubos de ensayo previamente estandarizados a 600 nm, posteriormente se esterilizo y se realizó la prueba de esterilidad de los mismos en la incubadora alrededor de 24 h, después de haber dejado transcurrir el tiempo determinado se preparó la campana de flujo laminar para su utilización, se esterilizo el área con alcohol al 70 % y se dejó reposar por alrededor de 15 min bajo la luz UV, posteriormente se preparó el material a utilizar dentro de la campana laminar de flujo, con el flujo encendido y un mechero dentro de este, se procedió a inocular utilizando una asa bacteriológica previamente flameada en el mechero para posteriormente tomar una asada del cultivo de origen e inocular los tubos con el caldo nutritivo, después se etiqueto correctamente y se llevó a incubar alrededor de 24 h (CLSI, 2012).

Escalamiento McFarland

Al pasar el tiempo de incubación se tomaron los tubos activados y se pasaron por el espectrofotómetro a 600 nm buscando obtener una lectura inicial a partir de la cual se buscó una lectura de 0.100 a 0.110, esta se obtuvo de la siguiente forma, se tomó un tubo de cristal con caldo nutritivo, se fueron agregando microlitros a partir de los tubos activados hasta a lectura de 0.100 a 0.110, esto se realizó en una campana de flujo laminar (CLSI, 2012).

Preparación de los extractos

La obtención de las materias vegetales fue adquirida de la casa comercial Pacalli® posteriormente pasaron por un proceso de maceración en metanol y eliminación de su solvente a presión reducida en el rotavapor. Se resuspendió el extracto a 2000 ppm para el ensayo CMI en microplacas de 96 pocillos.

Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Dentro de la campana de flujo laminar se realizó el ensayo CMI en microplacas de plástico de 96 pocillos de la siguiente manera: de los pocillos A1,B1,C1, F1, G1 y H1 se agregaron 200 microlitros del extracto a estudiar, posteriormente de los pocillos A, B, C, F, G y H del 1 al 7 se agregó medio Müller Hilton después se hicieron las diluciones tomando 100microlitros de los pocillos A1,B1,C1, F1, G1 y H1 y se homogenizo con los pocillos A, B, C, F, G y H del 2 al 7 y se desechó el restante en el pocillo 8 de cada fila, de los pocillos A,B y C del 2 al 7 se agregaron 100 microlitros de la bacteria estandarizada y de los pocillos F, G y H de 2 al 7 se agregó medio nuevamente y se homogenizo, en los pocillos A, B y C se agregaron 100 microlitros de medio y 100 microlitros de bacteria y se dejaron incubar por 24 h (CLSI, 2012).

Hemolisis: Preparación de paquete globular

Se extrajeron alrededor de 3 tubos de sangre de un paciente tipo O+, después de haber extraído la sangre se procedió a centrifugar 3 veces alrededor de 5:00 min en 5000 rpm, luego se realizó la extracción del sobrenadante con una pipeta Pasteur y se le agrego la misma cantidad retirada de PBS, se volvió a repetir el mismo procedimiento hasta ver clarificado el sobrenadante de los tubos con sangre, en el último lavado se retiró el sobrenadante, después se agregó a un matraz de aforación para preparar una solución al 5% de eritrocitos y aforarlo con PBS.

Prueba hemolítica:

Para la realización de la hemolisis se requirió de 18 tubos cónicos con una capacidad de 2ml previamente etiquetados y se siguió el siguiente procedimiento:

Tratamiento:

Tabla 3. Tratamiento con extractos metanólico.

[uL]	Extracto	PBS	Paquete Globular
1000	25 µl	975 µl	250 µl
800	20 µl	980 µl	250 µl
600	15 µl	985 µl	250 µl
400	10 µl	990 µl	250 µl
200	5 µl	995 µl	250 µl

100	2.5 μl	997.5 μl	250 μl

Blanco:

Tabla 4. Blanco con extractos metanolico

[uL]	Extracto	PBS	Paquete Globular.
1000	25 μl	975 μl	250 μl
800	20 μl	980 μl	250 μl
600	15 μl	985 μl	250 μl
400	10 μl	990 μl	250 μl
200	5 μl	995 μl	250 μl
100	2.5 μl	997.5 μl	250 μl

Control Positivo:

Tabla 5. Control positivo con extractos metanólicos

[uL]	Agua destilada	Paquete Globular
1000	1000 μl	250 μl
800	1000 μl	250 μl
600	1000 μl	250 μl
400	1000 μl	250 μl

200	1000 µl	250 µl
100	1000 µl	250 µl

Después de la realización del tratamiento se llevó a incubar alrededor de 30 min, posteriormente se centrifugó durante 5:00 min a una temperatura de 4°C. Al finalizar se extrajeron 200 microlitros de los tubos cónicos y se depositaron en una microplaca de plástico de 96 posillos para su lectura en un lector de microplacas con una absorbancia de 630 nm (CLSI, 2012).

Pruebas Antiinflamatorias:

Diluciones de Diclofenaco:

Se preparo una solución stock la cual contiene como principal reactivo 10 mg de diclofenaco y como solvente 4 ml de PBS la cual se encontraba a 1000 ppm. Se prepararon 5 viales y se etiquetaron a diferentes concentraciones de la siguiente manera: 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62.05 y 31.05. Se tomaron 2 ml de la solución stock y se le adicionaron 2 ml de PBS para obtener nuestro segundo vial a 500 ppm, de la segunda dilución se tomaron 2 ml y se le adicionaron 2 ml de PBS para obtener 250 ppm, dicho procedimiento se realizó hasta llegar a la dilución 31.05 ppm, de la cual se desecharon los últimos 2 ml restantes.

Diluciones de Extracto:

Se preparo una solución stock la cual contiene como principal reactivo 10 mg de cascará sagrada y como solvente 4 ml de PBS la cual se encontraba a 1000 ppm. Se prepararon 5 viales y se etiquetarán a diferentes concentraciones de la siguiente manera: 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62.05 y 31.05. Se tomaron 2 ml de la solución stock y se le adicionaron 2 ml de PBS para obtener nuestro segundo vial a 500 ppm, de la segunda dilución se tomaron 2 ml y se le adicionaron 2 ml de PBS para obtener 250 ppm, dicho procedimiento se realizó hasta llegar a la dilución 31.05 ppm, de la cual se desecharán los últimos 2 ml restantes.

Diluciones de Albumina 3%:

Se tomaron 1.5 ml de nuestra Ovoalbúmina y se colocaron en un tubo eppendorf con tapa de 15 ml estéril y se agregaron 8.5 ml de PBS.

Prueba antiinflamatoria:

Se prepararon las diluciones de extracto, diclofenaco y albumina, posteriormente se etiquetaron los tubos de ensayo y se colocaron los volúmenes y concentraciones indicadas en las tablas 14, 15, 16 y 17. Esto se dejó reposar por alrededor de 15 min a temperatura ambiente, transcurridos los 15 min se metieron los tubos de ensayo en baño maría por alrededor de 70 ° C y se dejaron transcurrir 10 min, para finalizar se extrajo el tratamiento del baño maría y se dejó atemperar por alrededor de 15 min para posteriormente extraer 2 ml de cada uno de los tubos y colocarlos por tandas en celdas para su lectura en el espectrofotómetro 630 nm.

Prueba antiinflamatoria

Tabla 6. Prueba antiinflamatoria con extractos metanólicos

[ppm]	Extracto	PBS	Albumina.
1000	800 µl	1.12 µl	80 µl

500	800 µl	1.12 µl	80 µl
250	800 µl	1.12 µl	80 µl
125	800 µl	1.12 µl	80 µl
62.05	800 µl	1.12 µl	80 µl
31.05	800 µl	1.12 µl	80 µl

Prueba Diclofenaco:

Tabla 7. Prueba antiinflamatoria con reactivo de diclofenaco.

[ppm]	Diclofenaco	PBS	Albumina.
1000	800 µl	1.12 µl	80 µl
500	800 µl	1.12 µl	80 µl
250	800 µl	1.12 µl	80 µl
125	800 µl	1.12 µl	80 µl
62.05	800 µl	1.12 µl	80 µl
31.05	800 µl	1.12 µl	80 µl

Control negativo:

Tabla 8. Control negativo con reactivo de diclofenaco.

[ppm]	PBS	PBS	Albumina.
1000	800 µl	1.12 µl	80 µl

500	800 µl	1.12 µl	80 µl
250	800 µl	1.12 µl	80 µl
125	800 µl	1.12 µl	80 µl
62.05	800 µl	1.12 µl	80 µl
31.05	800 µl	1.12 µl	80 µl

Blanco:

Tabla 9. Blanco con reactivo de Ovoalbúmina.

[ppm]	Agua destilada	Ovoalbúmina.
1000	1.920 µl	80 µl
500	1.920 µl	80 µl
250	1.920 µl	80 µl
125	1.920 µl	80 µl
62.05	1.920 µl	80 µl
31.05	1.920 µl	80 µl

RESULTADOS

Ensayo de concentración mínima inhibitoria:

Tabla 10: Evaluación de la concentración mínima inhibitoria del extracto metanolico *R. purshiana* sobre bacterias ESKAPE.

Cepas Bacterianas	PPM	CMI (%)
E. faecalis ATTC 29212	125	79.89
S. aureus		

ATCC BAA-44	125	94.60
K. pneumoniae ATCC 700603	62.5	90.71
A. baumannii ATCC 15308	62.5	80.01
P. aeruginosa ATCC 27853	1000	75.47
E. coli ATCC 25922	250	95.70



Figura 1. Tratamiento de *R. purshiana* frente a *A. baumannii* y *K. pneumoniae*.



Figura 2. Tratamiento de *R. purshiana* frente a *P. aeruginosa*.



Figura 3. Tratamiento de *R. purshiana* frente a *E. coli*.



Figura 4. Tratamiento de *R. purshiana* frente a *E. faecalis* y *S. aureus*.

Prueba hemolítica

Tabla 11: Evaluación de actividad hemolítica de extracto metanolico *R. purshiana*.

Concentración (ppm)	Hemolisis (%)
1000	83.50
800	56.62
600	12.06
400	8.39
200	5.77
100	5.50

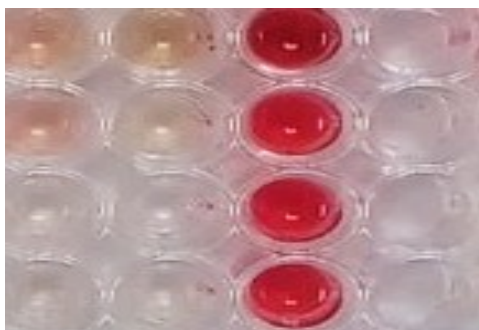


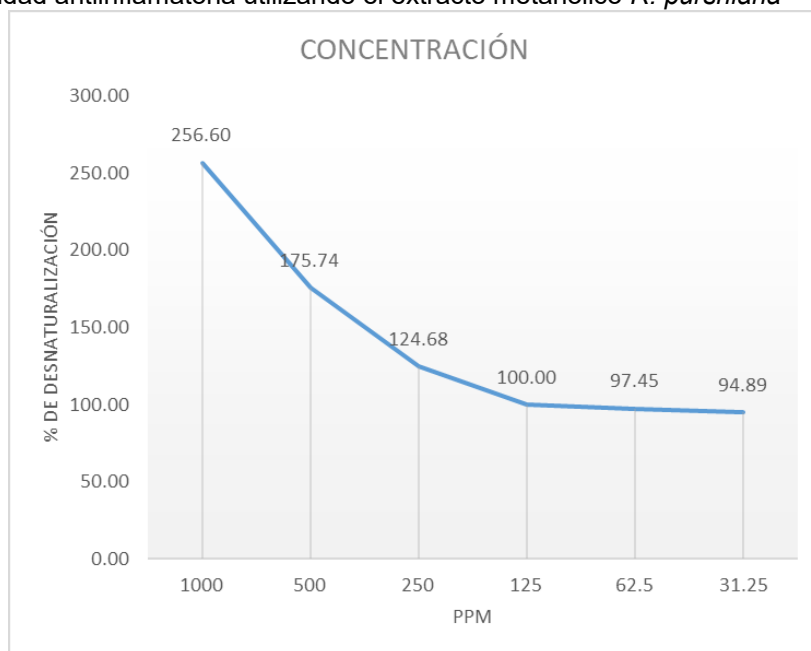
Figura 5. Tratamiento, blanco y control negativo de prueba hemolítica utilizando extracto metanólico de *R. purshiana*.



Figura 6. Repetición de Tratamiento, utilizando extracto metanólico de *R. purshiana*.

Prueba antiinflamatoria

Figura 7: Actividad antiinflamatoria utilizando el extracto metanólico *R. purshiana*



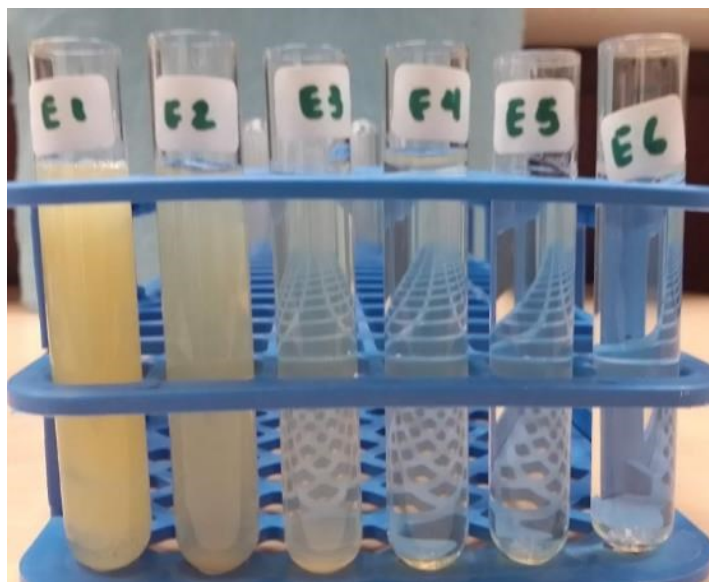


Figura 8. Prueba antiinflamatoria de *R. purshiana*.

CONCLUSIONES

En resumen, las pruebas de concentración mínima inhibitoria (MIC) demostraron que el extracto metanólico de cascara sagrada posee una actividad antibacteriana significativa siendo las bacterias Gram negativo con las cuales presenta mayor actividad a menor concentración. En términos de toxicidad, el extracto presentó una moderada citotoxicidad a una concentración de 200 ppm. Cascara sagrada presento un 100 % de actividad antiinflamatoria a una concentración de 125 ppm. Aunque no hay estudios que reporten la actividad de *R. purshiana*, estudios en la subespecie *R. davurica* han demostrado dicha actividad. En conclusión, cascara sagrada tiene un potencial significativo como agente antibacteriano y antiinflamatorio. Sin embargo, se necesitan realizar pruebas de tamizaje fitoquímico para determinar los metabolitos presentes en el extracto y determinar los responsables que le otorgan altos índices de citotoxicidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Bouaouda, K., et al. (2023). HPLC-UV-MS/MS profiling of phenolics from *Euphorbia nicaeensis* (All.) leaf and stem and its antioxidant and anti-protein denaturation activities. *Progress In Microbes & Molecular Biology*, 6(1). doi: 10.36877/pmmb.a0000331
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*. CLSI document M07-A9. 32(2).
- Espinoza Mijangos, A. J. (2023). *Evaluación de Extractos Metanólicos Libres y Nanoencapsulados de Smilax spp., Chiranthodendron pentadactylon, y Peumus boldus Contra Bacterias de Interés Dermatológico [Tesis de maestría]* Universidad Autónoma de Nuevo León
- Betrán, A., et al. (2020). Resistencia antibiótica de *Escherichia coli* en infecciones urinarias nosocomiales y adquiridas en la comunidad del Sector Sanitario de Huesca 2016-2018. *Revista clínica de medicina de familia*, 13 (3), 198–202. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-695X2020000300198
- Castro Orozco, R., et al. (2018). Resistencia antimicrobiana en *staphylococcus aureus* y *staphylococcus epidermidis*: tendencia temporal (2010-2016) y fenotipos de multirresistencia, Cartagena (Colombia). *Biosalud*, 17 (2), 25–36. <https://doi.org/10.17151/biosa.2018.17.2.2>

- Herrera Dutan, et al. (2021). Resistencia antimicrobiana en *Klebsiella pneumoniae*, Ecuador. *Revista Vive*, 4(12), 470–483. <https://doi.org/10.33996/revistavive.v4i12.107>
- Plantas de acción laxante en el tratamiento del estreñimiento primario. (2000). *Offarm*, 19(3), 118–123. <https://www.elsevier.es/pt-revista-offarm-4-articulo-plantas-accion-laxante-el-tratamiento-15469>
- Pardi, G., et al. (2009). Detección de *enterococcus faecalis* en dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico. *Acta odontológica venezolana*, 47 (1), 110–121. https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652009000100014
- Rincón, S., Panesso, D., Díaz, L., Carvajal, L. P., Reyes, J., Munita, J. M., & Arias, C. A. (2014). Resistencia a antibióticos de última línea en cocos Gram positivos: la era posterior a la vancomicina. *biomédica: Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 34(0 1), 191. <https://doi.org/10.1590/S0120-41572014000500022>
- Miller, J. S. (2011). The discovery of medicines from plants: A current biological Perspective1. *Economic Botany*, 65(4), 396–407. <https://doi.org/10.1007/s12231-011-9171-2>

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *PHYSALIS IXOCARPA* SOBRE CEPAS MULTIFARMACORESISTENTES DE INTERÉS NOSOCOMIAL

Israel Valle Villavicencio¹, David Gilberto García Hernández¹, Aldo Fabio Bazaldúa Rodríguez¹,
Magda Elizabeth Hernández García¹ y Joel Horacio Elizondo Luevano²

¹Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, ²Facultad de Agronomía, UANL
israel.vallev@uanl.edu.mx

RESUMEN

El reino vegetal cuenta con una serie de sustancias químicas que se sintetizan bajo distintos estímulos durante el ciclo de vida de la planta, estos metabolitos secundarios representan un área de gran interés para la farmacología gracias a sus aplicaciones médicas. Una de ellas, la actividad antimicrobiana, ha cobrado especial atención debido al aumento de la resistencia a los antibióticos de primera línea generando un aumento en la creciente necesidad de tratamientos alternos, y es aquí donde los productos naturales son una viable alternativa. En el presente trabajo de investigación, siguiendo la metodología de microdilución descrita por la CLSI (M07-A9) 2012¹, se analizó la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *P. ixocarpa* sobre bacterias multifarmacoresistentes de interés nosocomial *Acinetobacter baumannii* ATCC 15308 (CMI 187.5 ppm), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (CMI 375 ppm), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (CMI 93.8 ppm), *Escherichia coli* ATCC 25922 (CMI 375 ppm) y *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-44 (CMI 250 ppm). Con el objetivo de evaluar la actividad citotóxica de esta planta se determinó su actividad hemolítica² obteniendo un porcentaje de hemólisis de 89.03 %, 84.90%, 82.94%, 76.74%, 83.20% y 65.92% a las concentraciones de 1000, 500, 250, 125, 62.5 y 31.75 ppm respectivamente. Es importante resaltar que las 6 cepas multifarmacoresistentes presentaron sensibilidad a concentraciones inferiores a 1000 ppm y una actividad hemolítica superior al 65% en todas las concentraciones evaluadas, comprobando así la actividad antimicrobiana como alternativa a fármacos y un precedente para el tratamiento tópico de infecciones bacterianas.

INTRODUCCIÓN

Desde el surgimiento de la civilización, los humanos han identificado en su entorno, especialmente las plantas, como fuente no solo de alimento sino de recursos que les permitían desarrollar sus vidas sorteando las problemáticas que se presentaban en sus vidas, de este modo transformaron los diferentes ingredientes de los que disponían, de especias a medicinas, pues a través de prueba y error, nuestros antepasados pudieron identificar plantas que presentaban un tratamiento a distintas enfermedades y padecimientos (Jamshidi-Kia, 2017). La transmisión de esta información a lo largo de la historia resultó en el desarrollo de la herbolaria y la medicina tradicional llegando a nuestros días como un componente fundamental en la cultura de nuestro país. Para el territorio mexicano, la botánica ha sido la fuente más utilizada por comunidades o pueblos, pues su eficacia y accesibilidad han sido documentadas desde el México prehispánico en el código de la Cruz-Badiano. En la actualidad se tiene el conocimiento ante la CONABIO de 4,000 especies de plantas de uso medicinal, lo que representa el 15% de la flora total de México (SEMARNAT, 2023).

Hoy en día mucha de la información sobre las propiedades medicinales de las plantas, originalmente empírica, se ha comprobado de manera experimental para la identificación de múltiples actividades biológicas, coincidiendo con el aumento de la prevalencia patologías causadas por microorganismos multifarmacoresistente. Una de las cuales es la antimicrobiana, que es derivada de los compuestos químicos presentes en las plantas, estos podrían ser la respuesta a la resistencia que presentan las bacterias a fármacos cuando pierden su efectividad; disparando su prevalencia, diseminación y morbilidad, siendo los ambientes nosocomiales uno de los focos más importantes para su propagación.

Las bacterias multifarmacoresistentes son aquellas bacterias que por el descuido en los tratamientos con antibiótico o de manera natural presentan una resistencia a los tratamientos antes aplicados para el manejo de patologías causadas por estas, de modo que su combate y tratamiento,

aumentando así el riesgo de propagación conllevando un aumento considerable de la morbilidad, al principio las infecciones causadas por estas bacterias se limitaban en ambientes nosocomiales, sin embargo, se ha observado la diseminación de estos agentes infecciosos volviéndolo un fenómeno común en nuestros días (Bharadwaj et. al., 2022). La Organización Mundial de la Salud tiene identificadas como prioritarias a las bacterias utilizadas en el presente estudio, por lo que la efectividad del extracto metanólico empleado resulta de gran interés.

En esta investigación, se trabajó con la vesícula costillada de *Physalis ixocarpa* un fruto globoso de pulpa acuosa, numerosas semillas y su característica cáscara, es conocido en México con varios nombres: tomatillo, tomate de cáscara, tomate verde, etc. A lo largo del país ha aparecido en vestigios arqueológicos donde se identificó su uso en la alimentación desde tiempos precolombinos, su implementación llegó hasta nuestros días pues el tomatillo es un ingrediente muy popular en la gastronomía mexicana especialmente en la preparación de salsas (Hernández & Yáñez, 2009). En el territorio nacional se conocen 50 especies del género *Physalis* por lo que a México se le considera como el punto de origen del taxón (Medina-Medrano et al., 2012). Es la quinta hortaliza más importante del país con una producción de 563,000 toneladas en 2011 distribuida en plantíos de 30 estados (Vidsupra 2013).

La planta ha sido utilizada en la herbolaria para tratar múltiples malestares como los son la tos, fiebre o amigdalitis; las hojas para desordenes gastrointestinales y la cáscara, a manera de infusión, se usa por diabéticos y puede bajar la presión sanguínea (CONABIO, 2022). Sin embargo, una de las aplicaciones más importantes es la antimicrobiana derivada de las "físalinas", compuestos esteroideos que según Gamero-Vellanos y colaboradores en 2012¹, reportaron actividad antibacteriana de *Physalis alkenengi* en una sepsis inducida con *Pseudomonas aureuginosa* en roedores. Así mismo Zunpeng et. al en 2016 añaden el papel de ciertos flavonoides en el aporte al efecto antibacteriano probado tanto *in vitro* como *in vivo*.



Figura 1: *Physalis ixocarpa*, tomatillo

OBJETIVO

Evaluar la actividad antimicrobiana presente en el extracto metanólico de *Physalis ixocarpa* sobre 5 cepas multifármacorresistentes (*Acinetobacter baumannii* ATCC 15308, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-44) determinando su Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y evaluar si existe efecto lítico en eritrocitos humanos para conocer las posibles implicaciones toxicológicas en el empleo del extracto.

Materiales y métodos

Para la elaboración del extracto se compró en supermercados locales la planta y se recolectó la cáscara, se procedió a secarse a la sombra para triturar 20 g (peso seco) utilizando un molino manual; el residuo triturado pasó a maceración mecánica en 500 ml de metanol realizando 3 lavados cada 48hrs. El volumen final de la maceración (1500 ml) se filtró y se continuó con la evaporación

del solvente a presión reducida utilizando un rotavapor, se recuperó el extracto y se resuspendió a 3000 ppm para el análisis de su actividad antimicrobiana.

Para la determinación de su concentración mínima inhibitoria se siguió la metodología de microdilución descrita por el CLSI (M07-A9) 2012, se utilizó una placa de 96 pocillos donde se realizaron las diluciones seriadas, se inocularon por triplicado con la bacteria estandarizada al tubo 0.5 de escala McFarland y se incubó 24 h a 37 °C en una incubadora, finalmente se leyó en el espectrofotómetro (Génesis 20, USA) a 540 nm y se procesaron en una base de datos para la determinación de su CMI.

Para la prueba de hemólisis se realizó la metodología empleada por Espinoza-Mijangos (2023), se realizó la extracción de sangre siguiendo la NOM-253-SSA1-2012, se centrifugó retirando el sobrenadante y rellenado el volumen con Buffer Salino de Fosfatos (PBS) 3 veces a 3500rpm. Posteriormente se elaboró el Paquete Globular (PG) al 5% para lo cual se colocaron 5 ml el tejido sanguíneo de glóbulos rojos en un matraz de aforación de 100 ml y se aforó. En tubos cónicos de plástico se colocaron, por triplicado, utilizando el siguiente patrón de dilución: tratamiento (tabla 1), blanco (tabla 2) y control (tabla 3).

Se centrifugaron a 13500 rpm a 4 °C por 5 min., se incubó 30 min. y se recuperó el sobrenadante colocándolo en microplaca de 96 pozos para su lectura a 540 nm en espectrofotómetro, los datos se procesaron en Excel (2015) para conocer su porcentaje de hemólisis.

Tratamiento	1	2	3	4	5	6
Concentración (ppm)	1000	800	600	400	200	100
μL de extracto	25	20	15	10	5	2.5
μL de PBS	975	980	985	990	995	997.5
μL de PG	200	200	200	200	200	200

Tabla 1: Prueba de hemólisis a distintas concentraciones.

Tratamiento	1	2	3	4	5	6
μL de agua destilada	1000	1000	1000	1000	1000	1000
μL de PG	200	200	200	200	200	200

Tabla 2: Blanco, misma concentración en todos los viales.

Tratamiento	1	2	3	4	5	6
μL de extracto	25	20	15	10	5	2.5
μL de PBS	975	980	985	990	995	997.5

Tabla 3: Control positivo para prueba de hemólisis.

RESULTADOS

El extracto metanólico de *P. Ixocarpa* mostró actividad antimicrobiana a distintas concentraciones sobre las cepas bacterianas probadas.

<i>P. Ixocarpa</i> (ppm)	3000	1500	750	375	187.5	93.8	46.9
<i>S. aureus</i>	100.00	100.00	100.00	49.79	75.11	55.15	31.90
<i>K. pneumoniae</i>	100.00	100.00	100.00	50.03	77.86	58.43	24.72
<i>A. baumannii</i>	100.00	100.00	100.00	95.77	71.35	38.49	30.98
<i>E. faecalis</i>	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	82.51	66.32
<i>E. coli</i>	100.00	100.00	100.00	42.49	54.83	10.43	13.24

Tabla 4: % de inhibición.

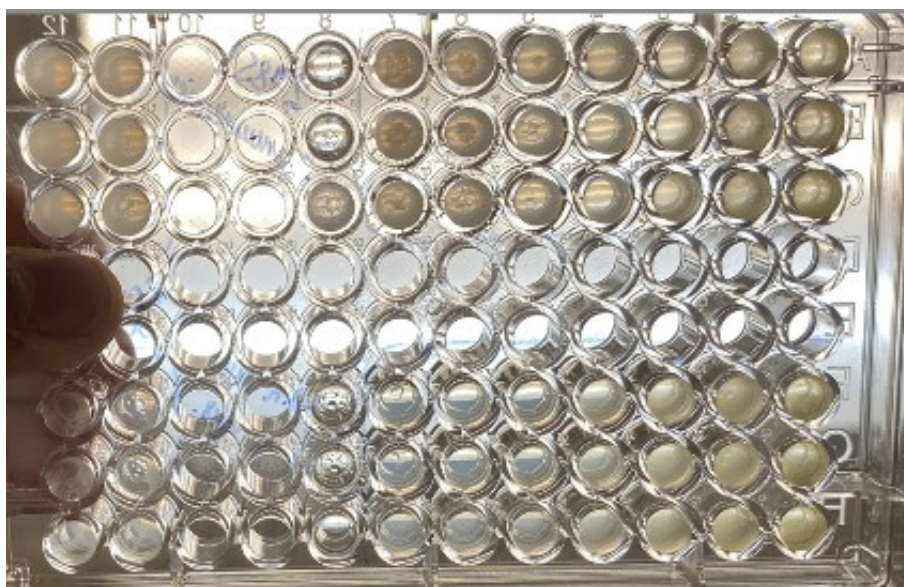


Figura 2: Concentración Mínima Inhibitoria por microdilución.

Se alcanza efectividad de la concentración mínima inhibitoria cuando se alcanza un 80% a dicha concentración

Cepa bacteriana	CMI (ppm)	% de Inhibición
<i>K. pneumoniae</i>	375	78.57
<i>A. baumannii</i>	187.5	79.91
<i>E. coli</i>	375	90
<i>S. aureus</i>	187.5	78.42
<i>E. faecalis</i>	93.8	81.87

Tabla 5: CMI para cada bacteria.

El extracto alcanzó su mayor actividad contra *E. faecalis* a una concentración de 93.8ppm. Para el porcentaje de hemólisis se obtuvo la siguiente gráfica

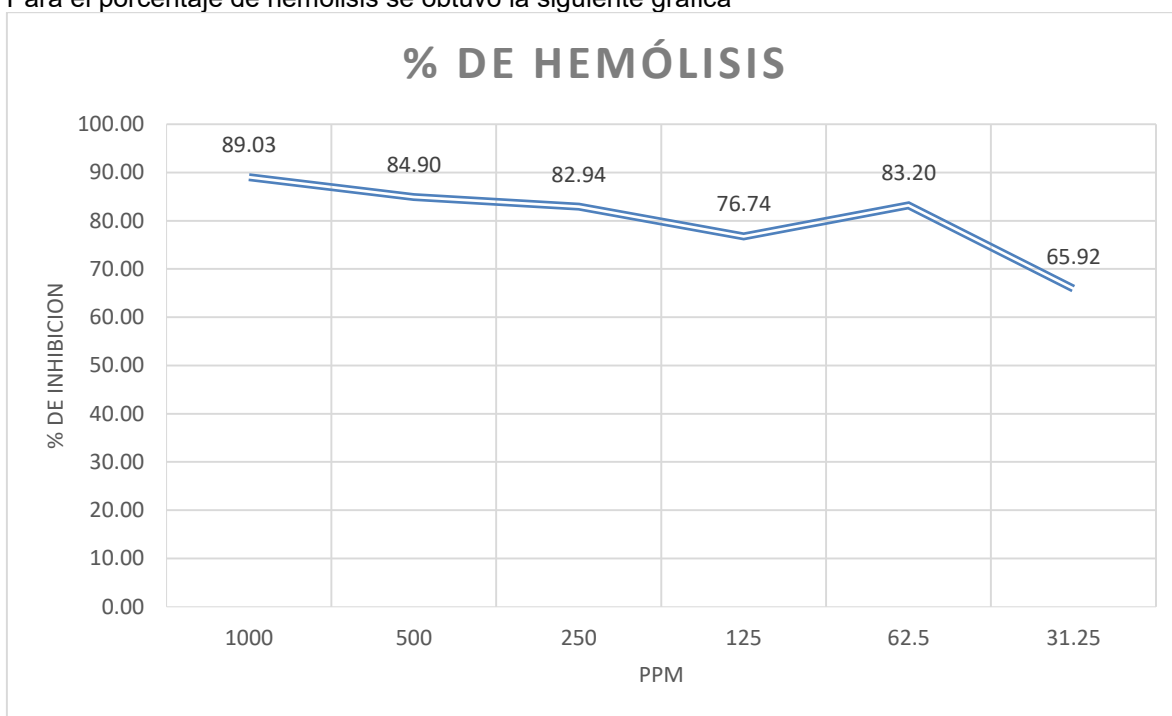


Figura 3: Gráfica de porcentaje de hemólisis.

Se muestra un porcentaje de hemólisis mayor al 65% en todas las concentraciones evaluadas.

CONCLUSIONES

Las cepas de bacterias multifarmacoresistentes presentaron sensibilidad al extracto metanólico de *Physalis ixocarpa* a concentraciones inferiores a las 3000 ppm, presentando así la actividad antimicrobiana. Siendo más efectiva *E. faecalis*, la cual alcanzó su CMI a una concentración de 93.8 pmm.

El extracto métanólico del tomatillo tuvo una alta actividad hemolítica, mayor al 65% en todas las concentraciones evaluadas, en el estudio de Panjaitan, & Yuliana, en 2023, no se mostró toxicidad en extracto de *P. angulata*, una especie del mismo género, por lo cual se recomienda comprobar el

efecto tóxico en cultivos celulares para asegurar el aprovechamiento de esta planta en el tratamiento de infecciones bacterianas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., & Amini-Khoei, H. (2017). Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of herbmed pharmacology*, 7(1), 1-7.
2. De Medio Ambiente y Recursos Naturales, S. (s. f.). Plantas medicinales de México. gob.mx. <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/plantas-medicinales-de-mexico+>
3. Silva, N. C. C., & Fernandes Júnior, A. J. J. O. V. A. (2010). Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 16, 402-413.
4. La OMS pone al día la lista de bacterias farmacorresistentes más peligrosas para la salud humana. (2024). Who.int. Recuperado el 6 de junio de 2024, de <https://www.who.int/es/news/item/17-05-2024-who-updates-list-of-drug-resistant-bacteria-most-threatening-to-human-health>
5. Hernández, J. F. S., & Yáñez, S. B. (2009). Aprovechamiento tradicional de las especies de *Physalis* en México. *Revista de Geografía Agrícola*, (43), 81-86.
6. Medina-Medrano, J. R., Almaraz-Abarca, N., Reyes-Martínez, A., Barriada-Bernal, L. G., Delgado-Alvarado, E. A., Rivera-Rodríguez, D. M., & Cobaleda-Velasco, M. (2012). EL GÉNERO *Physalis* EN DURANGO: REVISIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN Y USOS.
7. UNA MIRADA GENERAL AL TOMATE DE CÁSCARA (*PHYSALIS*). (2013). *Vidsupra, Vision Científica.*, 5(2), 90.
8. Conabio. (s. f.). Qué nos aportan los tomates verdes | Biodiversidad Mexicana. Biodiversidad Mexicana. https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/que-nos-aportan/N_tomates
9. Gamero-Vega, G., Ormeño Llanos, M., Bazalar-Palacios, J. D. R., Armas Juárez, C., & Quitral, V. (2022). Efectos terapéuticos del género *Physalis* L.: una revisión de la literatura. *Perspectivas en Nutrición Humana*, 24(2), 247-265.
10. Shu, Zunpeng, Xing, Na, Wang, Qihong, Li, Xinli, Xu, Bingqing, Li, Zhenyu, Kuang, Haixue, Antibacterial and Anti-Inflammatory Activities of *Physalis Alkekengi* var. *franchetii* and Its Main Constituents, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 4359394, 10 pages, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4359394>
11. Organización Mundial de la Salud. (2024, mayo 17). La OMS pone al día la lista de bacterias farmacorresistentes más peligrosas para la salud humana. <https://www.who.int/es/news/item/17-05-2024-who-updates-list-of-drug-resistant-bacteria-most-threatening-to-human-health>
12. Bharadwaj, A., Rastogi, A., Pandey, S., Gupta, S., & Sohal, J. S. (2022). Multidrug-resistant bacteria: their mechanism of action and prophylaxis. *BioMed research international*, 2022(1), 5419874.
13. Espinoza Mijangos, A. J. (2023). *Evaluación de extractos metanólicos libres y nanoencapsulados de Smilax spp., Chiranthodendron pentadactylon, y Peumus boldus contra bacterias de interés dermatológico* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
14. Panjaitan, R. G. P., & Yuliana, Y. G. S. (2023). Description of Ciplukan Toxicity (*Physalis angulata* L.). *Pharmacognosy Journal*, 15(3).

RELACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS CON LA HETEROGENEIDAD AMBIENTAL EN ESPECIES DEL GÉNERO *PROSOPIS* EN EL ESTADO DE ZACATECAS

Liliana Carranza Becerra¹, Lucía Delgadillo Ruiz¹, Alfredo Esparza Orozco¹, María Isabel Chávez Ruvalcaba¹, Eladio Delgadillo Ruiz², Cruz Daniel Mandujano García¹ y Benjamín Valladares Carranza³

¹ Universidad Autónoma de Zacatecas, ² Universidad de Guanajuato, ³ Universidad Autónoma del Estado de México
luciadelgadillo@uaz.edu.mx

RESUMEN

Los mezquites son árboles que se adaptan a distintos tipos de clima, vegetación y tipos de suelo y se encuentran mayormente distribuidos en zonas áridas y semiáridas y presentan una importancia ecológica, social y económica. Cuando los mezquites se encuentran expuestos a diversos factores bióticos y abióticos, generan mecanismos de protección como la producción de metabolitos secundarios en hojas, flores, tallos y frutos. La heterogeneidad ambiental representa la variabilidad de las condiciones bióticas y abióticas que influye en las respuestas biológicas de las plantas implicadas en la producción de metabolitos secundarios en plantas. El objetivo de este estudio fue analizar la relación de la producción metabolitos secundarios con la heterogeneidad ambiental en especies del género *Prosopis* ubicadas en las zonas sur, centro y norte del estado de Zacatecas. Se realizó un muestreo de vainas de mezquite, se muestrearon 48 sitios y se tomó una muestra de 50 vainas por sitio. Las vainas fueron medidas, pesadas y se extrajeron extractos de cada muestra. Los extractos fueron obtenidos mediante dos métodos de extracción. Se llevaron a cabo pruebas fitoquímicas de cada extracto para determinar la presencia o ausencia de MS. La HA fue estimada con el índice de entropía cuadrática "Rao Q" a partir del índice de vegetación ajustado al suelo (SAVI). Se evaluó la heterogeneidad ambiental, el peso y la longitud de las vainas de mezquite como posibles promotores de metabolitos secundarios a partir de análisis de componentes principales (PCA) y modelos lineales. Se analizó el efecto de la heterogeneidad ambiental, el peso y el tamaño de las vainas en la producción de metabolitos, con un análisis de varianza (ANOVA), el cual mostró que el efecto de la heterogeneidad ambiental se relaciona positivamente con la producción de metabolitos secundarios del mezquite, mientras que el peso y el tamaño, no tuvieron gran relevancia. En este estudio, se expone la relevancia que la heterogeneidad ambiental presenta sobre la producción de metabolitos secundarios en vainas del mezquite en el estado de Zacatecas, lo que podría resultar útil en aplicaciones agrícolas (como la alimentación de ganado), médicas y farmacológicas.

INTRODUCCIÓN

Las plantas vasculares representan uno de los grupos más diversos y ampliamente distribuidos en todos los continentes (CONABIO, 2012). En México, se registran 2084 géneros de plantas vasculares representadas por 304 familias (Villaseñor, 2016). Los matorrales son el ecosistema que ocupa mayor superficie (~800,000 km²) (Rzedowski, 1978) y albergan diversas comunidades vegetales de especies arbóreas y arbustivas; por ejemplo, el matorral de huizache, matorral xerófilo, matorral de mezquite, entre otras (Rzedowski, 2006). Los matorrales de mezquite pertenecen al género *Prosopis*, se caracterizan por sus formas de vida dominantes arbóreas y arbustivas, son árboles espinosos que miden de 3 a 17 m de altura, presentan hojas compuestas bipinadas, inflorescencias en amentos y vainas alargadas (Parra-Gil *et al.*, 2020).

México alberga nueve especies de mezquites, *P. laevigata* es la especie de mayor distribución; en contraste, *P. palmeri* solo se distribuye en Baja California Sur (Villaseñor, 2016). En el estado de Zacatecas, se distribuyen las especies *P. juliflora*, *P. laevigata* y *P. glandulosa* principalmente en ambientes áridos y semiáridos. Los mezquites tienen diversos usos, entre los que destaca la producción de madera, combustible, composta, y forraje a partir de sus vainas (Rodríguez *et al.*, 2014).

Las vainas del mezquite tienen gran relevancia y usos dentro del área médica; por ejemplo, se ha reportado que tienen la capacidad de disminuir el estrés oxidativo, dolor muscular, y pueden inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos, debido a la producción de metabolitos secundarios (MS) (Valencia et al., 2020). Los MS son compuestos químicos que producen las plantas cuando se encuentran expuestas a condiciones ambientales adversas. En contraste, los metabolitos primarios están involucrados en el crecimiento, desarrollo, respiración y fotosíntesis de las plantas (García, 2016).

Las variaciones ambientales relacionadas con los factores bióticos y abióticos del ambiente se definen como Heterogeneidad Ambiental (HA), ejercen una influencia sobre la riqueza de la biota (Stein et al., 2014). Además, se ha observado que la HA puede promover las condiciones ambientales que impulsa la diversidad de MS en las poblaciones de plantas (Fuica-Carrasco et al., 2023). Debido a que las especies que experimentan mayor variación en los factores ambientales donde se desarrollan promueve la diversidad de su metaboloma.

La HA es un elemento clave para entender el comportamiento, establecimiento, desarrollo, reproducción y supervivencia de la biota (Santibáñez-Andrade et al., 2009). Puede ser estimada de diversas maneras, ya sea a partir de mediciones en campo (e.g., variación de la cobertura vegetal) o mediciones a partir de sensores remotos (SR) (e.g., a partir de imágenes satelitales) (Palmer et al., 2000). Sin embargo, aunque las mediciones en campo pueden ser muy precisas, estas suelen ser costosas. En contraste, los SR se han convertido en una herramienta muy utilizada debido a la amplia disponibilidad de productos satelitales de acceso gratuito.

Por ejemplo, la HA puede ser estimada a partir de índices espectrales de vegetación como el índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI) (Esparza-Orozco et al., 2020), o el índice de vegetación ajustado al suelo (SAVI) el cual es una versión corregida del NDVI ideal para evaluar zonas áridas (Silva, 2014). De tal manera que la HA puede ser representada como la desviación estándar (DS) de índices espectrales de vegetación (Silva, 2014). Por lo que el objetivo planteado fue analizar la relación de la producción metabolitos secundarios con la heterogeneidad ambiental en especies del género *Prosopis* ubicadas en las zonas sur, centro y norte del estado de Zacatecas.

TEORÍA

La heterogeneidad ambiental se relaciona con la producción de metabolitos secundarios en vainas de mezquite.

PARTE EXPERIMENTAL

La recolecta botánica y de frutos (vainas) se realizó en la parte sur, centro y norte del estado de Zacatecas. Se muestrearon 48 sitios y se tomó una muestra de 50 vainas por sitio. Las vainas fueron medidas, pesadas. El extracto de cada muestra fue obtenido mediante extracción por ultrasonido, donde se pesaron 3 g de la muestra molida por cada 30 mL de solución extractora (metanol: agua ácido fórmico, 80:18:2) y se dejó en maceración durante 30 días.

Posteriormente, los macerados a 4°C fueron sonicados en un sonicador (GEX, 130PB) durante 5 ciclos de 1 min a 60 Hz. Los macerados de cada muestra fueron filtrados. La determinación de los metabolitos de las muestras se llevó a cabo mediante pruebas cualitativas descritas por Bañuelos *et al.* (2018), que incluyeron las determinaciones de taninos, florotaninos, oxidrilos fenólicos, alquenos, esteroides, triterpenos, cumarinas, lactonas, flavonoides, sesquiterpenlactonas, saponinas, antocianinas, terpenoides y alcaloides.

Para estimar la HA en los sitios de muestreo, se utilizó el índice de vegetación ajustado al suelo (SAVI), este índice fue usado como insumo para estimar la HA con la métrica de entropía cuadrática "Rao Q", una medida útil de HA (Rocchini *et al.*, 2021). Para identificar relaciones entre la cantidad de metabolitos registrada y la HA de los sitios de muestreo, se realizó un análisis de componentes principales (PCA). Posteriormente, para identificar la dirección y fuerza de posibles relaciones entre la HA y la cantidad de metabolitos del extracto, se ajustó un modelo con distribución de Poisson.

Para analizar el efecto de la HA, el peso y tamaño de las vainas en la producción de metabolitos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Para todos los análisis estadísticos se utilizó una prueba de significancia $\alpha = 0.05$. Los análisis mencionados anteriormente fueron realizados con el software estadístico R (R Core Team, 2021).

RESULTADOS

De acuerdo con los resultados, se observó que la HA se relacionó positivamente con la cantidad de metabolitos ($P < 0.001$) principalmente con los sitios de la región Sur (Figura 1). Las elipses representan los tres transectos muestreados en el estado de Zacatecas, en los que se aprecian los MS extraídos para cada región. En la región Sur se observa una mayor diversidad, mientras que las elipses correspondientes al transecto Centro y Norte, presentan una diversidad menor. Los resultados del ANOVA indican que el efecto de la HA se relaciona positivamente con la producción de metabolitos en mezquite ($P < 0.05$; Tabla 1). En contraste, el efecto del peso parece no ser un factor que influya en la producción de metabolitos (Tabla 1).

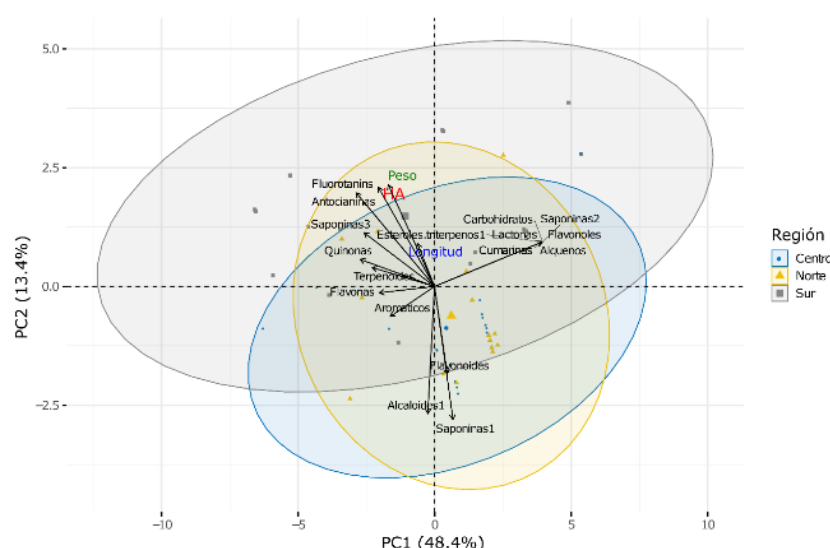


Figura 1. Gráfico biplot del análisis de componentes principales (PCA), para la heterogeneidad ambiental (HA), Longitud de vaina, Peso de vaina (gr), y la cantidad de metabolitos extraídos. Las elipses muestran las tres regiones muestreadas en el Estado de Zacatecas. Entre paréntesis se muestra el porcentaje de varianza explicada para cada componente principal (PC1 y PC2).

Tabla 1. Análisis de varianza (ANOVA), se muestran los resultados del efecto de las variables independientes: heterogeneidad ambiental (HA), Longitud de vaina y Peso de vaina (gr), sobre la producción de metabolitos (variable dependiente).

Variable	g.l	Suma cuadrados	de Error medio	cuadrado Valor F	p
HA	1	25.1	25.098	5.864	0.0198*
Longitud de vaina	2	2.52	1.259	0.294	0.7467
Peso de vaina	2	23.64	11.82	2.762	0.0747

Significancia estadística: * < 0.05

CONCLUSIONES

Este estudio demuestra que la HA es un factor relevante que influye en la producción de metabolitos en especies del género *Prosopis* de un ambiente semiárido, sobre todo en la parte sur del estado de Zacatecas. Esto tiene serias implicaciones en el uso de los frutos del mezquite, ya que algunos metabolitos pueden ser beneficiosos en aplicaciones agrícolas como la alimentación de ganado con

frutos de mezquite. Este estudio permite la identificación de regiones particulares del estado de Zacatecas donde se podrían promover dichas prácticas agrícolas.

BIBLIOGRAFÍA

1. CONABIO, "Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. Biodiversidad". Instituto de ecología y de historia natural de México (2012).
2. J. L. Villaseñor, "Catálogo de las plantas vasculares nativas de México", Revista Mexicana de Biodiversidad, 2016, 87, 559–902.
3. J. Rzedowski, Vegetación de México. Limusa, México, D.F. 1978.
4. J. Rzedowski, Vegetación de México. 1ra. Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Taxon, 2006. 31(4), 504.
5. P. J. Parra-Gil, C. Baltaza, I. Castellanos, J. Romero-Nápoles, M. A. Martínez-Morales, J. A. Cid-Becerra, "Preferencia y depredación de semillas de mezquite por escarabajos (Coleoptera: Bruquidae)". Revista Mexicana de Biodiversidad, 2020. 91(4).
6. E. N. Rodríguez-Sauceda, G. E. Rojo-Martínez, B. Ramírez-Valverde, R. Martínez-Ruiz, M. de la C. Cong-Hermida, S. M. Medina-Torres, H. H. Piña-Ruiz, "Análisis técnico del árbol del mezquite (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl.) en México", Ra Ximhai, 2014. 173–194.
7. D. Valencia, P.E.O. Rueda, L. Peralta, A. Mario, S. R. Mazón-López, J. Ortega-García, "Compuestos bioactivos, actividad antioxidante y perfil de ácidos grasos en aceite de semilla de Mezquite (*Prosopis* spp)", Revista de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición, 2020. 70(1), 50–59.
8. R.D.H. García, "Caracterización de algunos metabolitos primarios y secundarios en dos variedades comerciales de lúcumo (*Pouteria lucuma*)", Repositorio Universidad Nacional Agraria La Molina Molina. 2016.
9. A. Stein, K. Gerstner, H. Kreft, "La heterogeneidad ambiental como impulsor universal de la riqueza de especies a través de taxones, biomas y escalas espaciales", Cartas de ecología, 2014. 17(7), 866–880.
10. C. Fuica-Carrasco, Ó. Toro-Núñez, A. Lira-Noriega, A.J. Pérez, V. Hernández, "Expresión del metaboloma en poblaciones de *Eucryphia cordifolia*: papel de la estacionalidad y la hipótesis de centralidad del nicho ecológico", Journal of Plant Research, 2023. 136(6), 949.
11. G. Santibáñez-Andrade, S. Castillo-Argüero, J.A. Zavala-Hurtado, O.Y. Martínez, A.M. Hernández, "La heterogeneidad ambiental en un matorral xerófilo". Boletín de la Sociedad Botánica de México, 2009. 85:71-79
12. M.W. Palmer, T. Wohlgemuth, P. Earls, J.R. Arévalo, S.D. "Thompson, Opportunities for long-term ecological research at the Tallgrass Prairie Preserve, Oklahoma", In: Lajtha K, Vanderbilt K, editors. Cooperation in Long Term Ecological Research in Central and Eastern Europe: Proceedings of ILTER Regional Workshop. Budapest, Hungary. 2000. pp. 123–128.
13. A. Esparza-Orozco, A. Lira-Noriega, J.F. Martínez-Montoya, L.F. Pineda-Martínez, S. de J. Méndez-Gallegos, Influencias de la heterogeneidad ambiental en la composición de anfibios en sitios de reproducción en una región semiárida de México. Revista de ambientes áridos, (2020). 182, 104259.
14. L.M.L. Silva, "Aplicaciones de la teledetección en el análisis de daños en masas de coníferas en la provincia de Burgos España", Instituto Nacional de Investigación agraria y agropecuaria. Universidad de Valladolid. 2014.
15. R. Bañuelos-Valenzuela, L. Delgadillo-Ruiz, F. Echavarría-Cháirez, O. Delgadillo-Ruiz, C. Meza-López, "Composición química y FTIR de extractos etanólicos de *L. tridentata*, *O. vulgare*, *A. ludoviciana* y *R. graveolens*. Agrociencia, 2018. 52(3), 309–321.
16. D. Rocchini, E. Thouverai, M. Marcantonio, M. Iannacito, D. Da Re, M. Torresani, G. Bacaro, et al. "Rasterdiv—An Information Theory tailored R package for measuring ecosystem heterogeneity from space: To the origin and back", Methods in Ecology and Evolution, 2021. 12(6), 1093–1102.
17. T. R Core, R: "A language and environment for statistical computing (Version 4.2.3)", R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2021.

VIABILIDAD DEL MEDIO STUART PARA LA CONSERVACIÓN DE CEPAS DE TRABAJO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA QFB-UMSNH

Judith Ayala García, Patricia Yazmín Figueroa Chávez, Eduardo Zavala Huante.

Facultad de Químico Farmacobiología - Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
judith.ayala@umich.com

RESUMEN

Un cepario es un lugar o una instalación dedicada a la conservación y mantenimiento de cepas microbianas, que son muestras de microorganismos. Estas cepas se mantienen en condiciones controladas, a temperaturas específicas y en medios de cultivo adecuados, para garantizar su viabilidad y pureza a lo largo del tiempo. En la actualidad existen organismos internacionales y nacionales que determinan los lineamientos metodológicos para la conservación y mantenimiento de cepas bacterianas en los laboratorios de Microbiología. No existe un método universal para la preservación de células microbianas vivas de diferentes grupos taxonómicos in vitro debido en primer lugar, a las características específicas de los distintos microorganismos, en segundo lugar, a los diferentes requisitos para diferentes duraciones de almacenamiento y, en tercer lugar, a las capacidades técnicas de los laboratorios. Diversos expertos recomiendan conservaciones de acuerdo al periodo de tiempo que puede ser corto, mediano o largo plazo, y a su vez, en función del tiempo si es por metabolismo activo o inactivo, de aquí la importancia de mantener y resguardar las especies bacterianas. La finalidad es evaluar la utilización del medio de cultivo Stuart como método de conservación a corto plazo, en función de la viabilidad y preservación de las características fenotípicas de las cepas de trabajo en el Cepario del Laboratorio de Microbiología, QFB-UMSNH. La metodología es cuantitativa, descriptiva y longitudinal. Las cepas de trabajo se identificaron morfológicamente y bioquímicamente, posteriormente se recuperaron en agar BAB y se incubaron 24 horas para obtener colonias aisladas y se hizo el pase al medio de cultivo Stuart comercial por triplicado para su conservación y análisis a los 2, 4 y 6 meses a temperatura ambiente. Los resultados arrojaron que la recuperación de las bacterias a los 2 meses es del 70%, a los 4 y 6 meses del 60% de la población bacteriana, el 100% de las características morfológicas y bioquímicas permanecieron en las bacterias, al realizar la prueba t de student se obtiene un p valor de 0.001 indicando un resultado estadísticamente significativo para la viabilidad del medio Stuart. En conclusión, derivado de este estudio se demuestra que es factible utilizar el medio Stuart como método de conservación a corto plazo en las condiciones de temperatura y humedad del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de QFB-UMSNH. El medio Stuart al ser escaso en nutrientes permite la preservación de cultivos de microorganismos al favorecer la disminución de la actividad metabólica factor elemental a considerar en la conservación y mantenimiento de microorganismos.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, existen en el mercado diferentes medios de cultivo que son utilizados con la finalidad de preservar los microorganismos (mo). Las colecciones de cultivos bacterianos se catalogan como centros de recursos biológicos, puesto que permiten conservar cepas de mo que posteriormente pueden ser utilizados con fines educativos, de investigación e incluso en el área de biotecnología, por lo que, es necesario que las técnicas que se han de aplicar en su conservación y mantenimiento sean los mejores para garantizar su viabilidad, disponibilidad del mo, así como mantener todas sus características fenotípicas, genotípicas⁽¹⁾.

No existe un método universal para la preservación de células microbianas vivas de diferentes grupos taxonómicos in vitro debido en primer lugar^(2,3), a las características específicas de los distintos microorganismos, en segundo lugar, a los diferentes requisitos para distintas duraciones de almacenamiento y, en tercer lugar, a las capacidades técnicas de los laboratorios⁽⁴⁾. Todos estos requisitos resultan indispensables en los ceparios.

Por ello, el propósito de este trabajo es evaluar la utilización del medio de cultivo Stuart como método de conservación a corto plazo, en función de la viabilidad y preservación de las características

fenotípicas de las cepas de trabajo en las condiciones del Cepario del Laboratorio de Microbiología, QFB-UMSNH y que, a su vez, esto permita que se utilicen de manera adecuada en la parte práctica de las materias de Microbiología General, Bacteriología Clínica I y II.

TEORIA

Un cepario es un lugar o una instalación dedicada a la conservación y mantenimiento de cepas microbianas, que son muestras de microorganismos⁽⁵⁾. Estas cepas se mantienen en condiciones controladas, a temperaturas específicas y en medios de cultivo adecuados, para garantizar su viabilidad y pureza a lo largo del tiempo⁽²⁾.

En el cepario se resguardan diferentes tipos de cepas como⁽⁶⁾:

- Cepas de colección: son cultivos de mo definidos por lo menos a nivel de género y especie, mantenidos como colección de cultivos o Centro de Recursos Biológicos y con un número de identificación.
- Cepas de referencia: son cultivos de mo conservados bien definidos en sus características y además con un certificado de identificación.
- Cepas de reserva: son cepas idénticas, obtenidas de un solo subcultivo de una cepa de referencia.
- Cepas de trabajo: son subcultivos primarios procedentes de cepas de referencia o de colección.
- Cepas comerciales: son cultivos de ciertas cepas, estas principalmente pueden o no proceder de cepas de referencia o colección.
- Cepas salvajes: son cepas que no provienen de las cepas de colección o de los recursos biológicos que se tienen⁽⁶⁾.

Por lo que, las cepas de trabajo son aquellas que proceden de un subcultivo primario, ya sea de una cepa de reserva, de colección o de una muestra clínica⁽⁶⁾ y éstas se pueden mantener en varias alícuotas para su uso posterior.

Para la identificación de una cepa en particular es indispensable realizar una serie de pruebas que permitan hacer una identificación de sus rasgos fenotípicos característicos, que incluyen:

- ✓ Revisión macroscópica de las colonias en el cultivo.
- ✓ Reacción a la tinción Gram para analizar morfología microscópica.
- ✓ Mo exigente o no exigente nutricionalmente.
- ✓ Propiedades metabólicas
- ✓ Pruebas bioquímicas⁽⁵⁾

Existen diferentes métodos de conservación, para su elección de cada uno de ellos depende del tipo de microorganismo a preservar, el tiempo que desea guardar. Algunos ejemplos son⁽⁷⁾:

- Método a largo plazo
 - Liofilización
 - Ultracongelación
- Método a mediano plazo
 - Arena estéril
 - Sílica gel
 - Arcilla
- Método a corto plazo
 - Transferencia periódica⁽⁷⁾.

De todos los métodos que existen, se toman en cuenta ciertos aspectos, pero principalmente se debe de garantizar la conservación de los cultivos bacterianos⁽⁸⁾, para poder implementar este tipo de métodos es importante lo siguiente:

1. El cultivo que se ha de conservar este puro.
2. Evitar la contaminación cruzada.
3. Que por lo menos sobrevivan en la conservación el 80% de las células bacterianas.
4. Que estas células bacterianas no sufran modificaciones genéticas en la conservación⁽⁹⁾.
5. Las instalaciones de los lugares de trabajo
6. Temperatura
7. Cuestiones económicas y de disponibilidad.

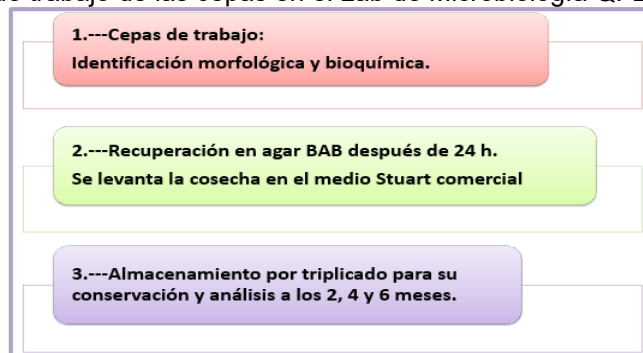
Al contar con estas alternativas de preservación también es importante analizar los medios de cultivo que se pueden utilizar, de tal forma que permanezcan viables los mo. Un ejemplo de estos medios es: El medio Stuart, es un medio que permite conservar a los mo por periodos de tiempos prolongados entre 14 a 6 meses, dado sus características con el que cuenta el medio⁽¹⁰⁾.

PARTE EXPERIMENTAL

El objetivo es evaluar la viabilidad del medio Stuart como medio de conservación de cepas de trabajo en el Laboratorio de Microbiología de QFB-UMSNH.

La metodología es de tipo cuantitativa, descriptiva y longitudinal.

Metodología general de trabajo de las cepas en el Lab de Microbiología QFB-UMSNH.



RESULTADOS

Como existe la necesidad de conservar cepas en el Laboratorio de Microbiología de QFB-UMSNH para sus actividades de docencia, se analizó el medio de cultivo Stuart como alternativa de conservación dadas sus características. Para determinar la factibilidad del uso del medio de cultivo a analizar, se llevó a cabo la inoculación de los mismos con microorganismos que son nutricionalmente poco exigentes y que previamente ya habían sido caracterizados fenotípicamente de acuerdo a lo establecido en la literatura. De los crecimientos obtenidos se hizo un pase al medio de cultivo de agar base sangre (BAB) y posteriormente, a las 24 horas se levantó la cosecha de la cepa pura y se inoculó por triplicado en medio Stuart para valorar su eficacia como medio de conservación. A los 2 meses se tomó un tubo almacenado y se sembró en placa de BAB para la valoración del crecimiento de la cepa conservada y así sucesivamente a los 4 y 6 meses de almacenamiento. En la figura 1 se observa el crecimiento colonial obtenido a partir del tubo de medio Stuart conservado a los 2, 4 y 6 meses correspondiente a los meses de septiembre, noviembre y febrero.

Es importante mencionar, que la valoración del crecimiento colonial en las placas de BAB a partir de los medios conservados se realizó de manera cualitativa, reportándose como abundante, moderado y escaso. En esta misma gráfica, se puede observar que predominó el crecimiento abundante en los medios analizados.

Figura 1. Se muestra la forma de crecimiento de manera cualitativa en cuanto a cantidad si fue abundante, moderado o escaso del medio Stuart.

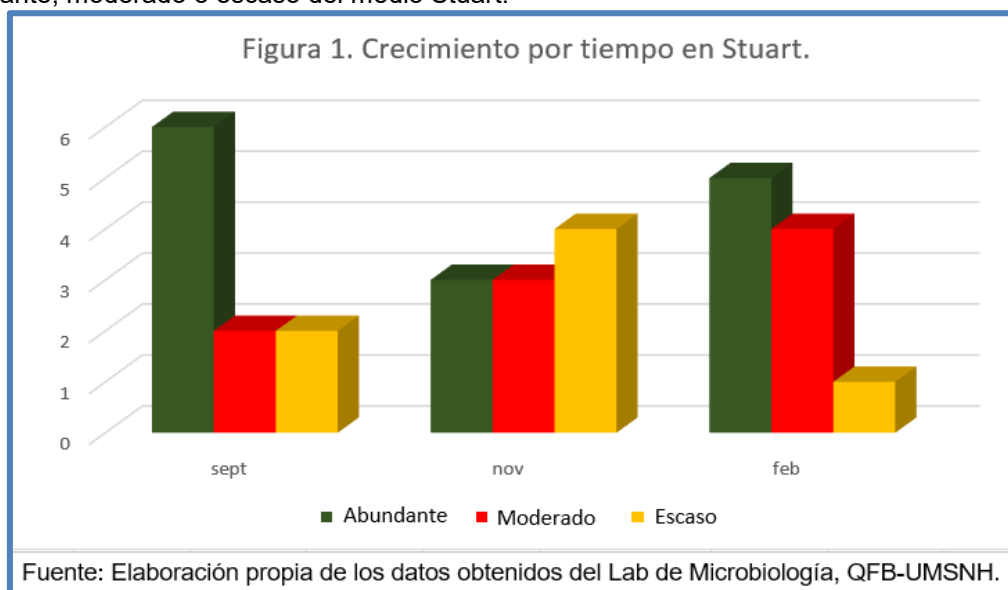
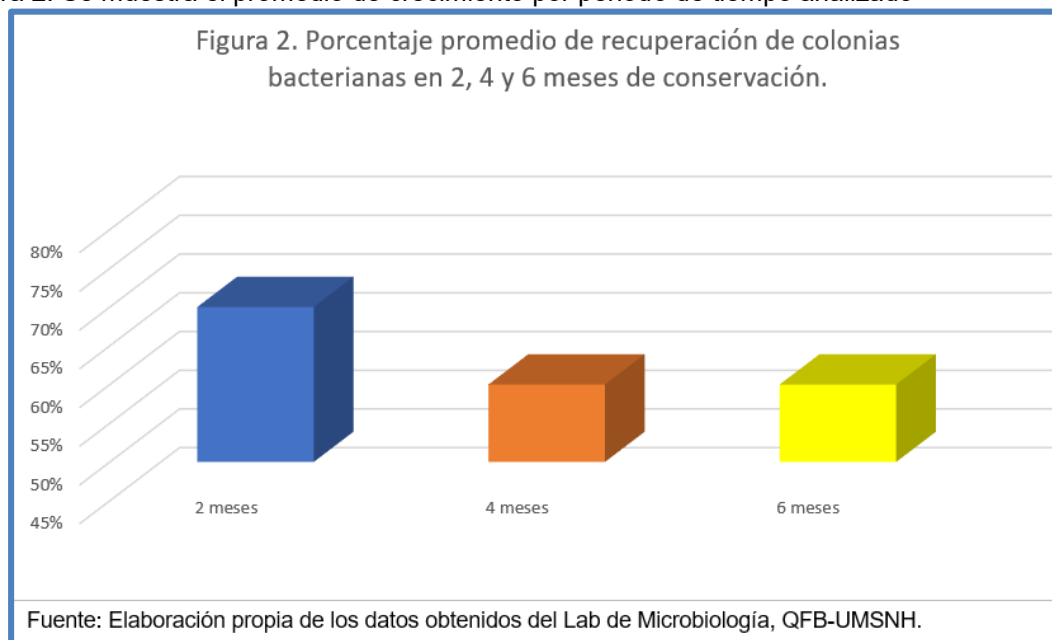


Figura 2. Se muestra el promedio de crecimiento por periodo de tiempo analizado



En la figura 2, se aprecia el promedio de recuperación de colonias bacterianas por cada tiempo que se analizó. Resulta que a los 2 meses la recuperación fue del 70% y, para los 4 y 6 meses fue del 60% de recuperación. El 100% de las características morfológicas se preservaron.

Para el tratamiento estadístico, se hizo la prueba de la normalidad, ya que teníamos datos normales, se procedió a realizar la comparación de medias con la prueba T de student, como se ve en la tabla 1, se hicieron varias comparaciones en cuanto al periodo de tiempo. En las diferentes pruebas la significancia es menor al p valor de 0.05 por lo que en cuanto a recuperación entre los diferentes meses no hay diferencias significativas. Por lo tanto, se puede determinar que el medio Stuart es viable para su uso como medio de conservación en el Laboratorio de Microbiología de QFB-UMSNH.

Tabla 1. Procesamiento estadístico de muestras relacionadas, obteniéndose diferentes significancias bilaterales en los periodos de tiempos analizados indicando que no hay diferencia y que el medio es factible.

	N	Correlación	Sig.
Par 1 2M y 4M	8	.594	.0012
Par 2 4M y 6M	8	.987	.0103
Par 3 6M y 2M	8	.759	.0010

Fuente: Elaboración propia de los datos obtenidos.

Imagen 1. Medio Stuart con cepas de conservación



Fuente: Fotografía del medio en el Laboratorio de Microbiología de QFB-UMSNH

CONCLUSIONES

Derivado de este estudio se demuestra que es factible utilizar el medio Stuart como método de conservación a corto plazo en las condiciones de temperatura y humedad del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de QFB-UMSNH. El medio Stuart al ser escaso en nutrientes permite la preservación de cultivos de microorganismos al favorecer la disminución de la actividad metabólica factor elemental a considerar en la conservación y mantenimiento de microorganismos. Como trabajo a futuro será analizar si el periodo de tiempo se puede extender más de los 6 meses y las características fenotípicas de las bacterias se siguen manteniendo para uso en las prácticas docentes que se imparten facultad, teniendo como ganancia un ahorro significativo en la utilización de material y que este pase de recuperación no sea cada 3 meses si no que sea más prolongado.

REFERENCIAS

1. Cueva Chanalata DG, Mayorga Miniguano NA, Albuja Landi AK (dir). Aislamiento, identificación y conservación de cepas bacterianas encontradas en muestras de Ceviche de chochos [Trabajo de Integración Curricular]. [Riobamba-Ecuador]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, 2021. Enlace: <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/14773/1/56T01006.pdf>
2. Gherna LR. Culture Preservation. En Culture Preservation. Methods for General and Molecular Microbiology. (eds CA Reddy, TJ Beveridge, JA Breznak, GA Marzluf, TM Schmidt y LR Snyder). 2014 (pág. 1020).

3. Lopardo HA, DB. Estudio de dos sistemas de transporte para mantener la viabilidad de bacterias de interés clínico. (2012).
4. Puchkov EO. Preservation of Viable Microorganisms in the Laboratory: An Overview of Basics, Methods and Practical Recommendations for Beginners. *Austin J BiotechnolBioeng*. 2023; 10(1):119
5. Cifuentes RLD, Quispe EIM. Manual de prácticas de microbiología del Cepario del laboratorio de biotecnología de la Universidad Pedagógica Nacional. Bogotá, Colombia.2014.
6. Garay E, Aznar R, Lalucat J, Ribas F. Informe técnico sobre cepas de Trabajo en el Laboratorio de Análisis Microbiológico. [España]. Sociedad Española de Microbiología. 2006. Enlace:
https://www.uv.es/cect2/65_Informe_Cepas_Trabajo#:~:text=%2D%20Cepas%20de%20trabajo%3A%20subcultivos%20primarios,de%20una%20colecci%C3%B3n%20de%20cultivos
7. Ortiz T, Ocampo V, Prada LD, Franco-Correa M. Métodos de conservación para actinobacterias con actividad solubilizadora de fósforo. *Rev. Colomb. Biotecnol*. Vol. XVIII No. 2. 2016;(2): 32-39. <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v18n2/v18n2a05.pdf>
8. Weng AZ, Junco DRA, Díaz ROE, Álvarez MI, Beltrán DJR, Rodríguez SMC. Conservación bacteriana por método simple a temperatura ambiente: una alternativa viable. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiol*. [Internet]. 2005 Ago;43(2). Disponible: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032005000200005&lng=es.
9. García Uruburu GMD. Conservación de cepas microbianas. *Temas de actualidad SEM*. 2001: 30:12-30:16
10. López-López R. Manejo y transporte de muestras microbiológicas. *ELSEVIER*, Septiembre 2001. Vol 20. Núm 8. Pp 122-127 <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-manejo-transporte-estras-microbiologia-13018375>

PRESENCIA DE PARÁSITOS GASTROINTESTINALES EN HUMANOS Y CERDOS DE TRASPATIO EN COMUNIDADES RURALES, VERACRUZ, MÉXICO

María Fernanda López-Flores¹, Aracely López-Monteón², Angel Ramos-Ligonio³, Jaime Morales-Romero⁴, Francisco García-Orduña⁵, María de Jesús Rovirosa-Hernández⁶

¹Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz 91190, México

^{2,3} LADISER Inmunología y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Orizaba, Veracruz, 94340 México

⁴ Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, 91190, México

^{5,6} Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, 91190, México
Marifer.flores94@gmail.com

RESUMEN

Las enfermedades parasitarias afectan tanto a los humanos como a los animales domésticos, de manera particular, la parasitosis en la producción porcina¹ es debida a malas condiciones de vivienda, sistemas de gestión o medidas higiénico-sanitarias, las cuales pueden generar infecciones tisulares, y por ende representa un riesgo para la salud humana². El objetivo del estudio fue determinar la presencia y riqueza de parásitos gastrointestinales en humanos y en cerdos de traspatio en dos comunidades rurales del Estado de Veracruz. El estudio se realizó en las comunidades de Magallanes y Mirador Pilapa, Veracruz. Se incluyeron en el estudio hombres y mujeres ($n= 35$) en un rango de 20 a 76 años, se solicitaron muestras fecales de 2 a 3 días consecutivos, se obtuvo un total de 102 muestras fecales y se almacenaron en frascos Copro Trainer de 300 mL. Mientras que, en los cerdos, se colectó una muestra fecal por individuo ($n= 17$), se guardaron en tubos cónicos de 15 mL. Las muestras fecales se rotularon (No. de individuo, localidad y fecha), se agregó formalina al 10% hasta cubrir la muestra, se selló con papel parafilm y se guardaron en una hielera a temperatura ambiente hasta el momento del análisis en el laboratorio. Se realizó el método coproparasitoscópico y se tiñeron con lugol para observar la morfología de los parásitos, para la identificación se utilizó un atlas de parasitología humana y veterinaria, las muestras se observaron en un microscopio óptico a un objetivo de 10X y 40X. Se obtuvo una prevalencia general en las muestras de heces en los humanos del 94.28% (33/35), con un total de 7 taxones diferentes de parásitos gastrointestinales con un IC 95% (29.27-56.72), a diferencia de las muestras fecales de cerdos, la prevalencia general fue del 100% (17/17), se observaron 5 taxones diferentes de parásitos con un IC 95% (-16.65-20.42). Además, se realizó la prueba de Chi-cuadrada para determinar la diferencia entre la prevalencia de parásitos gastrointestinales en las muestras de los humanos y las diferentes localidades, en la que se encontró una diferencia significativa (p -valor= 0.05, X-squared= 9.37, $df= 4$), también, se realizó una correlación de Spearman para identificar la asociación entre la prevalencia y riqueza de parásitos en las muestras fecales de humanos y cerdos, sin embargo no se encontró asociación ($Rho= -0.93$, $df= 4$, p valor= 0.00). Aunado, se observó tanto en las muestras de humanos como de los cerdos de traspatio que comparten la presencia de los parásitos: *Entamoeba* spp; *Balantidium* spp; y *Ascaris* spp. Los resultados mostraron que los humanos y los cerdos tienen una prevalencia elevada y comparten 4 taxones de parásitos gastrointestinales. Es importante tomar medidas de prevención para la producción porcina para así disminuir la probabilidad de adquirir enfermedades parasitarias con potencial zoonótico. Agradecemos a la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (MFLF-784412) y al proyecto (MJRH-174332019100).

INTRODUCCIÓN

La crianza del ganado porcino tiene un gran impacto en el sector agropecuario. La porcicultura en México se encuentra en el tercer lugar dentro de la producción de carnes y se lleva a cabo de manera tecnificada, semitecnificada y de traspatio (Hernández-Martínez *et al.*, 2020). Generalmente, en zonas rurales, la producción de cerdos es por sistemas de traspatio. Este sistema de crianza puede caracterizarse por una mala higiene ambiental, la cual pueden representar un factor de riesgo importante para la presencia de parásitos gastrointestinales en los animales (Valle *et al.*, 2006; Jufare, 2015).

La presencia de parasitosis es de gran importancia en los animales, ya que los cerdos pueden ser reservorio de parásitos como *Balantidium coli*. Este patógeno provoca la balantidiasis porcina, la cual suele ser asintomática en los cerdos, sin embargo, en los humanos puede ser sintomática. Además, los cerdos suelen infectarse por la presencia de helmintos entre otros parásitos (Jufare, 2015; Noorpiشه *et al.*, 2020). Las enfermedades parasitarias en los animales de producción genera una disminución del consumo de alimentación, mala absorción de nutrientes, desnutrición y anemia. Además, predisponen a los individuos a infecciones concurrentes al suprimir su sistema inmunológico, provocando daños a la salud de los animales infectados, lo que representa una pérdida económica significativa para la industria porcina (Hale & Stewart, 1987; Stewart & Hale, 1988).

En el caso de los humanos, según la Organización Mundial de la Salud, en el 2019, reporta que aproximadamente 3,500 millones de personas se encuentran parasitadas. Esta condición afecta a la población en general, pero principalmente a los países en vías de desarrollo debido a la falta de sistemas eficientes o fuentes de agua potable (Quesada, 2012; Moreira-Macías *et al.*, 2024). El hombre puede infectarse por parásitos de la fauna doméstica, como el cerdo. Por ejemplo, *B. coli*, la cual es causada por la interacción en las áreas donde se crían cerdos, especialmente si no se practica una buena higiene (CDC, 2020).

La mala práctica sanitaria, el manejo de los cerdos y la falta de medidas de higiene pueden desarrollar enfermedades, convirtiéndose en una problemática para la salud pública debido a la transmisión de enfermedades con potencial zoonótico, López y Peña (2020), recalcan que los cerdos pueden infectarse en algún momento de su vida por la presencia de parásitos gastrointestinales, sin embargo, aquellos que son criados al aire libre están expuestos a un mayor riesgo de infección. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar la presencia y riqueza de parásitos gastrointestinales en humanos y en cerdos de traspato en 2 comunidades rurales del Estado de Veracruz.

TEORÍA

En México, la porcicultura es una de las principales actividades en la ganadería. De acuerdo con Estévez-Moreno y Miranda-de la Lama (2022), el consumo de carne de cerdo es de 20kg/persona/año. De las diferentes formas de crianza de cerdos, el sistema de traspato es uno de los más comunes, debido a sus bajos costo. Este sistema se caracteriza por tener de 2 a 5 cerdos sueltos o en criadero. La alimentación que se les proporciona suelen ser desperdicios o sobrantes de comida, y generalmente se desarrolla su crianza en zona rurales (Morrillo-Portilla, 2024).

Los cerdos son susceptibles al parasitismo cuando la higiene no es manejada de manera correcta. La acumulación de las heces y desechos orgánicos en el entorno de los animales puede propiciar un medio adecuado para la reproducción de parásitos gastrointestinales, así como de moscas o gusanos (López & Peña, 2020). La presencia de parásitos representa una amenaza para el bienestar de los cerdos y también para la salud humana, especialmente para aquellos encargados de los criaderos, que están en contacto directo con los porcinos y sus heces (Condemayta *et al.*, 2018). Algunos de los factores de riesgo para la presencia de parásitos en los cerdos incluyen el tipo de crianza, la limpieza de las instalaciones y el manejo de las excretas. Por ello, se recomienda implementar buenas prácticas de manejo sanitario para prevenir la propagación de los patógenos (Morrillo-Portilla, 2024).

Puicón y cols. (2021), reportan que tanto humanos como cerdos suelen compartir parásitos gastrointestinales, principalmente helmintos como *Ascaris* sp., debido a la falta de medidas higiénicas en crianzas, que se agrava por la mala situación de los factores económicos. Por otro lado, Condemayta y cols. (2018), mencionan que la cría de cerdos en traspato puede facilitar la transmisión del parásito *Balantidium coli* entre cerdos y humanos. La prevalencia de este patógeno suele ser mayor en la población porcina en comparación a la población humana. Los autores reportan que el 10.34% de las personas que criaban cerdos estaban infectados por *Balantidium coli*, mientras que sólo el 2.83% de las personas que no criaban cerdos fueron positivas al patógeno.

Labrada y cols. (2024), resaltan la importancia de realizar estudios que busquen determinar la presencia de parásitos gastrointestinales con potencial zoonótico en poblaciones porcinas, así como comprender los mecanismos de transmisión a los humanos. Obtener información sobre la prevalencia y riqueza de parásitos gastrointestinales en cerdos de traspatio no solo permiten implementar mejores prácticas de manejo, sino también desarrollar programas de crianza con el fin de establecer estrategias efectivas de control y prevención (Jufare, 2015).

PARTE EXPERIMENTAL

El estudio se realizó al sur de Veracruz, México, en dos comunidades rurales: Magallanes (18°, 21', 59.1" N y 94°, 46', 36.1" O, con una altitud de 295m), y en Mirador Pilapa (18°, 37" N, 94°, 75" O, y una altitud de 111m).

El clima es cálido y húmedo con vegetación de selva alta perinnifolia y costera. La población tiene un gran rezago social y alta pobreza, además, no gozan de servicios básicos de saneamiento ni agua potable, el 64% de la población rural se dedica a actividades como la agricultura y la ganadería (Plan de Desarrollo Municipal, 2022). La investigación se realizó entre abril de 2022 y mayo de 2023.

Colecta de muestras de heces en humanos

Se realizó un muestreo voluntario no probabilístico (Otzen y Manterola, 2017), en aquellas personas que se dedican a la cría de cerdos o habitan cerca del criadero. Por lo tanto, se analizaron un total de 35 personas que aceptaron participar en este estudio, de las cuales 27 personas son residentes de la comunidad rural de Magallanes y 8 de Mirador Pilapa. La población estuvo conformada por hombres (54.28%) y mujeres (45.71%), con un rango de edad de 20 a 74 años de edad.

Las muestras de heces se recolectaron en frascos de 300 mL de (CoproTrainer®) ver Figura 1; se solicitaron muestras seriadas durante 2 a 3 días, posteriormente, se agregó formalina al 10% hasta cubrir completamente la muestra y luego se selló con papel ParaFilm. Se obtuvieron un total de 96 muestras fecales de los 35 participantes. Las muestras fueron almacenadas en una hielera a temperatura ambiente hasta el momento de analizarlas en el laboratorio.

Colecta y análisis de muestras de heces en cerdos

Las muestras de heces de los cerdos se colectaron de manera individual ($n=17$), se guardaron en tubos cónicos de 15 mL. Las muestras se rotularon (No. de individuo, localidad y fecha) ver Figura 2; se agregó formalina al 10% hasta cubrir la muestra, se selló con papel parafilm y se guardaron en una hielera a temperatura ambiente hasta el momento del análisis en el laboratorio.

Análisis de muestras de heces en humanos y cerdos

Tanto en las muestras de heces de los humanos como de los cerdos se realizó un examen coproparasitológico sereado siguiendo la técnica de Beltrán *et al.*, (2009), este método permite detectar la presencia de quistes y trofozoítos de protozoarios, así como huevos y larvas de helmintos. Para teñir las muestras se utilizó lugol y luego se observó en un microscopio óptico con los objetivos de 10X y 40 X. Para la identificación se utilizó un atlas de parasitología humana y veterinaria de Ash and Orihel (2010).

Los análisis de laboratorio se realizaron en el laboratorio LADISER Inmunología y Biología Molecular de la facultad de Ciencias Químicas, Orizaba, Ver.

Análisis estadístico

La prevalencia de parásitos se calculó dividiendo el número de individuos infectados por el total de individuos examinados (multiplicado por 100) Rondon *et al.* (2017). Se realizó la prueba estadística de Chi cuadrada para determinar la asociación entre la prevalencia de parásitos gastrointestinales en las muestras de los humanos y las diferentes localidades. Y una correlación de Spearman para relacionar la prevalencia y taxones de parásitos en las muestras fecales de humanos y cerdos. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa R Studio interfaz (Copyright (C) 2022 por Posit Software, PBC) versión 2023.09.0+463 (2023.09.0+463).



Figura 1. Colecta de muestras fecales en humanos

Figura A. Participante del estudio

Figura B. Muestras de heces

Fotografía: fuente propia, 2024



Figura 2. Colecta de muestras fecales en cerdos de traspatio

Figura A. cerdos en el criadero

Figura B. Colecta de muestras de heces

Fotografía: fuente propia, 2024

RESULTADOS

Se obtuvo una prevalencia general en las muestras de heces en los humanos del 94.28% (33/35) con un total de 7 taxones ver Figura 3; diferentes de parásitos gastrointestinales con un IC 95% (29.27-56.72) Tabla 1.

Tabla 1. Prevalencia de parasitosis gastrointestinales en humanos

Parasitosis gastrointestinal	Prevalencia de parásitos		
	Positivos	Prevalencia (%)	IC 95%
General del total de participantes	33/35	94.28%	(29.27-56.72)
Por localidad			
Magallanes	25/35	71.42%	
Mirador Pilapa	8/35	22.85%	
Taxón de parásito observado en las muestras fecales por triplicado			
<i>Entamoeba</i> sp	69/96	71.88%	
<i>Balantidium</i> sp	5/96	5.21%	
<i>Ascaris</i> sp	4/96	4.17%	
<i>Strongyloides</i> sp	1/96	1.04%	
<i>Hymenolepis</i> sp	1/96	1.04%	
<i>Clonorchis</i> sp	1/96	1.04%	
<i>Blastocystis</i> sp	1/96	1.04%	

Prevalencia de parásitos gastrointestinales observados en las muestras fecales de los humanos en los ejidos de Magallanes y Mirador Pilapa, México.

IC: Intervalo de confianza

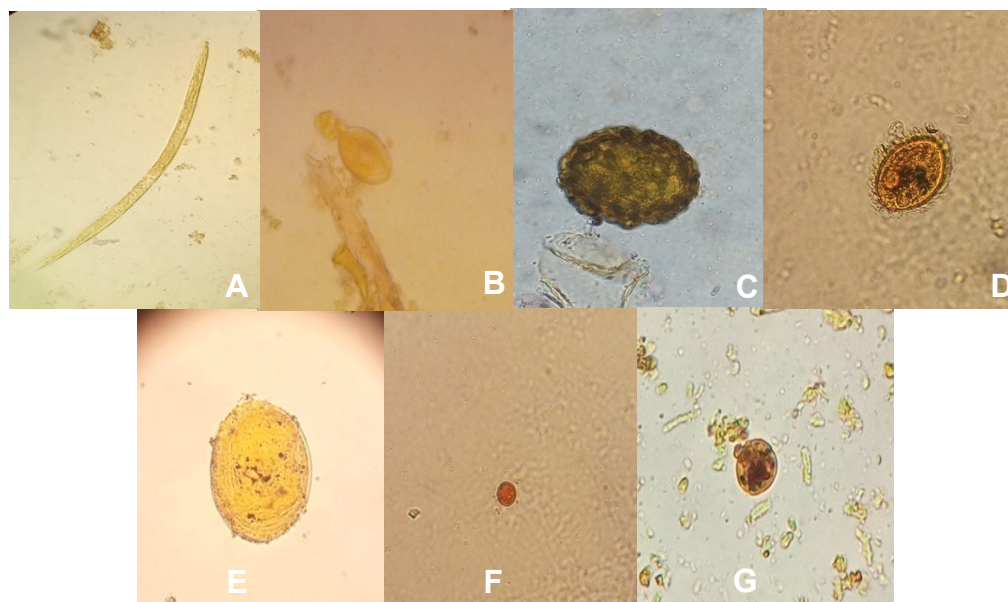


Figura 3. Parásitos gastrointestinales observados en las heces de los humanos

A) Larva de *Strongyloides* sp; B) Huevo de *Clonorchis* sp; C) huevo de *Ascaris* sp; D) Quiste de *Balantidium* sp; E) Huevo de *Hymenolepis*; F) *Entamoeba* sp; G) *Blastocystis* sp.

Tinción con lugol y observados a una amplificación de 40 X.

Fotografía: fuente propia, 2023

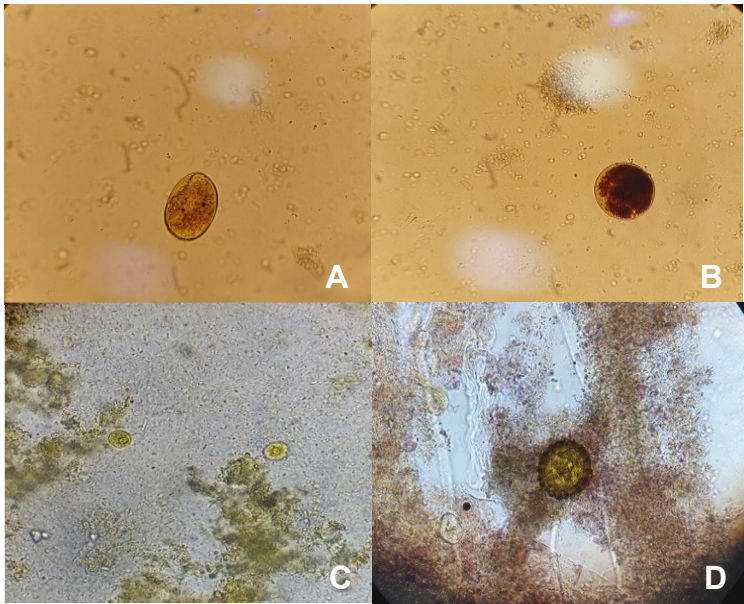


Figura 4. Parásitos gastrointestinales observados en las heces de los cerdos
Figura A. Trofozoíto de *Balantidium* sp.
Figura B. Quiste de *Balantidium* sp.
Figura C. Quiste de *Entamoeba* sp.
Figura D. Huevo de *Ascaris* sp.
Tinción con lugol y observados a una amplificación de 40 X.
Fotografía: fuente propia, 2024

A diferencia de las muestras fecales de cerdos, la prevalencia general fue del 100% (17/17), se observaron 5 taxones ver Figura 4; diferentes de parásitos con un IC 95% (-16.65-20.42). Tabla 2.

Tabla 2. Prevalencia de parasitosis gastrointestinales en cerdos			
Parasitosis gastrointestinal	Prevalencia de parásitos		
	Positivos	Prevalencia (%)	IC 95%
General del total de las muestras de heces de cerdo	17/17	100%	(-16.65-20.42)
Por localidad			
Magallanes	8/17	47.05%	
Mirador Pilapa	9/17	52.94%	
Taxón de parásito observado en las muestras fecales			
<i>Entamoeba</i> sp	17/17	100%	
<i>Balantidium</i> sp	5/17	29.41%	
<i>Ascaris</i> sp	3/17	17.64%	
Prevalencia de parásitos gastrointestinales observados en las muestras fecales de los cerdos en los ejidos de Magallanes y Mirador Pilapa, México.			
IC: Intervalo de confianza			

Además, se realizó la prueba de Chi-cuadrada de Pearson's, para determinar la asociación entre la prevalencia de parásitos gastrointestinales en las muestras de los humanos y las diferentes localidades. Se encontró una diferencia significativa (p -valor= 0.05, X-squared= 9.37, df = 4).

Aunado, se realizó una correlación de Spearman para relacionar la prevalencia y taxones de parásitos en las muestras fecales de humanos y cerdos, se observó una correlación negativa y significativa (Rho = -0.93, df = 4, p valor= 0.00). Se identificó que tanto en las muestras de heces de los humanos como de los cerdos de traspatio comparten la presencia de los parásitos: *Entamoeba* sp; *Balantidium* sp; y *Ascaris* sp. La prevalencia de parásitos gastrointestinales fue mayor en la población de cerdos (100%) en comparación a la población humana (94.28%).

CONCLUSIONES

Los resultados mostraron una elevada prevalencia de parásitos tanto en humanos como en cerdos, con la presencia de 3 taxones compartidos entre ambas poblaciones. Esta alta prevalencia posiblemente se debe a las deficientes condiciones en las que se encontraron los animales. Se observó que algunos cerdos no estaban resguardados de manera adecuada, encontrándose en libertad y defecando al aire libre, lo que aumenta el contacto de las heces de los animales infectados con el hombre, generando un intercambio de parásitos gastrointestinales entre las dos poblaciones. En las muestras humanas, se observó la presencia de *Balantidium* sp; el único protozoo ciliado que puede infligir daño al hombre y puede estar relacionado con un proceso zoonótico en el cual los cerdos son el reservorio del patógeno. La presencia de *Balantidium* se ha asociado con malas condiciones higiénicas, falta de servicios básicos y eliminación inadecuada de excretas, características que coinciden con el presente estudio. Además, se observó que algunos cerdos carecen del corral, lo cual podría ser un posible factor de riesgo para los humanos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jufare, N, Awol, T, Fadesse, Y, Tsegaye, & B. Hadush, "Parasites of pigs in two farms with poor husbandry practices in Bishoftu, Ethiopia". Onderstepoort J Vet Res., Vol 82,1, 2015, pp. 1-5.
2. C.A. Moreira-Macías, M.J. Pinargote-Moreira, J, Castro-Jalca, "Parasitism in human immunodeficiency infection in the global population"., Vol.8 No.1 (2024): Journal Scientific Investigar., Vol 8,1, 2024, pp. 4624-4640.
3. C.D.C. (Centers for Disease Control and Prevention), "Balantidiasis", 2020. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dpdx/balantidiasis/>
4. D.P. Morillo Portilla, "Identificación de parásitos gastrointestinales y factores de riesgo en cerdos (*Sus scrofa domesticus*) en la parroquia de Julio Andrade", 2024, Tesis de Licenciatura, Universidad Politécnica Estatal Del Carchi, Ecuador, Tulca,
5. J. Hernández-Martínez, G. Rodríguez-Licea, G. Gómez-Tenorio, E. Guzmán-Soria, E. Rebollar-Rebollar, y S. Rebollar-Rebollar, "Análisis de la competitividad de la porcicultura en Tejupilco y Luvianos, México (2006-2018)". Agronomía mesoamericana., Vol. 31,1, 2020, pp. 663-677
6. J.C. López, y M.A. Peña, "Prevalencia y factores de riesgos de infecciones por protozoarios intestinales", Veterinary Parasitology., Vol. 93,1, 2020, pp. 393-408.
7. L. Beltrán, P. Beldomenico, J. González, "Estudio coproparasitológico de mamíferos silvestres en cautiverio con destino a relocación en Santa Cruz, Bolivia". Vetzootec., Vol 3,1, 2009, pp. 51-60.
8. L. Quesada, "Principales aspectos de los coccidios asociados a diarrea en pacientes VIH positivos". Acta Médica Costarricense., Vol. 54, 3, 2012, pp. 139-145
9. L. X. Estévez-Moreno, y G.C. Miranda-de la Lama, G. C, "Meat consumption and consumer attitudes in Mexico: Can persistence lead to change?", Meat Science., Vol.193, 108943, 2022, pp. 1-7.
10. L.R. Ash, T.C. Orihel, "Helmintos", in Atlas de Parasitología (Buenos Aires, Argentina, 2010), pp 179-181.

11. Laabrada Ching, J, Villamarín, B.D.R. Jiménez, V.MA, y Castaño, T.L.S, "Zoonotic gastrointestinal protozoans of the pig. Bibliographic review", *Salud, Ciencia y Tecnología.*, Vol 4,938, 2024, pp. 1-11,
12. O.M. Hale, y T.B. Stewart, "Feed and maintenance costs of internal parasites in growing-finishing swine", *Agri-Practice.*, Vol. 8,4,1987, pp. 33–35.
13. O.M. Hale, y T.B. Stewart, "Losses to internal parasites in swine production", *Journal of Animal Sciences.*, Vol 66, 1, 1988, pp. 1548–1554.
14. OMS (Organización Mundial de la Salud), "Las 10 principales causas de defunción", 2019. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
15. Plan Municipal de Desarrollo, "Ayuntamiento de Tatahuicapan de Juárez, Ver". 2022. Disponible en <https://www.veracruz.gob.mx/finanzas/wp-content/uploads/sites/2/2022/PMD/PMD%20Tatahuicapan%20de%20Juárez.Veracruz.2022-2025..pdf>
16. S. Noorpisheh Ghadimi, M.R. Abedini, B. Sarkari, A. Savardashtaki, y F. Mikaeili, "Neobalantidium coli: First molecular identification from the Eurasian wild boar, *Sus scrofa* in Bushehr Province, Southwestern Iran", *Veterinary Medicine and Science.*, Vol. 6, 1, 2020, pp. 51-60
17. S. Rondón, M. Ortiz, C. León, N. Galvis, A. Link, y C. González, "Seasonality, richness, and prevalence of intestinal parasites of three neotropical primate (*Alouatta seniculus*, *Ateles hybridus* and *Cebus versicolor*) in a fragmented forest in Colombia". *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife.*, Vol. 6,3, 2017, pp. 202-208.
18. T. Otzen, y C. Manterola, "Técnicas de Muestreo sobre una Población a Estudio". *International journal of morphology.*, Vol 35,1, 2017, pp. 227-232.
19. V. Puicón, A. López-Flores, F. Fabian-Dominguez, & H. Sánchez-Cárdenas, "Prevalencia coprológica de parásitos gastrointestinales en humanos y porcinos de crianza de traspato del distrito de Zapatero, San Martín". *Revista de Veterinaria y Zootecnia Amazónica.*, Vol.1,1,2021, pp. 4-14.
20. Y. Valle-Peguero, Y. Guerra-Llorens, J.D. Mencho Ponce, J. D, & A. Vázquez Flores, "Comparación de parasitismo gastrointestinal en cerdos estatales y privados en diferentes categorías". *REDVET.*, Vol. 18,2, 2006, pp. 141-144
21. Z. Condemayta, D. Condemayta, D. Ruelas, y V. Ibañez, "Prevalencia de *Balantidium coli* en la población humana y porcina asociado a factores socioeconómicos y saneamiento ambiental en el Distrito de Acora Puno Perú", *Revista de Investigaciones Altoandinas.*, Vol. 20,1, 2018, PP. 85-94.

EFFECTO DE LA INFECCIÓN CON LA BACTERIA DIARREOGENICA *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATÓGENA SOBRE LA ACTIVIDAD GABAÉRGICA EN EL ORGANISMO MODELO *CAENORHABDITIS ELEGANS*

Leonardo Hernández Hernández¹, Diego Wenceslao Aguilar Ocampo¹, Luis Antonio Ramírez Contreras², Araceli Castillo Romero¹, Gabriela Camargo Hernández², Susan Andrea Gutiérrez Rubio¹, Rafael Cortes Zarate¹ y Abel Hernández Chávez¹

¹ Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, ² Centro Universitario de los Altos, Universidad de Guadalajara.
leonardo.hhernandez@academicos.udg.mx

RESUMEN

Introducción: El trastorno en el microbioma intestinal y sus relaciones armónicas con la fisiología normal se denomina colectivamente "disbiosis intestinal", que se ha identificado como un factor importante que conduce a enfermedades, por alterar la homeostasis de los neurotransmisores, entre otras cosas. Entre estos neurotransmisores, el neurotransmisor inhibitorio GABA (ácido gamma-aminobutírico) en regiones fisiológicas, está implicado en vías y funciones del SNC, como comportamiento, control motor, estado de ánimo o sueño. También es importante el efecto que bacterias patógenas sobre la generación de la disbiosis intestinal. Estamos interesados en los procesos involucrados en diarreas infecciosas provocadas por las bacterias con relevancia médica, como son las cepas diarreogénicas de *Escherichia coli*, dentro de las cuales se distinguen la *E. coli* enteropatogénica (EPEC) que causa diarreas infecciosas y que en la actualidad son causa importante de morbilidad infantil, a nivel mundial, y motivo frecuente de hospitalizaciones y consultas pediátricas. Desafortunadamente, la complejidad del sistema y nervioso y la diversidad de la microbiota intestinal en mamíferos, obstaculizan la comprensión de su interacción. No obstante, esto pueden ser investigado en un modelo más simple y definido, el nematodo *Caenorhabditis elegans*, utilizado ampliamente en estudios de patogénesis microbiana y que posee un sistema nervioso simple que incluye al sistema GABAérgico. **Objetivo:** Evaluar el efecto de la infección por *Escherichia coli* enteropatogénica sobre la actividad del GABA en *Caenorhabditis elegans*. **Metodología:** Se emplearon *C. elegans* de las cepas N2 Bristol (WT) y EG1653 (oxIs22 [unc-49p::unc-49::GFP + lin-15(+)] X), que en función de los experimentos fueron distribuidos en un grupo CONTROL, alimentado con su comida estándar, la *E. coli* OP50, y un grupo EPEC, alimentado con *Escherichia coli* enteropatogénica. Se hicieron los ensayos en los días 1, 2 y 3 de infección. Para evaluar cambios en la funcionalidad del sistema GABAérgico, gusanos N2 fueron sometidos al ensayo de toque a la nariz. Para determinar si hubo cambios en los receptores GABA_A, los gusanos EG1653 se montaron en una almohadilla de agarosa al 2% dispuesta sobre un portaobjetos e inmovilizados con una gota de Azida de sodio 40 mM; posteriormente se observaron en un microscopio de epifluorescencia. **Resultados.** La respuesta de encogimiento en el ensayo de toque a la nariz muestra daño del sistema GABAérgico. Esto se registró con EPEC en el 22% de los ensayos el día 1, disminuyendo a 6% el día 2 y desapareció al día 3. Los gusanos EG1653 infectados con EPEC, mostraron una disminución, con relación al control, en los receptores GABA_A del 31% y del 44% en el área corporal dorsal y ventral respectivamente. **Conclusión:** Los resultados sugieren que la infección con EPEC disminuyen la actividad GABAérgica, con una recuperación posterior.

INTRODUCCIÓN

En la última década, se ha evidenciado la existencia de una vía de comunicación bidireccional entre las bacterias intestinales y el sistema nervioso central (SNC), llamado eje microbiota-intestino-cerebro, el cual ejerce una influencia profunda en los procesos cerebrales clave, como la neuroinflamación, la neurotransmisión, la neurogénesis, la modulación del sistema inmune y la producción de metabolitos como los ácidos grasos de cadena corta que poseen propiedades neuroactivas. También en el sentido opuesto, mecanismos biológicos como el sistema inmunológico y la señalización del nervio vago, también son importantes en el desarrollo de la microbiota intestinal. De hecho, trastornos como la ansiedad y la depresión se han relacionado con alteraciones en la microbiota intestinal. Esto resalta su importante papel en la regulación de la actividad cerebral y las

funciones cognitivas. No obstante, no es claro cómo ocurre esta interacción, ni como esta afecta el funcionamiento normal del cerebro.

Ahora bien, el trastorno en el microbiota intestinal y sus relaciones armónicas con la fisiología normal se denomina colectivamente "disbiosis intestinal". Varios estímulos externos, como los fármacos, pueden influir en el entorno microbiano intestinal y provocar la disbiosis intestinal, que se ha identificado como un factor importante que conduce a varias enfermedades, ya sea por los metabolitos liberados o por la conexión neuronal intestinal. A nivel intestinal se ha documentado en trastornos intestinales, incluida la enfermedad inflamatoria intestinal o el síndrome del intestino irritable. A nivel cerebral, la disbiosis intestinal está involucrada con enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson), al liberar metabolitos anormales del intestino, y en manifestaciones neuropsiquiátricas (trastorno del espectro autista, la ansiedad y la depresión), al interferir con la homeostasis de los neurotransmisores.

TEORÍA

Entre los neurotransmisores involucrados en el eje microbiota-intestino-cerebro, el neurotransmisor inhibitorio GABA (ácido gamma-aminobutírico), cuando es liberado por neuronas en regiones fisiológicas, está implicado en vías y funciones del SNC, como comportamiento, control motor, estado de ánimo o sueño (Ochoa-de la Paz et al., 2021), además, tiene efectos sobre las células inmunitarias (Jin et al., 2013). Por otro lado, se sabe que algunas bacterias del microbiota intestinal producen GABA y que este junto con el GABA endógeno influye a la respuesta inmune (Strandwitz, 2018). También es importante el efecto que tienen bacterias patógenas sobre la generación de la disbiosis intestinal. En este sentido, existe un creciente interés por comprobar si bacterias patógenas, median la comunicación entre los sistemas metabólico, el sistema inmune, el sistema nervioso periférico y el central a través del eje microbiota-intestino-cerebro (Lynch & Pedersen, 2016). Es de nuestro interés estudiar como interactúan las bacterias patógenas con relevancia médica, como son las cepas diarreogénicas de *Escherichia coli*, dentro de las cuales se distinguen la *E. coli* enteropatogénica (EPEC) que causa diarreas infecciosas y que en la actualidad son causa importante de morbilidad infantil, a nivel mundial, y motivo frecuente de hospitalizaciones y consultas pediátricas (Rodríguez-Angeles, 2002).

Desafortunadamente, la complejidad del sistema nervioso y la diversidad del microbiota intestinal en mamíferos, obstaculizan la comprensión de su interacción. No obstante, esto puede ser investigado en un modelo más simple y definido, el nematodo *Caenorhabditis elegans*, un organismo modelo que por sus características es ideal para examinar las funciones de neuronas y circuitos neuronales específicos en la regulación inmunitaria durante la infección por patógenos, de una manera simplificada y definida desde una base molecular. Asimismo, es utilizado ampliamente en estudios de patogénesis microbiana y posee un sistema nervioso simple que incluye al sistema GABAérgico con su maquinaria biosintética, sus componentes anatómicos-funcionales y sus conexiones sinápticas (Jorgensen, 2005). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la infección por *Escherichia coli* enteropatógena sobre la actividad del GABA en *Caenorhabditis elegans*.

PARTE EXPERIMENTAL

Las cepas de *E. coli* diarreogénicas se cultivan en placas de agar nutritivo (Becton Dickinson, Maryland, USA), y son incubadas a 37°C por 18-20 h. Asimismo, se emplearon *C. elegans* de las cepas N2 Bristol (WT) y EG1653 (oxIs22 [unc-49p::unc-49::GFP + lin-15(+)] X). Estas cepas fueron proporcionadas por el *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC, Minneapolis, MN, EE. UU.). Todos los experimentos se realizaron con gusanos adultos, sincronizados por edad según los métodos estándar (Hope, 2000), cultivados en placas de Nematode Growth Medium agar (NGM) con sus respectivas fuentes alimentarias, patógenas y estándar a <20°C. La fuente de alimento estándar es la cepa de *E. coli* OP50. Para los experimentos se prepararon cultivos stocks de las cepas patógenas y la estándar, a partir de un cultivo de toda la noche, crecido en caldo LB (37°C, 250 rpm) hasta llegar a una densidad óptica de 0.1 (OD 600 nm, BioPhotometer Eppendorf, 1x10⁸ UFC/mL).

Protocolo de infección. Se prepararon placas de agar NGM de 35 mm con la cepa de estudio (EPEC), así como E. coli OP50 como control. Para esto, se añadieron a cada placa de agar NGM, 30 microlitros del stock de los cultivos de estas cepas en caldo LB con una absorbancia de 0.1 (OD= 0.600 nm, 1×10^8 UCF/ml). En cada placa de infección serán transferidos 30 gusanos, los cuales serán mantenidos a 20°C y se alimentarán por 24, 48 y 72 horas (periodos de infección) con las bacterias control o con las cepas de estudio. Al final de cada periodo de infección, se realizaron los estudios correspondientes.

Grupos de Estudio para Ensayos en C. elegans. Se establecieron 2 grupos de estudio: un grupo control, que fueron nemátodos alimentados con la comida estándar, la bacteria no patógena E. Coli OP50, y un grupo EPEC, donde los gusanos fueron alimentados con E. coli enteropatógena.

Ensayo de respuesta al tacto de la nariz (Nose Touch). Para evaluar cambios en la funcionalidad del sistema GABAérgico, gusanos N2 fueron sometidos al ensayo de toque a la nariz. En este ensayo se toca con un pelo de ceja el bulbo posterior de la faringe de un animal que se mueve hacia delante (Chalfie & Sulston, 1981). Un fallo en el sistema GABAérgico, induce una respuesta defectuosa de la locomoción sinusoidal con un encogimiento cuando el gusano retrocede. Los gusanos se grabarán en vídeo con un microscopio estereoscópico con cámara digital.

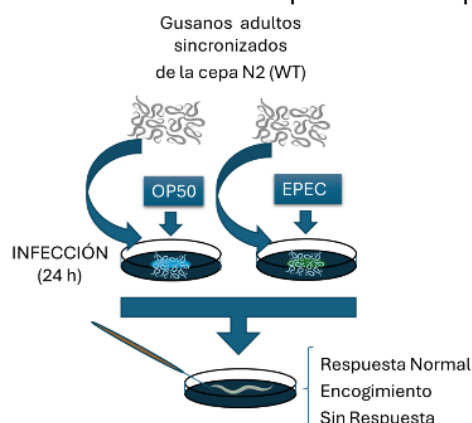


Figura 1. Protocolo experimental del ensayo de toque a la nariz

Procedimiento de montaje y observación en el microscopio de Epifluorescencia. Para determinar si hubo cambios en los receptores UNC-49 (ortólogos de los receptores GABA_A), al menos 5 gusanos de la cepa EG1653 se transfirieron a una almohadilla de agarosa al 2% con una gota de Azida de sodio 40 mM, y posteriormente se les colocó un cubreobjetos. Los gusanos se visualizaron en un momento similar después de la exposición, para medir de forma reproducible y comparable. Las imágenes de Epifluorescencia se capturaron con un objetivo de 20X a 40X en un microscopio invertido con un accesorio de Epifluorescencia y cámara digital, a tiempos de exposición constante. Las imágenes de epifluorescencia se procesaron con los programas Image J (NIH, Bethesda, MD).

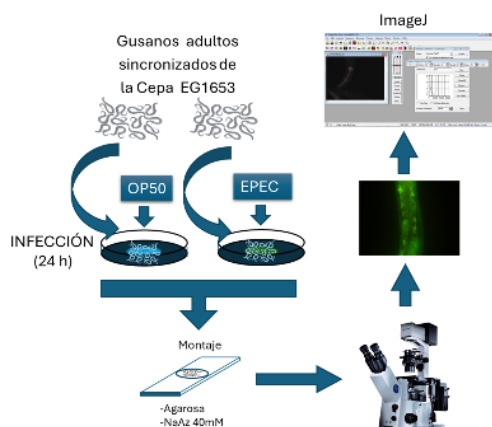


Figura 2. Protocolo experimental de microscopia de epifluorescencia con gusanos de la cepa EG1653

RESULTADOS

La infección con EPEC incrementó la frecuencia de respuesta de encogimiento durante el ensayo de toque a la nariz en el 22% de los ensayos del día 1, esto es indicativo de un daño del sistema GABAérgico. Sin embargo, la frecuencia de la respuesta de encogimiento disminuyó a 6% el día 2 y desapareció al día 3.

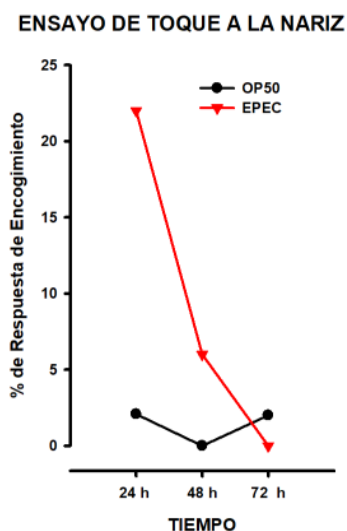


Figura 3. Efecto de la infección con EPEC, sobre la conducta de encogimiento en el ensayo de toque a la nariz.

Los estudios de microscopia de epifluorescencia se llevaron a cabo con gusano EG1653, que es una cepa transgénica que expresa la proteína UNC-49 unida a proteína verde fluorescente (GFP). Observamos que los gusanos EG1653 infectados con EPEC, mostraron una disminución, con relación al control, en los receptores UNC-49 (ortólogo de GABA_A) del 31% y del 44% en el área corporal dorsal y ventral respectivamente.

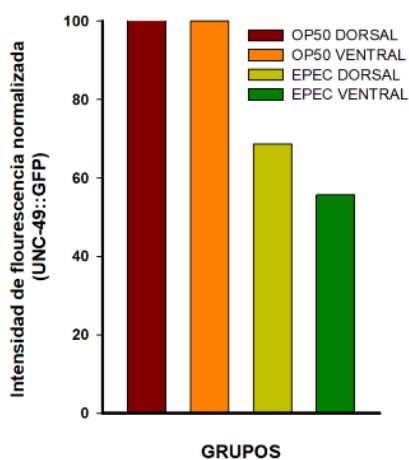


Figura 4. Efecto de la infección con EPEC, sobre la expresión de receptores UNC-49.

CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que la infección con EPEC causa un deterioro de la actividad GABAérgica, con una recuperación posterior. También indican que la infección induce una disminución de la cantidad de receptores GABA_A en los músculos ventrales y dorsales del cuerpo del *C. elegans* en el primer día, lo que concuerda con el deterioro del sistema GABAérgico. Finalmente, aparentemente

hay una recuperación de la función GABAérgica, lo que podría sugerir una posible respuesta compensatoria tras la infección.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chalfie, M., & Sulston, J. (1981). Developmental genetics of the mechanosensory neurons of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 82(2), 358-370. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(81\)90459-0](https://doi.org/10.1016/0012-1606(81)90459-0)
2. Hope, I. A. (1999). *C. elegans: A Practical Approach* (1 edition ed., Vol. 213). Oxford University Press. http://books.google.com.mx/books?id=BqsZ_iGqOeAC
3. Jin, Z., Mendu, S. K., & Birnir, B. (2013). GABA is an effective immunomodulatory molecule. *Amino Acids*, 45(1), 87-94. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1193-7>
4. Jorgensen, E. M. (2005). GABA In J. M. Kaplan (Ed.), *WormBook. The C. elegans Research Community*. <https://doi.org/doi/10.1895/wormbook.1.14.1>, <http://www.wormbook.org>.
5. Lynch, S. V., & Pedersen, O. (2016). The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med*, 375(24), 2369-2379. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1600266>
6. Ochoa-de la Paz, L. D., Gúlias-Cañizo, R., D'Abril Ruíz-Leyja, E., Sánchez-Castillo, H., & Parodí, J. (2021). The role of GABA neurotransmitter in the human central nervous system, physiology, and pathophysiology. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 22(2), 67-76. <https://doi.org/10.24875/rmn.20000050>
7. Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 44(5), 464-475. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342002000500011&lng=es&tlng=es.
8. Strandwitz, P. (2018). Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Res*, 1693(Pt B), 128-133. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.03.015>

FISIOLOGÍA E HISTOQUÍMICA DE LA PLANTA MEDICINAL *JATROPHA DIOICA*

Paola Susana Alcaraz Tapia¹, Sofía Loza Cornejo¹, Celia Guadalupe Pedroza Pedroza¹, Paola Trinidad Villalobos Gutiérrez¹, María de la Luz Miranda Beltrán¹, Brenda Mata Ortega¹ y Martin Ortiz Morales²

¹ Centro Universitario de los Lagos, Universidad de Guadalajara, ² Centro de Investigaciones en Óptica, A.C.

RESUMEN

La planta *Jatropha dioica*, también conocida como sangre de drago o sangre de dragón, es una especie arbustiva con amplia distribución en México, particularmente en regiones áridas y semiáridas. Se ha documentado que prácticamente todas sus partes (semillas, hojas, tallo, raíz), poseen propiedades medicinales, así como actividad biológica fungicida, bactericida, entre otras. Por ejemplo, las hojas presentan actividad antiinflamatoria, mientras que el tallo cuenta con actividad antifúngica al igual que la raíz. El objetivo del presente trabajo fue evaluar algunos aspectos de la fisiología de la planta en dos temporadas ambientales contrastantes (lluvia-sequía), tales como el índice de contenido de clorofila (ICC) y contenido relativo de agua (CRA), así como la presencia de metabolitos secundarios (alcaloides), ya que a estos compuestos químicos se les atribuye algunas propiedades medicinales de la especie. Para las pruebas fisiológicas se midió el ICC mediante un equipo portátil (n=15 hojas por tres repeticiones) y para el contenido relativo de agua (CRA) se consideró una n=6 hojas también por triplicado, en diferentes periodos de muestreo, con la finalidad de contribuir al conocimiento del metabolismo fotosintético y la capacidad de almacenamiento de agua o estado hídrico de la planta. Para el análisis histoquímico se analizó el contenido de alcaloides en hojas, tallo y raíz (n=6 repeticiones de hojas, tallo y raíz), mediante la aplicación de pruebas histoquímicas y su observación con un microscopio óptico. Los resultados demostraron un mayor ICC (5.97 ± 0.62 CCI) en temporada de lluvia; mientras que el CRA fue relativamente más alto (96.53 ± 0.17 %) en época de sequía. En cuanto a la histoquímica, se observó una gran acumulación de alcaloides en todos los tejidos de ambas temporadas.

INTRODUCCIÓN

Las plantas se encuentran sometidas frecuentemente a situaciones desfavorables en el ambiente conocidas con el nombre de estrés medio ambiental (Moreno, 2015). Por ejemplo, de acuerdo con Wahid y col. (2007), el estrés por altas temperaturas causa cambios morfo-anatómicos, fisiológicos y bioquímicos en las plantas, que afectan su crecimiento y su desarrollo y pueden conducir a una drástica reducción del rendimiento económico en las plantas cultivadas. Además, bajo diversos tipos de estrés (biótico o abiótico), las plantas producen una serie de productos secundarios llamados metabolitos secundarios tales como fenoles, flavonoides, terpenoides, antocianinas, entre otros, como mecanismo de defensa frente a depredadores, virus, bacterias, etc. (Indrajeet y Rajesh, 2018). *Jatropha dioica*, también conocida como sangre de drago es un arbusto perenne que se distribuye principalmente en el centro de México, particularmente en regiones áridas y semiáridas, por lo que es una planta que tiene gran resistencia a la sequía. La planta ha sido empleada en la Medicina Tradicional Mexicana desde tiempo atrás, ya que se prepara como decocción para el control de caída del cabello, dolores de riñones y problemas de digestión (Manzanero-Medina y col., 2009). Prácticamente todas sus partes (semillas, hojas, tallo, raíz), poseen propiedades medicinales, así como actividad biológica fungicida, bactericida, entre otras. Por ejemplo, el extracto etanólico de la raíz tiene propiedades antifúngicas y antibacterianas (Silva-Belmares y col., 2014).

TEORÍA

Las especies pertenecientes a la familia Euphorbiaceae, destacan porque tienen gran cantidad de látex en la planta (Elumalai y col., 2013) y en general, las semillas se caracterizan por presentar contenidos relativamente altos de aceite; por ejemplo, la “higuerilla” (*Ricinus communis* L.), el “piñón” (*Jatropha curcas* L.) y la “mala mujer” (*Cnidoscolus multilobus* (Pax) I.M. Johnst.) (Córdoba-Téllez y col., 2015). *Jatropha dioica* se distingue porque al ser cortados los tallos o raíces segregan un látex

incolores (ricos en taninos) que en contacto con el aire se torna rojizo oscuro semejante a la sangre, de ahí el nombre común de sangre de drago (Manzanero-Medina y col., 2009; Pérez-Pérez y col., 2020b).

Es un arbusto perenne escasamente leñoso y posee una altura desde los 30 hasta los 150 centímetros. Generalmente forman colonias, debido a sus rizomas, de los cuales originan tallos semileñosos de coloración negro-rojizo. Las hojas aparecen únicamente en la época de lluvias y se encuentran agrupadas en fascículos y son obovadas, siendo más anchas hacia la zona del ápice. Las flores son pequeñas y agrupadas en cimas o fascículos, su corola varía de color blanquecino a rosado (Figura 1). Los frutos son globosos de aproximadamente 1.5 cm de diámetro y sólo cuentan con una semilla de color café de un cm de diámetro (Rzedowski y Calderón, 2001; Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009; Manzanero-Medina y col., 2009; Pérez-Pérez y col., 2020b).



Figura 1. Caracteres morfológicos de *Jatropha dioica*. A. Planta *J. dioica* en su hábitat natural; B. Rizoma; C. Hojas y frutos; D. Flores. Imágenes propias.

Actualmente los estudios sobre cómo afectan las condiciones ambientales contrastantes (lluvia-sequía) la fisiología y química a la planta medicinal *Jatropha dioica*, son escasos o nulos por lo que en el presente trabajo se evaluaron algunos aspectos de la fisiología tales como el índice de contenido de clorofila (ICC) y contenido relativo de agua (CRA) de esta especie en diferentes épocas del año, así como la presencia de metabolitos secundarios (alcaloides); ya que a estos compuestos químicos se les atribuye algunas propiedades medicinales de la planta.

PARTE EXPERIMENTAL

Se tomaron muestras de las plantas de *J. dioica* para comparar su fisiología y contenido de alcaloides en temporadas de lluvia (mayo-octubre) y sequía (noviembre-abril) en el cerro denominado “Cerro de la bola” ubicado en las siguientes coordenadas geográficas: 21°21′ 05.6′ ′ N 101°57′ 28.6′ ′ O.

Índice de contenido de clorofila (ICC)

El ICC se midió mediante un equipo portátil (CCM-200; Bioweb, Colombia). Para esto se consideraron hojas de entre 1-2 cm de longitud. Se midió este índice en tres hojas de cada planta (n= 5 plantas por tratamiento).

Contenido relativo de agua (CRA)

El contenido relativo de agua es usado para medir el nivel de agua de un tejido. Es una medida del contenido de agua respecto al total de agua que éste puede almacenar; se expresa como porcentaje y permite conocer el estado hídrico de la planta (Acevedo, 2003).

Para esta prueba se tomaron las hojas (n=10) de la planta *J. dioica* para posteriormente pesarlas (masa fresca) y después se sumergieron en agua destilada durante una hora; se volvió a registrar el peso (masa turgente) y finalmente las muestras se introdujeron a una estufa durante dos horas a 70 °C y se registró su peso una vez más (masa seca) (Kramer, 1974). Se utilizó la siguiente fórmula para conocer el CRA:

$$CRA = \frac{MF - MS}{MT - MS} \times 100$$

Donde:

CRA: Contenido relativo de agua

MF: Masa fresca foliar

MS: Masa seca foliar

MT: Masa turgente foliar

Pruebas histoquímicas

Se determinaron de manera cualitativa (presencia/ausencia) los metabolitos secundarios (alcaloides) en diferentes órganos de las plantas de *J. dioica* como son: hojas, tallo y raíz y se describió su distribución en el tejido.

Para ello se realizaron cortes a mano alzada en tallo y raíz a excepción de la hoja, posteriormente se añadió el colorante de Wagner y se considera una prueba positiva al observarse los metabolitos de color naranja, rojo, marrón claro a intenso (casi negro).

RESULTADOS

Los resultados de los parámetros fisiológicos de ICC y CRA medidos en diferentes temporadas de lluvia y sequía se resumen en el Cuadro 1. Mientras que el contenido de alcaloides en los diferentes tejidos de la planta se observa de manera detallada en la Figura 2.

Caracteres fisiológicos de *Jatropha dioica*

Índice de contenido de clorofila (ICC)

Las plantas de *Jatropha dioica* provenientes de la condición climática de lluvia mostraron una mayor cantidad de clorofila (5.97 CCI) en comparación de las de sequía (1.43 CCI) (Cuadro 1). Estos resultados coinciden con Seckin y Aksoy (2014), quienes analizaron el contenido de clorofila en la planta *Polygonum maritimum* bajo dos regímenes de estrés hídrico (72 hrs. y 10 días), ya que las hojas también presentaron un mayor contenido de clorofila en el control con 17.47 y 16.46 mg/g, mientras que las sometidas a estrés hídrico presentaron un contenido de clorofila más bajo con 14.80 y 16.46 mg/g. En otro estudio realizado por Sausen y Golcalven (2010), en plantas de la especie *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) sometidas a estrés hídrico, encontraron resultados diferentes, ya que observaron un menor contenido de clorofila en las plantas con riego regular (462 g/m²) en comparación con las plantas sometidas a estrés hídrico (555 g/m²).

Cuadro 1. Comparación de parámetros fisiológicos de la planta *Jatropha dioica* provenientes de diferentes condiciones ambientales (lluvia-sequía).

Parámetro fisiológico	Temporada	
	Lluvia	Sequía
Índice de contenido de clorofila (CCI)	5.97±0.62	1.43±0.15
Contenido relativo de agua (%)	77.95±0.21	96.53±0.17

Los datos representan la media $\pm$ el error estándar.

El contenido de clorofila es de gran importancia, ya que la capacidad fotosintética de las hojas depende de ésta y otras características, tales como la calidad de la luz (longitud de onda e intensidad de luz), agua, temperatura y minerales disponibles para la planta (Verma y col. 2014; Vongcharoen y col. 2019).

Contenido relativo de agua (CRA)

En cuanto a este parámetro fisiológico, la planta de *Jatropha dioica* proveniente de la sequía tuvo un valor de 96.53% en comparación con las plantas analizadas provenientes de la estación de lluvia con 77.95% (Cuadro 1). Al comparar con otras especies de plantas estudiadas por otros autores como Sapeta y col. (2013), quienes compararon las hojas de dos accesiones de *Jatropha curcas* en diferentes regiones: Indonesia (Ind) e Isla Cape Verde (CVi) y un tratamiento control (riego frecuente) registraron un valor de 66.4 para Ind y 75.6% para CVi; mientras que las plantas bajo estrés hídrico tuvieron un valor de 73.5 y 82.9% para Ind y CVi, respectivamente. Lo anterior es similar a los resultados registrados en la presente investigación, donde destacaron solo las plantas de la sequía por su mayor contenido relativo de agua. Mientras que Souza-de Oliveira y col. (2016), al comparar el CRA de plántulas de dos variedades de *Jatropha curcas* bajo estrés hídrico obtuvieron que las variedades CNPAE 183 y 191 también mostraron un alto contenido relativo de agua mayor del 80%. Un aumento en el CRA podría deberse al aumento del potencial hídrico, esto debido a que aumenta el cierre de estomas y, por lo tanto, la reducción de la transpiración como lo establecen Mathobo y col. (2017) y Merlaen y col. (2019). Cabe destacar, sin embargo, que una reducción de CRA puede ser causada por una mayor absorción o translocación de agua a otras partes de la planta como un mecanismo fisiológico para suprimir el impacto de la sequía (Okunlola y col., 2017).

Pruebas histoquímicas

Contenido de alcaloides

Las pruebas realizadas con el reactivo de Wagner para la visualización de alcaloides en hojas, tallo y raíz en la planta de *Jatropha dioica* en diferentes condiciones climáticas (Lluvia-sequía) mostraron diferencias cualitativas, las cuales se observan en la Figura 2. En el caso de las hojas de *J. dioica* provenientes de la lluvia se destacaron por presentar una gran acumulación de alcaloides sobre todo cerca de las nervaduras. En cuanto al tallo y raíz de ambas condiciones climáticas no destacó ninguna de las plantas, ya que ambos órganos presentan gran acumulación de alcaloides distribuidos por todo el tejido. Comparando con otros autores tales como Prelania y col. (2015) quienes analizaron hojas de *Withania somnifera* (Solanaceae), observaron alcaloides en los tricomas. Mientras que Novia y col. (2016), también observaron la presencia de alcaloides en las plantas de *Acalypha indica* y *Acalypha wilkesiana* (Euphorbiaceae) en las hojas y en algunas zonas del tallo como el xilema y el córtex.

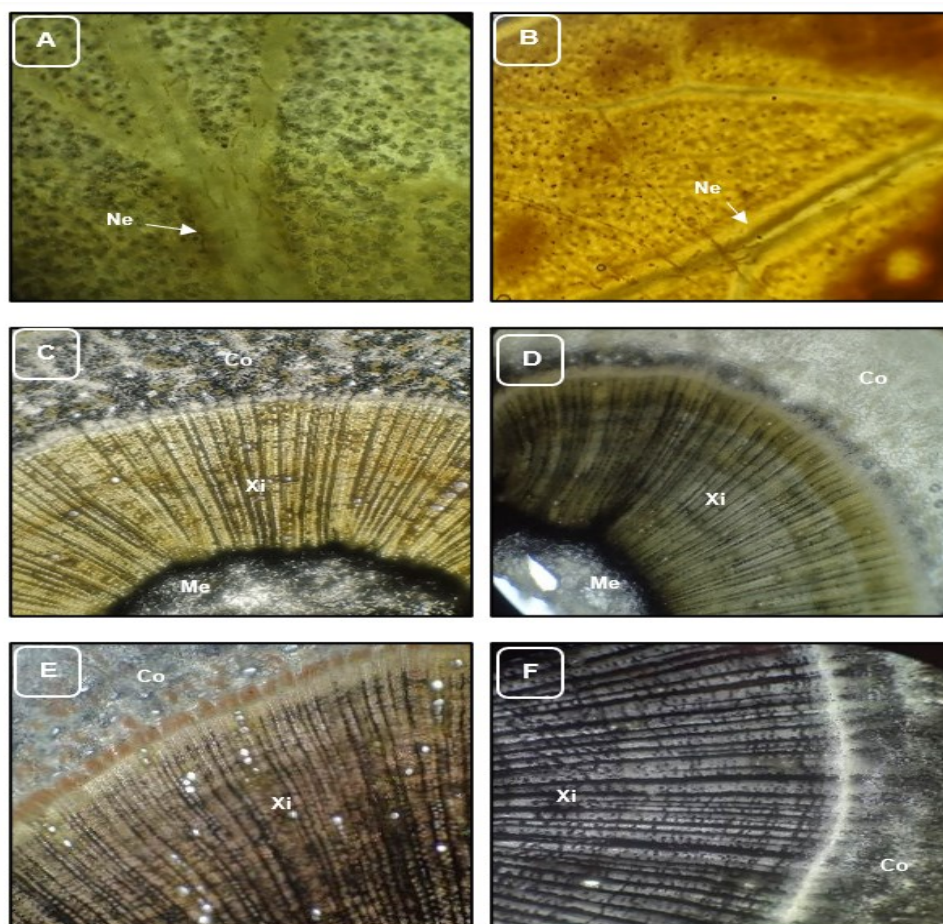


Figura 2. Vista superficial de las hojas (A-B), cortes transversales del tallo (C-D) y raíz (E-F) de *J. dioica*, provenientes de diferentes condiciones climáticas de lluvia (A, C, E) y sequía (B, D, F). Los alcaloides se tiñen de color naranja, café a negro con el reactivo de Wagner. Aumento a 4 X y 10X. Co: córtex, Me: médula, Ne: nervadura, Xi: xilema.

De acuerdo con Bhambhani y col. (2021), los alcaloides sintetizados se almacenan en compartimentos celulares específicos y, al detectar diferentes señales de estrés del entorno se liberan de los orgánulos almacenados/glándulas específicas y se exportan a los tejidos diana. Se acumulan comúnmente en las partes aéreas de la planta, como las hojas o tallos, pero también se pueden encontrar en cantidades variables en las raíces. La cantidad almacenada en los tejidos subterráneos puede aumentar según la presencia de insectos que se alimentan de las propias raíces (Patchett y col., 2008).

CONCLUSIONES

Las plantas *J. dioica* provenientes de la lluvia presentaron un ICC mayor (5.97 ± 0.62) en comparación de las provenientes de la sequía. Mientras que estas últimas destacaron por presentar mayor CRA (96.53 ± 0.17). En cuanto al contenido de alcaloides las plantas de ambas temporadas destacaron por presentar una gran acumulación de alcaloides distribuidos por todos los tejidos de hojas, tallo y raíz.

BIBLIOGRAFÍA

1. E. Acevedo, "Resistance to abiotic stresses. in plant breeding: principles and prospect" London: Chapman & Hall, 2003, 406-418.
2. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, "Sangre de drago o sangre grado", Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&d=7483>. 2009, Accesado: 07/10/2021
3. S. Bhambhani, K.R. Kondhare, and A.P. Giri, "Diversity in chemical structures and biological properties of plant alkaloids" *Molecules*, Vol. 26, 2021, 1-29. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26113374>
4. L. Córdoba-Téllez, E. Bautista-Ramírez, A. Zamarripa-Colmenero, J.A. Rivera-Lorca, A. Pérez-Vázquez, O.M. Sánchez-Sánchez, J. Martínez-Herrera, y J.A. Cuevas-Sánchez, "Diagnóstico y Plan Estratégico de la Red *Jatropha* spp. en México", 1ra edición. SNICS, SINAREFI, México, 2015, 116 pp.
5. R. Elumalai, R. Selvaraj, and A.L.A. Chidambaram, "Biosystematical studies in some taxa of *Jatropha* Linn", *Int. J. Curr. Sci*, Vol. 6, 2013, 63-69.
6. K. Indrajeet, and K.S. Rajesh, "Production of Secondary Metabolites in Plants under Abiotic Stress: An Overview", *Significances Bioeng Biosci*. Vol. 2(4), 2018, 196-200. DOI: 10.31031/SBB.2018.02.000545
7. P. Kramer, "Relaciones hídricas de suelos y plantas" Edutex S.A. México, 1974, 538 pp.
8. G. I. Manzanero-Medina, A. Flores-Martínez, E. Sandoval-Zapotitla, y R. Bye-Boettler, "Etnobotánica de siete raíces medicinales en el mercado de Sonora de la Ciudad de México" *Polibotanica*, Vol. 27, 2009, 191-228.
9. R. Mathobo, D. Marais, J. and Martin, "The effect of drought stress on yield, leaf gaseous exchange and chlorophyll fluorescence of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.)" *Agricultural Water Management*, Vol. 180, 2017, 118-125.
10. B. Merlaen, E. De Kesyer, L. Ding, O. Leroux, O., F. Chaumont, and M.C. Van Labeke, "Physiological responses and aquaporin expression upon drought and osmotic stress in a conservative vs prodigal *Fragaria x Ananassa* Cultivar", *Plant Physiology and Biochemistry*, Vol. 145, 2019, 95-106.
11. L.J. Moreno, "Respuesta de plantas *in vitro* de banano cv. 'Grande naine'(Musa AAA) transformadas con el gen de osmotina ap24 al estrés hídrico", Tesis de Doctorado, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, 2015, 100 pp.
12. A. Novia, A.P. Yekt, and H.N. Laurentius, "Antioxidant activity and histochemical analysis of *Acalypha indica* L. and *Acalypha wilkesiana* Muell. Arg. Vegetative and generative organs", *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, Vol. 8(10), 2016, 1657-1662.
13. G.O. Okunlola, O.A. Olatunji, R.O. Akinwale, A. Tariq, and A.A. Adelusi, "Physiological response of the three most cultivated Pepper species (*Capsicum* spp.) in Africa to drought stress imposed at three stages of growth and development", *Scientia Horticulturae*, Vol. 224, 2017, 198-205.
14. B.J. Patchett, R.B. Chapman, L.R. Fletcher, and S.R. Gooneratne, "Root loline concentration in endophyte-infected meadow fescue (*Festuca pratensis*) is increased by grass grub (*Costelytra zealandica*) attack", *New Zeal. Plant Prot*, Vol 61, 2008, 210-214.
15. J.U. Pérez-Pérez, B. Reyes-Trejo, D. Guerra-Ramírez, y J.A. Cuevas-Sánchez, "Aceite de semilla de *Jatropha dioica* Seseé como fuente potencial de biodiesel", *Revista Bio Ciencias*, Vol. 7, 2020, 1-13. DOI: <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e728>
16. M. Prelania, N. Yougasphree, and N. Gonasageran, "Micromorphology, histochemistry and ultrastructure of the foliar trichomes of *Withania somnifera* (L.) Dunal (Solanaceae)", *Plants*, Vol. 242, 2015, 1107-1122.
17. J. Rzedowski, y G. Calderón de Rzedowski, "Flora fanerogámica del Valle de México" CONABIO, Instituto de Ecología A. C. Centro Regional del Bajío, 2da edición, Michoacán, México, 2001, 1406 pp.

18. H. Sapeta, J.M. Costa, T. Lourenc, J. Maroco, P. van der Lindee, and M.M. Oliveiraa, "Drought stress response in *Jatropha curcas*: Growth and physiology", *Environmental and Experimental Botany*, Vol. 85, 2013, 76-84.
19. T.L. Sausen, and L.M. Gonçalves-Rosa, "Growth and carbon assimilation limitations in *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) under soil water stress conditions", *Acta Bot. Bras*, Vol. 24(3), 2010, 648-654.
20. B. Seckin, and M. Aksoy, "Drought tolerance of knotgrass (*Polygonum maritimum* L.) leaves under different drought treatments" *Pak. J. Bot*, Vol. 46 (2), 2014, 417-421.
21. Y. Silva-Belmares, C. Rivas-Morales, E. Viveros-Valdez, M.G. De la Cruz-Galicia, and P. Carranza-Rosales, "Antimicrobial and cytotoxic activities from *Jatropha dioica* roots", *Pakistan Journal of Biological Sciences*, Vol. 17(5), 2014, 748-750. DOI: <https://doi.org/10.3923/pjbs.2014.748.750>
22. P. Souza-de Oliveira, L. Dias-da Silva, T. Araújo-de Santana, B. Galvêas-Laviola, A. Queiroz-Paiva, M. Schramm-Mielke, and F. Pinto-Gomes, "Morphophysiological changes in young plants of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) subjected to water stress and recovery", *Afr. J. Agric. Res*, Vol. 11(45), 2016, 4692-4703.
23. K.K. Verma, M. Singh, R.K. Gupta, and C.L. Verma, "Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence, antioxidant enzymes and growth responses of *Jatropha curcas* L. during soil flooding", *Turk J Bot*, Vol. 38, 2014, 130-140.
24. K. Vongcharoen, S. Santanoo, P. Banterng, S. Jogloy, N. Vorasoot, and P. Theerakulpisut, "Diurnal and seasonal variations in the photosynthetic performance and chlorophyll fluorescence of cassava 'Rayong 9' under irrigated and rainfed conditions", *Photosynthetica*, Vol. 57, 2019, 268-285.
25. A. Wahid, S. Gelani, M. Ashraf, M.R. Foolad, "Heat tolerance in plants: An overview", *Environm. Exp. Botany*, Vol. 61(3), 2007, 199-223. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.05.011>

IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO SELECTIVO PARA HIERRO TRIVALENTE A TRAVÉS DE UN QUIMIOSENSOR FLUORESCENTE A BASE DE RODAMINA B

Aguilar-Medrano Berenice, Silva-Díaz Luna Gabriela, Morales-Murueta María Fernanda, Olalde-García Paulina, Núñez-Vilchis Alejandro

Laboratorio de Instrumentación Analítica, Parque Biotecnológico UAQ, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas S/N Querétaro, Qro. C. P. 76010
baguilar31@alumnos.uaq.mx

RESUMEN

Los sensores fluorescentes han mostrado una nueva perspectiva para los métodos de cuantificación de iones metálicos, no sólo por sus propiedades altamente selectivas, sino también porque son un método más accesible, tienen un funcionamiento más sencillo y presentan una respuesta más rápida en comparación con otros métodos de cuantificación¹. El monómero funcionalizado con rodamina (RBNCH) es un monómero capaz de emitir fluorescencia al entrar en contacto con el Fe^{3+} , por lo que puede considerarse como un quimiosensor selectivo del ion en determinadas matrices². El objetivo del estudio fue implementar el método en una disolución de acetonitrilo/agua (9:1 v/v) y validar los parámetros analíticos: límite de cuantificación (LoQ), especificidad, en presencia del ion bivalente, y repetibilidad de acuerdo a la guía de la Eurachem³. Se obtuvo un LoQ de 20 μM , valor mayor al reportado para otros quimiosensores luminiscentes⁴. Respecto a la especificidad, se encontró que RBNCH presenta mayor afinidad al Fe^{3+} en matrices con concentraciones superiores de Fe^{2+} , posiblemente debido a la alta densidad de carga del catión trivalente que reacciona con bases “duras” presentes en el sitio de coordinación. Finalmente, el análisis de varianza ($\alpha=0.05$) indicó que el método es repetible dando $p=0.14$, entre las réplicas ($N=10$). La validación e implementación de este método cuantitativo se presenta como una alternativa viable y práctica para el análisis de este ion, empleando un quimiosensor de elaboración sencilla. Es importante evaluar la aplicación en matrices biológicas donde ambos iones están presentes.

INTRODUCCIÓN

El hierro es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre, representando el 5% de la misma y el 70% en el núcleo de la tierra. Los estados de oxidación más comunes de los iones de este compuesto son el Fe^{2+} y el Fe^{3+} . Ambos iones metálicos presentan propiedades y juegan papeles distintos en diversos ámbitos. En el cuerpo humano, están presentes 40-50 mg de hierro por kg de peso corporal, en donde el 50% se encuentra como hemoglobina y el 25% como reserva hepática [5]. En la sangre, el ion Fe^{2+} se encarga del transporte y almacenamiento del oxígeno [6].

Los métodos actualmente empleados para la cuantificación de iones metálicos son: electrodos de ion selectivo (ISE), espectrofotometría UV-Vis y la espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplada por inducción (ICP-AES) [7,1]. Una de las desventajas de los métodos es que no permiten establecer la especiación entre los iones férrico (Fe^{3+}) y ferroso (Fe^{2+}) y aquellos que logran hacerlo son caros [6].

Se han implementado unas técnicas con el objetivo de desarrollar métodos más sencillos y prácticos para la cuantificación de estos. El uso de quimiosensores funcionalizados con ciertos fluoróforos se presenta con una alternativa factible para la resolución de este problema, pues muchos de ellos permiten identificar y cuantificar selectivamente a estos metales. La rodamina B ha atraído la atención este campo, pues es un fluoróforo que presenta excelentes propiedades fotofísicas, altos coeficientes de excitación y excelente fotoestabilidad, además de económico y accesible [8]. Las ventajas que estos quimiosensores presentan son excepcionales, pues por regular generan una respuesta más rápida, muestran una alta selectividad hacia iones metálicos, son considerados procesos con una operación más simple y reducen significativamente costos al compararlos con otros métodos [7,1].

Como se menciona, la estrategia principal que suele utilizarse en el diseño de quimiosensores es encontrar un compuesto que logre actuar como un buen fluoróforo, normalmente el fluoróforo por excelencia es la rodamina y sus derivados. Ésta basa su respuesta fluorescente en el mecanismo de cambio de forma del cierre y la apertura del anillo de espirolactama, entendiendo que cuando se da la apertura del anillo se observa el fenómeno de fluorescencia [9].

En el caso del monómero funcionalizado con rodamina B (RBCNH) [2], el mecanismo de la apertura del anillo de espirolactama es viable, debido a que cuando el monómero RBNCH se encuentra en presencia del ion Fe^{3+} el grupo carbonilo es activado, lo que conduce a que el doble enlace entre el C y el O se rompa y los electrones π pasen a formar un doble enlace con el N presente en el anillo de espirolactama, dicho proceso descrito con anterioridad, aunado a la coordinación entre el O del grupo carbonilo del anillo de espirolactama, el N de la amina adyacente y el Fe^{3+} son factores que propician la apertura del anillo de espirolactama. Se deduce que el Fe^{3+} encuentra su sitio de coordinación entre el O del carbonilo y el N de la amina adyacente debido a que el Fe^{3+} funciona como un ácido de Lewis [7].

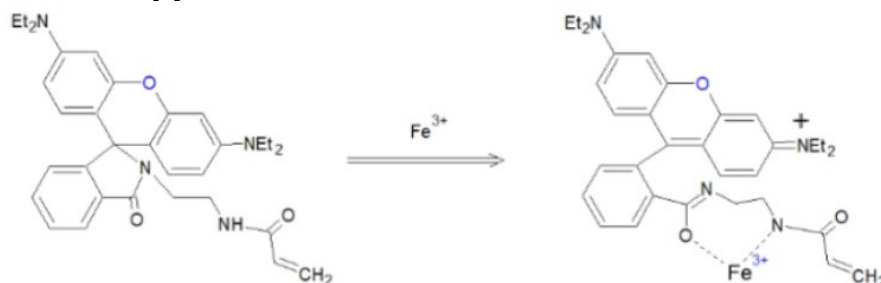


Figura 1. Apertura del anillo de espirolactama en el monómero RBNCH, en presencia de Fe^{3+} .

Para este quimiosensor ya han sido estudiados algunos de los parámetros necesarios para la validación del mismo: como el límite de detección; con un valor de 27 nM, la linealidad; con un rango de 100 a 200 μM y la selectividad que posee frente a otros 12 metales: Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^{1+} , Zn^{+2} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , K^{1+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+} y Pr^{3+} [2]. Sin embargo, aún no se ha reportado la aplicación ni validación de los métodos desarrollados para iones de hierro.

En el presente estudio, se planteó la determinación de los parámetros antes mencionados: límite de cuantificación, especificidad y repetibilidad con el propósito de poder validar parcialmente al método y establecer que los resultados que se obtienen son confiables.

PARTE EXPERIMENTAL

Se sintetizó el monómero RBNCH siguiendo la metodología de Jiang *et al.* (2023). Las disoluciones de Fe^{3+} se prepararon a partir de un estándar 1000 $\mu\text{g/mL}$ marca High purity standards™ y las de Fe^{2+} a partir de un estándar de 100 mg/L marca Hach®. Todas las disoluciones se prepararon en agua desionizada.

Igualmente, la metodología se realizó siguiendo la guía: La adecuación al uso de los métodos analíticos, una guía de laboratorio para validación de métodos y temas relacionados, publicada por Eurachem [3].

Curva de calibración

Tomando en cuenta el rango lineal reportado por Jiang *et al.* (2023), se prepararon disoluciones con concentraciones de 100, 115, 130, 145, 160, 175, y 190 μM . Por triplicado, cada punto de la curva fue tratado y analizado como se indica a continuación: se preparó una disolución stock de 500 μM del monómero RBNCH disuelta en acetonitrilo (CH_3CN) y una disolución mixta de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (9:1, v/v), seguido a esto se colocaron 500 μL de disolución del monómero con 50 μL de cada disolución de Fe^{3+} antes mencionada y se aforó hasta 5 ml con una disolución de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (9:1 v/v). Se agitó durante 90 minutos y se midió la intensidad de emisión en el espectrofotómetro de fluorescencia

(Perkin Elmer, mód. LS-45), el máximo de emisión fluorescente se encuentra en λ_{em} 586 nm (λ_{ex} 308 nm).

Límite de cuantificación (LoQ).

Se realizaron mediciones de 10 réplicas blancos independientes preparados como se menciona en la elaboración de la curva de calibración. Para el cálculo del LoQ se utilizó la intensidad de emisión promedio y la desviación estándar S_0 . A partir de S_0 , con la siguiente fórmula: $S'_0 = S_0 n$ y $LOQ = kQS'_0$ se calculó el límite de cuantificación, donde k_Q representa el factor utilizado para el límite de cuantificación que por defecto tiene un valor de 10, según la IUPAC.

Especificación

Se prepararon las disoluciones de ensayo de la misma forma que los blancos de la sección anterior, añadiendo 50 μ L de disoluciones de Fe^{3+} con concentraciones de 100, 150 y 190 μ M previo al aforo y a la incubación por agitación. La medición de la intensidad de emisión se realizó por triplicado. Se realizó el mismo procedimiento pero en este caso utilizando soluciones de Fe^{2+} .

De igual forma, se preparó y analizó por triplicado una disolución que contenía 50 μ L de Fe^{3+} y 50 μ L de Fe^{2+} a 100 y 190 μ M, respectivamente; esto con la finalidad de observar la interferencia del ion bivalente.

Se calcularon las concentraciones de cada disolución con la curva de calibración del punto anterior.

Repetibilidad

Para la estimación de la repetibilidad, se emplearon 10 réplicas de disoluciones que contenían 50 μ L de Fe^{3+} y 50 μ L de Fe^{2+} a 100 y 190 μ M, respectivamente, como las mencionadas en el punto anterior. Las mediciones de cada réplica se elaboraron por triplicado y se realizó ANOVA de un factor a los resultados obtenidos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Límite de cuantificación

Tabla 1. Determinación del límite de cuantificación de Fe^{+3} , mediante el monómero RBNCH.

Concentración promedio (μ M)	
46.887	52.456
46.431	57.486
56.578	64.566
60.909	45.744
54.270	56.116

Tabla 2. Valores de desviación estándar de las muestras blanco (S_0), desviación estándar para el cálculo del límite de cuantificación y resultados del cálculo del límite de cuantificación.

S_0	S'_0	LOQ (μ M)
6.332	2.002	20.026
3.2	2	26

El valor correspondiente al LOQ del método de cuantificación planteado fue de 20.026 μ M. Valor que en comparación con límites de cuantificación de otros quimiosensores fluorescentes como el quimiosensor fluorescente a iones de Fe^{3+} basado en dímeros de ftalonitrilo, cuyo LOQ es de 9.85 μ M [4] resultado ser dos menor mayor que este.

Especiación

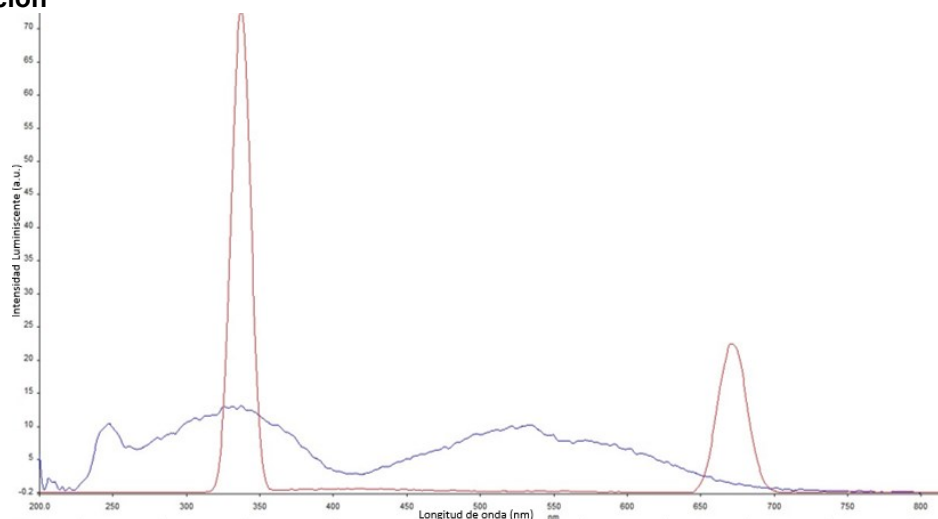


Figura 2. Espectro de luminiscencia (Scan completo) solución del monómero RBNCH (500 μ M) y solución $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 9:1. Azul espectro de excitación y rojo espectro de emisión. La longitud de onda a la cual se realiza la cuantificación y detección de fluorescente es a 586 nm, en el espectro de emisión. Para este caso, no se aprecia un incremento en dicha región.

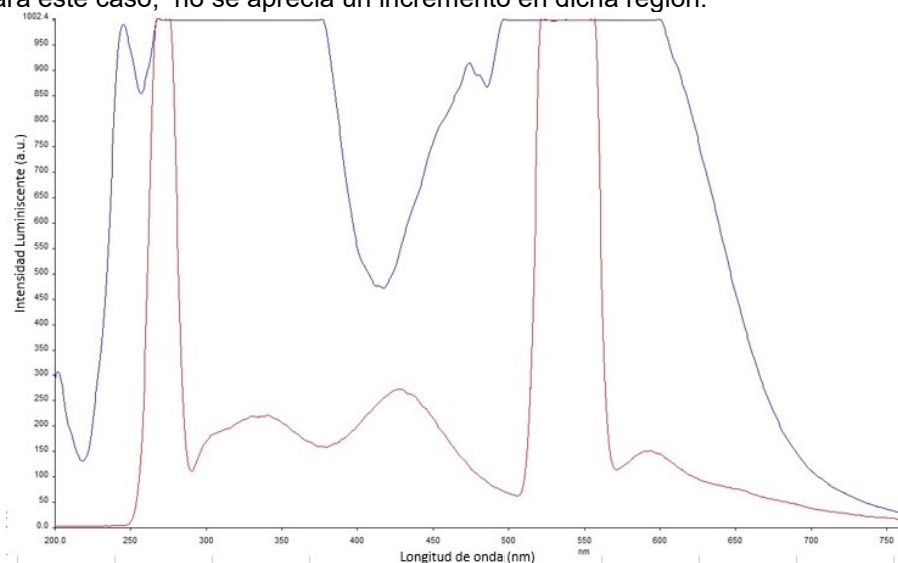


Figura 3. Espectro de luminiscencia (Scan completo) solución del monómero RBNCH (500 μ M) y Fe^{3+} (190 μ M), aforada en solución $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 9:1. Azul espectro de excitación y rojo espectro de emisión. La longitud de onda a la cual se realiza la cuantificación y detección de fluorescente es a 586 nm, en el espectro de emisión. Para este caso, sí se aprecia un incremento en dicha región.

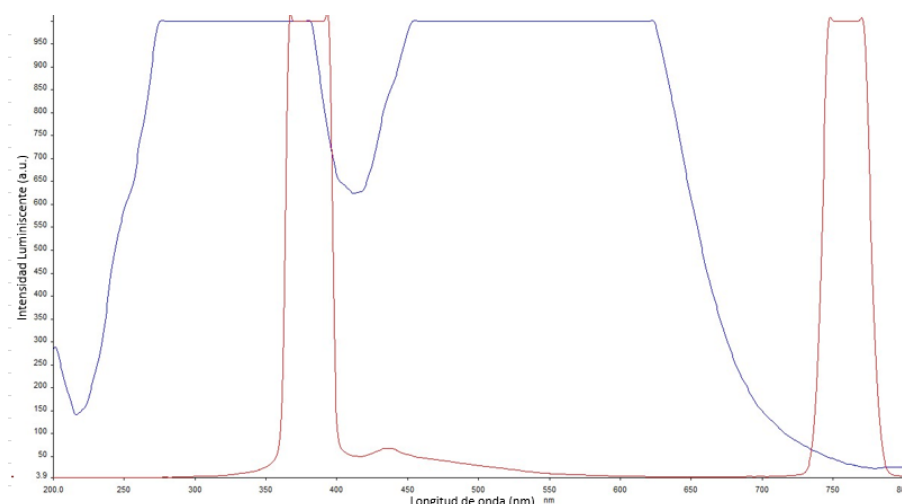


Figura 4. Espectro de luminiscencia (Scan completo) solución del monómero RBNCH (500 μM) y Fe^{2+} (190 μM), aforada en solución $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 9:1. Azul espectro de excitación y rojo espectro de emisión. La longitud de onda a la cual se realiza la cuantificación y detección de fluorescente es a 586 nm, en el espectro de emisión. Para este caso, no se aprecia un incremento significativamente en dicha región.

Tabla 3. Respuesta luminiscente (a.u.) de la disolución de monómero RBNCH en presencia de distintas concentraciones de Fe^{3+} y Fe^{2+} .

Concentraci ón	A.u. Fe^{3+}	A.u. Fe^{2+}
100 μM	74.23 4	16.92 7
150 μM	116.4 40	19.83 2
190 μM	153.6 78	22.29 3

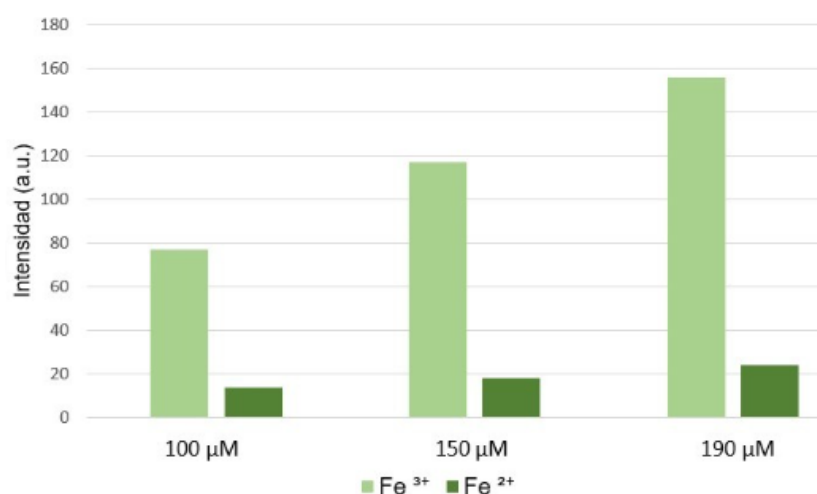


Figura 5. Gráfico comparativo entre la intensidad luminiscente (a.u.) registrada para el Fe^{2+} y Fe^{3+} , a la misma concentración. Barra morada Fe^{3+} y barra verde Fe^{2+} .

Tabla 4. Respuesta luminiscente (a.u.) de la disolución de monómero RBNCH en presencia de una mezcla de iones Fe^{2+} y Fe^{3+} .

Concentración Fe^{3+} (μM)	Concentración Fe^{2+} (μM)	Intensidad (a.u.)
100	190	88.517

Para nuevas tecnologías, al implementar el uso de técnicas selectivas como la descrita, le es indispensable desarrollar estrategias efectivas que hagan posible esta tarea. La rodamina ha sido una molécula muy empleada para el desarrollo de quimiosensores para diversos iones metálicos, como ya se mencionó anteriormente. Sin embargo, la manera en la que estos quimiosensores actúan es creando sitios de coordinación específicos para poder quelar o acomplejar solo a una clase de iones. La cadena adyacente unida a la rodamina es indispensable para poder formar dicho sitio, dependiendo de los átomos que la conforman y la naturaleza de los mismos. Se ha establecido que aquellos ácidos de Lewis con una alta densidad de carga, como el Fe^{+3} , reaccionan efectivamente con bases “duras”, como los átomos de Oxígeno. Por otro lado, ácidos con menores densidades de cargas, como el Fe^{+2} , reaccionan y forman complejos más estables con bases menos duras [10].

Para este caso, el sitio de coordinación para el ion metálico se forma entre un átomo de Oxígeno que proviene de la estructura de la rodamina y un átomo de Nitrógeno, perteneciente a la cadena adyacente. De acuerdo a la experimentación realizada, se determinó que el monómero RBNCH forma complejos selectivamente con iones férricos, pues la intensidad fluorescente producida por la apertura del anillo espirolactama aumenta significativamente cuando se mantienen en contacto con este ion, a diferencia del ion ferroso.

Resultados similares se han encontrado en otras investigaciones donde se han analizado distintas cadenas adyacentes unidas a diferentes átomos donadores de electrones y se ha concluido que aquellas unidas a cadenas con Nitrógeno forman selectivamente complejos con el ion Fe^{+3} . Además establecen que la presencia de Nitrógeno en la molécula funciona como un amortiguador, para evitar que cambios en el pH alteren la intensidad reportada y puedan existir interferencias en las mediciones [4].

Repetibilidad

Tabla 5. Tabla de ANOVA de un factor, realizado con los datos obtenidos en la experimentación.

	Intensidad 1 (a.u)	Concentrac ión 1 (μM)	Intensid ad 2 (a.u)	Concentración 2 (μM)	Intensida d 3 (a.u)	Concentraci ón 3 (μM)
Réplica 1	83.484	113.437	72.345	100.680	109.276	142.974
Réplica 2	87.616	118.169	76.963	105.969	93.405	124.798
Réplica 3	96.497	128.339	81.353	110.996	96.291	128.104
Réplica 4	94.483	126.033	80.542	110.068	99.246	131.488
Réplica 5	99.252	131.495	105.235	138.346	111.469	145.486
Réplica 6	77.065	106.086	87.384	117.903	67.766	97.727

Réplica 7	82.923	112.794	120.467	155.790	92.355	123.596
Réplica 8	94.864	126.469	98.34	130.450	88.431	119.102
Réplica 9	75.667	104.485	86.084	116.414	79.872	109.300
Réplica 10	102.341	135.032	91.345	122.439	97.248	129.199
F	1.7404566					
	7					
Probabilidad de F	0.1446650					
	4					

Tabla con resultados obtenidos para la repetibilidad del método de cuantificación de Fe^{3+} , evaluados con el estudio estadístico ANOVA de un solo factor, en donde se obtiene una probabilidad para F de 0.144 para las réplicas realizadas.

Respecto a la repetibilidad del método, el valor obtenido para la probabilidad de F fue de 0.1446, lo que es mayor de 0.05, en un intervalo de confianza al 95%. Esto significa que no hay evidencia suficiente que implique que pueda haber una variación significativa entre las medias de las réplicas realizadas.

CONCLUSIONES

Se estimó el límite de cuantificación del monómero RBNCH, cuyo valor obtenido fue de 20.026 μM , que comparado con otros quimiosensores similares resultó superior.

Se determinó que el monómero RBNCH si posee selectividad por el ión Fe^{3+} pese a que aún en matrices donde se encuentra presente el ión Fe^{2+} la especiación permanece constante durante la realización de varias réplicas, se estima que es debido a la alta densidad de carga del Fe^{+3} que reacciona efectivamente con bases “duras”, como los átomos de oxígeno, presentes en el sitio de coordinación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ming, X.; Jiang-Tao, L.; Gang, C.; Yin-Yun, C.; Dan, L.; Li-Le, W. A Series of Photosensitizers for Fe^{3+} in Aqueous Solution and Cells with Colorimetric and Fluorescent Channels: Synthesis and Performance. *Front. Chem.* 2020, 10.
2. Jiang D, Zheng M, Ma X, Zhang Y, Jiang S, Li J, Zhang C, Liu K, Li L. Rhodamine-anchored polyacrylamide hydrogel for fluorescent naked-eye sensing of Fe^{3+} . *Molecules* 2023; 28(18): 6572
3. Barwick V, Morillas-Bravo P, Stephen L, Engman J, Elin L, Eurofins L, Magnusson B, Müller-Mersin T, Patriarca M, Pohl B, Robouch P, Sibbesen L, Theodorsson E, Vanstapel F, Leuven, Vercruysse I, Yilmaz A, Ömeroglu P, Örnemark U. La adecuación al uso de los métodos analíticos una guía de laboratorio para validación de métodos y temas relacionados. *Eurachem* 2014; 1:19-39
4. Al-Raqa, S.; Öoğlu, I.; Erbahar, D.; Durmuş, M. A novel selective fluorescent chemosensor for Fe^{3+} ions based on phthalonitrile dimer: synthesis, analysis, and theoretical studies. *Turk. J. Chem.* 2020, 44, 1254-1264.

5. Bastida, S.; Toxqui, L.; De Piero, V.; Sánchez, M.; Vaquero, E. Deficiencia y sobrecarga de hierro; implicaciones en el estado oxidativo y la salud cardiovascular. *NH* 2010, 25, 350-365. <https://doi.org/10.3390/s20123470>
6. Fernández, Y.; Asín, L.; Beola, L.; Moros, M.; de la Fuente, J.; Fratila, R.; Grazú, V.; Gutiérrez, L.; Iron speciation in animal tissues using AC magnetic susceptibility measurements: quantification of magnetic nanoparticles, ferritin, and other iron-containing species. *ACS ABM* 2022, 5, 1879–1889. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsabm.1c01200>
7. Tapendu, S.; Narayan, D.; Jyotirlata, S.; Raja, S. Unusual red-orange emission from rhodamine-derived polynorbornene for selective binding to Fe³⁺ ions in an aqueous environment. *RSC*, 2020, 33, 4159-4165.
8. Kim H N, Hee Le M, Jung Kim H, Seung Kim J, Yoon J. A new trend in rhodamine-based chemosensors: application of spirolactam ring-opening to sensing ions. *Chemical Society Reviews* 2008; 37:1453–1744
9. Zuo, L.; Cai, W.; Jia, Y.; Hong, G.; Yu, T.; Xu, T.; Min, J. A highly selective colorimetric chemosensor for detecting the respective amounts of iron (II) and iron (III) ions in water. *NJC*. 2007.
10. Zu-D, L.; Hider, R. Design of iron chelators with therapeutic application. *Coord*, 2002, 232, 151-171.

ANÁLISIS SOBRE LA PRESENCIA DE *GLAUCOMYS VOLANS* EN LAS ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS EN MÉXICO

Bárbara Vargas-Miranda¹, Claudia Ballesteros-Barrera¹, Rocío Zárate-Hernández¹, Angélica Martínez-Bernal¹, Salvador Gaona Ramírez¹, Víctor Manuel Ramírez-Ramos², Selene Ortiz Burgos³

¹ División de Ciencias Biológicas y de la Salud. ² Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. C.P. 09340, San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, D.F. México, ³Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México. Batalla 5 de mayo S/N, Col. Ejército de Oriente, CP 09230. México, D.F.
bvm@xanum.uam.mx

RESUMEN

La ardilla voladora *Glaucomys volans* (Rodentia:Sciuridae) presenta una distribución desde el sur de los Estados Unidos hasta Honduras. Sus poblaciones se encuentran dispersas y estrechamente relacionadas a los bosques templados densos, los cuales disminuyen considerablemente en el país. En México se encuentra en categoría amenazada (A) por la NOM-059-2010 y categorizada como de menor riesgo (LC) en la IUCN. Una manera de conservar a la especie sería que las poblaciones se encuentren en Áreas Naturales Protegidas (ANP), que son aquellos espacios geográficos cuya finalidad es la conservación de la biodiversidad y la representatividad de sus ecosistemas. En México existen diversos tipos de áreas protegidas: federales, estatales, municipales, comunitarias, ejidales y privadas. Todas ellas tienen como función la conservación de la naturaleza son servicios ecosistémicos asociados y valores culturales. Las ANP están bajo la administración de la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP). De acuerdo con lo anterior, el objetivo de este trabajo fue analizar la distribución de esta especie en México y conocer en que ANP federales y estatales se encuentra. Para ello se obtuvieron registros de colecta en línea (SNIB y GBIF), de diferentes colecciones científicas y de literatura especializada. Dichas bases de datos fueron depuradas, eliminando datos duplicados, datos sin localidad y sin coordenadas. Posteriormente se realizó un análisis de la información con la intención de conocer las localidades de colecta en México y los registros en ANP federales y estatales. Los resultados mostraron que hay un total de 885 registros, de los cuales 331 son localidades únicas. Con respecto a la distribución de *Glaucomys volans*, 57 registros se encuentran en 9 ANP federales, siendo la Reserva de la Biósfera “Sierra Gorda” en el estado de Guanajuato, con mayor número de registros (35), seguido por “Cofre de Perote o Nauhcamtépetl” en el estado de Veracruz (8), y la “Z.P.F.T.C.C. de los Ríos Valle APRN” en el Estado de México (6). En cuanto a las ANP estatales, 11 de estas mostró 131 registros. El ANP “Chapa de Mota” en el Edo. Méx. contó con 72 registros, la Reserva de la Biósfera “El Cielo” en Tamaulipas (25) y el “Santuario del agua y forestal subcuena Tributaria Arroyo Sila” en el Edo. Méx. (15). Considerando que las ANP tienen como función proteger aquellas especies vulnerables, debido a que están perdiendo su hábitat, como en el caso de *Glaucomys volans*, es importante crear más espacios de conservación, así como incrementar el monitoreo de esta especie en las ANP.

INTRODUCCIÓN

La ardilla voladora *Glaucomys volans* (Figura 1) pertenece al Orden Rodentia, a la Familia Sciuridae y la Subfamilia Sciurinae (Hall, 1981). Esta ardilla es pequeña, de hábitos arbóreos, cuya característica particular es que cuenta con dos pliegues de piel entre las extremidades anteriores y las patas, llamada patagio. Esta membrana le permite planear y poderse desplazar entre los árboles hasta distancias largas de 90 metros (Ceballos y Miranda, 1985; Dolan y Carter, 1977), por lo que se le atribuye su nombre de “ardilla voladora” (Ceballos, 2014). Sus poblaciones se encuentran dispersas y estrechamente relacionadas con vegetación de pino y encinos, bosques de pino o solo de encino, y bosques templados densos, los cuales disminuyen considerablemente en el país, y por ende también las poblaciones de esta especie.

Presenta una distribución desde el sur de los Estados Unidos hasta Honduras, en México está muy fragmentada o aisladas sus poblaciones, como en bosques de las montañas de la Sierra Madre Oriental, Eje Volcánico Transversal y Sierra Madre del Sur (Ceballos y Galindo, 1983; Ceballos, 2014).

En México se encuentra en categoría amenazada (A) por la NOM-059-2010 (SEMARNAT, 2010) y categorizada como de menor riesgo (LC) en la IUCN (IUCN, 2014).

Las Áreas Naturales Protegidas (ANP) son aquellos espacios geográficos cuya finalidad es la conservación de la biodiversidad, mantener la flora y fauna silvestre, el paisaje natural y los procesos biogeoquímicos que se encuentran en ese ecosistema, además proporcionan oportunidades de recreación, educación y sitios de investigación científica (CONABIO, 2015).

En México las Áreas Naturales Protegidas (ANP), están bajo la administración de la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP). Que tienen como finalidad conservar la biodiversidad de las especies, así como conservar las poblaciones que se encuentren en estas Áreas, pues son espacios geográficos cuya finalidad es la conservación de la biodiversidad y la representatividad de sus ecosistemas. En México existen diversos tipos de áreas protegidas: federales, estatales, municipales, comunitarias, ejidales y privadas. Todas ellas tienen como función la conservación de la naturaleza son servicios ecosistémicos asociados y valores culturales (CONABIO, 2015).

Considerando que *Glaucomys volans* es una ardilla con características morfológicas particulares que la hacen ser especial por su adaptación de planear entre los árboles, y que las ANP, son lugares en que las especies tienen mayores probabilidades de ser conservadas, por lo que este trabajo tiene como objetivo analizar la distribución de esta especie en México y conocer en que ANP federales y estatales se encuentra.

METODOLOGÍA

Se obtuvieron registros de bases de datos digitales publicas: 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/>).

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, también se compilaron las localidades en bibliografía (Hall, 1981; Ceballos, 2014; Ballesteros-Barrera *et al.*, 2016).

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 se creó un mapa de localidades de colecta. 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, 2023) y se cuantificaron los registros por estado y en ANP federales y estatales.

RESULTADOS

El análisis de las bases de datos mostró que hay un total de 885 registros, de los cuales 331 son localidades únicas. Los estados con mayor número de registros fue Oaxaca (94), Chiapas (75), Estado de México (43) y Tamaulipas (23) (Tabla 1). Se obtuvo un solo registro del trabajo de Sánchez-Cordero (2006), en el estado de Chihuahua, la localidad "Guachochi" en la Sierra Madre Occidental fue considerado para este análisis, respaldado por la publicación de Gardner y Ramírez-Pulido (2020) que menciona la subespecie *Glaucomys volans madrensis*, Goldman (1936) sin localidad específica en la Sierra Madre de Chihuahua, México. El ejemplar fue recibido en colección de mamíferos del Smithsonian Natural Museum of Natural History (NMNH) en marzo de 1926

catalogado con el número USNM 261694, colectado por A. L. Herrera. Diersing (1980) y Kerhoulas y Arbogast (2010) realizaron estudios de sistemática con muestras de este espécimen.

Existe un registro que no se contempló para el estudio final, debido a que la información de la localidad es insuficiente, corresponde a una piel de *Glaucomys volans goldmani* de la colección mastozoológica del American Museum of Natural History con el número de catálogo 145211, colectada por Thomas Baillie MacDougall en 1947, que cuenta con varias colectas de la especie en nuestro país, la información se obtiene desde la base de datos digital que proporciona la página web del museo <https://collections.nmnh.si.edu/search/>.

Tabla 1. Registros de *Glaucomys volans* para cada uno de los estados de México.

ESTADO	No. REGISTROS
Oaxaca	94
Chiapas	75
Edo. Méx.	43
Tamaulipas	23
Guerrero	17
Hidalgo	14
Querétaro	14
Veracruz	14
San Luis Potosí	13
Michoacán	12
Puebla	9
Chihuahua	1
Puebla	1

En México las Áreas Naturales Protegidas (ANP), están bajo la administración de la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP). Las ANP cuentan con un decreto presidencial, que tienen como finalidad conservar la biodiversidad de especies y aquellas que se encuentren en este espacio geográfico tendrán a considerar su conservación dentro de su biodiversidad y la representatividad de su ecosistema. Actualmente existen 226 ANP de carácter federal, de las cuales 82.7% cuentan con una superficie exclusivamente terrestre (CONANP, 2024). Las ANP federales tienen como función la de conservar la naturaleza con servicios ecosistémicos asociados y valores culturales.

La distribución de *Glaucomys volans* en ANP, 57 registros se encuentran en 9 ANP federales, siendo la Reserva de la Biósfera “Sierra Gorda” en el estado de Guanajuato, con mayor número de registros (35), seguido por “Cofre de Perote o Nahcamtépetl” en el estado de Veracruz (8), y la “Z.P.F.T.C.C. de los Ríos Valle APRN” en el Estado de México (6). Dos registros en dos ANP federales, respectivamente, corresponden al estado de Chiapas y cuatro, con un solo registro en cada ANP, se registran en las entidades de la Ciudad de México, Estado de México, Morelos, Hidalgo, SLP, Tamaulipas, Guanajuato y Querétaro (Tabla 2).

En cuanto a las ANP estatales, son aquellas establecidas por pueblos, comunidades y ejidos en terrenos de su propiedad destinadas a la conservación de la biodiversidad y restaurarla para que tenga un equilibrio ecológico, sin que se modifique el régimen de propiedad (Artículo 92 Bis 4, LAPDF) (CONANP, 2024). Este estudio mostró que los registros de *Glaucomys volans* están presentes en 11 ANP Estatales. El ANP “Chapa de Mota” en el Edo. Méx. contó con 72 registros (Figura 1), la Reserva de la Biósfera “El Cielo” en Tamaulipas (25) y el “Santuario del agua y forestal subcuenca Tributaria Arroyo Sila” en el Edo. Méx. (15) (Tabla 3).

Figura 1. *Glaucomys volans* en un troco de *Quercus* sp, en el Estado de México, Chapa de Mota (foto tomada por Bárbara Vargas-Miranda).

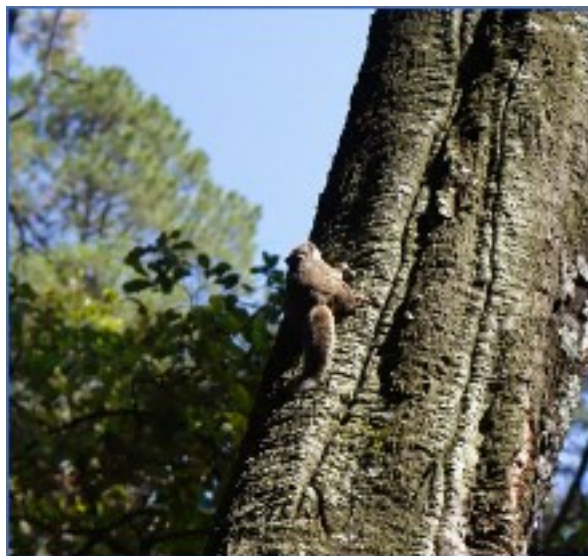
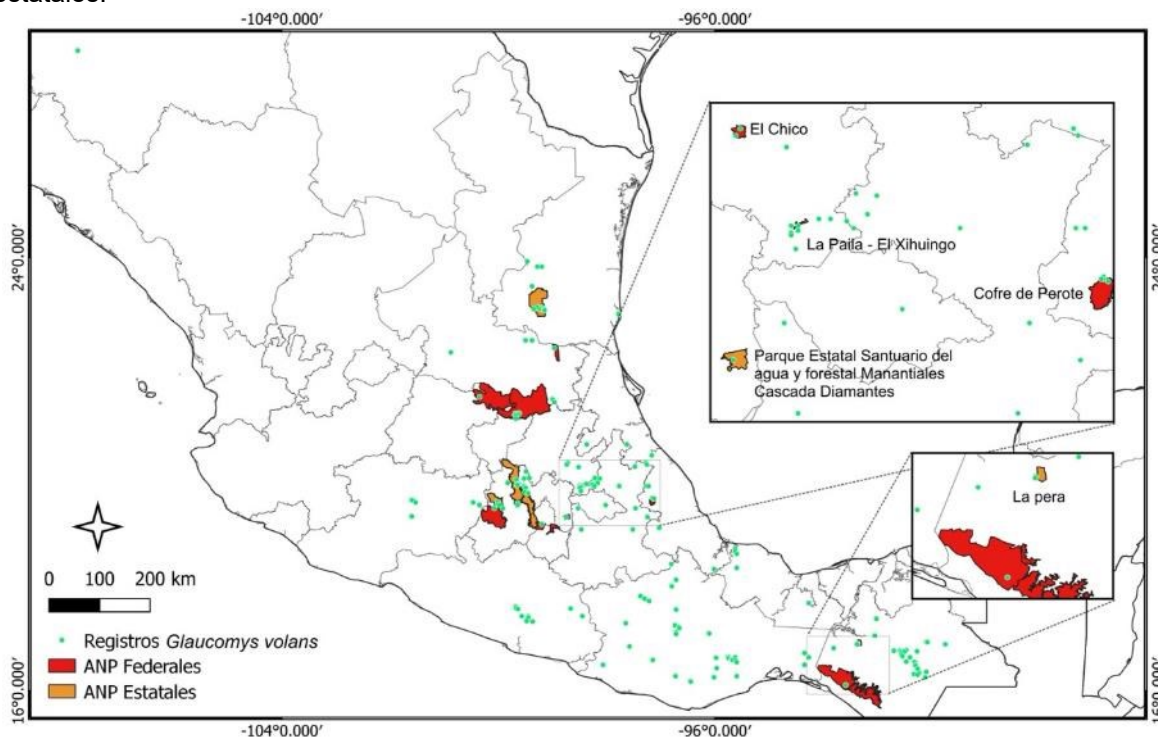


Figura 2. Mapa que muestra los registros obtenidos de *Glaucomys volans* y las ANP federales y estatales.



En el ANP Estatal “Chapa de Mota” es donde se tiene el mayor número de registros, con 72. En esta área se ha reportado que las poblaciones presentan una alta variabilidad genética (Ceballos *et al.*, 2010). El ANP “El Cielo”, una reserva reconocida de 1987 y que forma parte de la red “El Hombre y La Biosfera” por la Unesco y del Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas (SINAP), esta ANP cuenta con 27 registros. El “Santuario del agua y forestal Subcuenca Tributaria Arroyo Sila” en el Estado de México, con 15 registros.

Cuatro ANP Estatales solo presentaron un solo registro de esta especie (Tabla 3). Una de ellas es el “Corredor Biológico Chichinautzin” fue declarada ANP en 1988, con 65,901 ha esta en una parte de la Ciudad de México, el Estado de México y Morelos, cuenta con siete tipos de vegetación (Pulido-Esparza *et al.*, 2009). Un registro único en una ANP fue en “El Chico”, en la localidad a 1 km al este de la Hacienda el Tepozán, en el municipio de Almoloya al sur del estado (Ceballos y Galindo, 1983). Con base a los resultados obtenidos se propone incrementar los estudios de la “ardilla voladora” en las ANP s decretadas, pues no en todas se cuenta con estudios sobre la protección de esta especie en esos sitios. Es necesario realizar estudios ecológicos y biológicos, tales como la reproducción, alimentación, conductuales etc. Se debe considerar la gestión de corredores biológicos establecidos por la CONANP para que las ANP tengan una conectividad y potencial el flujo genético entre las poblaciones de *Glaucomys volans*.

CONCLUSIONES

Considerando que las Áreas Naturales Protegidas, tanto Federales y Estatales, tienen como función proteger aquellas especies vulnerables, debido a que están perdiendo su hábitat, como en el caso de la “ardilla voladora” *Glaucomys volans* en México, es por lo que es importante crear más espacios de conservación, así como incrementar el monitoreo de esta especie en las ANP.

Tabla 2. Registros en Áreas Naturales Protegidas Federales para *Glaucomys volans*; se resalta aquella ANP federal en que existe más registros.

No.	ANP Federales	Estado	No. registros
1	Sierra Gorda	Querétaro, Guanajuato, Hidalgo	35
2	Cofre de Perote o Nauhcampatépetl	Veracruz	8
3	Z.P.F.T.C.C. de los Ríos Valle de Bravo, Malacatepec, Tilostoc y Temascaltepec	Edo. Méx.	6
4	La Sepultura	Chiapas	2
5	Z.P.F. en los terrenos que se encuentran en los Mpios. de La Concordia, Ángel Albino Corzo, Villa Flores y Jiquipilas	Chiapas	2
6	Corredor Biológico Chichinautzin	CD.MEX, Edo. Méx., Morelos	1
7	El Chico	Hidalgo	1
8	Sierra del Abra Tanchipa	SLP, Tamaulipas	1
9	Sierra Gorda de Guanajuato	Guanajuato, Querétaro	1

Tabla 3. Registros en Áreas Naturales Protegidas Estatales para *Glaucomys volans*; se resalta aquella ANP estatales en que existe más registros.

No.	ANP Estatales	Estado	No. registros
1	Chapa de Mota	Edo. Méx.	72
2	El Cielo	Tamaulipas	27
3	Santuario del agua y forestal Subcuenca Tributaria Arroyo Sila	Edo. Méx.	15
4	Santuario del agua y forestal Presa Villa Victoria	Edo. Méx.	8
5	La Pera	Chiapas	3
6	Huitepec-Los Alcanfores	Chiapas	2
7	Parque Estatal Santuario del agua Sistema Hidrológico Presa Huapango	Edo. Méx.	2
8	La Paila - El Xihuingo	Hidalgo	1
9	Parque Estatal Santuario del agua y forestal Manantiales Cascada Diamantes	Edo. Méx.	1
10	Parque Otomí-Mexica	Edo. Méx.	1
11	Santuario del agua y forestal subcuenca Tributaria Presa Antonio Alzate	Edo. Méx.	1

BIBLIOGRAFÍA

1. L. Gardner, y J. Ramirez-Pulido, "Type localities of Mexican land mammals, with comments on taxonomy and nomenclature", edited by R. D. Bradley, Texas Tech University, Natural Science Research Laboratory, 2020.
2. 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.
3. CONABIO. "Áreas Naturales Protegidas Estatales, Municipales, Ejidales y Privadas de México 2015 (edición: 1) [Descripción del formato de representación geográfica: Shapefile", Formato vectorial compuesto por 8 archivos (dbf, prj, sbn, sbx, shp, shx, xml, cpg)], Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Distrito Federal Tlalpan, 2015, Recuperado de http://www.conabio.gob.mx/informacion/metadatos/gis/anpest15gw.xml?_htpccache=yes&_xsl=/db/metadatos/xsl/fqdc_html.xsl&_indent=no
4. CONANP, Áreas Naturales Protegidas Federales de México, enero 2024 [Descripción del formato de representación geográfica: Shapefile. Formato vectorial compuesto por 4 archivos (shp, shx, dbf,prj)]. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Ciudad de México, (2024), Recuperado de: <http://geoportal.conabio.gob.mx/metadatos/doc/html/anpenero2024gw.html>
5. R. Hall. "The Mammals of North America". 2nd ed. John Wiley & Sons, New York, 1981.
6. Ceballos (Ed.). Mammals of México. JHU press, 2014,100-101.
7. Ceballos, P. Manzano, F. Mendez-Harclerode, M. L. Haynie, D. H. Walker, y R. D. Bradley. "Geographic distribution, genetic diversity, and conservation status of the Southern flying squirrel (*Glaucomys volans*) in México", Occasional Papers, Museum of Texas Tech University, Natural Science Research Laboratory, 299, 2010, 1-15.

8. Ceballos, y A. Miranda, "Notes on the biology of Mexican flying squirrels (*Glaucomys volans*) (Rodentia: Sciuridae)", The Southwestern Naturalist, 30, 1985, 449-450.
9. G. Ceballos, y C. Galindo. "*Glaucomys volans goldmani* (Rodentia: Sciuridae) in Central México", The Southwestern Naturalist, 28, 1983, 375-376.
10. INEGI, "AGEE Área Geoestadística Estatal [Descripción del producto: División política estatal 1:250000. 2023, Escala: 1:250000, Formato de representación geográfica: Shapefile". Formato vectorial compuesto por 4 archivos (shp, shx, dbf,prj)]. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Ciudad de México, México, 2024. Recuperado de <http://geoportal.conabio.gob.mx/metadatos/doc/html/dest23gw.html>
11. IUCN (International Union for Conservation of Nature), "The IUCN Red List of Threatened Species". Version 2014,2, 2014. www.iucnredlist.org
12. N. Kerhoulas, y B. Arbogast, "Molecular systematics and Pleistocene biogeography of Mesoamerican flying squirrels", Journal of Mammalogy, 91, 2010, 654-667.
13. P. Dolan, y D. Carter, "*Glaucomys volans*", Mammalian Species, 78, 1977, 1-6.
14. SEMARNAT, "(Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales), Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental -Especies nativas de México de flora y fauna silvestres, Categoría de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo", 2010, Diario Oficial de la Federación, Diciembre 30 2010, Ciudad de México, México.
15. V. E. Diersing. "Systematics of Flying Squirrels, *Glaucomys volans* (Linnaeus), from Mexico, Guatemala, and Honduras. The Southwestern Naturalist, 25(2), 1980, 157-171, <https://doi.org/10.2307/3671238>
16. V. Sánchez-Cordero, "Estado actual del conocimiento biológico de algunas especies de roedores de las familias Muridae, Geomyidae, Heteromyidae y Sciuridae (Rodentia: Mammalia) incluidas en el PROY-NOM-059-ECOL-2000", Instituto de Biología, Bases de datos SNIB-CONABIO, proyectos W036, A026 y L047. México, D. F. 2006.
17. V.A. Pulido-Esparza, A. Espejo-Serna, y A. R. López, "Las monocotiledóneas nativas del Corredor Biológico Chichinautzin", Acta Botanica Mexicana, 86, 2009, 9-38.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE PÉTALOS DE TAGETES ERECTA CONTRA MICROORGANISMOS Y SU TOXICIDAD EN ERITROCITOS HUMANOS

Carlos Sebastián González Perez¹, Catalina Leos Rivas¹, Catalina Rivas Morales¹, David Gilberto García Hernández¹, Eduardo Sánchez García¹

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas
carlos.gonzalezpr@uanl.edu.mx

RESUMEN

El crecimiento de la población refleja el problema de resistencia antibiótica debido a la desinformación de estos donde el enfoque aprovechando recursos de origen biótico impulsa a encontrar alternativas con plantas de importancia medicinal y comercial para verse reforzado su aprovechamiento de la misma forma el impulso en encontrar alternativas naturales para protección contra bacterias fármacorresistentes las cuales han tenido un 44% de incidencia en Latinoamérica y hongos fitopatógenos es perceptible al momento de encontrar resistencias a fungicidas de los mismos. La planta *Tagetes erecta* o comúnmente conocida como cempasúchil entra en juego teniendo interacciones desde la época prehispánica usándose como método de aminorar malestares como vómito e indigestión. Se obtuvo extracto metanólico con pétalos de la planta *T. erecta* de Poza Rica, Veracruz por medio de una maceración en metanol durante 20 días; posteriormente se eliminó el solvente a presión reducida para su almacenamiento y uso, se realizó un tamizaje fitoquímico para determinar de manera parcial los metabolitos que presentan de manera cualitativa mostrando la presencia de cumarinas, quinonas, flavonoides, taninos y carbohidratos. Se realizó la CMI utilizando la metodología de microdilución (CLSI M07 A09), 2012, con 6 cepas de interés clínico: *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-44, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Acinetobacter baumannii* ATCC 15308 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (1000 a 31.25 ppm) en una microplaca teniendo en las 6 bacterias una inhibición en rango de 1000 ppm, *E. faecalis* 92%, a 500 ppm *S. aureus* 81% y *E. coli* a 90%, a 250 ppm *P. aeruginosa* 93% y *K. pneumoniae* 90% y la que mejor inhibición presento a 125 ppm *A. baumannii* un 81% se determinó con prueba CMB que el extracto tiene actividad bactericida en 1000 ppm y bacteriostáticas en 500 ppm, se evaluó la toxicidad del extracto frente a eritrocitos humanos mediante la prueba de hemólisis para determinar una Hemo-compatibilidad del extracto *T. erecta* realizando un tratamiento con sus diluciones (1000 a 31.25 ppm) con PBS y el paquete globular, encontrando un porcentaje del promedio de 1.08% en las diferentes concentraciones de actividad hemolítica. Se comprobó la actividad antifúngica contra cepas del género *Fusarium*, siendo de los principales agentes fitopatógenos con mayor resistencia con impacto en viveros, se probaron 7 cepas, presentando actividad en 7 teniendo halos de inhibición de 2.1cm, 1.3 cm, 0.5 cm, 1.7 cm, 2.06 cm en las cepas. Teniendo estas pruebas se evaluó que los pétalos de *t. erecta* tienen actividad bactericida y actividad antifúngica además de comprobación de hemólisis con porcentajes bajos de toxicidad todo esto con carácter favorables para futuros usos.

INTRODUCCIÓN

La OMS ha declarado que la resistencia a los antimicrobianos es de las 10 principales amenazas en Salud Pública que enfrenta la humanidad. La producción de patógenos farmacorresistentes se ha ocasionado por el uso inadecuado y excesivo de los antimicrobianos es una de las causas principales que ha ocasionado patógenos farmacorresistentes. Estas afectan aproximadamente el 44% de la población de Latinoamérica; la escasez de antibióticos desde el 2019, se encuentran en espera de aprobación 31 antibióticos para combatir los efectos de las bacterias del grupo ESKAPE siendo: *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-44, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Acinetobacter baumannii* ATCC 15308 (WHO 2024). Asimismo, el aumento de pérdidas de cultivos de interés comercial como el maíz, cebada, trigo, caña de azúcar o mango que son los principales afectados en México por el género *Fusarium* (Watt, 2015). Con base a lo antes mencionado los viveros forestales que son afectados, impulsan la búsqueda de herramientas para combatir las cepas

de las diferentes especies de *Fusarium* vascular o Damping off, que es el género fitosanitario que hay que disminuir.

Por tal motivo el interés de conocer las características de las plantas con aplicaciones tanto médicos como comerciales es un punto de innovación por lo que se eligió la planta como *Tagetes erecta* o cempasúchil que se ha usado con propósito ornamental en la decoración en festividades del día de difuntos, legado por nuestros ancestros como la representación del sol y la vida por su característico color naranja, por la creencia de que las almas eran guiadas hacia los altares (SEGOB 2019), por tal motivo el potencial medico de *T. erecta* quedo un poco en la deriva debido a su uso en decoración, sin embargo, gracias a los descubrimientos del códice florentino escrito por el Fray Bernardino de Sahagún en el siglo XV describiendo el uso del cempasúchil mediante infusiones para aliviar gripes, resfriados, tos y problemas estomacales.

Con los antecedentes antes mencionados, resurge el interés de investigar las posibles actividades biológicas con aplicación medica como fitosanitaria, en el presente trabajo se seleccionó la flor para evaluar la actividad bactericida, fungicida sobre diferentes microorganismos patógenos que afectan a la humanidad, así como su toxicidad para una administración segura.

PARTE EXPERIMENTAL

Obtención del extracto

Fundamento: Obtener un extracto de un material vegetal extrayendo los metabolitos después de una maceración.

- I. Colecta del material vegetal
- II. Se seleccionaron pétalos de flores de *T. erecta* (60-100 g).
- III. Se colocaron en un matraz Erlenmeyer con el solvente seleccionado durante 2 a 7 d.
- IV. Se filtró el solvente y se coloca en un matraz bola.
- V. Se coloca en un Rotavapor Yamato RE200 para hacer una destilación a presión reducida a 40°C en un baño maría Yamato BM 100 hasta reducir el volumen del solvente.
- VI. Se coloca en recipientes (previamente pesados) para colocarse en un horno de secado a 50°C hasta la eliminación completa del solvente.
- VII. Posteriormente se pesa en una balanza analítica con el extracto y se determinar su rendimiento.

Tamizaje fitoquímico

Fundamento: Determinar mediante pruebas coloridas la presencia de metabolitos secundarios que se encuentran en el extracto.

Tabla 1: Observación del tamizaje fitoquímico para los metabolitos presentes.

Prueba química	Observación	Metabolito presente
Liebermann-Buchard	Color azul o morado para esteroides	Esteroides y Triterpenos
Cumarinas	Color rojizo para triterpenos	
	Coloración amarilla debe desaparecer al acidular	Cumarinas
Baljet	Coloración naranja o rojo oscuro	sesquiterpenlactonas
Ácido sulfúrico	Coloración roja persistente	Quinonas
Espuma	Espuma abundante	Saponinas
Shinoda	Color rojo intenso para flavonoides	Flavonoides
	Color naranja, verde o azul para derivados.	Derivados de Flavonoides
Cloruro férrico	Coloración verde oscuro y negra.	Oxidrilos fenólicos y Taninos.
Antrona	Presencia de anillo azul-verdoso en la interfase	Carbohidratos
Dragendorff	Precipitado naranja	Alcaloides
Molish	Presencia de anillo en la interfase	Carbohidratos

Lieberman-Buchard: En un tubo de ensaye disolver de 1-2 mg de extracto en solvente y colocar una gota del reactivo "Liebermann-Buchard" además de 1 mL de cloroformo y observar la coloración.

Cumarinas: En un tubo de ensaye disolver de 1-2 mg de extracto en solvente agregando una solución de hidróxido de sodio al 10% en agua y observar coloración.

Baljet: En una placa de porcelana colocar 1 mL del extracto solubilizado y colocar 3-4 gotas del reactivo "baljet" y observar coloración.

Ácido sulfúrico: En una placa de porcelana colocar 1 mL del extracto solubilizado se colocan 1-2 gotas de ácido sulfúrico coloreándose rojo se confirma al agregar 2-3 gotas de hidrosulfito de sodio al 5% decolorando la solución y se regenera el color añadiendo de 2-3 gotas de agua oxigenada al 30%.

Espuma: En un tubo de ensaye se coloca de 1-2 mg de extracto en solvente y agitar durante 30 s observar la espuma persistente.

Shinoda: En un tubo de ensaye disolver de 1-2 mg del extracto en solvente agregando unas gotas de ácido clorhídrico y una o dos limaduras de magnesio para observar el cambio de coloración.

Cloruro férrico: En un tubo de ensaye disolver de 1-2 mg de extracto en solvente añadiendo gotas de cloruro férrico al 1% en etanol y observar coloración.

Antrona: En un tubo de ensaye disolver de 1-2 mg de extracto en solvente añadiendo por la pared la solución de Antrona al 0.2 % en ácido sulfúrico concentrado y observar presencia de anillo.

Draguendorff: En una placa cromatográfica colocar una pequeña gota con un capilar del extracto solubilizado marcando el carril y añadir una o dos gotas del reactivo para colocarse en una cubeta con eluyente cloroformo/etanol 7:3, si se observa un precipitado naranja es positiva.

Molish: En un tubo de ensaye disolver de 1-2 mg de extracto en solvente e ir colocando por las paredes el reactivo de Molish hasta observar presencia de un anillo.

CMI (concentración mínima inhibitoria)

Fundamento: Determinar la menor concentración de un agente antimicrobiano (como un antibiótico) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo en un cultivo. En otras palabras, es la menor concentración de un agente antimicrobiano que aún puede prevenir el crecimiento de una bacteria o microorganismo.

- i. Selección de tubos de ensaye del mismo lote.
- ii. Preparación del medio de cultivo Müller-Hilton.
- iii. Inoculación de la bacteria en un tubo con medio MH

-Seleccionar la cepa bacteriana.

-En zona estéril flamear Asa y boquilla del tubo para tomar un inóculo.

-Girar asa dentro del tubo con medio

-Flamear e incubar a 36°C durante 24 h

- iv. Estandarizar bacteria a 0.5 escala de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL)

-Obteniendo absorbancias idóneas 0.100 A

- v. Preparación del extracto

-En un tubo cónico de 1.5 mL colocar 2 mg de extracto en 1 mL de solvente para obtener una concentración de 2,000 ppm.

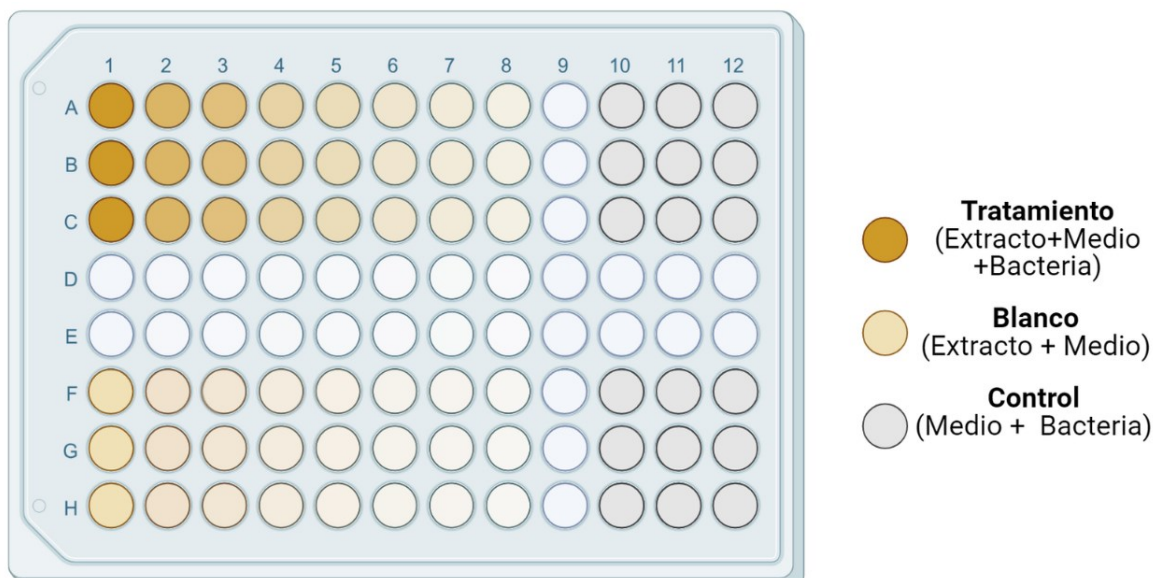


Figura 1: Colocación en la microplaca del tratamiento, blanco y control (31.25 a 2000 ppm.)

Metodología en la microplaca

En la columna 1 (A, B, C, F, G y H) colocar 200 μ L de extracto.

En las columnas 2-7 y 10-12 colocar 100 μ L de medio MH.

Posteriormente tomar 100 μ L de la columna 1 y realizar diluciones así hasta llegar a la columna 7 y desechar los últimos 100 μ L en la columna 8.

*Entre cada dilución cambiar de puntilla y homogenizar.

Colocar en las filas A, B y C 100 μ L de bacteria para tener 200 μ L en cada pocillo.

Colocar en las filas F, G y H 100 μ L de Medio Müller-Hilton para tener 200 μ L.

- vi. Incubación durante 24 h a 36°C
- vii. Lectura en Lector de microplacas BIO-TEK a 630 nm
- viii. Imprimir resultados de las absorbancias en la impresora EPSON LX-300+
- ix. Determinar resultados mediante Excel.

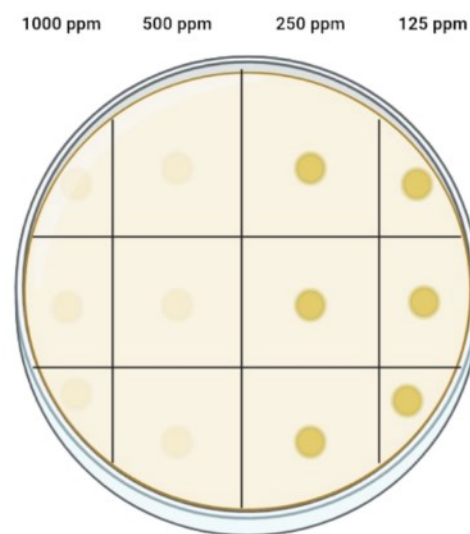
CMB (concentración mínima bactericida)

Fundamento: La Concentración Mínima Bactericida (CMB) determina la menor concentración de un agente antimicrobiano (como un antibiótico) que frena o elimina el crecimiento visible de un microorganismo en un cultivo.

Cuya prueba nos indica dos resultados: Bacteriostática si el agente microbiano crece o Bactericida si el agente microbiano no crece.

- i. En una caja Petri con agar marcar cuadrantes para colocar el goteo
- ii. Tomar 25 μ L de cada pocillo seleccionado en la microplaca de la CMI
- iii. Incubar durante 24 h a 36°C.
- iv. Observar crecimiento en los cuadrantes determinando actividad bacteriostática o bactericida.

Figura 1: Colocación para conteo por goteo en caja Petri



Actividad hemolítica

Fundamento: Determinar la capacidad de ciertas sustancias o agentes para lisar la membrana de los glóbulos rojos (eritrocitos).

Esta actividad puede ser causada por diversos factores, como toxinas microbianas, productos químicos, ciertos fármacos o condiciones médicas.

- i. Preparación del Paquete globular al 5%
 - Obtención de tubos con sangre O+ extraídos por venopunción.
 - Centrifugación a 3,500 rpm durante 5 min para extraer el suero y se sustituye con PBS a la misma altura.
 - Repetir 3 veces hasta una eliminación del suero total.
 - Tomar los eritrocitos y colocarlos en un matraz aforando con PBS para obtener el 5% de paquete globular.

- ii. Preparación del Extracto
 - En un Tubo cónico de 1.5 mL colocar 10 mg de extracto en 1 mL de solvente para obtener una concentración de 10,000 ppm.
 - Incubación a 36 °C.
 - Centrifugar a 13,000 rpm a 4 °C.
 - Retirar 200 µL del pocillo.
 - Lectura en Lector de microplacas BIO-TEK a 550 nm
 - Imprimir resultados de las absorbancias en la impresora EPSON LX-300+
 - Calcular resultados mediante Excel.

Tabla 2: Concentración de cada tubo para colocarse en microplaca (31.25 a 1000 ppm)

Tubo	Tratamiento					
	1	2	3	4	5	6
Concentración (ppm)	1000	800	600	400	200	100
Vol. de Extracto (µL)	25	20	15	10	5	2.5
Vol. de PBS (µL)	975	980	985	990	995	997.5
Vol. del PG (µL)	250	250	250	250	250	250

Tubo	Control Positivo (+)					
	1	2	3	4	5	6
Concentración (ppm)	1000	800	600	400	200	100
Vol. de Agua Destillada (µL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Vol. del PG (µL)	250	250	250	250	250	250

Tubo	Blanco					
	1	2	3	4	5	6
Concentración (ppm)	1000	800	600	400	200	100
Vol. de Extracto (µL)	25	20	15	10	5	2.5
Vol. de Extracto (µL)	975	980	985	990	995	997.
Vol. del Extracto (µL)	250	250	250	250	250	250

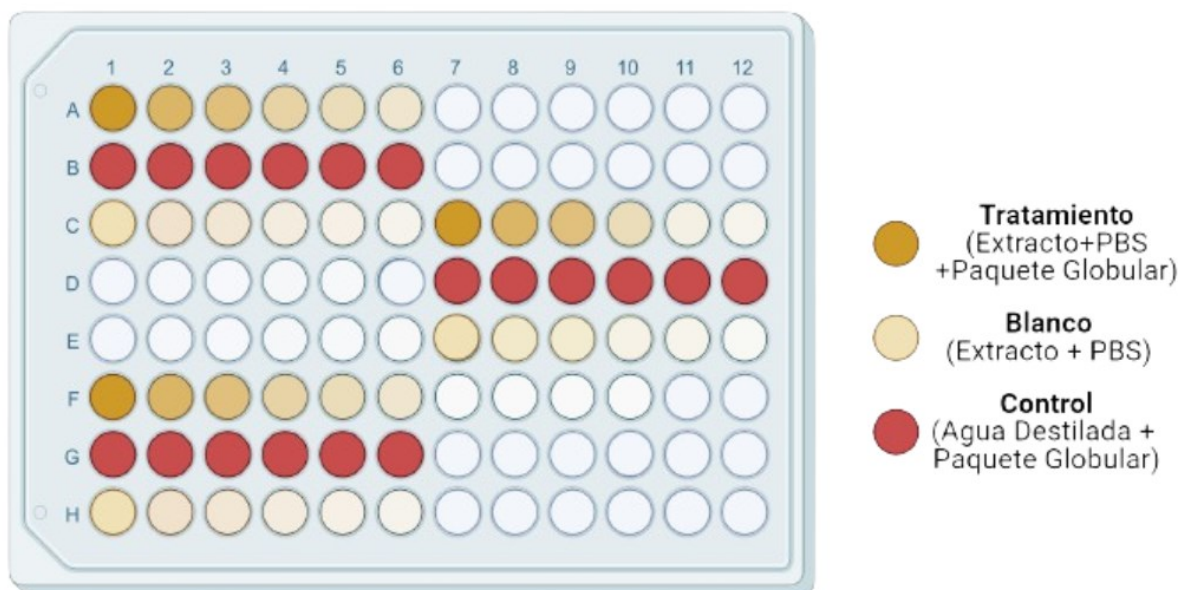


Figura 3: Colocación de la microplaca del tratamiento, blanco y control a través de Microdiluciones de 31.25 a 2000 ppm

Actividad antifúngica

Fundamento: La actividad antifúngica se basa en la capacidad de ciertas sustancias para inhibir el crecimiento de hongos, como *Fusarium*, mediante la interferencia con su metabolismo, membrana celular o ADN.

- i. Preparación de solución con esporas
 - Preparar cajas Petri con PDA
 - Flamear boquilla del tubo y tomar 100 μ L de la cepa
 - Difundir cepa con un asa Drigalsk de vidrio en la caja
 - Hacer pocillos con un diámetro de 1 cm
 - Depositar 150 μ L del extracto a 100,000 ppm.
 - Incubar durante 5 d a 36°C
 - Medir los halos de inhibición



Figura 4: Incubación en placa y pocillos

RESULTADOS

Obtención del extracto

- i. Se obtuvo un rendimiento del 6.59% de extracto de los pétalos frescos de *Tagetes erecta* recolectados de Poza Rica, Veracruz después de 2-7 d en maceración en metanol de forma estática.

Tamizaje fitoquímico

Tabla 3: Metabolitos presentes después del tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de *T. erecta*.

Prueba química	Resultado	Metabolito presente
Liebermann-Buchard	-	Esteroles y Triterpenos.
Cumarinas	-	Cumarinas
Baljet	+	Sesquiterpenlactonas
Ácido sulfúrico	+	Quinonas
Espuma	-	Saponinas
Shinoda	+	Flavonoides
Cloruro férrico	+	Oxidrilos fenólicos y Taninos.
Antrona	+	Carbohidratos
Dragendorff	-	Alcaloides
Molish	+	Carbohidratos

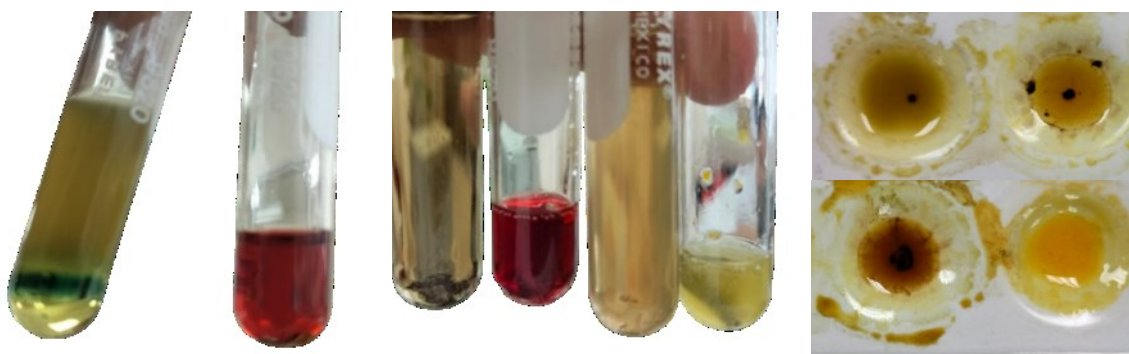


Figura 5: Tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de *T. erecta*.

CMI (concentración mínima inhibitoria)

-Después de realizar la metodología a través de microdiluciones con 9 repeticiones se encontraron los siguientes resultados del extracto de *T. erecta* obteniendo CMI de 125 a 1000 ppm con inhibición arriba del 80% dependiendo la bacteria.

-La bacteria *Acinetobacter baumannii* ATCC 15308 fue la que mejor inhibición presento con el extracto a 125 ppm con un 81.85% teniendo buena actividad inhibitoria con una de las bacterias de prioridad del listado de la OMS.

-La bacteria *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 fue la que menor inhibición se encontró a 1000 ppm con un 92.99%.

Tabla 3: CMI de manera descendiente dependiendo la concentración del extracto de *T. erecta*.

Bacteria	CMI (ppm)	% Inhibición	% Desviación est.
<i>A. baumannii</i>	125	81.85	± 4.52
<i>P. aeruginosa</i>	250	93.27	± 2.24
<i>K. pneumoniae</i>	250	90.59	± 1.19
<i>E. coli</i>	500	90.04	± 1.59
<i>S. aureus</i>	500	81.82	± 6.52
<i>E. faecalis</i>	1000	92.99	± 2.56

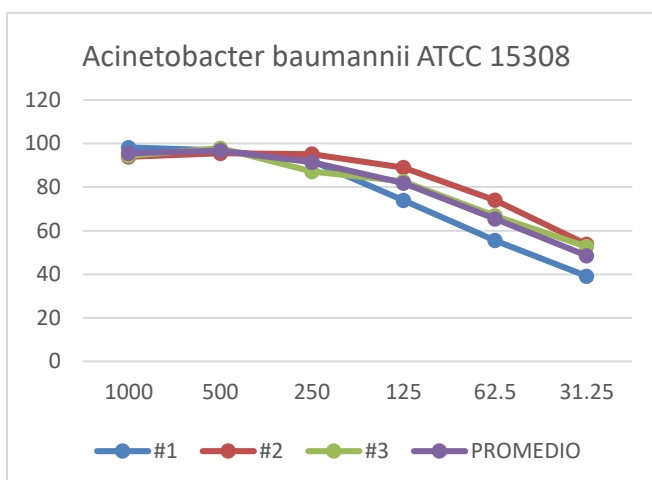
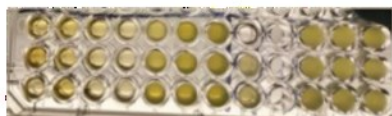


Figura 6: Actividad inhibitoria del extracto de *T. erecta* sobre *Acinetobacter baumannii* $n = 3$

• ***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**



• ***Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603**



• ***Escherichia coli* ATCC 25922**



• ***Enterococcus faecalis* ATCC 29212**



• ***Staphylococcus aureus* ATCC BAA-44**



• ***Acinetobacter baumannii* ATCC 15308**



Figura 7: Inhibición del extracto de *T. erecta* sobre las diferentes bacterias.

CMB (concentración mínima bactericida)

-A través de los resultados de la prueba por goteo se encontró que el extracto se comporta de forma bactericida a 1000 ppm en 4 de las 6 cepas probadas con excepción de *K. pneumoniae* y *E. faecalis* las cuales permaneció de manera bacteriostática.

-El extracto solo demostró actividad bactericida a 500 ppm en *Acinetobacter baumannii* siendo un resultado favorable al ser la que presentó mayor inhibición.

Tabla 4: CMB del extracto de *T. erecta*.

Bacteria	Concentración (ppm)		
	1000	500	250
<i>A. baumannii</i>	+	+	-
<i>P. aeruginosa</i>	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-
<i>E. coli</i>	+	-	-
<i>S. aureus</i>	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-

(+ Bactericida y – Bacteriostática)

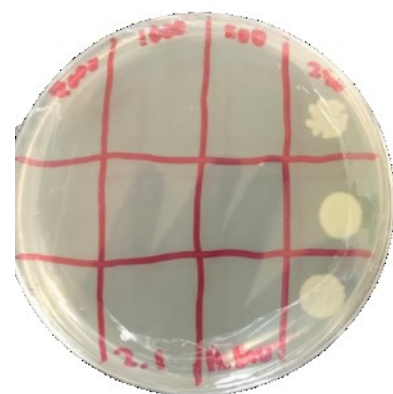


Figura 8: Inhibición del extracto de *T. erecta* sobre *Acinetobacter baumannii* a 500 ppm

Hemolisis

Después de realizar la metodología se llegó a un promedio de **1.08%** de hemolisis reportándose debajo de 2% en todas las concentraciones denominándose **No Tóxico**.

Tabla 5: Hemolisis del extracto de *T. erecta* (31.25 a 1000 ppm).

Concentración (ppm)	Hemolisis (%)	Desviación Estándar (±)	Resultado
1000	0.35	0.56	No Tóxico
500	0.77	0.77	No Tóxico
250	1.24	0.19	No Tóxico
125	1.03	0.40	No Tóxico
62.5	1.62	0.34	No Tóxico
31.25	1.51	0.27	No Tóxico

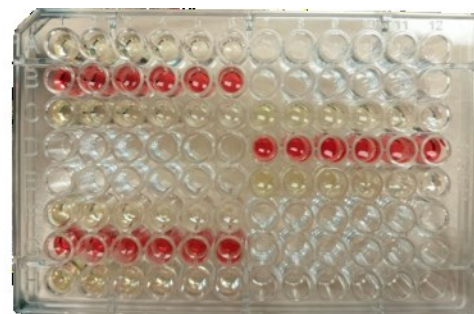


Figura 9: Hemolisis de *T. erecta* (1.08%)

Actividad Antifúngica

-Se encontraron halos de inhibición superiores a 1 cm, encontrándose actividad inhibitoria siendo preliminar para aplicar una CMI con las cepas de fusarium para determinar la concentración mínima inhibitoria contra hongos fitopatógenos.

Tabla 6: Inhibición del extracto de *T. erecta* (7 cepas de fusarium).

Cepa	Halo de Inhibición (cm)
V2-1	2.1
V2-7	1.3
V2-10	2.1
V4-3	2.1
V5-4	0.5
V5-5	1.7
V5-6	2.1

n = 3



Ilustración 10: Halo de inhibición del extracto en la cepa V2-1.



Ilustración 11: Halo de inhibición del extracto en la cepa V2-7.



Ilustración 12: Halo de inhibición del extracto en la cepa V2-10.



Ilustración 13: Halo de inhibición del extracto en la cepa V4-3.



Ilustración 14: Halo de inhibición del extracto en la cepa V5-4.



Ilustración 15: Halo de inhibición del extracto en la cepa V5-5.



Ilustración 16: Halo de inhibición del extracto en la cepa V5-6.

CONCLUSIONES

Los extractos metanólicos de *T. erecta* (cempasúchil) presentaron actividad bactericida sobre seis cepas multifármacorresistentes del grupo ESKAPE inhibiéndolas en más de un 80% a diferentes concentraciones; actividad antifúngica sobre siete cepas del género *Fusarium* con halos de inhibición de 0.5 a 2.1 cm y con muy bajos porcentajes de hemólisis (1.08%).

Considerando que *T. erecta* puede ser una alternativa viable como tratamiento y/o coadyuvante de enfermedades ocasionadas por bacterias y hongos, aunado al uso comercial tradicional ornamental del día de difuntos.

BIBLIOGRAFÍA

1. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
2. De Información Agroalimentaria y Pesquera, S. (s. f.). *La flor de cempasúchil, un ícono de México*. gob.mx. <https://www.gob.mx/siap/articulos/la-flor-de-cempasuchil-un-icone-de-mexico?idiom=es#:~:text=La%20tradici%C3%B3n%20marca%20hacer%20senderos,s%C3%ADmbolo%20de%20vida%20y%20muerte>.
3. De Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, I. N. (s. f.). *Estudio fitosanitario: diagnóstico y control biológico de Fusarios*. gob.mx. <https://www.gob.mx/inifap/articulos/estudio-fitosanitario-diagnostico-y-control-biologico-de-fusarios-en-maiz>.
4. De Puebla, E. S. (2023, 24 octubre). Herbolaria mexicana: Usos medicinales del cempasúchil. *Aderezo*. Recuperado 12 de mayo de 2024, de <https://aderezo.mx/comer-sano/dia-de-muertos-usos-medicinales-de-la-flor-de-cempasuchil/>.
5. Espinoza Mijangos, A. J. (2023). Evaluación de extractos metanólicos libres y nanoencapsulados de *Smilax* spp., *Chiranthodendron pentadactylon*, y *Peumus boldus* contra bacterias de interés dermatológico (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
6. Hernández Iglesias, C. S. (2023). Actividad antifúngica de extractos de plantas contra diferentes especies de *Fusarium* causantes del mal del almácigo (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
7. Hernández Marín, D. A. (2015). Aislamiento y purificación de metabolitos secundarios de plantas con actividad antimicrobiana contra microorganismos farmacorresistentes del grupo ESKAPE (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
8. Lugano, L. (2011, 6 marzo). *Enfermedades en viveros forestales*. SIVICOFF Sistema Integral de Vigilancia y Control Fitosanitario Forestal. Recuperado 12 de mayo de 2024, de <http://sivicoff.cnf.gob.mx/ContenidoPublico/09%20Manuales%20t%C3%A9cnicos/Lista%20de%20documentos/Viveros%20forestales/Manual%20INTA%20plagas%20viveros.pdf>.
9. Olea Flores, A. L., Álvarez Román, R., Armendáriz Barragán, B., Rivas Morales, C., Leos Rivas, C., & Galindo Rodríguez, S. A. (2018). Perfil toxicológico preliminar del aceite esencial y el extracto metanólico de *Schinus molle*.
10. Watt. (2015). *Ficha técnica Fusarium SPP*. SEGOB. Recuperado 12 de mayo de 2024, de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/633031/Fusarium_spp_ma_z_2020.pdf.
11. World Health Organization: WHO. (2024, 17 mayo). La OMS pone al día la lista de bacterias farmacorresistentes más peligrosas para la salud humana. Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news/item/17-05-2024-who-updates-list-of-drug-resistant-bacteria-most-threatening-to-human-health>.

EL SUELO Y SU CAPACIDAD DE ADSORCIÓN EN LA RIBERA DEL LAGO DE CUITZEO

María Alcalá De Jesús, Mariela Casillas Corona, Juan Carlos González Cortes, María Elena Granados García y Emmanuel Rodríguez Hernández

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
tupuri12@yahoo.com.mx

RESUMEN

De acuerdo con la literatura se han reportado de forma espacial, suelos y polvos asociados a metales pesados (MP), tales como el Fe, Li, Mn, Pb, V y Zn (Delgado *et al.*, 2018); As, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb, V y Zn (Aguilar, 2019) que contaminan el medio y son de riesgo para la salud humana. Las propiedades de los suelos muestran una relación directa con la disponibilidad de los MP en el medio o estos se adsorben por las partículas finas del suelo. En el proceso de adsorción participan arcillas, materia orgánica (MO), pH y capacidad de intercambio de cationes (CIC) del suelo. Son escasos los trabajos que relacionan estas propiedades con los MP (Bautista *et al.*, 2017; Casillas, 2011, 2016). El objetivo fue identificar los sitios de mayor adsorción de MP en el área centro – oeste de la ribera del Lago de Cuitzeo en Michoacán. Se tomó como referencia las propiedades químicas pH, MO y CIC de 40 sitios reportados por Hernández (2018), éstas se caracterizaron y se clasificaron según la DOF (2001). Se determinó un índice de la capacidad de adsorción del suelo (ICA) de acuerdo con Casillas (2011) que pondera las propiedades químicas de los suelos. Más de 50% de los sitios presentó pH fuertemente alcalino y 7.5% fue neutro. La MO varió de clase media a muy baja y la CIC en 50% de los sitios fue muy alta. Se obtuvieron ICA en proporciones semejantes de Clase 4 y Clase 1, la primera clase se relaciona con los sitios con más contenido de MO y CIC, y suelos arcillosos. La adsorción de los cationes (MP) interactúan con la superficie de las arcillas y de la MO de los suelos (Jordán, 2006) y a mayor contenido tanto de arcillas como de MO, mayor es la capacidad de intercambio catiónico (Ortiz, 2010). En la Clase 1, los ICA fueron de menor valor. Los ICA obtenidos son de Clase 4 y 1; la primera localizada en la zona sur - sureste, mientras que la segunda clase está dispersa en los alrededores de la ribera del lago de Cuitzeo.

INTRODUCCIÓN

De las propiedades físicas y químicas de los suelos depende en gran parte la disponibilidad y la capacidad de que elementos como los MP sean adsorbidos por las partículas del suelo; entre los estudios que existen está el de Casillas (2011) quien obtuvo un índice para identificar zonas de amortiguamiento a la contaminación por MP a partir de propiedades del suelo como el pH, MO y la CIC para la ciudad de Morelia. Por otra parte, Bautista *et al.* (2017) obtuvieron varios índices sobre la capacidad de sorción y Hernández (2023) relacionó las propiedades químicas de suelos urbanos con la adsorción de MP en una zona del municipio de Zinapécuaro, Mich.

La capacidad de adsorción de un suelo se refiere a la capacidad que tiene este para resistir cambios en las concentraciones de MP en solución al ser adsorbidos por las partículas finas del suelo (Quintero, 2002), capacidad que depende de la superficie específica de fijación del suelo (Wild, 1989).

Los principales factores que afectan a la CAS son tipo y cantidad de arcilla y cantidad de MO. Así que los suelos que contienen más arcilla y MO tienen mayor capacidad amortiguadora (Ortiz-Villanueva y Ortiz, 1990)

Con base en lo anterior y para una zona como la ribera del lago de Cuitzeo en donde existe contaminación por MP, el objetivo del presente estudio fue identificar los sitios de mayor adsorción en el área centro – oeste de la ribera del Lago de Cuitzeo en Michoacán. La capacidad de adsorción de los cationes en el suelo se lleva a cabo en las partículas de arcilla y de la materia orgánica (Jordán, 2006) y entre más contenido de estas partículas esté presente en el suelo la CIC será mayor (Ortiz, 2010).

Un indicador es una variable que resume información del suelo haciendo que un fenómeno o condición de interés se haga perceptible, se cuantifique, mida y se comunique de manera comprensible (Gallopín, 2006).

Un ICA se determina mediante la relación entre las propiedades del suelo, ya sean físicas o químicas en función de objetivos establecidos; a las propiedades con mayor relación a la capacidad de adsorción se le asignan valores que deben ser ponderados con base en su capacidad amortiguadora.

PARTE EXPERIMENTAL

El área de estudio. se localiza en la zona centro-oeste de la ribera del Lago dentro de la Cuenca del Lago de Cuitzeo en el estado de Michoacán (Figura 1).

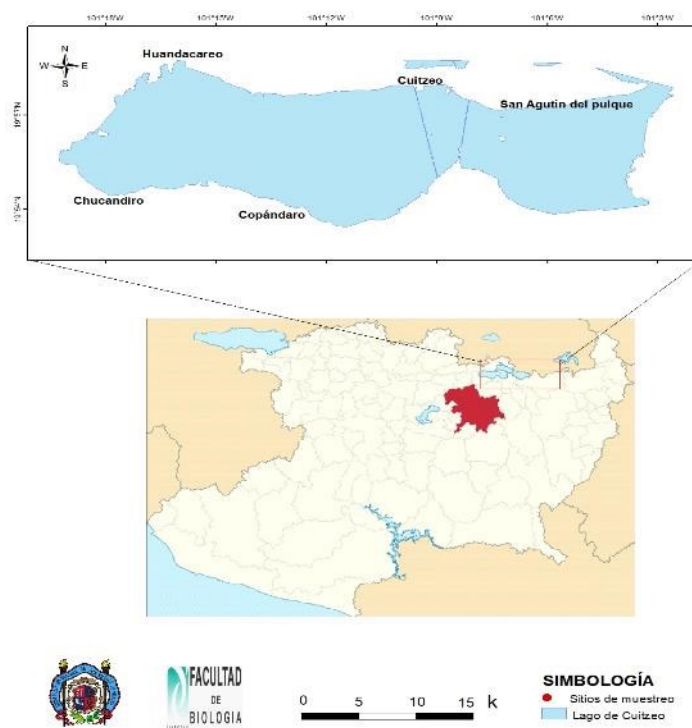


Figura 1. Localización del área centro-oeste de la ribera del Lago de Cuitzeo en Michoacán.

El clima de acuerdo con Köppen modificado por García es templado subhúmedo con lluvias en verano y temperatura media para el mes más frío, entre 3 °C y 10 °C (Cw1b(i')g) (García, 2004). La precipitación anual varía de 800 mm a 1000 mm (Vidal, 2010). Las rocas del área son Andesita y Dacita (Garduño-Monroy e Israde-Alcántara, 2010).

Los suelos son de tipo Vertisol localizado en depresiones y zonas planas, tienen más de 30% de arcillas expandibles, se encharcan e incrementan su volumen en húmedo, forman grietas cuando están secos; son profundos y fértiles; se les utiliza para actividades agrícolas y de pastoreo; Leptosol, son delgados (25 cm de espesor) y enseguida puede estar presente la roca dura o material intemperizado y Solonchak, se encuentran en algunas áreas de la ribera del lago y en donde el agua subterránea asciende, disolviendo y arrastrando sales que se depositan en la superficie del suelo (Cabrera *et al.*, 2010).

Los datos de las propiedades químicas pH, MO y CIC de 40 sitios se tomaron del trabajo reportados por Hernández (2018), información que se clasificó de acuerdo con el DOF (2001). El pH fue leído en potenciómetro en una mezcla de suelo agua relación 1:2; la MO se determinó por combustión húmeda con el método de Walkley y Black, y la CIC por extracción con acetato de amonio. Con estas propiedades se determinó un índice de la capacidad de adsorción del suelo (ICA) utilizando como referencia el índice reportado por Casillas (2011) que pondera las propiedades químicas de los suelos (Ecuación 1).

Ecuación 1

$$ICA = \sum [Propiedad\ química / (Máximo\ de\ cada\ propiedad) (Ponderación\ de\ cada\ propiedad)]$$

Se realizó un mapa de distribución del ICA con apoyo del programa ArcGIS, y se hizo un análisis estadístico básico.

RESULTADOS

Los resultados de los promedios de las propiedades químicas se muestran en el Cuadro 1 y Figura 2. Más de 50% de los sitios presentó pH fuertemente alcalino distribuidos al sur y noreste de la ribera y 7.5% fue neutro. La MO varió de clase media al oeste a muy baja alrededor de la ribera, y la CIC, en 50% de los sitios fue muy alta localizada al sur-suroest, principalmente.

Cuadro 1. Propiedades químicas de los suelos clasificados con base en la DOF (2001).

Propiedad del suelo	Clase	
pH	Neutra	6.7 a 7.3
	Medianamente alcalina	> 7.3 a 8.5
	Fuertemente alcalina	> 8.5
MO (%)	Muy baja	< 4.1
	Baja	4.1 a 6.0
	Media	> 6.0 a 10.9
CIC (cmol kg ⁻¹)	Media	15.0 a 25.0
	Alta	> 25.0 a 40.0
	muy alta	> 40.0

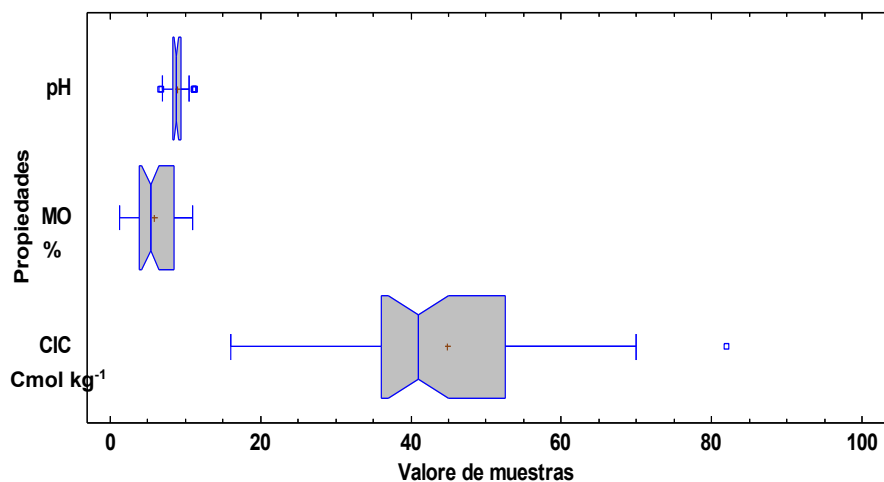


Figura 2. Propiedades químicas de los suelos en la ribera del Lago de Cuitzeo.

De acuerdo con las propiedades químicas del suelo, se obtuvieron los siguientes Índices de Capacidad de Adsorción (ICA) (Cuadro 2 y Figura 3).

Cuadro 2. Índice de Capacidad de Adsorción de los suelos.

Clase		ICA
1	Baja	0.4132 – 0.5898
2	Media	0.5898 – 0.6142
3	Alta	0.6142 – 0.6386
4	Muy Alta	0.6386 – 0.8936

ICA: Índice de Capacidad de Adsorción.

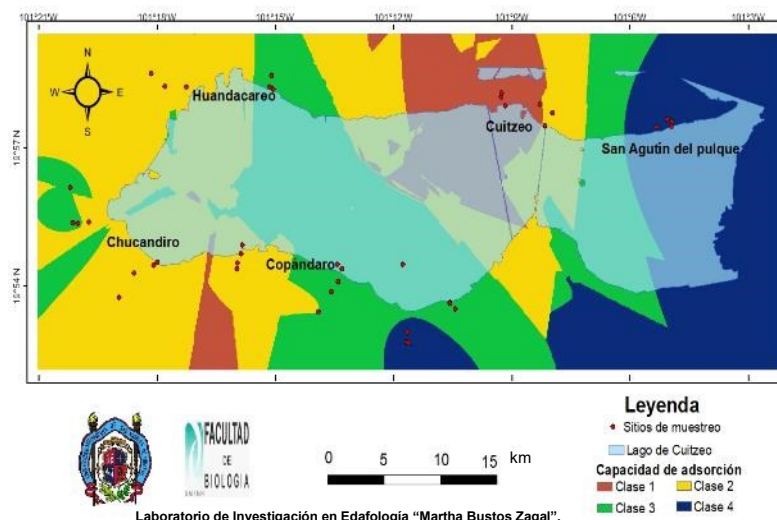


Figura 3. Índices de Capacidad de Adsorción (ICA) en suelos de la ribera del Lago de Cuitzeo en Michoacán.

Los índices de adsorción (ICA) de Clases 3 y 2 se presentan en mayor proporción; son similares en extensión las Clases 4 y 1. El ICA de Clase 4 se relaciona con los sitios de clase media de MO y clase muy alta de CIC, esto se ve favorecido por la presencia de suelos arcillosos de tipo Vertisol que se caracterizan por tener arcillas expandibles y se localiza en la zona sur-sureste; la capacidad de adsorción, en especial de cationes se debe a la interacción entre estos con la superficie de los coloides de arcilla y MO (Jordán, 2006), a mayor contenido de coloides en un suelo, mayor es la capacidad de intercambio catiónico (Ortiz, 2010). Los ICA de Clase 1 son los de menor capacidad de adsorción, ésta clase se encontró en sitios en donde la MO y la CIC son de clase más baja y media, respectivamente.

Los resultados del análisis estadístico básico se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Análisis estadístico básico de los suelos de la ribera del Lago de Cuitzeo.

	<i>Media</i>	<i>Error Estandar</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Superior</i>
pH	8.96175	0.177388	8.60295	9.32055
MO	5.92525	0.431314	5.05283	6.79767
CIC	44.8	2.03312	40.6876	48.9124

MO: materia orgánica; CIC: capacidad de intercambio catiónico.

CONCLUSIONES

La Clase 4 del ICA es la más favorable y se relaciona con los sitios con MO de clase media, CIC de clase muy alta y varios sitios con pH fuertemente alcalinos, localizados en la zona sur y sureste de la ribera del Lago de Cuitzeo. En estos sitios

La Clase 1 del ICA es la menos favorable dispersa en la zona noreste en donde la MO y la CIC son de clase más baja y media, respectivamente.

En la mayoría de los sitios se obtuvieron ICA de Clase 2 y 3 que sugieren un riesgo intermedio en la capacidad de adsorción de MP por las partículas de suelo que existen en el ambiente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar, E., A. D. 2019. Análisis de fuentes de metales pesados en suelos de una comunidad rural aledaña al Lago de Cuitzeo, usando sistemas de información geográfica y estadística multivariada. Tesis de Licenciatura. U.M.S.N.H.
2. Bautista F., Campuzano. E., Delgado C, y Goguitchaichvili A. 2017. Índices de sorción de metales pesados en suelos urbanos: el caso de Morelia, Michoacán. Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana.
3. Cabrera A., L. E. Medina, M. Alcalá, J. F. Sánchez y J. M. Ayala. 2010. Suelos. pp 42-45. *In*: Cram S., L. Galicia, I. Israde-Alcántara. Atlas de la cuenca del Lago de Cuitzeo: Análisis de su geografía y entorno socio ambiental.
4. Casillas C. M. 2011. Caracterización y análisis espacial de las propiedades de suelos urbanos contaminados por metales pesados. Tesis Licenciatura en la U.M.S.N.H.
5. Casillas, C. M. 2016. Metales pesados y su impacto en la población humana del municipio de Copándaro, Michoacán. Tesis de Maestría en Geociencias y Planificación del territorio. U.M.S.N.H.
6. Delgado, C., I. Israde A., F. Bautista, A. Gogichaishvili, C. Márquez, R. Cejudo e I. González. 2018. Distribución espacial de Fe, Li, Pb, Mn, V, y Zn en suelos urbanos de Morelia, Michoacán, México. *Rev. Int. Contam. Ambie.*, pp 427-440.
7. DOF (Diario Oficial de la Federación). Norma Oficial de Suelos. 2002. NOM-023-SEMARNAT-2001. Que especifica lineamientos para análisis de Fertilidad, Salinidad y Clasificación de Suelos.
8. Gallopin G. C. 2006. Los indicadores de desarrollo sostenible aspectos conceptuales y metodológicos. pp 11-13. Santiago de Chile: Fodepal. Recuperado de: [ftp.uta.cl/redcauquenes/cauquenes_estudio/Articulos/GALLOPIN_LOS_INDICADORES_DE_DESARROLLO_SUSTENTABLE_ASPECTOS_CONCEPTUALES_Y_METODOLOGICOS.pdf](ftp.uta.cl/redcauquenes/cauquenes_estudio/Articulos/GALLOPIN_LOS_INDICADORES_DE_DESARROLLO_SUSTENTABLE_ASPECTOS_CONCEPTUALES_Y_METODOLOGICOS.pdf)
9. García E. 2004. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Series de libros. Núm. 6. Instituto de Geografía, UNAM. México, D.F. Disponible en http://www.igeograf.unam.mx/sigg/utilidades/docs/pdfs/publicaciones/geo_siglo21/serie_lib/modific_al_sis.pdf
10. Garduño-Monroy V. H. y Isrrade-Alcantara I. 2010. Geología. Capítulo 1. Características físicas. *In*: Atlas de la Cuenca del Lago de Cuitzeo: Análisis de su Geografía y Entorno Socioambiental. ISBN: 978-607-02-1830-9.
11. Hernández M., N.S. 2018. Caracterización de elementos traza en suelos agrícolas en la ribera oeste del Lago de Cuitzeo. Tesis de Maestría en Ciencias. U.M.S.N.H.
12. Hernández T., T. 2023. Adsorción de elementos potencialmente tóxicos y propiedades químicas en suelos al oriente del Lago de Cuitzeo. Tesis de Licenciatura. U.M.S.N.H.
13. Jordán L. A., 2006. Manual de Edafología. Depto. de cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola. Universidad de Sevilla.
14. Ortiz-Villanueva, B., C. A. Ortiz S. 2010. Edafología. 7ª ed. en español. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Suelos. México, D. F. V. A Gómez C. (Ed).
15. Quintero E. C. 2002. Dosificación del Fósforo según Tipos de Suelos. Informaciones agronómicas del cono sur, N° 16. Disponible en: [http://www.ipni.net/ppiweb/iaarg.nsf/\\$webindex/CEF961F84A80520903256CB000481488/\\$file/nota2.pdf](http://www.ipni.net/ppiweb/iaarg.nsf/$webindex/CEF961F84A80520903256CB000481488/$file/nota2.pdf) (Revisado el 09 de junio de 2024).
16. Vidal. R. 2010. Clima *In*: Atlas de la Cuenca del Lago de Cuitzeo: Análisis de su Geografía y Entorno Socioambiental. ISBN: 978-607-02-1830-9.
17. Wild A. 1989. Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell. Ed. Mundi-prensa, Madrid 1047 p.

DETERMINACIÓN DE LA SUPERVIVANCIA DE LOS AISLADOS DE *AZOTOBACTER* SP. EN PRESENCIA DE HIDROCARBUROS

Jesús Manuel Tadeo Antonio¹, Dalia Molina Romero², Liliana López Pliego³, Miguel Castañeda Lucio⁴, Verónica Cepeda Cortejo⁵

Facultad de Ciencias Biológicas - BUAP^{1,2,5}, ICUAP-BUAP^{3,4} Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

jesus.tadeo@alumno.buap.mx

RESUMEN

Los hidrocarburos derivados del petróleo son contaminantes comunes, que ponen en peligro a los ecosistemas terrestres y acuáticos, debido a su sedimentación y liberación en el ambiente¹. Los derrames accidentales del petróleo crudo y sus derivados causan serios problemas ambientales en el agua y el suelo². Para contrarrestar este problema se han utilizado tratamientos fisicoquímicos que son costosos y presentan una eficiencia limitada³; una alternativa biotecnológica, es la biorremediación, donde se utilizan agentes biológicos para metabolizar, inmovilizar o extraer los contaminantes en cuestión. La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* se ha estudiado como agente biorremediador debido a su gran capacidad catabólica, con pocos requerimientos abióticos y una fácil adaptación a condiciones adversas; sin embargo, es una bacteria patógena⁴.

En el presente estudio se propone analizar tres cepas de *Azotobacter* sp. S4Ta, SM3.2 y la cepa tipo AEIV para evidenciar la supervivencia en presencia de dos hidrocarburos. Las cepas se aislaron de la biosfera de la reserva de Tehuacán, Puebla.

Se realizó un experimento de crecimiento bacteriano en diferentes concentraciones de hidrocarburos (gasolina y diésel). El tratamiento control utilizó sacarosa como fuente de carbono óptima, además de tres tratamientos independientes con concentraciones del 1, 2 y 3% de gasolina; así como otros tres tratamientos donde se emplearon como fuente de carbono al diésel al 1, 2 y 3%. Los cultivos tuvieron una incubación de 192 horas y se determinó la población bacteriana (log UFC/ml) cada 24 horas.

Los datos arrojaron que el aislado de S4Ta toleró el 1 y 2 % de diésel, generando una población de 1.87×10^8 UFC/ml, por el contrario, al 3 % se observó un descenso de la población en dos órdenes de magnitud; Por otro lado, la bacteria S4Ta resistió el 1 y 2 % de gasolina, produciendo una población de 1×10^7 UFC/ml, sin embargo, al 3% se produjo estrés bacteriano y la muerte de la bacteria *Azotobacter* sp. S4Ta. El aislado *Azotobacter* sp. SM3.2 mostró mayor tolerancia al 3% de ambos hidrocarburos con una población en el orden 5.95×10^8 UFC/ml. Por último, la cepa tipo AEIV mostró poca tolerancia a los hidrocarburos durante las primeras 48 horas de crecimiento; sin embargo, a las 192 horas de incubación, mostró supervivencia en diésel al 3% y a la gasolina a una concentración del 2%.

En base a los resultados, podemos concluir que, *Azotobacter* sp. es un género bacteriano no patógeno que puede resistir y sobrevivir en presencia de hidrocarburos, es importante puntualizar que *Azotobacter* sp. S4Ta presentó mayor tolerancia al diésel y el aislado SM3.2 sobrevivió a la presencia de ambos hidrocarburos al 3%.

INTRODUCCIÓN

El medio ambiente presenta un deterioro progresivo, cuyas causas principales son la explotación demográfica, industrialización, urbanización y turismo, asociado a estos aspectos se incrementa el consumo del petróleo y sus derivados, los cuales generan residuos que favorecen la acumulación de desechos tóxicos principalmente en el suelo (Vásquez et al., 2010).

Existen numerosas tecnologías de remediación de suelos contaminados y de acuerdo a Volke y Velasco (2002) se pueden agrupar en 3 tipos: a) biológicos (biorremediación, bioestimulación, fitorremediación, biolabranza, etc), en donde las actividades metabólicas de ciertos organismos permiten la degradación, transformación o remoción de los contaminantes a productos metabólicos inocuos; b) fisicoquímicos (electrorremediación, lavado, solidificación/estabilización), aquí se toma ventaja de las propiedades físicas y químicas de los contaminantes para destruir, separar o contener la contaminación; y c) térmicos (incineración, vitrificación, desorción térmica), en los cuales se utiliza calor para promover la volatilización, quemar, descomponer o inmovilizar los contaminantes.

Sin duda existen diversas alternativas reportadas como efectivas para la descontaminación, pero para seleccionar la tecnología de remediación adecuada se debe tener en consideración: a) características del sitio, b) tipo de contaminante, concentración y características fisicoquímicas, c) propiedades fisicoquímicas y tipo de suelo a tratar y d) costo (Volke y Velasco, 2002).

Para contrarrestar el deterioro ambiental se han generado soluciones biotecnológicas, como la biorremediación, que es un proceso metabólico de transferencia de electrones, necesarios para el crecimiento microbiano (Gadd, 2010), donde los residuos o contaminantes se oxidan mediante la actividad enzimática microbiana que cataliza la transferencia de electrones (Vidali, 2001).

El petróleo es considerado como uno de los contaminantes más perjudiciales para el medio ambiente. En el caso del suelo, la contaminación por hidrocarburos impide el intercambio gaseoso con la atmósfera, afectando diferentes procesos fisicoquímicos, como la evaporación y la capilaridad, que, dependiendo del tipo de hidrocarburos, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida pueden convertirse en procesos lentos, ocasionando toxicidad en los suelos y aguas contaminadas (Vásquez *et al.*, 2010).

Diversos géneros bacterianos pueden participar de este proceso de biorremediación, entre ellas se destaca *Pseudomonas aeruginosa* debido a su gran versatilidad en el uso de fuentes de carbono (Tonini *et al.*, 2010, Olivera y Alves, 2013). *P. aeruginosa* usa un amplio rango de compuestos orgánicos a inorgánicos para su metabolismo lo que le permite aprovechar muchos tipos de sustratos varios considerados tóxicos, como hidrocarburos alifáticos y aromáticos, aparte de ser resistente a metales pesados, antimicrobianos y detergentes (Ruiz, 2007, Martinez *et al.*, 2010).

TEORÍA

En la biorremediación la disponibilidad de nutrientes es uno de los principales factores limitantes que impiden la degradación de los contaminantes en los hábitats naturales (Chandra *et al.*, 2013). Carbono (C), nitrógeno (N) y el fósforo (P), estos son nutrientes necesarios para mantener la actividad metabólica óptima en las bacterias. En un sitio contaminado con hidrocarburos de petróleo, el suministro de carbono aumenta; sin embargo, la cantidad de nitrógeno y fósforo disminuyen drásticamente. Para que el proceso de biodegradación microbiana sea eficaz, los sitios contaminados deben cumplir con el requisito de una relación C: N :P en el rango 100:10:1 (Chandra *et al.*, 2013, Fernández, 2012).

El uso generalizado de petróleo causa serios problemas ambientales. Algunos compuestos se degradan fácilmente, los alcanos de cadena larga y, en particular, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), son relativamente resistentes a la degradación. Las técnicas de biorremediación basadas en el uso de microorganismos capaces de degradar contaminantes presentan dos ventajas en comparación con los procesos fisicoquímicos, la biorremediación bacteriana es económicamente viable y menos dañina para el ambiente (Cui *et al.*, 2014).

Las bacterias diazotróficas del género *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Aquaspirillum*, *Marinobacter*, *Dietzia* y *Alcanivorax* han sido utilizadas en procesos de biorremediación, además, son capaces de compensar la limitación de nitrógeno mediante el proceso biológico de fijación de nitrógeno en suelos contaminados con diésel (Al-Bader *et al.*, 2013; Al-Mailem *et al.*, 2010, 2013; Eckford *et al.*, 2002)

Por otra parte, las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) se aplican en la agricultura de forma incrementada, ya que representan una herramienta eficaz para reemplazar o disminuir el uso de fertilizantes químicos, pesticidas y otros suplementos dañinos (Ansari *et al.*, 2017, Ansari y Mahmood, 2019).

Algunas especies del género *Azotobacter* son consideradas como PGPR; este género está formado por bacterias aeróbicas Gram negativas y fijadoras de nitrógeno de vida libre que habitan en el suelo. Tienen formas bacilares o esféricas y forman quistes de paredes gruesas (células latentes resistentes a condiciones nocivas) en condiciones ambientales desfavorables (Martyniuk y Martyniuk, 2003). Se sabe que estas bacterias reducen el nitrógeno atmosférico para la síntesis de proteínas celulares, y que se mineralizan en el suelo, proporcionando a las plantas o cultivos una parte considerable del nitrógeno disponible en el suelo (Aquilanti *et al.*, 2004).

Asimismo, un estudio realizado por Kizilkaya (2009) demostró que los contenidos de carbono y azufre del suelo aumentaron en respuesta a la presencia con especies de *Azotobacter* al acelerar la mineralización de los residuos orgánicos del suelo, lo que posteriormente redujo la absorción de metales pesados en el suelo.

Además de la fijación biológica de nitrógeno (BNF), las especies de *Azotobacter* pueden influir directamente en el crecimiento de las plantas mediante la síntesis de hormonas de crecimiento. Estas hormonas no solo pueden mejorar el crecimiento de las plantas y la absorción de nutrientes, también pueden proteger indirectamente a las plantas hospedadoras de fitopatógenos y estimular la interacción con otros microorganismos beneficiosos de la rizosfera (Sahoo *et al.*, 2014; Arora *et al.*, 2018). Igualmente, las cepas de *Azotobacter* mostraron efectos positivos sobre el crecimiento de las plantas, el rendimiento de los cultivos y los requisitos de nitrógeno en varios cereales y legumbres (maíz, arroz y trigo) económicamente importantes, alcanzando una mejora significativa del rendimiento (hasta un 40%) (Choudhury y Kennedy, 2004; Kannan y Ponmurungan, 2010; Wani y Ali, 2013; Ritika y Utpal, 2014).

En el ecosistema del suelo, las poblaciones de *Azotobacter* sp. se ven afectados por parámetro fisicoquímicos como la materia orgánica, el pH, la temperatura, la profundidad del suelo, la humedad del suelo y la salinidad del suelo (Kizilkaya, 2009). En respuesta a la temperatura, *Azotobacter* es un organismo mesófilo típico que crece a temperaturas óptimas de 25 a 30°C (Saribay, 2003). A un pH menor a 6 disminuye la población de *Azotobacter* (Andjelkovic' *et al.*, 2018). El pH óptimo es de 7 a 7.5, que favorece las funciones fisiológicas de *Azotobacter*, aun pH menor de 6 es estresante y disminuye la población a 10^2 y 10^4 por gramo de suelo (Becking, 2006).

PARTE EXPERIMENTAL

Se reactivaron las células de las cepas de *Azotobacter vinelandii* (AEIV, S4Ta, SM3.2) a partir de glicerol, que se encontraban conservadas a -20°C. Se tomaron 30 μ l del glicerol y se sembraron en una placa con medio rico PY suplementado con ácido nalidíxico (10 mg/ml). Las placas se incubaron durante 24 horas a 30°C. Las cepas se resembraron en placas con medio mínimo Burk Sacarosa (BS) suplementado con ácido nalidíxico (10 mg/ml), utilizando la técnica de estría cruzada. Las placas se incubaron durante 48 horas a 30°C.

Una vez reactivadas las cepas, se prepararon los pre-inóculos. Se utilizaron tubos cónicos de 50 ml con 10 ml de medio líquido PY suplementado con ácido nalidíxico (10 mg/ml). Se realizaron los pre-inóculos de cada cepa por triplicado. Los pre-inóculos se incubaron durante 24 horas a 30°C.

Los cultivos se establecieron con 25 ml de medio líquido BS, se emplearon diferentes fuentes de carbono, y fueron inoculados a partir del precultivo, con una población bacteriana equivalente a una D.O de 0.02, las condiciones de incubación fueron de 30°C, a 160 rpm durante 192 horas.

Se aplicaron los siguientes tratamientos a cada cepa de *Azotobacter* sp. S4Ta, *Azotobacter vinelandii* AEIV (cepa tipo) y *Azotobacter* sp. SM3.2, por triplicado:

Tratamiento	Fuente de Carbono	de	Porcentaje	Vol. Final por Matraz
1.- Control Positivo	Sacarosa	-	-	25 ml
2.- Control Negativo	Sin Fuente de Carbono	-	-	
3.- Hidrocarburo	Gasolina / Diésel	1%	1%	
		2%	2%	
		3%	3%	

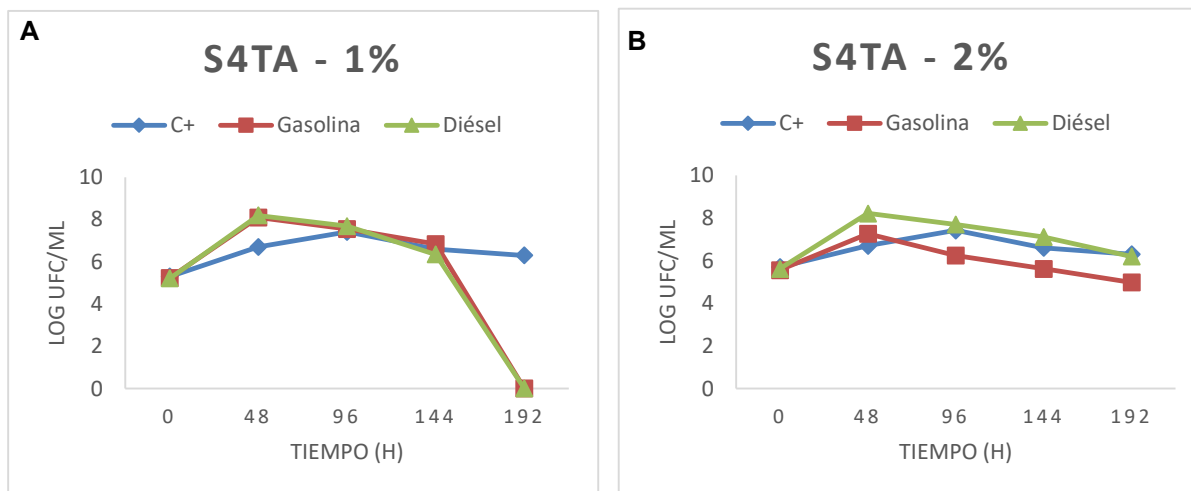
Los cultivos bacterianos fueron evaluados cada 24 horas por un periodo de 192 horas, mediante la técnica de Goteo en placa por sellado masivo (GSPM) (Corral et al., 2012) y los resultados se reportaron en UFC/mL.

RESULTADOS

Azotobacter sp. S4Ta toleró el 1% y 2% de diésel, al 1% de ambos hidrocarburos la población alcanzó la mayor población 1.87×10^8 UFC/ml a las 48 horas de cultivo, así como, al 2% de diésel (Figura 1 A y B); sin embargo, cuando las bacterias estuvieron en contacto con gasolina al 2% la población se mantuvo en 2.3×10^7 UFC/ml, un orden de magnitud menor en comparación con el tratamiento con diésel a las 48 horas de inoculación. *Azotobacter* sp. S4Ta al 3% de diésel obtuvo la población máxima de 5.68×10^8 UFC/ml a las 168 horas y en esta condición se mantuvo la viabilidad de las bacterias.

Por el contrario, la cepa S4Ta en presencia de gasolina al 3% se observó la máxima población a las 48 horas (7.49×10^7 UFC/ml), posteriormente la población descende drásticamente hasta las 162 horas (4.0×10^5 UFC/ml) (Figura 1C).

El crecimiento de la cepa tipo registró la mayor población a las 96 horas con 9.68×10^8 UFC/ml, en presencia de sacarosa (fuente de carbono óptima) y la población descendió un orden de magnitud a 168 horas (Figura 1).



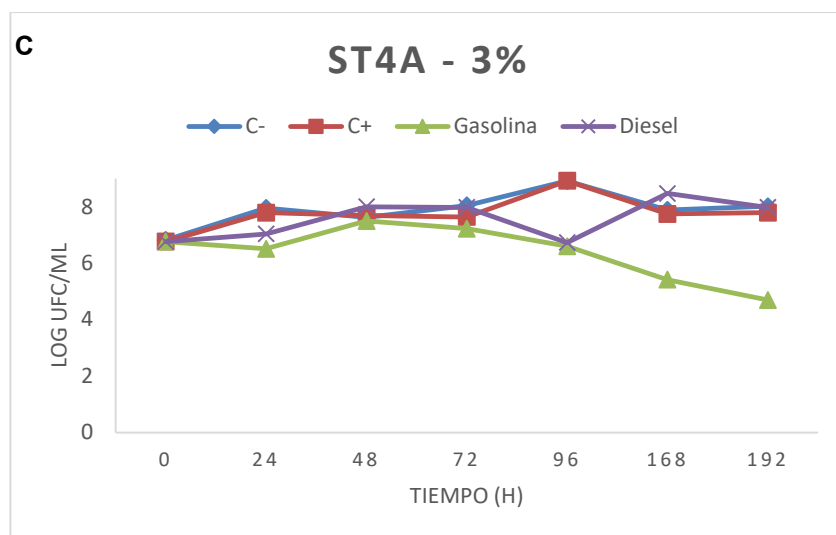


Figura 1. Tolerancia de *Azotobacter vinelandii* S4Ta a Gasolina y Diésel. A: concentración de la fuente de carbono al 1% (línea con rombos azules (C+) es el control positivo, línea con cuadros anaranjados la fuente de carbono es gasolina, línea con triángulos grises la fuente de carbono es diésel). B: concentración de la fuente de carbono al 2% (con línea rombos azules (C+) es el control positivo, línea con cuadros anaranjados la fuente de carbono es gasolina, línea con triángulos grises la fuente de carbono es diésel). C: concentración de la fuente de carbono al 3% (línea con rombos azules (C-) es el control negativo, línea con cuadros anaranjados (C+) es el control positivo, la línea con triángulos grises la fuente de carbono es gasolina, la línea con cruces amarillas la fuente de carbono es diésel).

La cepa tipo *Azotobacter vinelandii* AEIV mostró mayor tolerancia a los hidrocarburos al 2 y 3%, la cepa produjo la máxima población 5.2×10^6 UFC/ml en gasolina y diésel al 2%, a las 48 horas de crecimiento, posteriormente la población decreció de forma discreta hasta 1.0×10^5 UFC/ml a las 192 horas de incubación; sin embargo, *Azotobacter vinelandii* AEIV mostró un crecimiento similar con diésel al 3% y con la sacarosa, alcanzó la máxima población a las 48 horas de incubación con una población de 1.0×10^8 UFC/ml y la población se mantuvo constante hasta las 192, tiempo en que se desarrolló el experimento. Cuando la cepa tipo creció en gasolina al 3%, la población máxima (9.6×10^7 UFC/ml) se alcanzó hasta las 72 horas de incubación, y la población se mantuvo constante a lo largo del experimento (Figura 2B).

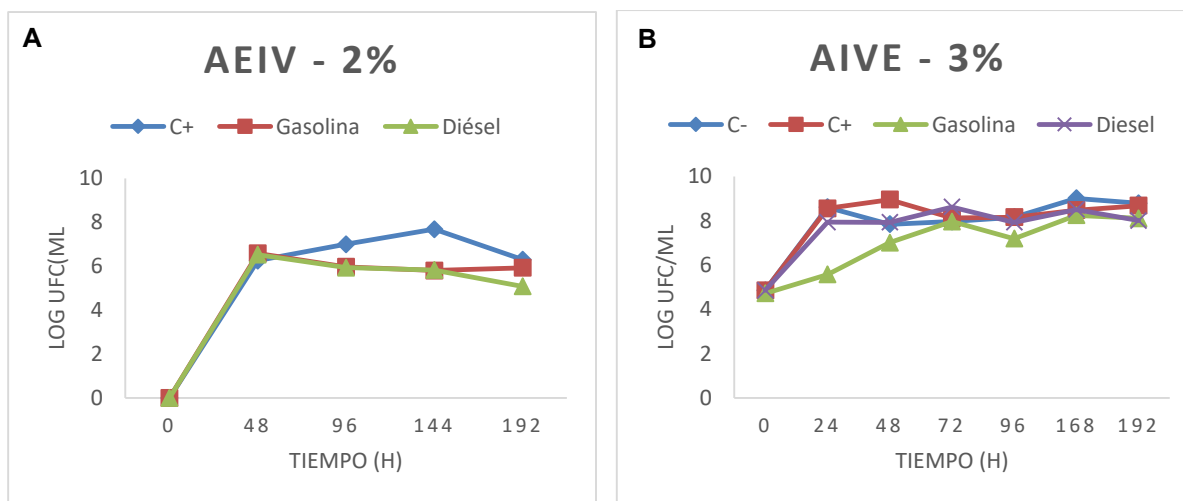


Figura 2. Tolerancia de *Azotobacter vinelandii* AEIV a Gasolina y Diésel. A: concentración de la fuente de carbono al 2% (línea con rombos azules (C+) es el control positivo, línea con cuadros anaranjados la fuente de carbono es gasolina, línea con triángulos grises la fuente de carbono es diésel). B: concentración de la fuente de carbono al 3% (línea con rombos azules (C-) es el control negativo, línea con cuadros anaranjados (C+) es el control positivo, la línea con triángulos grises la fuente de carbono es gasolina, la línea con cruces amarillos la fuente de carbono es diésel). *Azotobacter* sp. SM3.2 mostró tolerancia y crecimiento con ambos hidrocarburos al 3%, en diésel al 3% y en sacarosa (fuente de carbono óptima) la mayor población fue de 1.0×10^9 UFC/ml a las 48 horas de crecimiento y la población se mantuvo constante hasta las 192 horas en que se desarrolló el experimento (Figura 3); asimismo, cuando *Azotobacter* sp. SM3.2 creció en presencia de gasolina al 3% la población máxima se alcanzó a las 48 horas de crecimiento, sin embargo la población (1.0×10^8 UFC/ml) fue un orden de magnitud menor en comparación con los otros dos tratamientos, la población se mantuvo constante durante las siguientes horas del experimento (Figura3).

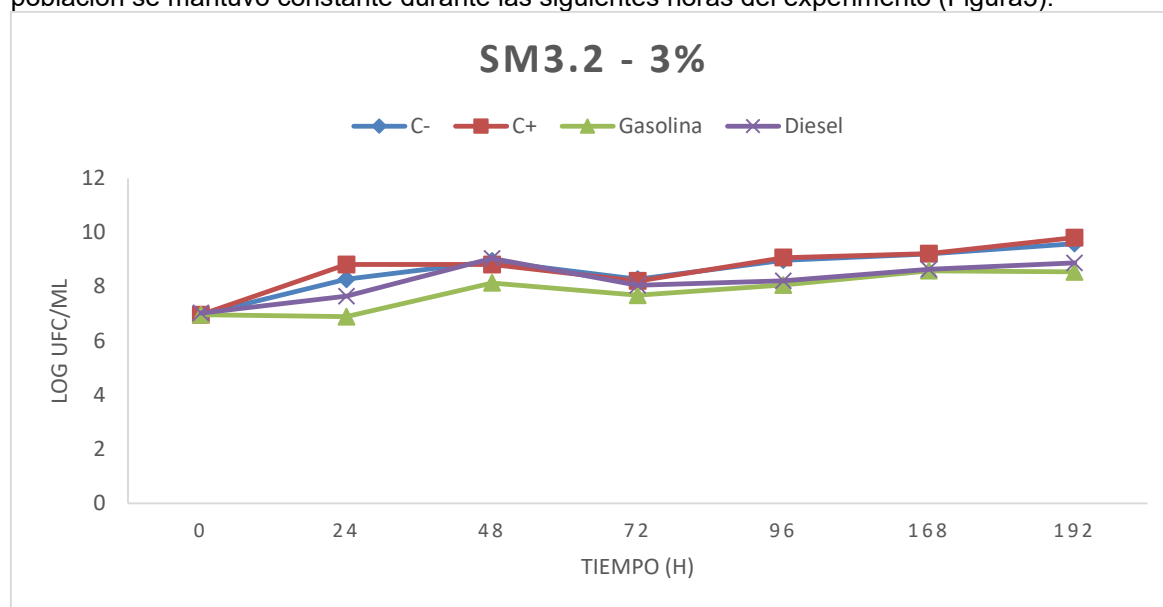


Figura 3. Tolerancia de *Azotobacter vinelandii* SM3.2 a Gasolina y Diésel. Concentración de la fuente de carbono al 3% (línea con rombos azules (C-) es el control negativo, línea con cuadros anaranjados (C+) es el control positivo, la línea con triángulos grises la fuente de carbono es gasolina, la línea con cruces amarillos la fuente de carbono es diésel).

CONCLUSIONES

Las cepas de *Azotobacter vinelandii* AEIV tipo y SM3.2 pueden sobrevivir y crecer en presencia de hidrocarburos como diésel y gasolina en concentraciones de 1 al 3% sin generar muerte celular. Para el caso particular de *Azotobacter vinelandii* S4Ta también tolera y crece en presencia de los anteriores hidrocarburos al 1 y 2% y en diésel al 3%. Finalmente se sugiere que *Azotobacter vinelandii* es una bacteria potencialmente útil para la biorremediación en presencia de hidrocarburos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Z. Cui, G. Cui, W. Xu, Q. Gao, B. Li, G. Yang and L. Zheng, *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 2014, 91, 45–51.
2. Wu, H.; Xie, L.; Wu, Y.; Chen, L.; Jiang, B.; Chen, X.; Wu, Y. *Improving cleaner production of human activities to mitigate total petroleum hydrocarbons accumulation in coastal environment*. *Mar. Pollut. Bull.* 2023, 186, 114473.

3. Ashok, A.; Cusack, M.; Saderne, V.; Krishnakumar, P.K.; Rabaoui, L.; Qurban, M.A.; Duarte, C.M.; Agusti, S. *Accelerated burial of petroleum hydrocarbons in Arabian Gulf blue carbon repositories*. Sci. Total Environ. 2019, 669, 205–212.
4. Luján, D. (2019). *Uso de Pseudomonas aeruginosa en biorremediación*. Bio Tecnología, 23(1), 32-42.
5. Andjelković, S., Vasića, T., Radovića, J., Babića, S., Markovića, J., Zornića, V., & Djurić, S. (2018). *Abundance of azotobacter in the soil of natural and artificial grasslands*. Solut. Proj. Sustain. Soil Manage, 172.
6. Ansari, R. A., & Mahmood, I. (Eds.). (2019). *Plant health under biotic stress: volume 1: organic strategies*. Springer.
7. Ansari, R. A., Rizvi, R., Sumbul, A., & Mahmood, I. (2017). *PGPR: current vogue in sustainable crop production*. Probiotics and plant health, 455-472.
8. Aquilanti, L., Favilli, F., & Clementi, F. (2004). *Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of Azotobacter from soil samples*. Soil Biology and biochemistry, 36(9), 1475-1483.
9. Becking, JH (2006). "La familia Azotobacteraceae ", en *The Prokaryotes: Volumen 6: Proteobacteria: Subclase Gamma* , eds M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer y E. Stackebrandt (Nueva York, NY: Springer), 759–783. doi: 10.1007/0-387-30746-X_26
10. Corral-Lugo, A., Morales-García, Y. E., Pazos-Rojas, L. A., Ramírez-Valverde, A., Martínez-Contreras, R. D., & Muñoz-Rojas, J. (2012). *Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de "Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo"*. Revista Colombiana de Biotecnología, XIV(2), 147-156.
11. Gadd GM (2010) *Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation*. Microbiology. 156: 609–643.
12. Kannan, T. y Ponmurugan, P. (2010). Respuesta de variedades de arroz (Oryza sativa L.) a la inoculación de *Azospirillum brasilense*. J. Fitol. 2, 8-13
13. Kennedy, IR, Choudhury, ATM y Kecskés, ML (2004). Diazotrofos bacterianos no simbióticos en sistemas agrícolas: ¿se puede aprovechar mejor su potencial para promover el crecimiento de las plantas? Biol del suelo. Bioquímica. 36, 1229-1244. doi: 10.1016/j.soilbio.2004.04.006
14. Kizilkaya, R. (2009). *Nitrogen fixation capacity of Azotobacter spp. strains isolated from soils in different ecosystems and relationship between them and the microbiological properties of soils*. J. Environ. Biol, 30(1), 73-82.
15. Martínez A, Cruz M, Veranes O, Carballo ME, Salgado I, Olivares S, Lima L & Rodríguez D (2010) *Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares*. Rev. CENIC. Cien. Biol. 41: 1-10
16. Martyniuk, S., & Martyniuk, M. (2003). Occurrence of *Azotobacter* spp. in some Polish soils. *Polish Journal of Environmental Studies*, 12(3), 371-374.
17. Oliveira RM & Alves F (2013) *Diversidade microbiana utilizada na biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados*. Acervo da Iniciação Científica 3: 1-14.
18. Ritika, B. y Utpal, D. (2014). Biofertilizante, un camino hacia la agricultura orgánica: una revisión. África. J. Microbiol. Res. 8, 2332–2343. doi: 10.5897/AJMR2013.6374 Robson, RL, Eady, RR,
19. Ruíz L (2007) *Pseudomonas aeruginosa, aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos*. Tesis de doctorado en Microbiología Molecular. Universidad de Barcelona. Barcelona. pp. 1-180.
20. Sahoo, R. K., Ansari, M. W., Dangar, T. K., Mohanty, S., & Tuteja, N. (2014). *Phenotypic and molecular characterisation of efficient nitrogen-fixing Azotobacter strains from rice fields for crop improvement*. Protoplasma, 251, 511-523.
21. Saribay, G. F. (2003). *Growth and nitrogen fixation dynamics of Azotobacter chroococcum in nitrogen-free and OMW containing medium*. Spesifikasi Kompos dari Sampah Organik Domestik.
22. Tonini RMCW, de Rezende CE & Grativol AD (2010) *Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão*. Oecol. Aust. 14: 1025-1035.
23. Vásquez MC, Guerrero-Figueroa JT & Quintero AP (2010) *Biorremediación de lodos contaminados con aceites lubricantes usados*. Rev. Col. Biotecnol. 2: 141-157.

24. Vázquez MC, Prada PA & Mondragon MA (2010) *Optimización del proceso de compostaje de productos post-cosecha (cereza) del café con la aplicación de microorganismos nativos*. Nova. 8: 213-219.
25. Vidali M (2001) Bioremediation. An overview. Pure. Appl. Chem. 73: 1163–1172.
26. Volke T. y Velasco J. (2002). *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. Instituto Nacional de Ecología, México, 64 pp.
27. Wani, S. y Ali, T. (2013). Uso potencial de *Azotobacter chroococcum* en la producción de cultivos: una descripción general. actual. Agrícola. Res. J. 1, 35–38. doi: 10.12944/CARJ.1.1.04

ESTUDIO DE LAS GLUCOSIDASAS SECRETADAS POR UN HONGO AISLADO DE UN CONSORCIO FÚNGICO

Juan Magaña Martínez¹, Lérica Liss Flores Villavicencio¹, José Pedro Castruita Domínguez², Juan Luis Pichardo Molina³ y Julio César Villagómez Castro²

¹ Departamento de Biología, DCNE, Universidad de Guanajuato, ² Departamento de Ecología, CUCBA, Universidad de Guadalajara, ³ Centro de Investigaciones en Óptica, A. C. León
j.maganamartinez@ugto.mx; castroj@ugto.mx

RESUMEN

Actualmente, la producción de polímeros a partir de combustibles fósiles se ha incrementado para satisfacer las necesidades del consumo creciente de plásticos; generando residuos y gases de efecto invernadero que alteran los ecosistemas. El problema se potencia cuando el uso para el que se crearon estos productos finaliza; desechándolos en el ambiente con la consecuente alteración en los ciclos tróficos de las especies residentes. Para evitarlo, la biotecnología ofrece como alternativa su procesamiento por microorganismos capaces de secretar enzimas que los degraden en compuestos inocuos, que utilizarán estos organismos. Este proceso, denominado biorremediación, brinda una pauta para el desarrollo de las sociedades sustentables. En este sentido, en el grupo de investigación se tiene un consorcio fúngico recuperado en una solución acuosa con PET pulverizado, del cual se han obtenido cultivos axénicos de diferentes aislados. Uno de ellos, denominado A7, previamente caracterizado morfológicamente, pertenece al género *Penicillium*, y es capaz de secretar enzimas hidrolíticas de polímeros naturales. Este resultado nos indujo a su caracterización bioquímica, motivo del presente trabajo, donde se planteó como objetivo la caracterización parcial de las glucosidasas secretadas por A7. Para llevar a cabo el objetivo, el hongo se cultivó en placas de agar con MMM (Medio Mínimo de Mathur) durante 7 días, adicionalmente se realizó el crecimiento en MMM líquido pH 4.5 utilizando como fuente de carbono polímeros naturales (celofán dulce, carboximetilcelulosa y celulosa microcristalina) y glucosa como control. Los medios inoculados se incubaron a 28 °C bajo dos condiciones: agitación (125 rpm) y condiciones estáticas. Cada semana durante 21 días se tomó una alícuota del cultivo, recuperando el sobrenadante libre de células por centrifugación (2655 g, 10 min, 4 °C); en el cual se cuantificó la proteína secretada. Posteriormente, se determinaron las actividades enzimáticas utilizando como sustratos, derivados de la 4-metilumbeliferona (4-MU) acoplada a celobiosa o glucosa. La fluorescencia liberada se determinó en un espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS-5B (λ_{exc} , 350nm; λ_{em} , 440 nm) cuantificando, mediante interpolación en una curva de calibración con 4-MU. Se analizaron constantes cinéticas en función de temperatura, tiempo cantidad de sustrato. Nuestros resultados mostraron mayor actividad enzimática con el sustrato de β -glucosidasa cuando se utilizó el SN del cultivo en carboximetilcelulosa, seguido de los realizados con celofán dulce y celulosa microcristalina como fuente de carbono. Por lo que la caracterización de la glucosidasa se realizó en el SN del aislado A7 crecido con carboximetilcelulosa. Tras 21 días de incubación, la actividad de β -glucosidasa, en el SN libre de células, fue mayor con 30 minutos de incubación, a temperatura de 60°C y 4-metilumbeliferil-glucósido 10 μ M como sustrato. Indicando estos resultados que el aislado A7 muestra degradación de residuos celulósicos semejante a otros hongos filamentosos descritos en la literatura dentro del género *Penicillium*.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, varios países presentan el problema de la contaminación por el crecimiento de la población, la exigencia en la calidad de vida y la industrialización. En México se tiene una problemática importante por la contaminación del agua, aire y suelo, la mayor parte de este problema es debido a que diariamente se desechan grandes volúmenes de residuos plásticos y gran parte de este volumen no es tratado o su tratamiento es casi nulo (Cristán Frías *et al.*, 2003). Los polímeros tienen una gran demanda de producción por el crecimiento demográfico y, lamentablemente, con la misma velocidad que se demandan se desechan. Se estima que alrededor de 100 millones de toneladas de plásticos se producen anualmente en México y cerca de 30 millones corresponden a material de empaque, es decir, material que solo cubre al producto principal y que, por su corta vida,

va a parar en el mejor de los casos, en los rellenos sanitarios, ya que, de no ser así, quedarán dispersos en el medio ambiente (Rodríguez Alba *et al.*, 2021).

Para mitigar el daño que han generado los polímeros naturales y sintéticos a los ecosistemas y las especies que en ellos habitan se ha hecho uso de la biotecnología, ya que, con ella se opta por procesos sustentables en lugar de los procesos tradicionales. La biotecnología utiliza microorganismos como hongos, bacterias o algas, para degradar estos residuos contaminantes presentes actualmente en los ecosistemas (Rodríguez Gonzales *et al.*, 2022). Su principal herramienta son las enzimas secretadas por los microorganismos modelo, los cuales utilizan el contaminante o residuo contaminante y lo transforman en metabolitos menos tóxicos, lo secuestran metabólicamente o los convierten en compuestos inocuos para el medio ambiente, propiciando así que ninguna especie se vea comprometida (Vandera & Koukkou, 2017).

La biorremediación usa diferentes organismos para transformar los contaminantes en metabolitos inocuos o utilizarlos como fuente de nutrientes necesarios para su crecimiento y funciones metabólicas, de tal forma que ya no representan un riesgo en el ecosistema. Algunos de los organismos más utilizados en la biorremediación son plantas, levaduras, hongos y bacterias (Torres Rodríguez, 2003). Algunas de las especies más utilizadas en la biorremediación de los hidrocarburos en el suelo o agua, son *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Serratia* y *Proteus* (Castillo Rogel *et al.*, 2020). En este sentido, una bacteria ampliamente estudiada por su gran batería enzimática degradadora del tereftalato de polietileno (PET) es *Ideonella sakaiensis*, la cual adicionalmente tiene la capacidad de degradar bisfenol A, así como su análogo el bisfenol S, siendo posibles sustratos de la PET hidrolasa (PETasa) y la mono(2-hidroxietil) tereftalato hidrolasa (MHETasa) secretadas por esta bacteria (Pop *et al.*, 2023).

Algunas especies de hongos también contribuyen en la biorremediación ya que gracias a su capacidad de adaptabilidad y de generar enzimas hidrolíticas, posibilitan la degradación de sustancias complejas a moléculas simples, como es el caso de *Aspergillus flavus* DDN, el cual ha sido ampliamente estudiado debido a su potencial degradador de metales pesados en agua, realizando procesos de bioadsorción, bioacumulación y biotransformación, además de secretar enzimas que catalizan la degradación de Cr(VI), Pb(II), Zn(II), Cd(II) y Mg (Anupong *et al.*, 2022).

Las enzimas secretadas por estos organismos y particularmente las enzimas fúngicas secretadas por la matriz extracelular han demostrado tener ventajas sobre el uso como tal del hongo en cuestión debido a que, al hacer uso, en los procesos de biorremediación, de las enzimas secretadas, estas pueden catalizar reacciones que conllevan mucho tiempo si se expusiera el microorganismo completo a los agentes que se requieran tratar (Chávez *et al.*, 2013). Las hidrolasas son enzimas de interés biológico, ampliamente usadas en los procesos de biorremediación, ya que catalizan reacciones de ruptura de enlaces químicos mediante la incorporación de una molécula de agua. Dentro de este gran grupo de enzimas se encuentran las celulasas, que pertenecen a la superfamilia de las glicosilhidrolasas, las cuales catalizan la hidrólisis del enlace glucosídico y son secretadas por algunos hongos filamentosos. Estas enzimas tienen diferentes sitios activos y cada una recibe un nombre distinto. Las endoglucanasas cortan al azar polisacáridos generando oligosacáridos; las exoglucanasas actúan en los extremos reductores y no reductores del polisacárido liberando celobiosa y, las β -glucosidasas hidrolizan la celobiosa a glucosa (Gutiérrez Rojas *et al.*, 2015).

En este sentido, en nuestro grupo de investigación tenemos un consorcio fúngico recuperado de una suspensión acuosa de PET pulverizado, del que se obtuvieron diferentes aislados capaces de degradar polímeros naturales y sintéticos. Al mantener estos aislados en cultivo axénico observamos que pueden degradar polímeros mediante las enzimas que secretan (Silva Rodríguez, 2019; Pérez Méndez, 2021; Calderón Tinajero, 2023). Uno de los aislados, el denominado A7 (aislado 7), fue previamente caracterizado morfológicamente, sugiriendo su pertenencia al género *Penicillium*, presentando, además, un patrón de proteínas secretadas diferencial cuando se cultiva en presencia de polímeros celulósicos como fuente de carbono. Estas proteínas presentan pesos moleculares de los 108 a los 18 kDa (Magaña Martínez *et al.*, 2023). Motivo por el cual se

inició su caracterización bioquímica con base en la caracterización parcial de las glucosidasas secretadas, objetivo general de este trabajo.

PARTE EXPERIMENTAL

Cultivo de A7 en MMM

A partir de un cultivo axénico del aislado 7 en agar TYI, se inoculó este hongo en Medio Mínimo de Mathur (MMM) pH 4.5, durante 7 días a 28 °C.

Crecimiento del aislado A7 en MMM adicionado con diferentes polímeros naturales y sintéticos

Se prepararon matraces Erlenmeyer de 25 mL conteniendo 8 mL de MMM líquido y adicionando como fuente de carbono, polímeros naturales y sintéticos al 0.1% p/v (celofán dulce (CD), celofán amargo (CA), carboximetilcelulosa (CMC), celulosa microcristalina (Avicel, ®, CEL) y como control se utilizó la glucosa (GLC), como única fuente de carbono. Se inocularon los matraces con un bocado de 7 mm de diámetro del aislado A7 en fase de crecimiento radial y se incubó por 21 días bajo dos condiciones de cultivo: estático y agitación a 125 rpm, ambos a 28 °C. Cada semana se tomó una alícuota para posteriores ensayos. Al término de la incubación el medio de cultivo se recuperó y se centrifugó a 2655 g por 10 minutos a 4 °C, los sobrenadantes libres de células (SN) se recolectaron en alícuotas de 2 mL. Los SN y las pastillas se colocaron a -20 °C para su posterior análisis.

Determinación de la proteína total secretada

En los SN recuperados se determinó la proteína por el método de Lowry *et al.* (1951). Para ello, previamente se realizó una curva de calibración con Albúmina Sérica Bovina (BSA), en el rango de 0 a 20 µg.

Análisis de la actividad enzimática de las glucosidasas

La actividad total y secretada de las celulasas y glucosidasas se determinó utilizando sustratos derivados de la 4-metilumbeliferona (4-MU) acoplada a celobiosa (4-MU-Celo, 4-metilumbeliferil-β-celobiósido) y a glucosa (4-MU-Glc, 4-metilumbeliferil-β-D-glucopiranosido) utilizando un rango de concentración de 5 - 20 mM en solución amortiguadora citrato-fosfato 150 mM, pH 4.5, y en un volumen de reacción de 200 µL. La mezcla se incubó durante 1 hora a 45 °C y al término de la incubación, la reacción se paró adicionando 2.3 mL de solución amortiguadora de bicarbonato de sodio-hidróxido de sodio, 0.1 M, pH 10.4. La 4-MU liberada del sustrato se cuantificó en condiciones alcalinas. La fluorescencia liberada se determinó en un espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS-5B (λ_{exc} 350nm; λ_{em} 440 nm), interpolando los valores de fluorescencia en una curva de calibración realizada con 4-MU en condiciones alcalinas (Hernández Guzmán *et al.* 2016).

Caracterización parcial de la β-glucosidasa del aislado A7

A partir de la fracción libre de células del aislado A7, SN recuperado del cultivo del hongo en MMM adicionado con CMC como fuente de carbono, se caracterizó parcialmente la actividad secretada de β-glucosidasa y de celobiosidasa (endocelulasa), utilizando el sustrato 4-MU-Glc y el 4-MUCelo, respectivamente; evaluando diferentes parámetros: concentración de proteína; tiempo de incubación, (30, 60 y 120 minutos); temperatura, (37, 45 y 60 °C) y concentración de sustrato (5, 10 y 15 mM) y, siguiendo el mismo procedimiento anteriormente descrito para determinar la actividad enzimática.

RESULTADOS

Crecimiento del aislado A7 en MMM adicionado con diferentes polímeros naturales y sintéticos

Se analizó el crecimiento de A7 en MMM, adicionado con polímeros naturales y sintéticos como fuente de carbono, durante 21 días en diferentes condiciones de cultivo: estático y agitación. En la Figura 1, se muestra el crecimiento macroscópico a diferentes tiempos 7, 14 y 21 días, indicando con cruces el crecimiento cualitativo en base a la cantidad de la masa micelial observada en la

superficie del cultivo y la turbidez del medio. En el cultivo estático se obtuvo un mayor crecimiento con celofán amargo (CA, +++) y celulosa microcristalina (CEL, +++), seguidos del celofán dulce (CD, ++) y la carboximetilcelulosa (CMC, ++); mientras que en condiciones de agitación se observó una mayor masa micelial con CD (+++) y CEL (+++), seguidos de CA (++) y CMC (++)

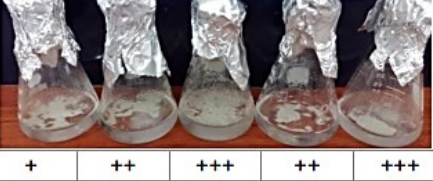
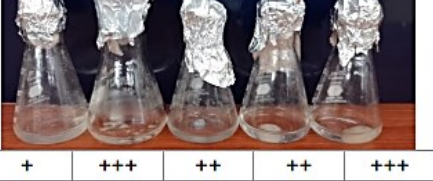
Condición	Estático					Agitación				
Incubación	GLC	CD	CA	CMC	CEL	GLC	CD	CA	CMC	CEL
0 días										
7 días										
14 días										
21 días										
Crecimiento	+	++	+++	++	+++	+	+++	++	++	+++

Figura 1. Cultivo de A7 en polímeros naturales y sintéticos en condición de agitación y estático a 28°C. Celofán dulce (CD), celofán amargo (CA), carboximetilcelulosa (CMC), celulosa microcristalina (Cel) y como control se utilizó la glucosa (GLC).

Determinación de la proteína secretada por A7 en diferentes condiciones de cultivo

Se determinó la proteína presente en cada uno de las alícuotas de SN recuperados cada semana, durante 21 días, de los cultivos incubados en condiciones estáticas (Tabla 1) y agitación (Tabla 2). En condiciones estáticas el control, cultivo en presencia de glucosa como fuente de carbono, presenta la mayor cantidad de proteína secretada a las dos semanas de incubación en condiciones estáticas y una disminución a la tercera semana; en cambio, en condiciones de cultivo en agitación, a la tercera semana se alcanzó la mayor cantidad de proteína secretada, si bien, un poco menor que la observada en condiciones estáticas a las dos semanas de incubación.

Particularmente, en condiciones de cultivo estático, se obtuvo una mayor cantidad de proteína secretada en presencia de carboximetilcelulosa $\geq$ celofán dulce a las tres semanas de incubación. En cambio, en condiciones de cultivo en agitación, el celofán amargo $\geq$ celulosa microcristalina, presentaron la mayor cantidad de proteína secretada. Si bien, con valores muy semejantes en los máximos obtenidos en ambas condiciones, en función del polímero utilizado como fuente de carbono. Cabe hacer notar que, en todos los casos, a la tercera semana de cultivo se observó una mayor cantidad de proteína secretada en los cultivos en presencia de polímero con respecto a los realizados con glucosa como fuente de carbono. Cabe aclarar que los resultados son el promedio de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

Tabla 1. Proteína secretada por A7 en cultivo estático en presencia de los diferentes polímeros utilizados como fuente de carbono

Cultivo estático		
	Polímero	Proteína (µg/µL)
Semana 1	Glucosa (GLC)	0.0525
	Celofán Dulce (CD)	0.0426
	Celofán Amargo (CA)	0.0243
	Carboximetilcelulosa (CMC)	0.0294
	Celulosa (CEL)	0.0636
Semana 2	Glucosa (GLC)	0.1354
	Celofán Dulce (CD)	0.0995
	Celofán Amargo (CA)	0.0995
	Carboximetilcelulosa (CMC)	0.0901
	Celulosa (CEL)	0.1311
Semana 3	Glucosa (GLC)	0.0940
	Celofán Dulce (CD)	0.1513
	Celofán Amargo (CA)	0.1355
	Carboximetilcelulosa (CMC)	0.1598
	Celulosa (CEL)	0.1483

n = 2

Tabla 2. Proteína secretada por A7 en cultivo en agitación en presencia de los diferentes polímeros utilizados como fuente de carbono

Cultivo en agitación		
	Polímero	Proteína (µg/µL)
Semana 1	Glucosa (GLC)	0.0324
	Celofán Dulce (CD)	0.0610
	Celofán Amargo (CA)	0.0290
	Carboximetilcelulosa (CMC)	0.0452
	Celulosa (CEL)	0.0644
Semana 2	Glucosa (GLC)	0.0807
	Celofán Dulce (CD)	0.1153
	Celofán Amargo (CA)	0.1256
	Carboximetilcelulosa (CMC)	0.0897
	Celulosa (CEL)	0.1224
Semana 3	Glucosa (GLC)	0.1154
	Celofán Dulce (CD)	0.1265
	Celofán Amargo (CA)	0.1637
	Carboximetilcelulosa (CMC)	0.1299
	Celulosa (CEL)	0.1436

n = 2

Determinación de la actividad enzimática secretada de β -glucosidasa y celobiosidasa

Los SN recuperados cada semana bajo ambas condiciones de cultivo, estático y agitación, y a los cuales se determinó la proteína secretada, fueron utilizados para cuantificar la actividad enzimática de β -glucosidasa y celobiosidasa (Tabla 3, 4 y 5). Si bien, en ambas condiciones de cultivo y, desde la primera semana de incubación, se observó crecimiento del hongo cultivado en presencia de glucosa como control y en los diferentes polímeros utilizados como fuente de carbono, se observaron diferencias con respecto a la actividad enzimática de β -glucosidasa y celobiosidasa.

Particularmente, solamente se detectó actividad de ambas enzimas, β -glucosidasa y celobiosidasa, en el cultivo crecido en presencia de carboximetilcelulosa como fuente de carbono o en celofán dulce. En la semana 1, la actividad de total secretada de β -glucosidasa por el hongo en presencia de CMC como fuente de carbono fue muy semejante, si bien se observaron diferencias en cuanto a las condiciones de cultivo, siendo un poco mayor la actividad específica en condiciones estáticas. En cuanto a la actividad de celobiohidrolasa el comportamiento fue muy similar. En cambio, en los cultivos con otras fuentes de carbono no se detectó actividad enzimática.

En el SN recuperado la semana 2 se detectó actividad de ambas enzimas en las dos condiciones de cultivo, estático y en agitación, tanto en presencia de celofán dulce como de carboximetilcelulosa. Usando el celofán dulce como sustrato, se observó una muy baja actividad de β -glucosidasa en condiciones de agitación y diez veces mayor en el cultivo estático. En cambio, en la determinación de celobiosidasa, sólo se observó actividad enzimática en condiciones de agitación. Con respecto al cultivo en presencia de carboximetilcelulosa como sustrato, la actividad de β -glucosidasa fue casi la misma bajo condiciones estáticas de cultivo, o bien bajo agitación. Sin embargo, en lo que respecta a la actividad de celobiohidrolasa, la actividad específica y total mostró un ligero incremento en condiciones de cultivo estático con respecto al cultivo en agitación. Un valor residual de celobiohidrolasa se observó con celulosa microcristalina en cultivo estático.

Tabla 3. Actividad enzimática secretada por A7 en la semana 1 en cultivo estático y en agitación en presencia de los diferentes polímeros utilizados como fuente de carbono

Semana 1			β -glucosidasa		Celobiosidasa	
	Fuente de Carbono adicionada al MMM		Act. Específica (nmoles 4-MU/mg/min)	Act. Total (nmoles 4-MU/min)	Act. Específica (nmoles 4-MU/mg/min)	Act. Total (nmoles 4-MU/min)
Agitación	Glucosa (G)		ND	0	ND	0
	Celofán dulce (CD)		ND	0	ND	0
	Celofán amargo (CA)		ND	0	ND	0
	Carboximetilcelulosa (CMC)		4.3395	1.5696	1.8721	0.6772
	Celulosa cristalina (C)		ND	0	ND	0
Estático	Glucosa (G)		ND	0	ND	0
	Celofán dulce (CD)		ND	0	ND	0
	Celofán amargo (CA)		ND	0	ND	0
	Carboximetilcelulosa (CMC)		6.2252	1.4642	2.3567	0.5543
	Celulosa cristalina (C)		ND	0	ND	0

ND, no detectado, n = 2

Tabla 4. Actividad enzimática secretada por A7 en la semana 2 en cultivo estático y en agitación en presencia de los diferentes polímeros utilizados como fuente de carbono

Semana 2			β -glucosidasa		Celobiosidasa	
	Fuente de Carbono adicionada al MMM		Act. Específica (nmoles 4- MU/mg/min)	Act. Total (nmoles 4- MU/min)	Act. Específica (nmoles 4- MU/mg/min)	Act. Total (nmoles 4- MU/min)
Agitación	Glucosa (G)		ND	0	ND	0
	Celofán dulce (CD)		0.1674	0.1544	0.9310	0.8588
	Celofán amargo (CA)		ND	0	ND	0
	Carboximetilcelulosa (CMC)		2.1734	1.5589	1.3247	0.9501
	Celulosa cristalina (C)		ND	0	ND	0
Estático	Glucosa (G)		ND	0	ND	0
	Celofán dulce (CD)		0.9226	1.4724	ND	0
	Celofán amargo (CA)		ND	0	ND	0
	Carboximetilcelulosa (CMC)		2.2136	1.5953	2.0863	1.5036
	Celulosa cristalina (C)		ND	0	0.8551	0.8969

ND, no detectado, n = 2

Al fin de la incubación en la semana 3, en condiciones de agitación se detectó actividad de β -glucosidasa en el SN del cultivo en presencia de celofán dulce con un valor 3 veces mayor que el de la semana 2, sin embargo, no se detectó actividad de celobiohidrolasa. Cuando el cultivo se realizó en presencia de carboximetilcelulosa como fuente de carbono, la actividad de β -glucosidasa fue muy semejante en ambas condiciones de cultivo, agitación o estático, y menor que la observada en la semana 2. Por otra parte, la actividad de celobiohidrolasa disminuyó significativamente con respecto a la semana 2, sin mostrar variación aparente entre las condiciones de agitación o cultivo estático.

Tabla 5. Actividad enzimática secretada por A7 en la semana 3 en cultivo estático y en agitación en presencia de los diferentes polímeros utilizados como fuente de carbono

Semana 3			β -glucosidasa		Celobiosidasa	
	Fuente de Carbono adicionada al MMM		Act. Específica (nmoles 4- MU/mg/min)	Act. Total (nmoles 4- MU/min)	Act. Específica (nmoles 4- MU/mg/min)	Act. Total (nmoles 4- MU/min)
Agitación	Glucosa (G)		ND	0	ND	0
	Celofán dulce (CD)		0.5726	0.5795	ND	0
	Celofán amargo (CA)		ND	0	ND	0
	Carboximetilcelulosa (CMC)		1.1442	1.1892	0.1340	0.1392
	Celulosa cristalina (C)		ND	0	ND	0
Estático	Glucosa (G)		ND	0	ND	0
	Celofán dulce (CD)		ND	0	ND	0
	Celofán amargo (CA)		ND	0	ND	0
	Carboximetilcelulosa (CMC)		0.9541	1.2200	0.3049	0.3899
	Celulosa cristalina (C)		ND	0	ND	0

ND, no detectado, n = 2

Caracterización parcial de la β -glucosidasa del aislado A7

Para caracterizar bioquímicamente la actividad enzimática del aislado A7, se utilizó el SN recuperado al final de la incubación del hongo con carboximetilcelulosa como fuente de carbono, y comparando la actividad enzimática en condiciones de cultivo estático o en agitación.

Bajo este tiempo de incubación y como se mostró en la Tabla 5., la actividad de β -glucosidasa era significativamente mayor que la actividad de celobiosidasa, la cual parece ser lábil o bien, se secreta en los primeros tiempos del cultivo (1 semana). Con base en estos resultados solo se caracterizó la actividad de β -glucosidasa, determinándose los parámetros cinéticos de tiempo y temperatura de incubación y finalmente la concentración óptima de sustrato.

Como se muestra en la Tabla 6. el tiempo óptimo para determinar la actividad enzimática fue de 30 minutos, tanto en el SN obtenido bajo condiciones estáticas de incubación como el que fue obtenido

del cultivo en agitación. Sin embargo, cabe notar que la actividad específica fue mayor en el cultivo estático con respecto al cultivo en agitación.

Tabla 6. Actividad secretada de β -glucosidasa por A7 cultivado con CMC como fuente de carbono en función del tiempo de incubación de la reacción

β -Glucosidasa	Estático		Agitación	
	Act.	Específica	Act.	Específica
Tiempo	(nmoles	4-	(nmoles	4-
	MU/mg/min)		MU/mg/min)	
30 min	3.70		2.82	
60 min	0.96		1.29	
120 min	0.43		0.60	

n = 2

Una vez analizado que el mejor tiempo de incubación para la determinación de actividad enzimática era de 30 minutos de incubación, se procedió a determinar la temperatura óptica, incubando la reacción a diferentes temperaturas como se muestra en la Tabla 7. Bajo condiciones de cultivo estático la mayor actividad se obtuvo a 60 °C y en condiciones de agitación a 45 °C, son un valor por la mitad del obtenido en el cultivo estático.

Tabla 7. Actividad secretada de β -glucosidasa por A7 cultivado con CMC como fuente de carbono en función de la temperatura de incubación

β -Glucosidasa	Estático		Agitación	
	Act.	Específica	Act.	Específica
Temperatura	(nmoles	4-	(nmoles	4-
	MU/mg/min)		MU/mg/min)	
30 °C	2.26		ND	
45 °C	1.07		1.14	
60 °C	2.53		0.10	

ND, no detectado, n = 2

Una vez determinada la temperatura optima de incubación se procedió a determinar la concentración del sustrato, utilizando 3 concentraciones de este (5, 10 y 15 mM) como se observa en la Tabla 8, la actividad enzimática mostro un valor proporcional al incremento de la concentración del sustrato, y con base en ello se sugiere utilizar para próximos experimentos la concentración de 10 mM.

Tabla 8. Actividad secretada de β -glucosidasa por A7 cultivado con CMC como fuente de carbono en función de la concentración del sustrato

β -Glucosidasa	Estático		Agitación	
	Act.	Específica	Act.	Específica
Concentración de sustrato (mM)	(nmoles	4-	(nmoles	4-
	MU/mg/min)		MU/mg/min)	
5	0.49		0.57	
10	0.88		0.72	
15	1.26		1.30	

n = 2

CONCLUSIÓN

El aislado A7 del género *Penicillium* muestra un crecimiento diferencial en los polímeros celulósicos ensayados, dependiendo de la condición de cultivo (estático o agitación). Se determinó que es capaz de secretar al menos 2 enzimas celolíticas (β -glucosidasa y celobiohidrolasa), las cuales secreta a partir de la primera semana de incubación y posteriormente disminuye su actividad, ya sea porque son degradadas por las condiciones del cultivo (temperatura, tiempo, cambio de pH) o por enzimas proteolíticas secretadas por el hongo. Al caracterizar la actividad de β -glucosidasa se observó que las condiciones óptimas de reacción son un tiempo de incubación de 30 minutos, temperatura de 60 °C y concentración de sustrato de 10 μ M. Estos resultados se deben confirmar con más ensayos y utilizando las condiciones óptimas de actividad, para determinar el potencial biotecnológico de este aislado como organismo que se pudiese usar como agente biorremediador.

Agradecimientos

Agradezco estímulo de investigación y vinculación otorgado por la Universidad de Guanajuato en la convocatoria de becas y estímulos estudiantiles 2023 con folio 01897/2023 en el periodo enero – junio 2023. Y a los recursos otorgados gracias al Proyecto CBF2023-2024-3070 de CONACYT

BIBLIOGRAFÍA

A. Cristán Frías, I. Ize, & A. Gavilán. La situación de los envases de plástico en México. Gaceta Ecológica, 2003. (69), 67-82.

A. Hernández Guzmán, A. Flores Martínez, P. Ponce Noyola, & J. C. Villagómez-Castro, Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from *Sporothrix schenckii*. FEBS Open Bio, 2016. 6(11), 1067–1077.

C.E. Pop, G. Deák, C. Maria, G. Ghiță, A.A. Ivanov, S. Fendrihan, D.F. Mihăilescu, M. Mernea. *Ideonella sakaiensis* Can Metabolize Bisphenol A as a Carbon Source. Microorganisms. 2023. 30;11(12):2891.

D. Torres Rodríguez. El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. Ecosistemas, 2003. XII (2), 1-5.

E. Rodríguez Alba, A. E. Bernal Dubón, H. E. Gaitán López, C. A. Kim Godoy, J.B Salguero Mérida, E. M. Toledo Hernández, A. Martínez Richa. La Ciencia de los Polímeros Biodegradables. JÓVENES EN LA CIENCIA, 2021. Volumen 10

E. Vandra, A.I. Koukkou Respuesta de la comunidad bacteriana a la contaminación por hidrocarburos en suelos y sedimentos marinos: una revisión crítica de estudios de casos. En: Cravo-Laureau, C., Cagnon, C., Lauga, B., Duran, R. (eds) Ecotoxicología microbiana. Springer, 2017. Cham.

G. Chávez, N. Estrada, Gómez, R. Choque, C. Crespo, & M. T. Álvarez,. Potencial de cepas fúngicas aisladas en el área de Biotecnología Fúngica. Primera parte: Uso de hongos en biorremediación. Revista CON-CIENCIA, 2013. 1(1), 85–91.

I. Gutiérrez Rojas, N. Moreno Sarmiento, & D. Montoya, Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. Revista Iberoamericana de Micología, 2015. 32(1), 1–12.

I. M. Calderón Tinajero. Caracterización de la actividad celulítica en un aislado fúngico. Tesis de Licenciatura (2023). Universidad de Guanajuato.

J. Magaña Martínez, N. Jaime Martínez., L.L. Flores Villavicencio, J.P. Castruita Domínguez, P. Ponce Noyola, J.L. Pichardo Molina, J.C. Villagómez Castro. COMPARACIÓN DE PROTEÍNAS FÚNGICAS SECRETADAS POR EL AISLADO FUNGICO A7 BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO. *Naturaleza Y Tecnología*, 2023 10(4). Universidad de Guanajuato.

M. L. Pérez Méndez. Caracterización bioquímica y molecular de diferentes aislados fúngicos. Tesis de licenciatura. 2021. Universidad de Guanajuato

O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951. 193(1):265-75.

R. T Castillo Rogel. F. J. More Calero, M. Cornejo La Torre, J.N. Fernández Ponce, & E.L. Mialhe Matonnier. Aislamiento de bacterias con potencial biorremediador y análisis de comunidades bacterianas de zona impactada por derrame de petróleo en Condorcanqui – Amazonas – Perú. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 2020. 22(3), 2015–2225.

Rodríguez Gonzales, A., Zárate Villarroel, S. G, & Bastida Codina, A. (2022). Biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para realizar biorremediación. *Revista de Ciencias Ambientales*, 56(1), 178–208.

Silva Rodríguez, A.V. Caracterización de microorganismos degradadores de PET. (Tesis de pregrado). 2019. Universidad de Guanajuato.

W. Anupong, K. Jutamas, R. On-Uma, M. Alshiekheid, A. Sabour, R. Krishnan, N.T. Lan Chi, A. Pugazhendhi, K. Brindhadevi. Bioremediation competence of *Aspergillus flavus* DDN on pond water contaminated by mining activities. *Chemosphere*. 2022 Oct; 304:135250

ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS MEDIOS DE CULTIVO PARA LA CONSERVACIÓN DE CEPAS DE TRABAJO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA QFB-UMSNH

Patricia Yazmín Figueroa Chávez¹, Judith Ayala García¹ y Jaqueline Figueroa Chávez¹.

1.-Facultad de Químico Farmacobiología - Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

patricia.figueroa@umich.com

RESUMEN

Las bacterias para su conservación y aislamiento efectivo requieren de diferentes medios de cultivo cuya composición garantice el mantenimiento de todas las características genéticas, morfológicas y de identificación de las bacterias durante un periodo considerable de tiempo. Por ello, es importante, que estos medios de cultivo utilizados contengan todos los nutrientes esenciales para promover y favorecer el mantenimiento de las cepas de trabajo, sobre todo las que se utilizan de manera rutinaria en los Laboratorios. El objetivo es comparar dos medios de cultivo semisólidos para evaluar cual es el que ofrece un mejor rendimiento para la conservación de cepas de trabajo en el Laboratorio de Microbiología de QFB-UMSNH. La metodología es de tipo cuantitativa, longitudinal, descriptiva. De las cepas previamente aisladas en placas del medio BAB se pasaron por duplicado al medio comercial Stuart semisólido y al medio Stuart semisólido preparado en el Laboratorio de Microbiología para su conservación. Los tiempos de conservación y análisis fueron 2, 4, 6 y 8 meses, cada tiempo determinado se evaluaron las características de las cepas conservadas en función del crecimiento en los diferentes medios, morfología macro y microscópica y el comportamiento bioquímico. Los resultados analizados fueron de 8 meses de trabajo, respecto a la valoración del crecimiento en los medios de cultivo se obtuvo lo siguiente: el promedio del porcentaje de recuperación en el medio Stuart comercial fue abundante en un 46.6%, en un 30% moderada y en un 23.3% con crecimiento escaso. Para el medio Stuart preparado se obtuvo un promedio de crecimiento abundante del 33.3%, un crecimiento moderado del 26.6% y el 40% se mostró escaso. Al realizar la prueba estadística se obtuvo en p valor de 0.470 indicando diferencia significativa entre ambos medios. Se concluye, que ambos pueden ser utilizados como medios de conservación de las cepas de trabajo por un corto tiempo, sin embargo, el que tiene mejor rendimiento es el medio Stuart comercial, ya que la presentación del tubo permite tener una menor manipulación y además mantener viables las cepas por un tiempo aproximado entre 6 a 8 meses, en las condiciones propias del Laboratorio de Microbiología QFB-UMSNH.

INTRODUCCIÓN

Dentro de los principales retos de los laboratorios de microbiología es el mantenimiento de cepas bacterianas, se requiere de hacer múltiples ensayos o pruebas para mantenerlas viables.

Un Cepario, es un lugar donde se depositan los microorganismos (mo) para su conservación y mantenimiento. En estos ceparios no solo se almacenan cepas de referencia, también mo aislados, identificados y caracterizados a partir de muestras clínicas humanas e incluso las que se obtienen por medio de investigaciones⁽¹⁾.

La colección de mo es de suma importancia para el quehacer científico en cualquiera de sus ámbitos geográficos, por lo que, se debe verificar la viabilidad, pureza y características fenotípicas de la colección bacteriana del Laboratorio en cuestión para el fortalecimiento del carácter sustentable de futuras investigaciones en las que se requiera de estos microorganismos⁽¹⁾. Por ello, es importante analizar los diferentes medios de cultivo que se ofertan en el mercado como método alternativo de mantenimiento y conservación ya que son los sistemas más importantes para promover el crecimiento microbiano con nutrientes artificiales⁽²⁾, además, teniendo como principal objetivo que sea accesible económicamente, de fácil manejo y de un alto rendimiento para los fines con los que se van a utilizar en los laboratorios y así mismo, ver cuál es el tiempo (meses) promedio en el que las cepas se mantienen viables.

TEORIA

El cultivo de los microorganismos actualmente sigue siendo la única manera de determinar completamente sus características y su clasificación⁽⁴⁾. Para que este aislamiento sea efectivo es necesario cultivar en diferentes medios de cultivo⁽⁵⁾.

Se le conoce como cepas microbianas a todas las células procariotas que pertenecen a una misma especie, sin embargo, muestran ciertas diferencias genéticas que no se encuentran en los demás miembros de la misma especie, por lo que se hace uso de diferentes pruebas para su identificación⁽⁶⁾, estos no son ampliamente analizados y conservados para su uso futuro, pero algo muy importante, que deben ser conservados como una cepa pura. Un cultivo puro se le conoce como al conjunto de individuos obtenidos en cultivo puro descendientes de un solo aislamiento, también suele llamarse clon ya que son descendientes de esa cepa pura previamente identificada y clasificada⁽⁷⁾. Por ello, los medios de cultivo deben de proveer todos los nutrientes esenciales, siendo un conjunto de sustancias químicas complejas, de proteínas, sangre, vitaminas, minerales, suero, etc.⁽⁷⁾ así como, el ambiente favorable para los mo y estos puedan crecer^(7,8), es importante mencionar que para que el medio de cultivo sea efectivo es importante conocer la biología del mo, lugar de aislamiento, respuesta inmunitaria y calidad del medio de cultivo⁽⁹⁾.

Los medios deben de cumplir con ciertos objetivos como⁽⁸⁾:

- Favorecer en todo momento el crecimiento del mo de tal manera que se pueda comprobar todas las características macroscópicas y microscópicas de los mo en cuestión.
- Evidenciar y facilitar las reacciones bioquímicas que son demostrables tanto por observación directa como indirecta al agregar ciertos reactivos reveladores.
- Mantener a los mo en las mejores condiciones en cuanto transporte y el almacenamiento para su posterior aislamiento o conservación⁽⁸⁾.

Otro aspecto importante de considerar es la composición del medio⁽⁷⁾, de esto depende que se lleven a cabo todas las reacciones de crecimiento y las reacciones bioquímicas. Existen diferentes medios de cultivo dependiendo su propósito de uso^(7,8):

- Medios básicos
- Medios enriquecidos
- Medios selectivos, diferenciales y de enriquecimiento
- Medios especiales
- Medios de transporte y conservación⁽⁸⁾.

Si bien se proponen diferentes medios de acuerdo a su composición, también se proponen en cuanto a su consistencia que puede ser: Líquido, Sólido o semisólido y a su origen que son naturales, semisintéticos y sintéticos^(7,9).

Los más importantes para mantener y conservar a los mo es analizar los medios de transporte y conservación, estos tienen la finalidad de conservar las muestras para su posterior análisis microbiológico, estos medios evitan la multiplicación de microorganismo existentes en la muestra y a su vez impedir la muerte de los mo y estos permanezcan viables⁽⁷⁾, de las más comunes encontramos el Amies y el medio Stuart^(8,9).

El cultivo Stuart este clasificado como un medio de transporte y conservación, es un medio semisólido que contiene amortiguadores y como agente reductor el tioglicolato de sodio, estos componentes a su vez mantienen un pH favorable que impide la deshidratación de los mo recolectados de diferentes muestras humanas y evita la oxidación o autodestrucción enzimática de los patógenos presentes, es muy utilizado en muestras de exudados faríngeos, nasales, óticos, conjuntivales y heridas, su presentación es listo para su uso o en polvo granulado para su preparación en el laboratorio⁽⁹⁾.

Se requiere cumplir con diferentes características para poder conservar las cepas puras como^(6,7):

- Cultivo joven de una sola cepa.
- Pruebas tintoriales.
- Pruebas bioquímicas
- Estabilidad genética
- Medio de cultivo adecuado

- Temperatura adecuada^(7,8).

Todo lo antes mencionado y para poder lograr esta conservación, es necesario analizar los diferentes métodos de conservación, los medios de cultivo y el tiempo en meses de vida de las bacterias a fin de garantizar todas las características bacterianas intactas y evitar la variabilidad genética o en su caso la muerte de los microorganismos⁽⁷⁾.

Es importante conocer que tiempo de conservación es el adecuado en las cepas bacterianas, si bien estás en su crecimiento muestran un comportamiento natural en la fase de crecimiento, teniendo como prioridad que las bacterias se mantengan en la fase estacionaria, que es donde las bacterias alcanzan su madurez y optimización de nutrientes y evitando la última fase de declive (muerte)^(7,9). Para poder evitar que las bacterias mueran es importante analizar cada cierto periodo de tiempo la viabilidad de las bacterias⁽⁷⁾.

PARTE EXPERIMENTAL

El objetivo principal del trabajo es evaluar y comparar dos medios de cultivo para la conservación de cepas de trabajo en el Laboratorio de Microbiología QFB-UMSNH y poder disponer de un método sencillo y económico.

La metodología es de tipo cuantitativa, longitudinal, descriptiva.

La forma de trabajo general fue la siguiente:

1. Análisis de cultivos para su clasificación e identificación.
2. Aislamiento de cepas en medio BAB y por duplicado se tomó la cosecha en medio comercial Stuart y medio Stuart preparado.
3. Conservación de ambos medios en el lapso de 2, 4, 6 y 8 meses.
4. Cada tiempo determinado se evaluaron las características de las cepas conservadas (Crecimiento, morfología macro y microscópica, comportamiento bioquímico), de ambos medios utilizados.
5. Análisis de datos.

RESULTADOS

El análisis realizado a los diferentes medios de cultivo comenzó desde la preparación del medio Stuart en el Laboratorio de Microbiología, ya que se deben de garantizar que todo esté totalmente estéril antes de uso y post-inoculación de las cepas y la realización del pedido del medio Stuart al proveedor.

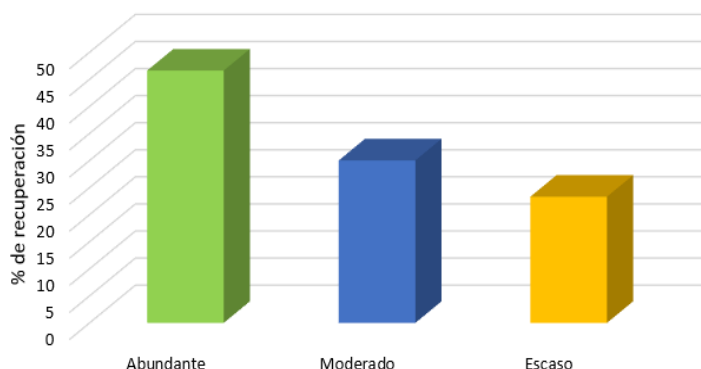
Actualmente se tienen en conservación 8 cepas puras, algunas Gram positivas y otras Gram negativas, las cuales no son exigentes nutricionalmente.

Toda vez que se tenían previamente identificadas se pasaron por estría cruzada a una placa de BAB y a las 24 horas de incubación y con el crecimiento obtenido, se levantó la cosecha con hisopos estériles para colocar en medio Stuart preparado y con el hisopo del medio comercial al tubo que se compró.

El periodo de evaluación consistió en diferentes periodos 2, 4, 6 y 8 meses, para con esos análisis decir cuál es el tiempo promedio en que las bacterias se mantienen viables y antes de que mueran volver a aislar y poner en nuevos medios y volver a conservar, y así sucesivamente repetir cada que se requiere.

En la figura 1, muestra el porcentaje promedio de la recuperación de las bacterias en el medio Stuart comercial en los meses de 2, 4, 6 y 8 meses.

Figura 1. Recuperación en medio Stuart-comercial

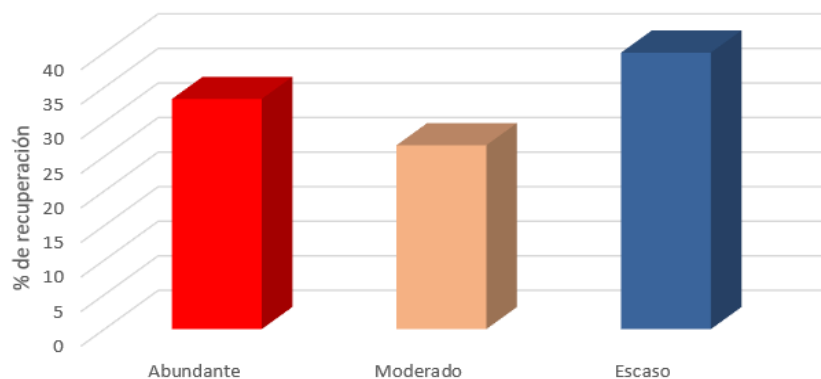


Fuente: Elaboración propia de los datos obtenidos en el Lab de Microbiología UMSNH.

Para la valoración del crecimiento se realizó de manera semicuantitativa para ambos medios, consistió en sembrar en placas de BAB se incubaron durante 24 horas y se valoró el promedio de crecimiento. Observar figura 1 y 2.

En la Figura 2, muestra el porcentaje promedio del crecimiento bacteriano en el medio Stuart preparado en el Laboratorio de Microbiología en el periodo de tiempo de 2, 4, 6 y 8 meses.

Figura 2. Recuperación en medio Stuart-preparado



Fuente: Elaboración propia de los datos obtenidos en el Lab de Microbiología QFB-UMSNH.

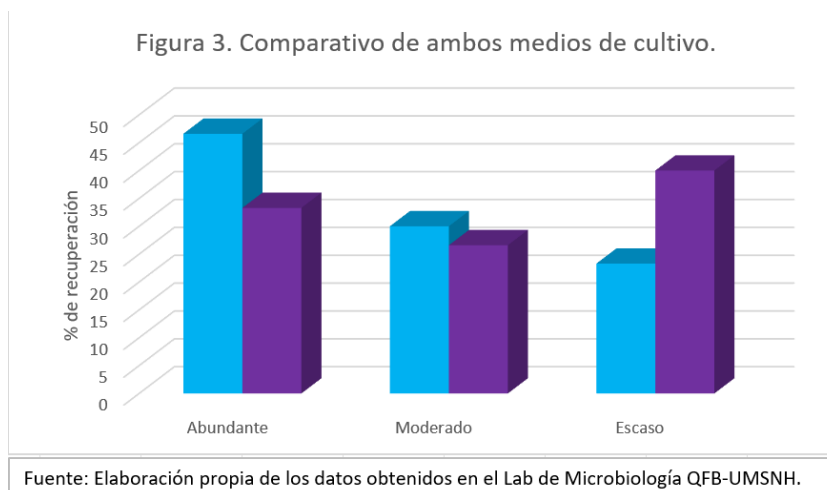
El análisis de datos se concentró en la tabla 1, se clasificó como crecimiento abundante al crecimiento que se mostraba en todas las estrías realizadas, de manera moderada al crecimiento donde solo en 2 estrías había crecimiento y en las demás estrías colonias aisladas y como escaso al crecimiento en una sola estría y en las demás muy pocas colonias aisladas, se compararon las que se habían conservado en medio Stuart preparado y el Stuart comercial, para el caso del Stuart comercial fue donde se obtuvo una mejor recuperación abundante con el 46% en comparación con el medio Stuart preparado con abundante solamente el 33.3%, el medio que se preparó el mayor porcentaje lo obtuvo en el crecimiento escaso con un 40%.

Tabla 1. Comparativo de recuperación en ambos medios.

	Abundante	Moderado	Escaso
%Stuart-comercial	46.6	30	23.3
%Stuart-preparado	33.3	26.6	40

Fuente: Elaboración propia de los datos obtenidos en el Lab de Micro QFB-UMNSH.

En la figura 3, se muestra de manera gráfica el comparativo del promedio de ambos medios en cuanto a crecimiento, observándose que el medio Stuart comercial tiene un mejor porcentaje de recuperación de manera abundante y moderada en comparación con el otro medio de cultivo.



Por último, se realizó el tratamiento estadístico para ver si hay diferencia significativa en la recuperación de las bacterias cada determinado tiempo en comparación con el medio Stuart comercial y el Stuart preparado, los datos no son normales, por ello se decide hacer la prueba de Wilcoxon obteniendo un p valor de 0.470 al ser un p valor mayor a 0.05, se dice que no hay diferencia significativa entre ambos medios y estos pueden ser utilizados para el propósito de conservación de cepas en un periodo que va de 2 a 8 meses manteniendo sus características genéticas de cada una de las cepas.

En la tabla 2, se muestra los resultados de la prueba estadística de Wilcoxon.

Tabla 2. Estadísticos de contraste^a

	STUARTPREPARADO - STUARTCOMERCIAL
Z	-.722 ^b
Sig. asintót. (bilateral)	.470

a. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

b. Basado en los rangos negativos

Fuente: Elaboración propia de datos obtenidos en el del Lab de Microbiología QFB-UMSNH

CONCLUSIONES

Se concluye, de acuerdo al procesamiento estadístico que ambos medios de cultivo pueden ser utilizados como medios de conservación de las cepas de trabajo por un corto tiempo, sin embargo, al analizar los datos del medio Stuart comercial se tiene un mejor rendimiento, ya que en un 46% se obtuvo crecimiento de manera abundante, esto puede ser por la presentación del tubo permite tener una menor manipulación y además mantener viables las cepas por un tiempo aproximado entre 6 a

8 meses, en las condiciones propias del Laboratorio de Microbiología QFB-UMSNH. Por otro lado se concluye que quizá el medio Stuart preparado lo que se ha de valorar ahora es que si desde el momento de preparar y el manipular sea que no se obtiene un buen porcentaje de recuperación, que de todos modos se obtiene en un 33.3% y permite el aislamiento de bacterias y estas puedan ser utilizadas en el Laboratorio de Microbiología de QFB-UMSNH.

REFERENCIAS

1. Gutiérrez-Jiménez J, Luna-Cazáres LM, Mendoza-Orozco MI, Díaz-Marina GdJ, Burguete-Gutiérrez JC, Feliciano-Guzmán JM. Organización, mantenimiento y preservación de la Colección de Cultivos Bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), México. Rev. Soc. Ven. Microbiol. [Internet]. 2015 Dic; 35(2): 95-102. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562015000200007&lng=es.
2. Casado-González Ma. Torrico-Cabezas G., Medina-Anguita M., Medios de cultivo en el laboratorio de microbiología. 2012. <https://libroslaboratorio.wordpress.com/wp-content/uploads/2012/09/medios-de-cultivo-en-un-laboratorio-de-microbiologc3ada.pdf>
3. Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología médica. 25ª. Edición. México. 2010, pp65
4. Ordóñez-Smith M. Guías prácticas para los laboratorios de Bacteriología clínica. Editorial Médica Panamericana.
5. COPISA. Cepa microbiológica: qué es y cuáles son los métodos de conservación. 2021 <https://copisa.com.mx/tipos-de-cepas-microbianas/>
6. De la Rosa M, Prieto J, Navarro JM. Microbiología en Ciencias de la Salud, conceptos y aplicaciones. 3ra edición. ELSEVIER. Ámsterdam, 2011. Pp11
7. Bailon-Lira L., González-Meléndez RC., Cervantes-Sandoval A., Atlas de pruebas bioquímicas para identificar las bacterias. Universidad Autónoma de México. 2003, pp. 16-23
8. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología Médica. 7ma edición. ELSEVIER. Ámsterdam, 2013. Pp 22
9. López-López R. Manejo y transporte de muestras microbiológicas. ELSEVIER, Septiembre 2001. Vol 20. Núm 8. Pp 122-127 <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-manejo-transporte-estras-microbiologia-13018375>

MONITOREO Y EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA EN PRODUCTOS DE BELLEZA DE ACUERDO A LA NOM-089-SSA1-1994

Eunice Muñoz Vázquez¹, Rubén Octavio Méndez Márquez¹, Rosalinda Gutiérrez Hernández²

¹Programa Académico de Químico Farmacéutico Biólogo, Unidad Académica de Ciencias Químicas. ²Programa Académico de Nutrición, Unidad Académica de Enfermería. Universidad Autónoma de Zacatecas, Campus UAZ S. XXI, Carretera Zacatecas-Guadalajara, Km 6. Ejido La Escondida, Zacatecas, Zac., México.
38191335@uaz.edu.mx

RESUMEN

El maquillaje es una herramienta social usada principalmente por el género femenino con diferentes objetivos, claramente uno de los más frecuentes es para embellecer a quien lo utiliza, motivo por el cual existen productos focalizados a distintas áreas de aplicación, creándose en el proceso distintas marcas comerciales. Con el objetivo de competir, la creación de productos de similar naturaleza se oferta a precios menores al producto original. Estos productos se aplican directamente sobre la piel humana, incluyendo áreas tan sensibles como los ojos y los labios, y nunca deben causar una reacción adversa, incluso durante una exposición prolongada. Para garantizar la calidad y la seguridad de un producto de belleza, hay que asegurarse de que cada uno de sus muchos ingredientes es seguro, al mismo tiempo que el proceso de producción fue el adecuado. Se seleccionaron 4 productos aplicados a la zona ocular, siendo estos 2 de marca reconocida y 2 de procedencia asiática, tratando de que fuesen lo más parecido posible, eligiéndose por conveniencia sombras y mascara para pestañas; de acuerdo a lo establecido en la NOM-089-SSA1-1994 se determinó que presentan mesófilos aerobios, hongos y levaduras; en los productos de procedencia asiática se contó un total mayor a 5000 UFC/g del producto de cada uno en mesófilos aerobios y un total mayor a 3000 UFC/g del producto con mohos y levaduras; mientras que en los productos de marca se encontró un total mayor a 2000 UFC/g del producto con mesófilos aerobios y 1800 UFC/g del producto con mohos y levaduras, excediendo los límites permisibles, los cuales eran 500 UFC/g del producto tanto para mohos y levaduras como para mesófilos aerobios.

Dichos resultados indican que ambos maquillajes analizados presentan contaminación microbiana que excede los límites permisibles indicados en la normatividad nacional vigente, siendo de menor calidad microbiológica los de procedencia asiática. Cobra relevante importancia el establecer monitoreos periódicos de los diversos lotes que se distribuyen en el país, para de esa manera evitar alteraciones a la salud del consumidor, e incluso realizar estudios posteriores de la posible asociación que pudieran tener dichos productos con la aparición de patologías cutáneas.

INTRODUCCIÓN

El maquillaje surgió como una herramienta social jerárquica, estableciendo con mayor facilidad la división de rangos, sexo, familias, clanes e incluso para la diferenciación de las distintas civilizaciones que convivían en regiones cercanas, siendo uno de sus mayores expositores reconocidos en el mundo, la civilización Egipcia; en esta cultura es donde se logra observar el giro de nuevos espectros, además de posicionamiento jerárquico y ceremonial, en esta civilización toman un importante papel esta clase de productos en el ámbito médico y de belleza, donde uno de los mayores ejemplos son los ungüentos que fungían como protectores solares y por supuesto unas barritas de carboncillo, pastas negras y polvos mezclados con mercurio (antecedentes de las sombras para ojos, mascara para pestañas y delineadores) los cuales se usaban para delinearse y adornarse los ojos y de este modo darles un aspecto más fino y felino.

Por otro lado en el lado occidental, más concretamente en México, la civilización de los mexicas usaban cochinillas para simular la sangre de sus héroes caídos, se machacaban distintas flores con tonalidades variadas para adornar sus rostros, destacando facciones atractivas; se usaban de preferencia las tonalidades rojizas y naranjas cuando se acercaban las fechas de las festividades

para el Mictlán; se crearon formulaciones para dar olores atractivos a la piel al machacar plantas aromáticas, usándolas en los baños.

Con este margen histórico se puede comprender por qué los productos de belleza comenzaron a esparcirse rápidamente por el resto del mundo, dado que fascinaban y volvían más atractivas a las personas, tapando sus imperfecciones y resaltando facciones atractivas; después de que el maquillaje tomara un aspecto estético en el antiguo Egipto estos se esparcieron hacia Europa, donde durante la época barroca y victoriana fueron satanizados, pues los consideraban impuros, sin embargo, con el descubrimiento de América y la incorporación de nuevos insumos, a eso sumándole la deformaciones dejadas por la peste bubónica y viruela, el maquillaje comenzó a tomar un rol social cada vez más relevante, siendo usado inclusive en exceso en los siglos posteriores para cubrir deformidades, conforme más aceptado fue socialmente mayor era la demanda. La gente comenzó a observar la aparición de enfermedades al usar ciertos productos, por ejemplo, algunos polvos blancos usados contenían altos niveles de arsénico que envenenaban lentamente a quienes los consumían o incluso las sombras verdes que al ser mezcladas con mercurio provocaban una enfermedad pulmonar y esto derivó posteriormente al mito de que el verde era de mala suerte.

Conforme pasaron los siglos, se giró el interés hacia el cuidado de los consumidores, poco a poco iniciando principalmente en los insumos utilizados, lentamente aquellos que presentan toxicidad fueron eliminados del mercado, posteriormente se fijó el interés en los contenedores del producto, creando aquellos que no solo mantenían adentro el producto sino que también de resguardarlo de posibles contaminantes comunes a los que se encontraban en contacto constante (como el polvo), y como plus se les añadió a ciertos productos facilidad de aplicación con brochas y aplicadores; en los últimos siglos se comenzó a dar importancia a la contaminación bacteriana, dado que cuando ocurrían estos incidentes se perdían productos y generaban daños en la piel, y como consecuencia produciendo una baja en el mercado.

Debido a lo anterior, obviamente nacieron instituciones y asociaciones que resguardaban y protegían la integridad física de los consumidores, naciendo una de las más importantes y antiguas en E.E.U.U, la FDA (Food and Drug Administration), asociación donde además de asegurarse de que los insumos fueran seguros y compatibles para el uso de los consumidores también se aseguran de que el producto final no produjera toxinas que generaran un daño posible en el consumidor; años posteriores en México, se crearon las Normas Oficiales Mexicanas, destacando la NOM-089-SSA1-1994 para tener un símil con los productos que fueran elaborados en el país, ambas normas establecen los límites máximos permisibles de mesófilos aerobios, mohos y levaduras, coincidiendo así en que los productos aplicados en el área del ojo debían tener como máximo 500 UFC/gr de cada especie anteriormente mencionada y no contener ningún patógeno.

El objetivo de la investigación experimental realizada es comparar maquillajes de marca reconocida versus si símil en maquillajes de procedencia asiática y así corroborar si es que todos cumplen con los límites permisibles y a la par conocer si realmente la calidad microbiológica de los maquillajes de marca reconocida es superior a los de procedencia asiática o si en cuestiones microbiológicas ambos son iguales.

TEORÍA

Las Normas Mexicanas son de orden público y social, nacen de una regularización nacional de los productos producidos y consumidos en el país, estas son expedidas por organismos regulatorios de la sanidad y cumplimiento satisfactorio de la producción y distribución de productos locales, esto con el objetivo de que la calidad sea al menos similar a los productos producidos y consumidos en otros paises, teniendo así la posibilidad de competir en el mercado internacional, y de forma complementaria, asegurar la seguridad sanitaria a los consumidores.

La NOM-089-SSA1-1994 establece métodos de evaluación microbiológica para las especies comunes de propagación y contaminación que se encuentren en productos de belleza, de este modo se asegura que son aptos para los usuarios consumidores de esta clase de productos, siguiendo lo

establecido por la Ley General de Salud, Reglamento y la Secretaría de Salud; esta norma se complementa con la Norma Oficial Mexicana NOM-141-SSA1/SCFI-2012 que establece lo referente al etiquetado para productos cosméticos preenvasados. Etiquetado sanitario y comercial, donde se establece que la etiqueta debe tener la información del contenido donde especifican los insumos usados para su elaboración en el idioma regente del país y en caso de ser comercializado internacionalmente, la información debe venir en el idioma del país exportado; estos deben ser legibles y entendibles, a su vez el contenedor debe declarar el contenido envasado junto con la fecha de fabricación y expiración y también la cantidad de tiempo hábil de uso para el contenido después de abierto, también se complementa con la NOM-259-SSA1-2022, Productos y servicios. Buenas prácticas de fabricación en productos cosméticos, donde se establecen los fundamentos mínimos para un lugar de elaboración de cosméticos de una forma sanitaria y de protección tanto para el fabricante como para el consumidor, de este modo se aseguran de que las empresas productoras estén regularizadas; el compendio de normas anteriormente mencionadas permite la correcta regularización en la fabricación cosmética, de este modo genera un correcto producto al menos en México.

En E.E.U.U. la FDA creó el BMA (Bacteriological Analytical Manual) donde en cada capítulo, se establecen los correctos lineamientos microbiológicos para los insumos y los productos, es decir, dejan en claro los niveles máximos de microorganismos que pueden contener los productos, así como los protocolos a seguir para su cuantificación, dependiendo de la especie y también incluye los límites máximos que pueden tener, dependiendo del producto; en el caso de los productos cosméticos en la 8va edición, el capítulo 23 abarca esta clase de productos cosméticos.

Tanto en la NOM como en el BMA se establecen los mismos lineamientos, donde especifican que el límite máximo permisible para los productos cosméticos aplicados en la zona del ojo son 500UFC/gr tanto para mesófilos aerobios como para mohos y levaduras, de este modo se aseguran de no poner en riesgo con potenciales agentes patógenos de infecciones al globo ocular ni a sus alrededores.

A pesar de la existencia de todas estas regulaciones, que si bien no son las únicas, porque cada país contempla la propia de ellos, han existido reportes de distintos países donde se han infringido estas normas, produciendo productos de baja calidad que han comprometido a la salud de los usuarios, dando estas pequeñas alertas los organismos regulatorios intentan en la medida de lo posible evaluar en los productos algunos artículos importantes que dejan muestra de los continuos intentos de regularizar y evitar la propagación de estas problemáticas, por ejemplo, Sędzikowska A., et al., 2021, en su artículo "Shared Makeup Cosmetics as a Route of Demodex folliculorum Infections" concluye que la costumbre de compartir maquillaje puede incrementar la transmisión de dermatofitos, aun si son por tiempo limitado o aunque sea un intervalo corto de tiempo, lo cual puede derivar en dermatitis. Un segundo reporte de Kim H., et al., 2020 realizado en Corea, informa la transferencia de contaminantes que ocurre cuando el producto es transferido de las manos del vendedor local al comprador y que fueron resguardados a temperaturas inadecuadas, donde encontraron que los cosméticos que eran pasados de mano en mano y en temperaturas inadecuadas tenían una cantidad elevada de UFC/gr en el producto, superando los límites máximos permisibles, al contrario de aquellos que fueron resguardados como corresponde. Otro reporte de Michalek I., et al., 2019 realizado en Europa, concluye que durante los años 2005-2018 se encontró una concordancia en los reportes de maquillajes contaminados, coincidiendo principalmente que las bacterias encontradas pertenecían al grupo de las gramnegativas, produciendo como consecuentes dermatitis atópica.

Aunque por otro lado también son populares las recetas naturales de cosméticos para distintas áreas; algunas que tomaron popularidad hace pocos años fueron aquellas para los ojos, desde la pigmentación hasta los olores, donde Couteau C., et al., 2022, establece que tan seguras microbiológicamente son este tipo de recetas, los resultados apuntan a que ninguna de las recetas es segura y son potenciales riesgos de salud ocular. Este reporte es concordante con lo reportado por Almukainzi M. et al., en 2022, quienes evaluaron la calidad y seguridad de los cosméticos más usados comúnmente y de la forma en que son resguardados usualmente, el cual mostró que la contaminación frecuente ocurría por especies de bacilos gramnegativos y que el almacenamiento era inadecuado, ya que algunos productos necesitaban ser refrigerados y dicha condición no se cumplía. Del mismo modo Bispo-Dos-Santos K., et al., 2021, utilizó irradiación UV para la limpieza

de maquillaje contaminado a propósito con una cepa de SARS-CoV-2, donde después de un tiempo fue inactivado y la formulación del maquillaje seguía siendo útil y segura para el consumo humano, esto da una solución para la sanidad del consumidor y también para reducir los niveles de contaminación al desechar estos productos, debido a que esta forma de descontaminación puede ser incluso preventiva al momento de la compra o distribución de los productos para evitar la entrada de agentes contaminantes y patógenos.

Por lo anterior y la necesidad de la aplicación y renovación en las normas, es urgente tener una actualización en cuanto a la aprobación de ingreso de productos cosméticos, así como su producción nacional, dado que ningún país está exento de que en algún momento los productos distribuidos puedan causar algún daño a sus pobladores. Es urgente la toma y aplicación de medidas preventivas para la no propagación de estos contaminantes, y a la par, evitar un daño ecológico importante, dado que una vez contaminados los maquillajes estos son inutilizables y son desechados de inmediato, generando una gran cantidad de residuos e incluso pérdidas monetarias.

PARTE EXPERIMENTAL

El objetivo fue comparar la calidad microbiológica de los productos de marca reconocida vs su símil en los productos de procedencia asiática, por lo tanto se adquirieron 4 productos de belleza de aplicación en el área del ojo, siendo de estos, 2 sombras en polvo para ojos y 2 mascararas para pestaña; los maquillajes de procedencia asiática fueron comprados en una de las tantas autodenominadas “importadoras”, mientras que los de marca reconocida se compraron en una tienda certificada de vender productos originales no imitaciones, para de ese modo tener la certeza de que se está evaluando realmente a la marca y no una fábrica de dudoso cuidado sanitario; a la par también se hizo lo posible por asegurarse de que la fecha de caducidad estuviera en margen y que si había caducado, aun entrara dentro de los márgenes máximos de extensión de vida para el tipo de producto (seis meses), estando solamente caducadas las sombras de marca reconocida por tres meses, por lo tanto se esperaba que los conservadores aun cumplieran con el propósito de mantener aislados o incapaces de crecer a los microorganismos.

Los cuatro productos estaban completamente sellados, se aseguró que ninguno de ellos tuviera alguna apertura o intento de violación al paquete, de ese modo se sabía que no habían sido contaminados por terceros (potenciales compradores que los toman), estos después fueron abiertos en el laboratorio en un área estéril, para en un principio observar si estos ya tenían presencia de contaminación y por lo tanto crecimiento bacteriano, buscando así la presencia de algún cambio de tonalidad en el color del producto reportado, una consistencia no esperada en el tipo de producto (especialmente en las máscaras para pestañas), un olor desagradable, y por último, la posible aparición de algún punto blanco, amarillo o inclusive de alguna colonia fúngica, lo cual fue descartado.

Una vez que se comprobó de que los productos constaban de una apariencia que no alertara a primera vista el crecimiento de algún microorganismo, se procedió a pesar un gramo de cada uno en placa Petri estéril y usando diferentes guantes para cada uno y así eliminar la interferencia de alguna contaminación cruzada. En el caso de las sombras, se intentó usar una cantidad equivalente de cada uno de los pigmentos presentes, la muestra abarco tanto el producto que se encontraba en la superficie como el que estaba en el fondo, de este modo se abarco la mayor área posible; en el caso de las máscaras para pestañas se intentó mezclar el contenido lo más homogéneo posible con el mismo aplicador del artículo intentando alcanzar el producto que se encontraba en el fondo; una vez pesados se hicieron tres diluciones seriadas en 9 ml de agua destilada en un inicio, debido a que las sombras no eran miscibles en agua se tuvo que agregar tween 20 al 10% y se mezcló con el vortex, este procedimiento se repitió de nuevo pero con agua estéril, eliminando la posibilidad de que en algún momento el agua destilada se hubiera visto comprometida.

Lo siguiente fue comprobar el posible crecimiento bacteriano, usando agar métodos estándar, se inoculo cada una de las diluciones en el agar en pico de flauta y se les dejo reposar una semana de 36-38°C descartando la intervención de crecimiento por conservadores y/o pigmentos, también se

incluyó un control negativo y de este modo se evitaron falsos positivos por la posible contaminación del agar; una vez con resultados positivos se procedió a la siguiente fase.

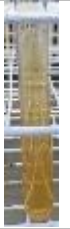
Para el conteo total de colonias se usó el método de vaciado en placa directo, se tomó un mL de cada una de las diluciones, se les vació en placas Petri estériles y se usaron los siguientes agares con los siguientes objetivos a contar: a) Agar Métodos Estándar (AME) para el conteo de mesófilos aerobios dejado por una semana a 36-38°C, b) Agar Papa Dextrosa (APD) para el conteo de hongos y levaduras por una semana a 25-28°C, c) Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) para el conteo absoluto de bacterias, levaduras y mohos, se usó este como reemplazo del agar Leethen que eliminaba la completa intervención de conservadores y pigmentes, reemplazo reportado por la FDA en el BMA; se hizo un duplicado de cada uno, también se incluyó un control negativo y se prescindió de la posible contaminación, con la obtención de positivos de todas las diluciones se continuo con la siguiente etapa.

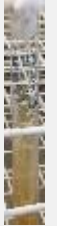
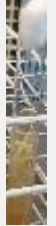
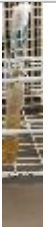
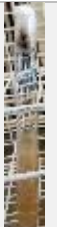
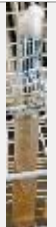
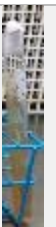
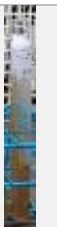
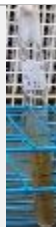
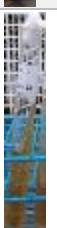
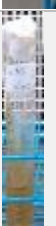
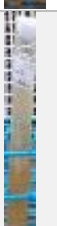
Se inocularon solamente las diluciones 1:100 y 1:1000 en 5ml de Caldo Dextros Sabouraud estéril (reemplazo del caldo Leethen), se incubaron por un día entero a 36-38°C junto con un control negativo, se encontró turbidez en cada una de las diluciones, tanto en las que fueron realizadas con agua estéril como las realizadas solo con agua destilada, posteriormente se inoculo en agar cromogénico orientador cada una de las diluciones para observar después el crecimiento, esto dado que este agar abarca tanto bacterias grampositivas como gramnegativas e incluso mohos y levaduras, a la par de que les otorga una pigmentación distintiva; estos se dejaron en la incubadora por un día a 36-38°C y se obtuvo el crecimiento positivo de las bacterias; por la pigmentación se tenía la sospecha de cual podría ser la especie, así que se hizo tinción de Gram para observar la pigmentación y morfología.

RESULTADOS

Después de hacer la inspección física de cada uno de los productos, donde se comprobó que estaban en condiciones óptimas al menos a primera vista, y al revisar que estuvieran en tiempo adecuado antes de la fecha de caducidad, donde las sombras de procedencia asiática tenían tres años todavía para caducar, la máscara de pestañas asiática tenía todavía de vida 4 años, a la máscara de pestañas de marca reconocida le restaban aun dos años y la única caducada pero todavía dentro de los meses máximos de conservación permitidos era la paleta de sombras de marca reconocida; cabe aclarar que todos los productos fueron adquiridos en febrero del 2024, con lo anterior registrado se hizo la preparación de las diluciones y se inoculo en tubos de ensayo con 9mL de AME en pico de flauta, los cuales fueron inoculados con las diluciones realizadas y se dejó en la incubadora por una semana a 36-38°C, esto debido a que no era el agar Leethen el cual evitaba la intervención en el crecimiento bacteriano por conservadores y/o pigmentos, también se hizo un control negativo (el cual fue un tubo del mismo agar preparado sin inocular) de ese modo si no había un crecimiento se descartaría posibles falsos positivos, se observó un crecimiento positivo en todas las diluciones, inclusive en algunos se logró apreciar la formación de pequeñas colonias; en las diluciones 1:1000 fue en donde se observó mayor crecimiento, probablemente debido a que al estar más diluido, había menor intervención de lo anteriormente mencionado.

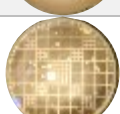
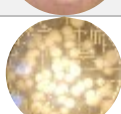
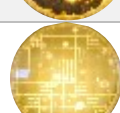
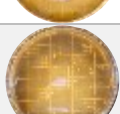
Tabla 1. Resultados obtenidos de la primera fase.

Producto	Dilución			Resultado	Control -	Resultado
	1:10	1:100	1:1000			
Sombras de marca				+		-

Sombras asiáticas				+		-
Mascara de pestañas de marca				+		-
Mascara de pestañas asiática				+		-
DUPLICADO AGUA ESTERIL						
Sombras de marca				+		-
Sombras asiáticas				+		-
Mascara de pestañas de marca				+		-
Mascara de pestañas asiática				+		-

Con el crecimiento positivo en el pico de flauta se evidenció que realmente existía la presencia de microorganismos, por lo tanto, también era probable que tuvieran mohos y levaduras, así que se procedió al conteo total de colonias. Realizando el vaciado en placa se les dejó reposar una semana a todos los medios inoculados, se realizaron las diluciones con agua destilada y agua estéril, se usaron 4 cajas por agar, siendo 3 para cada una de las diluciones y una para el control negativo (solo se agregó el agar a la caja), se utilizaron un total de 48 cajas también duplicados de estos para tener una certeza correcta de cuantas colonias realmente crecían en cada agar.

Tabla 2. Recopilación de imágenes del crecimiento de los productos con el agar y dilución correspondiente.

Producto	AME	Dilución	PDA	Dilución	ADS	Dilución
Sombras de marca		1:10		1:10		1:10
		1:100		1:100		1:100
		1:100		1:100		1:100
Sombras asiáticas		1:10		1:10		1:10
		1:100		1:100		1:100
		1:100		1:100		1:100
Mascara de pestañas de marca		1:10		1:10		1:10
		1:100		1:100		1:100
		1:100		1:100		1:100
Mascara de pestañas asiática		1:10		1:10		1:10
		1:100		1:100		1:100

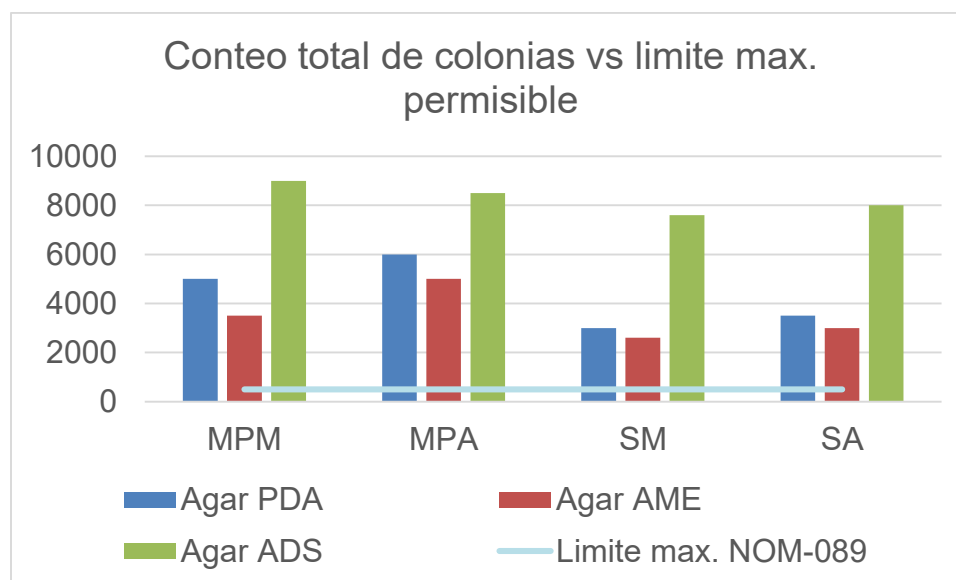


Se llevo a cabo el conteo total de cada agar por especie, contando también los duplicados, después se determinó un promedio de los microorganismos presentes por agar y producto; estos resultados fueron comparados con los límites máximos permisibles por especie reportados en la NOM-089-SSA1-1994, donde se reportaba como límite máximo para todas las especies un valor de 500 UFC/gr, encontrando 5-18 veces más el límite máximo permisible, es decir, un promedio de un 800% superior al límite reportado por producto. Si bien, los productos de procedencia asiática tuvieron mayor cantidad de crecimiento bacteriano, mohos y levaduras, los maquillajes de marca reconocida también tuvieron un crecimiento bastante superior. Se puede apreciar que al igual que en los agares en pico de flauta se encontró mayor crecimiento conforme más altas eran las diluciones, incluso en el agar Saburaud, que si bien es un buen reemplazo del agar Leethen, sigue siendo susceptible a las intervenciones de los colorantes y pigmentos en el crecimiento de los las especies, pero comparando a simple vista el crecimiento entre los agares AME y PDA contra el ADS, en el último, se puede ver que inclusive en la máscara de pestañas asiática se encuentra por completo saturado el crecimiento de los especímenes, comprobando así que, entre mayor es la dilución, mayor crecimiento hay por la disminución de colorantes y conservadores.

Tabla 3. Conteo total de colonias después de los duplicados vs límites máximos permisibles reportados en la NOM-089-SSA1-1994.

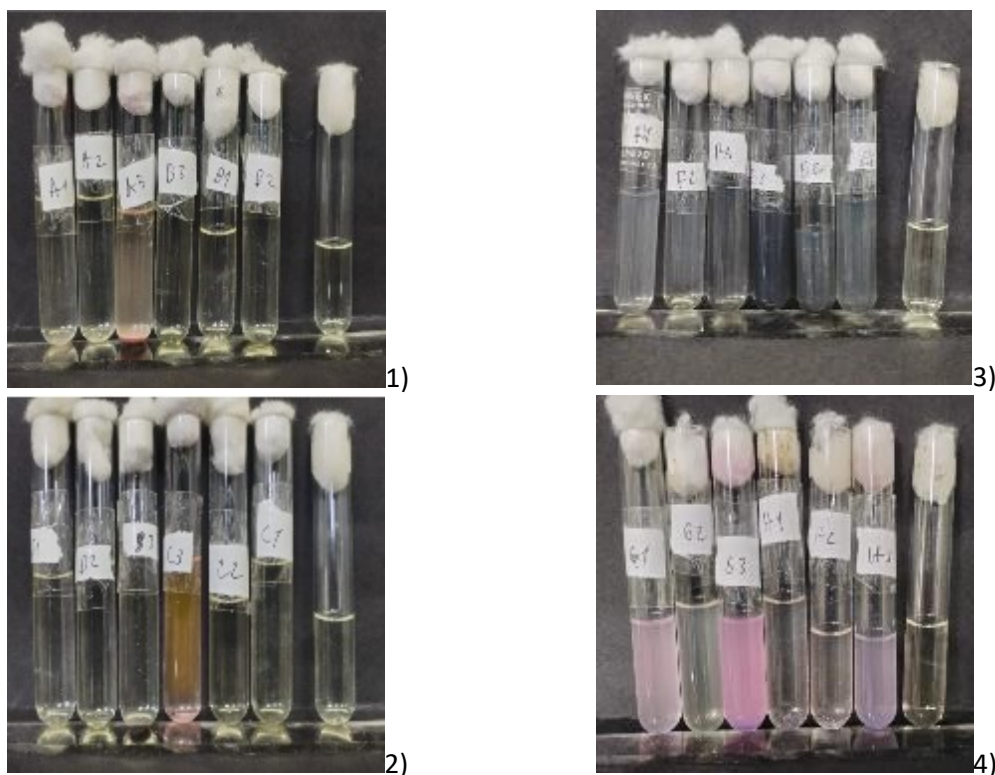
Productos	AGARES			
	PDA	AME	ADS	Limite max.
MPM	5000	3500	9000	500
MPA	6000	5000	8500	500
SM	3000	2600	7600	500
SA	3500	3000	8000	500

Descripción tabla 3: Donde MPM (mascara de pestañas de marca), MPA (mascara de pestañas asiática), SM (sombras de marca) y SA (sombras asiáticas).



Grafica 1. Comparación del crecimiento en cada agar vs el límite máximo permisible.

La tercera etapa consistió en hacer crecer los posibles microorganismos presentes en las diluciones 1:100 y 1:1000, para tener certeza concreta que hay un crecimiento masivo en los maquillajes evaluados se puso una gota de la dilución en caldo Sabouraud, que también tiene la facultad ser un reemplazo del caldo Leethen, permitiendo así que los organismos puedan proliferar realmente. Al día siguiente de la inoculación se constató la presencia de turbidez, siendo una clara señal que la contaminación microbiológica está presente; con esos resultados se procedió a inocular agar cromogénico orientador con los caldos, y dejando también un control negativo, evitando así los falsos positivos, dado que los caldos tenían presencia de turbidez, era de esperarse que también existiera crecimiento en los agares ya mencionados, lo cual se comprobó; estos agares solo necesitaron de un día entero para mostrar que especies había en los productos de belleza adquiridos.



Figuras. 1, 2, 3, 4: Caldos Sabouraud de las diluciones 1:100 y 1:1000 con el control negativo, donde 1) A y B son 1:100 y 1:1000 correspondientemente a SM 2) C y D son 1:100 y 1:1000 correspondientemente a SA 3) E y F son 1:100 y 1:1000 correspondientemente a MPA 4) G y BH son 1:100 y 1:1000 correspondientemente a MPM, se hizo incluso un triplicado para poder abarcar la mayor cantidad de especies de bacterias existentes.

Estos agares otorgaron una coloración a las bacterias correspondientes, se revisó la hoja técnica para conocer con que pigmentación reportaron cada bacteria y a estas se les hizo tinción de Gram para comprobar que concordaban con la morfología correspondiente; hubo 5 bacterias que aparecieron incluso una vez hechos los triplicados, generándose dos que se encontraron presentes en los cuatro productos, siendo estos la levadura *C. albicans*, que tomo una forma puntillosa y color blanquecina con orillas verdes, desprendiendo un olor característico, al hacer la tinción Gram se observaron las esporulaciones grampositivas, corroborando así su especie. La siguiente fue *P. aeruginosa*, la cual en este caso carecía de color, presentando colonias transparentes con una pequeña tonalidad café y con desprendimiento un olor frutal al abrirse la caja; la tinción dio bacilos gramnegativos, asegurando su género. Dos especies aparecieron en dos productos solamente, una de ellas *Enterococcus faecalis*, adquirió un color verde azulado con consistencia húmeda y al hacer la tinción Gram se observaron cocos grampositivos, con un olor suigénis, siendo la morfología correspondiente a esta bacteria, esta apareció solamente en los productos de procedencia asiática. La siguiente fue una colonia blanquecina y lechosa, la tinción Gram fue positiva y la morfología fue

de bacilos, constatando su género, estos se encontraron en ambas mascararas para pestañas y la última bacteria apareció solamente en las sombras de marca caducadas, la cual fue correspondiente a colonias grandes de un dermatofito con proyecciones color café y bordes azules y con un olor tenue a fermentado.

Tabla 4. Morfología macroscópica y microscópica de las principales bacterias con mayor presencia de desarrollo en agar cromogénico.

Bacteria/Hongo/Levadura	Tinción	% de aparición	Nombre bacteria
		100%	<i>C. albicans</i>
		100%	<i>P. aeruginosa</i>
		50%	<i>E. faecalis</i>
		50%	<i>Lactobacillus</i>
		25%	Posible dermatofito

Las bacterias encontradas son potencialmente patógenas, siendo obviamente las más alarmantes las que aparecieron en todos los maquillajes. Debido a que *C. albicans* puede causar blefaritis, la *P. aeruginosa* daños directos en la córnea, *E. faecalis* y *Lactobacillus* una conjuntivitis incluso severa y el dermatofito podría causar alteraciones o taponamiento de los conductos lagrimales, dependiendo de las condiciones inmunológicas del usuario de los productos.

CONCLUSIONES

En un principio se tenía previsto que los maquillajes que presentarían mayor contaminación serían los procedentes de Asia, debido a su transporte y el hecho de que estos son manipulados por diversas personas antes de ser utilizados por el consumidor final, mientras que los de marca reconocida presentarían al menos una buena calidad microbiológica o al menos levemente superior de los límites máximos permisibles en comparación a la de procedencia asiática. Dados los resultados obtenidos se confirma una superación absoluta al límite máximo permisible reportado en la NOM-089-SSA1-1994, de este modo se puede descartar la idea sugestiva de que un producto de marca reconocida tiene mayor sanidad e inocuidad que los productos vendidos en tiendas de distribución asiática. A la par, esto abre un panorama poco optimista acerca del tipo de productos que permiten los regentes sanitarios sean consumidos en el país, dado que por lo anterior se evidencia que no se tiene el cuidado suficiente y registro sanitario de que tan inocuos ingresan los productos al país; esto puede hacer sospechar de un bajo aseguramiento de la calidad y cuidado sanitario en las fabricas de producción de donde provienen los productos, sin embargo se puede defender a los productos de marca reconocida, ya que ambos tienen como lugar de procedencia E.E.U.U, donde la FDA tienen bien regulados los estándares de la calidad con la que los productos

son producidos para el consumo de sus habitantes, por lo tanto, las sospechas de donde se produjo la contaminación nace desde el momento del empaquetado del producto, el transporte de este a un nuevo país, los almacenes donde fueron resguardados, su posterior distribución a lo largo del país y que tan limpios eran los procesos en los sitios donde se dispuso el producto para su venta. Estos resultados evidencian una violación a las normas sanitarias y descuido de la ciudadanía que consume los productos de belleza, generándose así una posible alerta sanitaria, debido al peligro potencial que se avecina por el consumo de productos contaminados, e inclusive podría ser esta la razón de la creciente aparición de casos de enfermedades en los ojos, afectando la visión a corto y largo plazo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Almukainzi, M., Alotaibi, L., Abdulwahab, A., Albukhary, N., & El Mahdy, A. M. (2022). Quality and safety investigation of commonly used topical cosmetic preparations. *Scientific reports*, 12(1), 18299. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21771-7>
2. Bispo-Dos-Santos, K., Barbosa, P. P., Granja, F., Martini, M. C., Oliveira, C. F. S., Schuck, D. C., Brohem, C. A., Arns, C. W., Hares Junior, S. J., Sabino, C. P., & Proenca-Modena, J. L. (2021). Ultraviolet germicidal irradiation is effective against SARS-CoV-2 in contaminated makeup powder and lipstick. *Journal of photochemistry and photobiology*, 8, 100072. <https://doi.org/10.1016/j.jpap.2021.100072>
3. Couteau, C., Girard, E., & Coiffard, L. (2022). Analysis of 275 DIY recipes for eye cosmetics and their possible safety issues. *International journal of cosmetic science*, 44(4), 403–413. <https://doi.org/10.1111/ics.12776>
4. Hitchins A.D., Tran T.T., McCarron J.E. (2001). *Microbiological Methods for Cosmetics*, 2001, Chapter 23.
5. Kim, H. W., Seok, Y. S., Cho, T. J., & Rhee, M. S. (2020). Risk factors influencing contamination of customized cosmetics made on-the-spot: Evidence from the national pilot project for public health. *Scientific reports*, 10(1), 1561. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57978-9>
6. Michalek, I. M., John, S. M., & Caetano Dos Santos, F. L. (2019). Microbiological contamination of cosmetic products - observations from Europe, 2005-2018. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, 33(11), 2151–2157. <https://doi.org/10.1111/jdv.15728>
7. Norma Oficial Mexicana NOM-089-SSA1-1994, Bienes y servicios. Métodos para la determinación del contenido microbiano en productos de belleza. 1995.
8. Norma Oficial Mexicana NOM-141-SSA1/SCFI-2012, Etiquetado para productos cosméticos preenvasados. Etiquetado sanitario y comercial. 2014.
9. NORMA Oficial Mexicana NOM-259-SSA1-2022, Productos y servicios. Buenas prácticas de fabricación en productos cosméticos. 2022.
10. Sędzikowska, A., Bartosik, K., Przydatek-Tyrajaska, R., & Dybicz, M. (2021). Shared Makeup Cosmetics as a Route of *Demodex folliculorum* Infections. *Acta parasitologica*, 66(2), 631–637. <https://doi.org/10.1007/s11686-020-00332-w>

CARACTERIZACIÓN DE $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ EMBEBIDO EN SiO_2 Y FUNCIONALIZADO COVALENTEMENTE CON EL ÁCIDO 4-AMINO BENZOICO PARA SU EVALUACIÓN EN CELULAS MDA-MB-231

María Luz Carrera Jota¹, Ángel de Jesús Morales Ramírez¹, Carlos Felipe Hernández Fuentes²,
Teresita del Refugio Jiménez Romero¹, Pedro Adrián Martínez Montoya¹, Rodrigo Santiago
Ramírez¹, Jorge Luis Gutiérrez Estrada¹

¹ESIQIE-IPN., Unidad Profesional Adolfo López Mateo, Av. Miguel Bernard S/N, Col. Zacatenco,
Del. Gustavo A. Madero, C.P.: 07738, Ciudad de México, México.

²ESIME-IPN, Unidad Profesional, Av. Luis Enrique Erro, Adolfo López Mateos S/N, Zacatenco,
Gustavo A. Madero, 07738 Ciudad de México.

mcarrera@ipn.mx

RESUMEN

El presente trabajo muestra la síntesis de nuevos materiales híbridos de $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ embebido en SiO_2 mediante el proceso sol-gel y reacciones a reflujo para la funcionalización covalente con ácido 4-aminobenzoico (pABA). Estos materiales poseen propiedades magnéticas y ópticas favorables para aplicaciones biomédicas, muestran una emisión de fluorescencia de color rojo brillante y se utilizan con éxito como sonda de fluorescencia para imágenes celulares, terapia fotodinámica (PDT) y como un buen agente de contraste para resonancia magnética. Las caracterizaciones de los materiales se realizaron mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier evidenciando el enlace Si-O-C característico de la formación de los sililésteres, por difracción de rayos X se corroboró la estructura cúbica de óxido de lutecio, mediante microscopía electrónica de barrido se observaron aglomerados de partículas. Las propiedades luminiscentes de los materiales se estudiaron mediante espectroscopía de fotoluminiscencia, el material híbrido mostró una eficiencia de transferencia de energía debido a la combinación óptima del nivel de energía del nivel triplete del ligando y el nivel emisivo Eu^{3+} . Mediante análisis termogravimétrico se identificó el contenido de ácido 4-aminobenzoico funcionalizado. Los ensayos MTT mostraron que los materiales cultivados en células de cáncer de mama MDA-MB-231 no disminuyeron significativamente la viabilidad celular, lo que indica que estos materiales tienen una alta biocompatibilidad y pueden ser adecuados para aplicaciones biomédicas, como imágenes médicas.

INTRODUCCIÓN

En la última década, la demanda de materiales con propiedades fisicoquímicas específicas ha aumentado considerablemente, lo que ha motivado a los investigadores a centrar sus esfuerzos en el diseño de sólidos nanoestructurados híbridos. En este sentido, ha habido un interés creciente en el diseño, síntesis y desarrollo de complejos orgánicos que contienen lantánidos debido a sus excepcionales propiedades luminiscentes. A la hora de sintetizar nuevos materiales híbridos, la toxicidad también es un tema crucial y debe establecerse antes de su aplicación. Se eligieron óxidos de lutecio (III) y europio (III), ya sea individualmente o en asociación con otros compuestos debido a su aplicación validada y conocida por su bioimagen debido a sus altos valores de vida útil de emisión, además $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ incrustado en SiO_2 no se disocia ni se libera en los tejidos biológicos, por lo que es menos tóxico que $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$.

Las propiedades luminiscentes de los complejos orgánicos de lantánidos resultan de la transferencia de energía intramolecular ("efecto antena") entre el ligando y el ion metálico quelato (1-11). Los materiales híbridos inorgánico-orgánicos a base de lantánidos pueden combinar las ventajas de la parte inorgánica, como una alta estabilidad térmica y mecánica, con los beneficios de la parte orgánica, como la versatilidad sintética, propiedades luminiscentes, etc. (12). Se han combinado diversas matrices inorgánicas como zeolitas, SBA-15, MCM-41, titania, alúmina y arcilla con compuestos orgánicos como aminoalcoholes, polialcoholes, polímeros, alcóxidos, ácidos piridincarboxílicos, β -dicetonas, pABA, etc., para el desarrollo de híbridos y compuestos orgánicos-inorgánicos (8,13,14). Entre los materiales propuestos para las aplicaciones antes mencionadas, han ganado protagonismo los óxidos de tierras raras dopados con Eu^{3+} (15). Por otro lado, la inclusión

de $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ en SiO_2 se usa comúnmente como material de núcleo y cubierta en nanocompuestos estructurados núcleo-cubierta debido a su alta estabilidad mecánica, bajo costo, baja citotoxicidad, facilidad de preparación y biocompatibilidad. Además, los complejos orgánicos de tierras raras tienen bandas de emisión fuertes y estrechas y se utilizan ampliamente en muchos campos ópticos y biológicos.

Desafortunadamente, los propios complejos orgánicos de tierras raras todavía no pueden utilizarse en aplicaciones prácticas debido a su escasa estabilidad térmica y mecánica. Si el complejo orgánico de tierras raras estuviera incrustado en la superficie de la sílice, el núcleo de sílice puede reducir la vibración del esqueleto del ligando, mejorando así efectivamente la estabilidad, la intensidad de la luminiscencia del complejo y la viabilidad celular. Por lo tanto, la funcionalización de la superficie, a menudo aplicada a estos materiales, es necesaria para mejorar su estabilidad y capacidad de carga debido a los grupos hidroxilo presentes en la superficie de sílice.

En la literatura se conocen dos tipos de materiales híbridos. El primer tipo de material híbrido está formado por la mezcla física de dos componentes, la interacción entre las partes es causada por fuerzas débiles de Van der Waals, no existe una buena distribución por lo que la agrupación de iones lantánidos en este tipo de material híbrido da como resultado una disminución de la luminiscencia. Por otro lado, los materiales híbridos de segundo tipo presentan una interacción química debido a enlaces covalentes entre componentes inorgánicos-orgánicos, ayudando a una mejor distribución homogénea, intensidades de luminiscencia mejoradas y estabilidad térmica. Se ha elegido el ácido 4-aminobenzoico (PABA) como sustancia modelo, ya que la molécula tiene diferentes grupos funcionales, como ocurre en muchas moléculas de fármacos. PABA tiene dos polimorfos conocidos, pero el sistema está lejos de estar bien establecido y comprendido. El compuesto se utiliza principalmente en la fabricación de productos farmacéuticos y mejora la biocompatibilidad del material.

Sin embargo, Costa et al. estudiaron las propiedades de fotoluminiscencia de complejos de europio y terbio unidos covalentemente al material mesoporoso funcionalizado PABA-MCM-41 y observaron que la luminiscencia mejoraba respecto a $\text{Tb}(\text{PABA})_3$ y $\text{Eu}(\text{PABA})_3$ (2).

En el presente trabajo se sintetizaron sistemas $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{SiO}_2$ funcionalizados con ácido 4-aminobenzoico (PABA). Los sistemas híbridos se evaluaron en células de cáncer de mama MDA-MB-321 mediante ensayos MTT para observar su viabilidad celular. Los resultados mostraron la transferencia eficiente de energía entre ligandos orgánicos y el ion europio (III) bajo excitación visible de estos sistemas funcionalizados con PABA y no exhibieron citotoxicidad significativa, lo que los convierte en materiales prometedores para el bioetiquetado/bioimagen fluorescente y la administración de fármacos.

PARTE EXPERIMENTAL

Síntesis de $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ y $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ embebido en SiO_2

Se utilizó el proceso sol-gel para sintetizar la matriz $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$. Partiendo de 0,5 g de acetato de lutecio tetrahidrato, el cual se disolvió en etanol absoluto durante 10 min en agitación constante y una temperatura de 60 °C, para posteriormente incorporar 0.02689 g (5% $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), siguiendo con 669,3 μL de acetilacetato, 64.9 μL de ácido acético y finalmente 567 μL de agua desionizada. La solución se mantuvo agitando durante dos horas hasta observar un sol estable de color amarillo claro para obtener partículas densas y cristalizadas, los soles previamente obtenidos de $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ fueron secadas a 100 °C por 24 h y tratadas térmicamente a 300, 500 y 700 °C por 1 h, las muestras utilizadas para el embebimiento fueron las tratadas a 700 °C. Por otro lado, la síntesis de SiO_2 se realizó siguiendo el método de Stöber, se tomaron 2 mL de agua desionizada, la cual se agregó a 40 mL de etanol absoluto y se mantuvo en agitación constante durante 15 min y una temperatura de 35 °C, posteriormente se agregaron 2 mL de TEOS, se mantuvo por 10 min en agitación para luego colocarlo en el sonicador por 15 min, después del tiempo se retiró y se colocó en agitación para finalmente agregar 1 mL de NH_4OH , se sonico nuevamente por 15 min., y se dejó en agitación constante por 18 h. Finalmente, con los polvos obtenidos previamente de $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ se

prepara la relación molar Lu:Si 20:80, 80:20 y 50:50, se mantiene en agitación durante 2 horas, luego se lava con etanol y se seca a 100° C para para obtener $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{SiO}_2$ durante 24 horas.

Síntesis de $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{SiO}_2$ con pABA

Se tomaron 100 mg de nanopartículas de $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{SiO}_2$ y se mezclaron con 25 mL de una solución 0.05 M de pABA en Metanol, se agitaron durante 15 min y luego se sónico durante 10 min. A la solución se le agregaron unas gotas de H_2SO_4 y se mantuvo a reflujo durante 4 horas, luego el sistema se neutralizó con NaHCO_3 , se separó por centrifugación, se lavó dos veces con agua y metanol y se secó a temperatura ambiente.

Cultivo de células

Las células de cáncer de mama humano (MDA-MB-231) fueron proporcionadas por la Dra. Leticia Arregui del Departamento de Ciencias Naturales-UAM Cuajimalpa. Estas células se cultivaron en medio D-MEM/F-12 (Gibco) con suero bovino fetal al 10% (Gibco) en placas de 96 pocillos. Los ensayos de viabilidad celular se realizaron utilizando el kit de crecimiento celular MTT CT01 (Sigma-Aldrich) según el protocolo del fabricante. Las células se cultivaron a 37 °C y una atmósfera de CO_2 al 5%.

RESULTADOS

Propiedades estructurales

Para investigar la estructura cristalina y la superficie funcionalizada de las nanopartículas preparadas a partir de $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ y luego $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{SiO}_2$ funcionalizadas con pABA, se realizó difracción de rayos X (Figura 1), todas las muestras después de la funcionalización tienen la presencia de la fase cúbica Lu_2O_3 , con fuertes señales correspondientes a los planos (222), (400), (440) y (622) según la carta (JCPDS 43-1021) y se observó que a 700°C el sistema de $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ está completamente cristalizado al igual que las muestras embebidas con SiO_2 (no se muestran en los resultados). Por otro lado, también el DRX del pABA funcionalizado presenta varias señales fuertes centradas en 9, 13,7, 15,3 y 27,1°, confirmando así la presencia de pABA sobre la superficie del sistema $\text{Lu}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2$, ya que, como se observó mediante el análisis FT-IR, y por tanto, el proceso de secado posterior promueve la nucleación y crecimiento de pABA cristalino. Este resultado difiere de la mayoría de los reportes previos de materiales funcionalizados con pABA, donde generalmente no se observa su comportamiento cristalino (27,39–41). Además, Debasish Ghosh y col., observaron que es posible obtener materiales sin impurezas en la red de la matriz al funcionalizar con ácido 4-aminobenzoico. Sin embargo, para materiales luminiscentes, K. S. Ambili identificó funcionalizando zeolitas con pABA y europio dos nuevos picos de difracción en ángulos de (2θ) en 13,9 y 15,3 característicos de pABA, confirmando así la presencia de la molécula en los materiales híbridos. Por otro lado, la concentración de óxido de silicio en todas las relaciones molares no juega un papel relevante para la formación de la fase cúbica de $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$, ya que los planos aparecen a partir de la formación de dominios cristalinos dentro de la red amorfa del óxido. Sin embargo, la incorporación de SiO_2 a los sistemas disminuye las intensidades máximas relativas de los picos; esto podría deberse a la influencia de la sílice amorfa.

El tamaño del cristalito se calculó según la ecuación de Debay-Scherrer, para la muestra $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ se obtuvo un tamaño de 11 ± 1 nm, para la muestra pABA un tamaño de 29 ± 3 nm. Para las muestras funcionalizadas 20:80-pABA, 50:50-pABA, 80:20-pABA se obtuvo un tamaño de 7, 6 y 7 nm respectivamente, con una desviación estándar ± 1 nm para todos los casos.

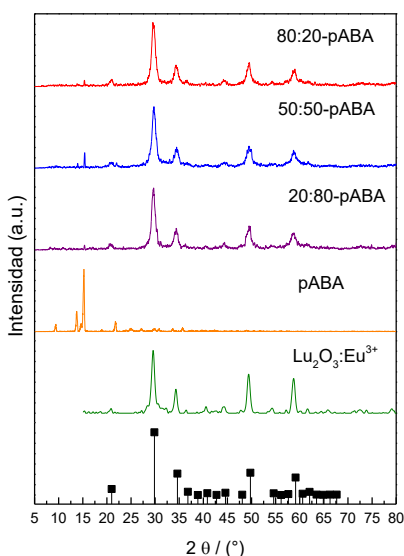


Figura 1. Patrones de DRX de las muestras de $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ a) pABA b), 20:80-pABA c), 50:50-pABA d) y 80:20-pABA (e)

Espectroscopía FTIR

En la figura 2a se muestra $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ a 700°C , no se observa presencia de moléculas de agua. La formación de Lu_2O_3 es confirmada por las bandas a 570 y 485 cm^{-1} , correspondientes a las vibraciones de estiramiento de Lu-O del Lu_2O_3 . Sin embargo, los espectros para la muestra de pABA (Figura 2b) muestran bandas estrechas centradas alrededor de $3460\text{--}3360\text{ cm}^{-1}$ que corresponden al estiramiento del enlace N-H de la amina primaria en el pABA, y a 1290 cm^{-1} (C-N) que es característico del grupo amino unido al anillo aromático del pABA. Las bandas centradas alrededor de $3229\text{--}2804$ (estiramiento O-H) y en 1668 cm^{-1} (estiramiento C=O) son características del grupo funcional ácido carboxílico. Las bandas de absorción con máximos en 1600 , 1573 y 1524 cm^{-1} pertenecen a las vibraciones de valencia de los enlaces C=C en el anillo de benceno. Las bandas de vibraciones de deformación de los enlaces N-H en el grupo amino y de los enlaces C-H en el anillo de benceno se registran en 1625 , 890 cm^{-1} y 1173 , 1131 , 844 cm^{-1} . Para la funcionalización se observó la reducción de intensidad de las bandas relacionadas con el grupo funcional ácido carboxílico.

Para las muestras 20:80-pABA, 80:20-pABA y 50:50-pABA se observaron bandas de absorción a 1190 cm^{-1} (estiramiento C-Si) y 1100 cm^{-1} (estiramiento Si-O-Si). También se pueden observar bandas a 1601 cm^{-1} y 1400 cm^{-1} que se deben al grupo ácido carboxílico de pABA. De igual forma se pueden observar bandas correspondientes a la amida (-CONH-) a 1638 cm^{-1} . Para la muestra de 50:50-pABA, la banda de ácido carboxílico se observó a 1706 cm^{-1} en comparación con las otras muestras de 20:80-pABA y 80:20-pABA. El pico amplio en el rango de 3000 a 3500 cm^{-1} se puede asignar a la vibración de estiramiento del grupo O-H del ácido carboxílico y, según este análisis, confirmamos la unión de pABA a las nanopartículas. El espectro infrarrojo se utilizó para confirmar la presencia del ligando pABA unido covalentemente a $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{SiO}_2$.

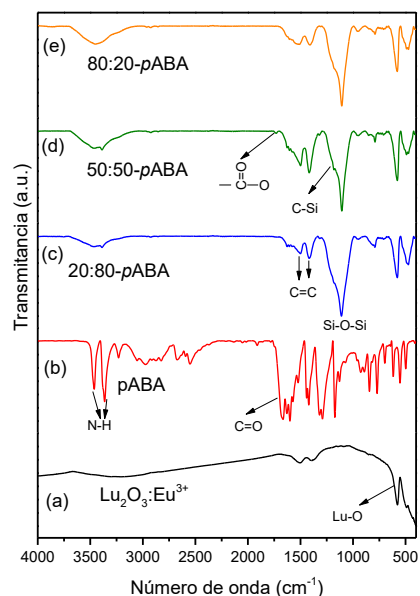


Figura 2. Espectro IR de $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ (a), *pABA* (b), 20:80-*pABA* (c), 50:50-*pABA* (d) y 80:20-*pABA* (e)

Análisis de morfología y composición elemental.

En la Figura 3a, la imagen MEB mostró $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ a 700°C , se observan partículas aglomeradas de tamaño micrométrico, obtenidas por el proceso sol-gel, por lo que este tamaño puede dificultar el uso de estos materiales para diversas aplicaciones médicas, donde es importante obtener un tamaño inferior a 100 nm. La solución propuesta es el recubrimiento de partículas de óxido con SiO_2 , como menciona Tomas Dippong, la inclusión de SiO_2 se utiliza para controlar el tamaño de las partículas, reducir la aglomeración de partículas y mejorar las propiedades magnéticas y la biocompatibilidad, y dado que el SiO_2 es biológicamente inerte, reduce el riesgo inflamatorio y su incorporación es ideal para aplicaciones médicas.

Para las muestras 20:80-*pABA* (3b) y 80:20-*pABA* (3c), presenta una distribución más uniforme ya que el SiO_2 genera tamaños de partícula más pequeños en comparación con las partículas en ausencia de sílice, ya que proporciona una mejor distribución y el *pABA* ayuda a formar hojuelas o espigas. Finalmente, para la muestra 50:50-*pABA* (3d), la formación es más homogénea y se puede observar más claramente en comparación con las muestras 20:80-*pABA* y 80:20-*pABA* y se corrobora con el tamaño del cristalito, que se obtuvo por difracción de rayos X.

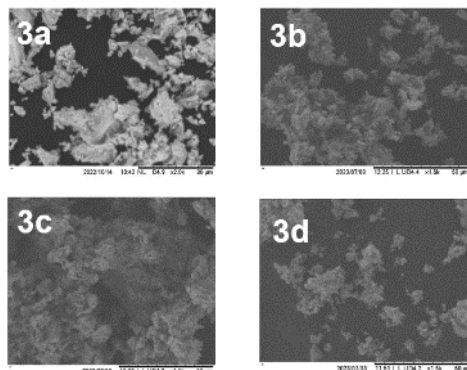


Figura 3. Micrografía electrónica de barrido de $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ (a), 20:80-*pABA* (b), 80:20-*pABA* (c), 50:50-*pABA* (d).

Análisis térmico

La Figura 4a muestra las curvas de TGA obtenidas para el material híbrido 20:80-pABA, se observa que la descomposición de la materia orgánica pABA ocurrió entre 185-260 °C con una pérdida de masa del 27 %, y entre 450-600 °C hubo combustión de materia orgánica pABA residual y condensación de grupos silanol adyacentes con una pérdida de masa del 4%. Este resultado indica el porcentaje de pABA que se funcionalizó en la muestra de pABA 20:80, que fue aproximadamente del 31 %.

Por otro lado, se observaron las curvas termogravimétricas para la muestra 50:50-pABA, (Figura 4b). La primera pérdida de agua se adsorbe físicamente y los disolventes residuales se encuentran en el rango de temperatura de 20 a 120 °C. La descomposición de la parte orgánica del pABA se produjo entre 160-280 °C correspondiente a un 25,5% de pérdida de masa y a 360-610 °C se observaron dos pérdidas de masa correspondientes a pABA residual con un porcentaje del 5%. Todos los resultados anteriores mostraron la funcionalización exitosa en la superficie de la nanopartícula $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{SiO}_2$ con pABA mediante enlaces covalentes. Por lo tanto, se puede inferir que el porcentaje de masa debido a la funcionalización de pABA es del 30,5%, lo que corresponde aproximadamente a la pérdida total de masa en los últimos tres eventos.

Finalmente, en la figura 4c para la muestra 80:20-pABA, observamos un porcentaje de pérdida del 2% del agua físicamente adsorbida y los solventes residuales comprendidos en el rango de temperatura de 20-150 °C, la descomposición de la materia orgánica de pABA ocurrió entre 185-260 °C con una pérdida de masa del 11%, también una pérdida de masa a 380-600 °C del 5% correspondiente al pABA residual. Para esta muestra se obtuvo una funcionalización en torno al 16%. La fuerte diferencia en el pABA funcionalizado para esta muestra, del 16 %, en comparación con las muestras 20-80 y 50-50 es aproximadamente ≈ 30 % para ambas, se puede explicar porque la primera presenta el menor contenido de SiO_2 y, por lo tanto, menos grupos silanol en los que se podría unir el pABA. Los resultados se pueden analizar más claramente en la Tabla 1, donde, según el análisis térmico y el contenido molar Lu/Si inicial, es posible establecer la composición química de las muestras sintetizadas. Los resultados muestran claramente que el mayor contenido molar de pABA funcionalizado está presente en la muestra de pABA 50:50. Además, según la literatura, la funcionalización informada de pABA suele estar entre el 7 y el 10 %, lo que demuestra que el proceso de funcionalización propuesto tiene una alta eficiencia. Además, los resultados obtenidos muestran una funcionalización entre 16-30.5%, ayudando a reducir la toxicidad en los ensayos de viabilidad ya que el PABA también actúa como eliminador de radicales libres, previniendo el daño del ADN por exposición a los rayos UV o la radiación solar.

Tabla 1. Composición química de muestras funcionalizadas de $\text{Lu}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2\text{-pABA}$.

Muestra	Peso %			mol %		
	% Lu_2O_3	% SiO_2	% pABA	% Lu_2O_3	% SiO_2	% pABA
80:20-pABA	78.10	5.90	16.00	47.75	23.87	28.38
50:50-pABA	53.38	16.12	30.50	21.47	42.94	35.59
20:80-pABA	31.25	37.75	31.00	8.42	67.35	24.23

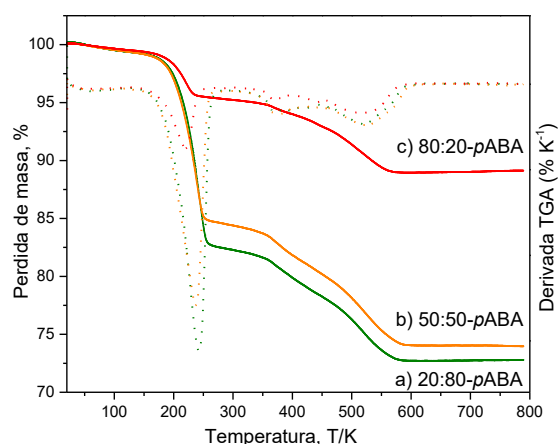


Figura 4. Análisis termogravimétrico de 20:80-pABA a), 50:50-pABA b) y 80:20-pABA c)

Estudios de fotoluminiscencia de sistemas híbridos $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{SiO}_2\text{-pABA}$

En la Figura 5 se muestran los espectros de excitación de 20:80-pABA, 80:20-pABA y 50:50-pABA obtenidos mediante las reacciones sol-gel y reflujo. Dado que se espera una alta emisión de los centros Eu^{3+} , el espectro de excitación se obtuvo monitoreando la transición $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ de Eu^{3+} a 612 nm. Al analizar el espectro, existen claramente diferencias entre las muestras híbridas. Para las muestras híbridas, la banda ancha en el rango entre 220 y 300 nm debido a Eu-O CTB disminuye claramente su intensidad, en comparación con los picos ahora fuertes y estrechos que se originan en las transiciones $\text{Eu}^{3+} f-f$ en el rango 350–470 nm, asignados a $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_0$ (362 nm), $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_1$ (381 nm), $^5\text{L}_6 \rightarrow ^7\text{F}_2$ (392 nm) y transiciones $^5\text{D}_2 \rightarrow ^7\text{F}_0$ (464 nm).

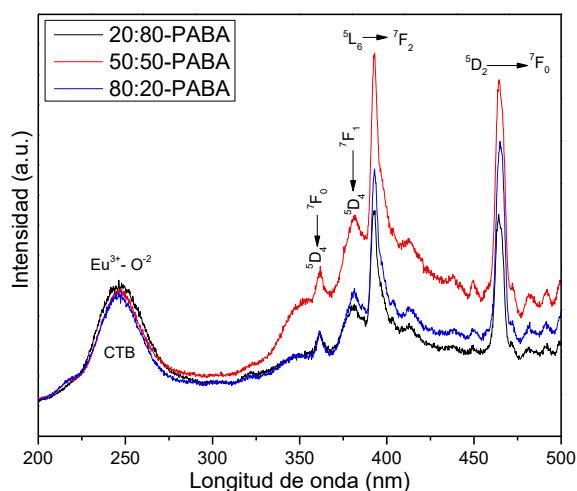


Figura 5. Espectro de excitación ($\lambda=612$) de polvos 20:80-pABA, 50:50-pABA y 80:20-pABA.

Es importante señalar que la banda CTB prácticamente no presenta variaciones con respecto a las tres muestras, lo cual es de esperarse, ya que esta banda está directamente asociada a los

mecanismos de transferencia de energía directamente de $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$, sin embargo, para las transiciones f-f se observan diferencias en la intensidad de las bandas como efecto de la composición química. Esto es importante porque normalmente las transiciones f-f tienen una eficiencia menor que el proceso CTB. En el caso de las muestras sintetizadas, también se observa claramente que la banda de excitación superior está centrada en 397 nm, correspondiente a la transición $^5\text{L}_6 \rightarrow ^7\text{F}_2$. Para la muestra 50:50-pABA, que es la que presenta mayor contenido molar de pABA, como se muestra en la tabla 1. Se observa el mecanismo de transferencia por efecto antena de pABA a los centros luminiscentes de Eu^{3+} en la matriz de Lu_2O_3 . Por otro lado, el hecho de que debido al pABA las muestras puedan excitarse a una longitud de onda más larga (393 nm) el trabajo muestra ventajas en comparación con los 254 nm habituales de la CTB, esto es beneficioso para aplicaciones médicas debido a la menor energía de exposición.

El mecanismo de transferencia de energía entre pABA y los centros de Eu, que se debe a la superposición de la banda de emisión de pABA (Figura 5b), con la banda de excitación de Eu (Figura 6a), se puede corroborar analizando el tiempo de desintegración de las muestras híbridas. con respecto a la muestra cerámica (Figura 6), monitoreando la emisión de Eu^{3+} a 612 nm y con una excitación de 360 nm, correspondiente a la banda de excitación de pABA puro. Los resultados se ajustaron utilizando la cinética de primer orden o mecanismo de reacción monomolecular:

$$I(t) = Ae^{-t/\tau}$$

donde I es la intensidad en un momento dado, A es la intensidad en $t=0$ y τ el tiempo de vida o decaimiento. De los resultados se desprende claramente que hay un aumento en el tiempo de desintegración de Eu^{3+} cuando se añade pABA al sistema, ya que este aumenta de 1,03 ms en el sistema cerámico a 1,51, 1,70 y 1,40 ms para los diferentes sistemas híbridos 80:20, 50:50 y 20:80 respectivamente. Además, el incremento en el tiempo está de acuerdo con los resultados del DSC (Tabla 1), ya que la muestra con mayor presencia de pABA, 50:50, es también la muestra con mayor tiempo de desintegración.

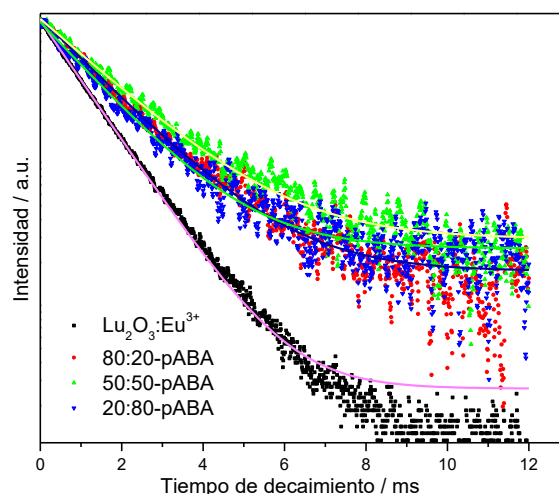


Figura 6. Curvas de tiempo de desintegración de sistemas híbridos y de muestra $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$.

Por otro lado, cuando los sistemas híbridos se excitan directamente a la banda de pABA (Figura 7), se evidencia la presencia de la banda de emisión azulada de pABA (entre 380 y 500 nm) y las bandas rojizas de Eu^{3+} (entre 550 y 650 nm). De los resultados anteriores se esperaba que la muestra con

mayor contenido de pABA presentara la mayor emisión, que de hecho es lo observado, ya que la muestra 50:50 es la que tiene mayor rendimiento lumínico.

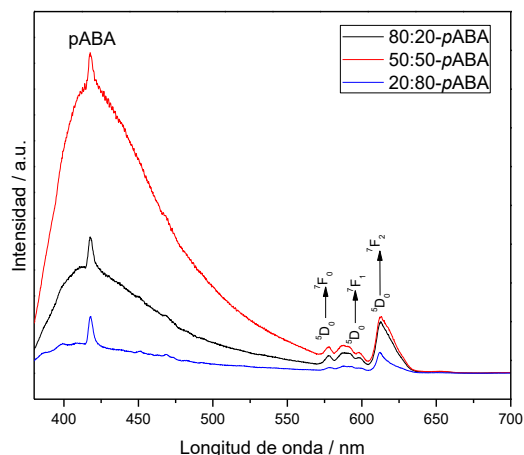


Figura 7. Espectros de emisión de polvos de 20:80-pABA, 50:50-pABA y 80:20-pABA.

Para visualizar más claramente el efecto de la longitud de onda de excitación con respecto a la emisión en los sistemas híbridos, se calcularon las coordenadas CIE de los sistemas y se compararon con los valores de las muestras de $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ y pABA (Figura 8). Los resultados del diagrama CIE muestran claramente que las muestras híbridas, independientemente de la longitud de excitación, presentan una mezcla de azul (derivado de pABA) y rojo (de Eu), en comparación con las muestras puras, puntos A ($\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$) y B (pABA). Por otro lado, las muestras que se excitan a 254 nm, es decir, directamente a la banda CBT, presentan un desplazamiento hacia el azul, considerando como punto inicial la muestra sólo con $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$, quedando en el centro del diagrama CIE, cerca del área de luz blanca. De manera similar, cuando los sistemas híbridos se excitan a través de pABA (punto B) a 360 nm, presentan un corrimiento al rojo.

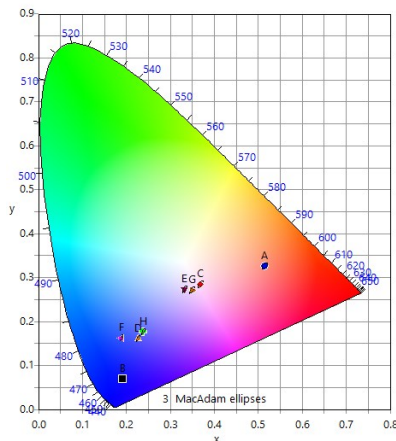


Figura 8. Diagrama de cromaticidad CIE para muestras híbridas en función de la longitud de onda de excitación.

Ensayo MTT

Se cultivaron células MDA-MB-231 en placas de 96 pocillos utilizando medio de cultivo DMEM-F12 con suero bovino fetal al 10% y antibiótico. Después de 24 horas de incubación, se formó una capa confluyente de células en las placas de 96 pocillos. Se agregó medio fresco con diferentes concentraciones de $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ y $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{SiO}_2$ funcionalizado con pABA (25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$).

Luego, la viabilidad celular se evaluó cuantitativamente mediante el ensayo MTT, que mide la actividad metabólica de las células. En este ensayo, las enzimas mitocondriales en células metabólicamente activas convierten la sal de tetrazolio en un producto de formazán. Para cuantificar la viabilidad celular, se agregaron 10 μL de solución de MTT a cada pocillo y se incubaron durante 4 horas más. Los cristales de formazán que se formaron se disolvieron luego en 100 μL de solución de isopropanol que contenía HCl 0,04 N. La absorbancia de las soluciones se midió a 570 nm usando un espectrofotómetro.

Los ensayos de viabilidad celular se realizaron primero en los polvos de $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ a diferentes concentraciones para observar el porcentaje de viabilidad como se muestra en la Figura 9, los tratamientos con los polvos fueron desde 25 $\mu\text{g/mL}$ hasta 200 $\mu\text{g/mL}$, donde se mostró que a concentraciones de 100 $\mu\text{g/mL}$ y 200 $\mu\text{g/mL}$ el porcentaje de viabilidad celular fue del 65% y 57% respectivamente. En cambio, para las concentraciones más pequeñas de 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$ el porcentaje aumenta considerablemente hasta el 100 y 96% respectivamente. Esto nos permite concluir que los polvos de $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ en concentraciones más bajas se pueden utilizar de forma segura en células MDA-MB-231, sin embargo, para aumentar la viabilidad celular $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ estas se embebieron en SiO_2 y se funcionalizaron con pABA, ya que se sabe que SiO_2 y pABA son biocompatibles y ayudan a mejorar la viabilidad de $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$, además la molécula del ácido *para*-aminobenzoico funciona como componente básico de diferentes fármacos y su liberación es lábil.

Además, el ensayo de viabilidad se muestra en la Figura 10 para las muestras 20:80-pABA, 50:50-pABA, 80:20-pABA, la viabilidad celular para los materiales híbridos no fue significativamente diferente de las células de control en concentraciones de hasta 200 $\mu\text{g/mL}$.

Estos resultados sugieren que los materiales híbridos son biocompatibles con las células humanas. Los resultados de este estudio son consistentes con los de estudios previos que han demostrado que $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{SiO}_2$ es biocompatible con células humanas. La alta biocompatibilidad de los materiales híbridos se atribuye a la naturaleza inerte de la matriz de sílice y a la naturaleza no tóxica de los iones Eu^{3+} . Estos resultados proporcionan evidencia de que los materiales híbridos podrían usarse para aplicaciones biomédicas, como la terapia contra el cáncer y la administración de fármacos.

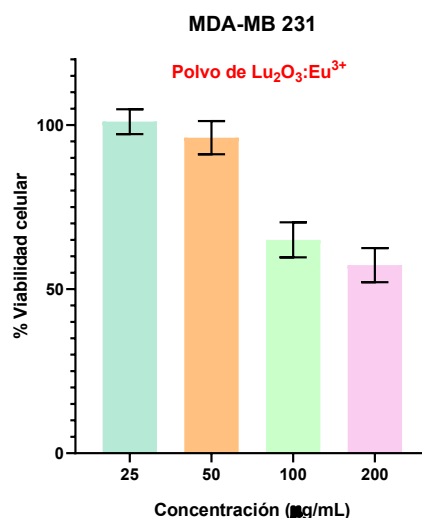


Figura 9. Viabilidad celular de las células MDA-MB 231 respecto al control (%), estimada mediante prueba de proliferación MTT después de 24 h con cuatro concentraciones, $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ (25-200 $\mu\text{g/mL}$).

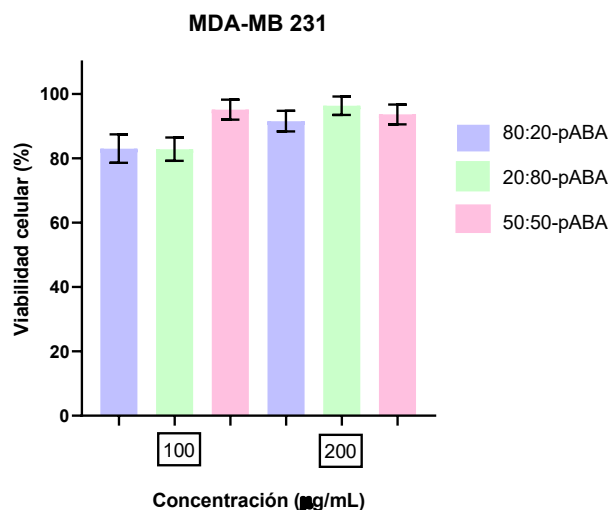


Figura 10. Viabilidad celular de las células MDA-MB 231 respecto al control (%), estimada mediante prueba de proliferación MTT después de 24 h con dos concentraciones de 80:20-*p*ABA, 20:80-*p*ABA y 50:50-*p*ABA.

Morfología celular

Los cambios morfológicos de las células de control y de las células expuestas a materiales híbridos 20:80-*p*ABA, 80:20-*p*ABA y 50:50-*p*ABA se ilustran en la Figura 11. No se observaron cambios morfológicos de las células de control cuando las células se trataron con concentraciones de 200 µg/ml. Sin embargo, al agregar los diferentes tratamientos se pudo observar el material aglomerado.

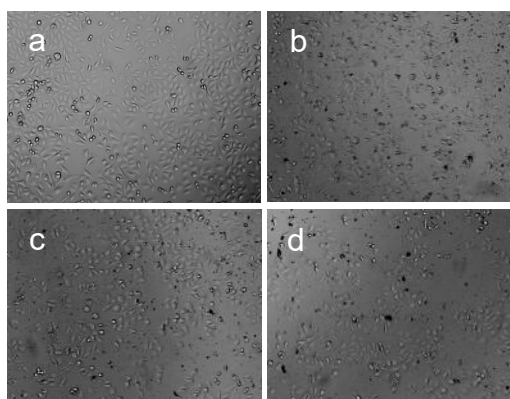


Figura 9. Morfología celular analizada mediante microscopía óptica (10X), células MDA-MB-231 control a), 80:20-*p*ABA b), 20:80-*p*ABA c), y 50:50-*p*ABA d) (200 µg/mL) durante 24 horas.

CONCLUSIONES

En este trabajo, se prepararon materiales híbridos mediante un proceso sol-gel y reacciones de reflujo para funcionalizar el ácido *para*-aminobenzoico (*p*ABA). Los materiales mostraron una fuerte emisión a 612 nm, característica del Eu³⁺. Esta emisión se debe al enlace covalente entre la nanopartícula y el *p*ABA. El análisis termogravimétrico mostró que alrededor del 16-30% de la materia orgánica se incorporó a los materiales, dependiendo de la proporción molar. Los ensayos de

viabilidad celular demostraron que estos materiales no presentan efectos adversos y son prometedores para aplicaciones biomédica

BIBLIOGRAFÍA

1. Jesty T, Ambili KS, Baby AM, Sonyamol S. Characterization and Optical Studies of Hybrid Materials Synthesized by Covalently Linking Eu³⁺ Ions, Para-Aminobenzoic Acid, and Titania. *J Appl Spectrosc.* 2017;84(1).
2. Ambili KS, Thomas J. Synthesis of hybrid materials by immobilizing para-aminobenzoic acid complexes of Eu³⁺ and Tb³⁺ in zeolite Y and their luminescent properties. *Journal of Porous Materials.* 2020 Jun 1;27(3):755–64.
3. Singh P, Kachhap S, Singh P, Singh SK. Lanthanide-based hybrid nanostructures: Classification, synthesis, optical properties, and multifunctional applications. Vol. 472, *Coordination Chemistry Reviews.* 2022.
4. Piguet C, Buezli JCG. ChemInform Abstract: Mono- and Polymetallic Lanthanoid-Containing Functional Assemblies: A Field Between Tradition and Novelty. *ChemInform.* 2010;31(6).
5. Lehn J -M. Perspectives in Supramolecular Chemistry—From Molecular Recognition towards Molecular Information Processing and Self-Organization. Vol. 29, *Angewandte Chemie International Edition in English.* 1990.
6. Sabbatini N, Guardigli M, Lehn JM. Luminescent lanthanide complexes supramolecular devices as photochemical. Vol. 123, *Coordination Chemistry Reviews.* 1993.
7. Hagan AK, Zuchner T. Lanthanide-based time-resolved luminescence immunoassays. Vol. 400, *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2011. p. 2847–64.
8. DeOliveira E, Neri CR, Serra OA, Prado AGS. Antenna effect in highly luminescent Eu³⁺ anchored in hexagonal mesoporous silica. *Chemistry of Materials.* 2007;19(22).
9. Wang J, Wang T, Hu Y, Zhang X, Ma Y, Lv H, et al. Fe³⁺ sensitivity fluorescence sensor from β -cyclodextrin-enhanced Eu³⁺ luminescence aggregates. *J Mater Sci.* 2021;56(18).
10. Chen J, Xu Y, Li S, Xu F, Zhang Q. Ratio fluorescence detection of tetracycline by a Eu³⁺/NH₂-MIL-53(Al) composite. *RSC Adv.* 2021;11(4).
11. Zhang YR, Xie XZ, Yin XB, Xia Y. Flexible ligand for Metal-Organic frameworks with simultaneous Large-Pore and antenna effect emission. *Chemical Engineering Journal.* 2022;443.
12. Carlos LD, Ferreira RAS, De Zea Bermudez V, Julián-López B, Escibano P. Progress on lanthanide-based organic–inorganic hybrid phosphors. *Chem Soc Rev.* 2011;40(2).
13. Wang J, Dou W, Kirillov AM, Liu W, Xu C, Fang R, et al. Hybrid materials based on novel 2D lanthanide coordination polymers covalently bonded to amine-modified SBA-15 and MCM-41: assembly, characterization, structural features, thermal and luminescence properties. *Dalton Transactions.* 2016;45(46):18610–21.
14. Li QF, Jin L, Li L, Ma W, Wang Z, Hao J. Water-soluble luminescent hybrid aminoclay grafted with lanthanide complexes synthesized by a Michael-like addition reaction and its gas sensing application in PVP nanofiber. *J Mater Chem C Mater.* 2017;5(19):4670–6.
15. Shi Y, Chen QW, Shi JL. Processing and scintillation properties of Eu³⁺ doped Lu₂O₃ transparent ceramics. *Opt Mater (Amst).* 2009;31(5).
16. Wang Z, Qian B, Wang F, Zhao Q, Wang Y, Zou H, et al. SiO₂:Tb³⁺@Lu₂O₃:Eu³⁺Core-Shell Phosphors: Interfacial Energy Transfer for Enhanced Multicolor Luminescence. *Inorg Chem.* 2021;60(4).

IMPORTANCIA DEL TIPO DE TEXTURA DEL SUELO EN MUNICIPIOS P'URHEPECHAS PRODUCTORES DE AGUACATE

Casillas Corona Mariela¹, Forte Velázquez Diana Janeth¹, Alberto Gómez-Tagle Chávez

Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales (INIRENA), Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH)

mariela.casillas@umich.mx, diana.fuerte@umich.mx

RESUMEN

Los suelos son un recurso natural donde se desarrollan la mayoría de los alimentos, lo cual tiene relación con las propiedades físicas de estos, pues de ellas depende la capacidad de producción agrícola. Una de las propiedades físicas de importancia es la textura del suelo y es que esta influye en la retención de agua, el tipo de drenaje para la aireación, así como la disponibilidad de nutrientes, elementos indispensables para la producción agrícola. La producción de aguacate en el estado de Michoacán ha aumentado considerablemente en los últimos años provocando cambios en los usos del suelo por lo cual es de suma importancia saber el tipo de textura en los suelos de 11 municipios que aportan el 47% de la producción total estatal de aguacate; se tiene como objetivo conocer el tipo de textura el suelo en los municipios con mayor productividad de aguacate en municipios P'urhépechas de Michoacán. Para el análisis se utilizó la carta edafológica escala 1:1000000 y se hizo el procesamiento en el programa Qgis para los once municipios de la región: Charapán, Cherán, Nahuatzen, Nuevo Parangaricutiro, Paracho, Peribán, Los reyes, Tancítaro, Tingambato, Uruapan y Ziracuaretiro. Los resultados del análisis evidenciaron que de las 410,423.14 ha que es la superficie total en esta región, el 19.34% tiene una textura 1, el 68.37% se ubica en la clase 2 y el 12.27% en la textura 3. La clase de textura que tiene mayor predominancia es la clase 2 que corresponde a suelos andosoles que se adecuan mejor a los requerimientos de los aguacates, al ser suelos que retienen la humedad con buenos nutrientes y una capacidad de aireación adecuada para las raíces de los árboles.

INTRODUCCIÓN

La región de la meseta P'urhépecha es de las principales zonas de producción de aguacate; este tiene importancia en la cocina local y extranjera, Michoacán es de principales productores y exportadores de aguacate hacia los Estados Unidos (Arima *et al* 2022); esta región produce el 46% del volumen total en Michoacán, con 840,889.29 toneladas al 2022 de acuerdo con información de la SIAP (2022) (Cuadro 1). El fruto del aguacate es de interés económico por lo que el incremento de huertas en la meseta p'urepecha ha incrementado considerablemente, desplazando a los otros cultivos de granos básicos de la región (De la Tejera *et al*, 2012).

La remuneración económica por el cultivo de aguacate hace inevitable la expansión del cambio de uso de suelo a huertas. De la Tejera *et al* (2012) menciona que dicho crecimiento es un modelo de desarrollo agrícola en el estado que implica una problemática tanto para productores de aguacate como para el sector agrícola y para la sociedad en general; por lo que es necesario prestar atención al deterioro ambiental a la deforestación, disminución de la biodiversidad y la degradación de los suelos por un mal manejo (León, 2020). Las propiedades edáficas tienen mucho que ver con la fertilidad y productividad de los suelos, entre las propiedades físicas se encuentra la textura del suelo que es la propiedad que indica las cantidades de partículas minerales inorgánicas de diámetro menor a 2 mm (Figura 1), es decir, la tierra fina, en el suelo; estas partículas se agrupan en tres clases, por tamaños y de acuerdo a la USDA son los siguientes: Arena "A" (2 - 0.05), Limo "L" (0.05 - 0.002) y Arcilla "R" (< 0.002) (Jaramillo, 2002).

Cuadro1.El cultivo de aguacate en la meseta P'urhépecha. Fuente:SIAP (2022)

Municipio	Superficie sembrada (ha)	Producción (ton)
Charapan	1,805.00	16,376.00
Los Reyes	7,149.00	74,513.26
Nuevo Parangaricutiro	8,990.00	93,441.00
Peribán	11,716.00	139,488.03
Tancítaro	24,805.00	231,517.00
Tingambato	4,250.00	41,395.00
Uruapan	17,640.00	186,079.00
Ziracuaretiro	5,225.00	58,080.00
Total	81,580.00	840,889.29

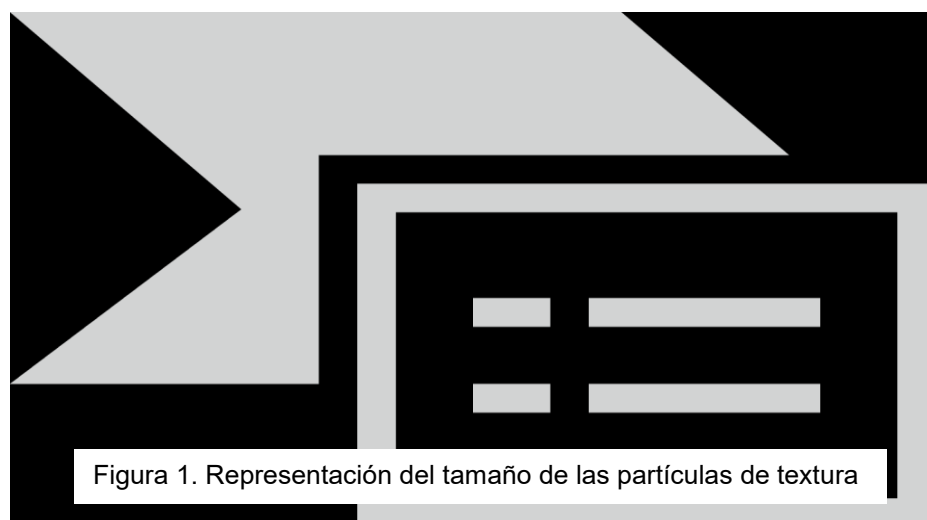


Figura 1. Representación del tamaño de las partículas de textura

La textura del suelo influye en la retención o filtración del agua, así como de nutrientes necesarios para los cultivos; un manejo inadecuado del suelo puede cambiar esta propiedad edáfica. Los suelos de la región P'urhépecha han sido utilizados para la agricultura durante varios años y algunos de los municipios son los principales productores de aguacate, esta región produce el 46% del volumen total en Michoacán, con 840,889.29 toneladas al 2022 de acuerdo a SIAP, 2022. Tomando en cuenta lo anterior el objetivo de este trabajo fue identificar la clase textural de los suelos de la franja aguacatera en la región p'urhépecha.

PARTE EXPERIMENTAL

La región P'urhépecha se encuentra en el estado de Michoacán entre los). Se localizan en el sistema volcánico transversal. Se encuentra en un rango altitudinal 1 600 y 2 600 msnm, así mismo presenta varios escenarios climáticos (Figura 2) , se concentran 22 municipios del estado: Coeneo, Charapan, Cherán, Chilchota, Erongarícuaro, Los Reyes, Nahuatzen, Nuevo Parangaricutiro, Paracho, Pátzcuaro, Peribán, Quiroga, Tancítaro, Tangamandapio, Tangancícuaro, Tingambato, Tingüindín, Tocumbo, Tzintzuntzan, Uruapan, Zacapu y Ziracuaretiro de los cuales los productores de aguacate son los siguientes: Charapán; Cherán; Los Reyes; Nahuatzen; San Juan Nuevo Parangaricutiro; Paracho; Peribán; Tancítaro; Tingambato; Uruapan y Ziracuaretiro

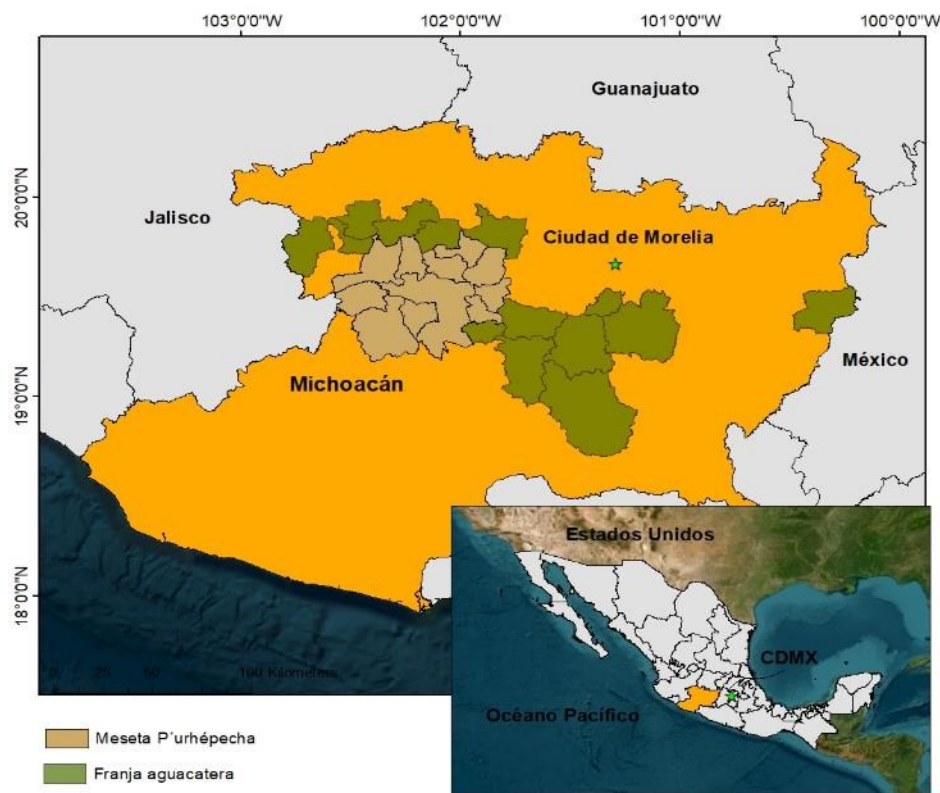


Figura 2. Localización del área de estudio en la meseta P'urhépecha

La metodología que se utilizó se basó en la cartografía, para lo cual se descargaron de las paginas oficiales de INEGI la carta edafológica escala 1:1000000 en formato shape y con el programa QGIS se hizo una delimitación de la zona de la meseta P'urhépecha, se procedió a obtener los datos del tipo de textura que proporciona la carta edafológica y la cual clasifica el INEGI de la siguiente manera Cuadro 2.

Cuadro 2. Clasificación de textura del suelo de acuerdo al INEGI

Tipo de textura	Descripción
Gruesa (1)	Suelos arenosos con más de 70% de arena, con menor capacidad de retención de agua y nutrientes para las plantas.
Media (2)	Comúnmente llamados francos, equilibrados en el contenido de arena, arcilla y limo.
Fina (3)	Suelos arcillosos con más de 35% de arcilla, que tienen mal drenaje, escasa porosidad, son por lo general duros al secarse, se inundan fácilmente y son menos favorables al laboreo

RESULTADOS

Los resultados del análisis evidenciaron el porcentaje del tipo de textura del suelo de las 410,423.14 ha que es la superficie total en esta región y se muestra en porcentaje como en hectáreas Cuadro 3.

Cuadro 3. Clasificación del tipo de textura en la franja aguacatera

Textura	Superficie (ha)	Superficie %
Gruesa	79, 074.17	19.26
Media	279,426.84	68.08
Fina	50,173.96	12.24
Agua	1,748.17	0.42
Total	410, 423.14	100

La clase de textura que tiene mayor predominancia es la clase media corresponde a suelos que en su mayoría son Andosoles y Luvisoles de acuerdo al INEGI, estos suelos poseen propiedades edáficas que se adecuan a los requerimientos para el desarrollo de cultivos de aguacates, al retener humedad y disposición de nutrientes, la textura franca al tener un equilibrio en los componentes (arcilla, limo y arena) les da una buena porosidad y por consiguiente una capacidad de aireación adecuada para las raíces, sin embargo hay que prestar atención a las prácticas de manejo que pueden llevar a la degradación o pérdida total de los suelos.

La clase media se puede relacionar con la alta producción de aguacate un ejemplo de ello es el municipio de Tancitaro con una superficie de siembra de 24,805.00 ha y 231,517.00 toneladas de producción (SIAP, 2022), esto muestra que el tipo de textura si es una propiedad edáfica importante en la producción de aguacate y de otros cultivos.

En la figura 3 se puede observar la distribución de la clase de textural, La clase fina se localiza hacia el sur, oeste y noroeste la región, la clase gruesa se representa en el centro y norte de la franja aguacatera y por último la clase media se distribuye en la mayor parte de la meseta P'urhépecha

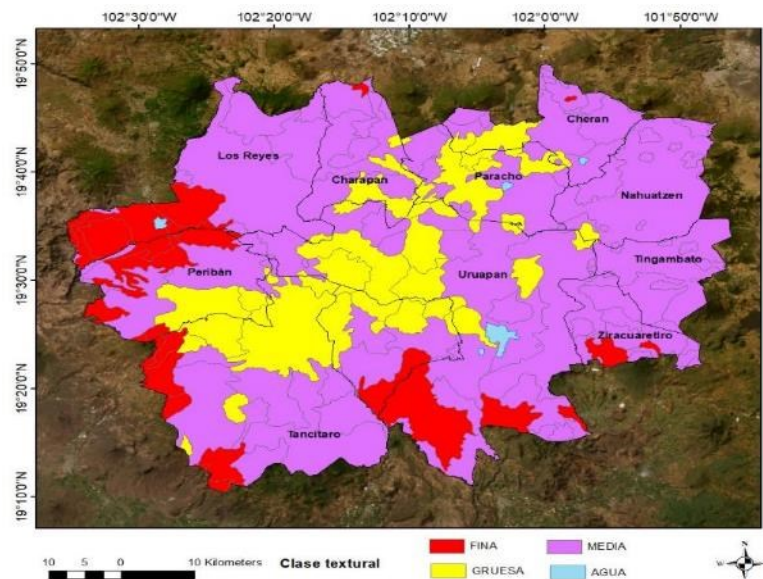


Figura 3. Clases de textura en suelos de la región

CONCLUSIONES

La textura del suelo es una propiedad edáfica importante en la agricultura y funciona como indicador de calidad del suelo. En la meseta Púrepecha el tipo de textura que predomina es la de clase media y ocupa 279,426.84 hectáreas de la zona aguacatera, por lo que estas texturas son adecuadas para el desarrollo de los cultivos de aguacate la textura contribuye en la retención de humedad y de nutrientes para las plantas por lo cual la producción en este suelo es redituable en cuanto al contenido de fruta y valor monetario.

La clase media de la textura se relaciona con los municipios con mayor producción y las características de los suelos dan pie a que se siga con el cambio de uso de suelo en huertas de aguacate.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arima, E. Y.; Denvir, A.; Young, K. R.; González-Rodríguez, A.; García-Oliva, F. Modelling avocado-driven deforestation in Michoacán, Mexico. *Environmental Research Letters* 2022, 17. DOI 10.1088/1748-9326/ac5419
2. De la Tejera H. B; Santos, O A; Santamaría. Q. H; Gómez. T; Olivares, C. El oro verde en Michoacán: ¿un crecimiento sin fronteras? Acercamiento a la problemática y retos del sector aguacatero para el Estado y la sociedad. 2012. *Economía y Sociedad*.
3. Jaramillo J, D. F. Introducción a la Ciencia del Suelo. 2002. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Medellín. 613 pp.
4. León R.A. Extensión del cultivo de aguacate en la meseta Purépecha, Michoacán y coincidencia con el uso de suelo reconocido oficialmente. 2020. Tesis de maestría. UMSNH
5. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Disponible en línea: <https://www.inegi.org.mx/temas/edafologia/>
6. Saxton, K. E; Rawls, W. J. "Soil water properties Characteristics" Hydraulic Properties Calculator, Universidad Nacional de la plata ed., Buenos Aires, 2009.
7. Saxton, K. E; Rawls, W. J. Soil Water Characteristic Estimates by Texture and Organic Matter for Hydrologic Solutions. *Soil Science Society of America Journal* 2006, 70(5). <https://doi.org/10.2136/sssaj2005.0117>

8. SIAP, 2012, en SIACON (Sistema de Información Agroalimentaria y de Consulta), 2011, documento en línea en: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=181&Itemid=426
9. SIAP, 2022, en SIACON (Sistema de Información Agroalimentaria y de Consulta), 2011, documento en línea en: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=181&Itemid=426

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y PERFIL BIOCLIMÁTICO DE LA ARDILLA *CALLOSPERMOPHILUS MADRENSIS* (MERRIAM, 1901) ENDÉMICA DE MÉXICO

Claudia Ballesteros-Barrera¹, Osiris Aguilar-Romero¹, Rocío Zárate-Hernández¹, Bárbara Vargas-Miranda¹, Selene Ortiz-Burgo² & Angélica Martínez-Bernal¹

¹Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Apartado Postal 55–535. CP 09340 Ciudad de México, México. ²Facultad de Ciencias UNAM

.bbc7@xanum.uam.mx.

RESUMEN

Callospermophilus madrensis o ardilla de la Sierra Madre Occidental es una especie de tamaño pequeño. Es endémica de México y de distribución restringida. Se encuentra en el noroeste del país, en la Sierra Madre Occidental. Habita en bosques mixtos de coníferas. En cuanto a su Categoría de riesgo se considera "Sujeta a protección especial (Pr)" por la Norma Oficial Mexicana y por la IUCN 2019-1 como Casi amenazada (NT). Es una especie poco conocida en su ambiente natural, lo cual dificulta su conservación. El propósito de este trabajo generar un mapa de su distribución con base en sus localidades de colecta, y conocer qué localidades están en alguna Área Natural Protegida (ANP), así como obtener el perfil bioclimático de la especie.

Para ello se obtuvieron datos de presencia de la especie de la literatura y de portales de colecciones científicas en línea. Se utilizó el programa ArcMap 10.4.1 para realizar el mapa de la distribución conocida y se generó el perfil bioclimático utilizando coberturas climáticas a una resolución de 1 km². En total se obtuvieron 69 localidades de registro, 53 en el estado de Chihuahua (en los municipios de Balleza, Batopilas, Bocoyna, Guachochi, Guadalupe y Calvo, Guerrero, Hidalgo del Parral, Morelos y Temósachic) y 16 en Durango (en los municipios de Durango, Guanaceví y Ocampo). Tan solo tres localidades se encuentran resguardadas en dos ANP: 1) Áreas de Protección de Flora y Fauna (APFF) Cerro Mohinora (dos localidades) y la APFF Tutuaca Papigochic (una localidad), ambas en el estado de Chihuahua. De acuerdo con los resultados del perfil bioclimático se tuvieron valores de: la temperatura media anual 11.2°C en promedio, temperatura promedio del trimestre más cálido 13.2 °C y del trimestre más frío de 4°C, mientras que la Precipitación anual en promedio fue de 414 mm, del trimestre más húmedo 295 mm y del trimestre más seco de 0 mm.

Los resultados de la distribución podrían ser utilizados para verificar si aún está presente la especie en dichos sitios, además se hace evidente la necesidad de incrementar los muestreos en regiones poco estudiadas, así como aumentar el área de protección. En cuanto a tener datos de las condiciones climáticas en las que se encuentra esta ardilla podría permitir analizar los impactos que el calentamiento global tendrá sobre su distribución.

INTRODUCCIÓN

México es un país reconocido por su alta biodiversidad y endemismo, y las ardillas no son la excepción. Las ardillas son roedores pertenecientes a la familia Sciuridae que ocupan el cuarto lugar en cuanto a diversidad dentro de los mamíferos, esta familia está compuesta por 50 géneros y casi 300 especies en el mundo (Koprowski et al. 2016). Se encuentran ampliamente distribuidas por todo el planeta, desde regiones templadas y tropicales hasta zonas áridas y desiertos, desde bosques templados hasta zonas áridas. Actualmente se reconocen aproximadamente 35 especies de ardillas en México, 13 de ellas son endémicas (Valdéz-Alarcón, 2003; Valdéz-Alarcón, 2014).

Callospermophilus madrensis o ardilla de la Sierra Madre Occidental, es una especie de tamaño pequeño. Es endémica de México y de distribución restringida y se distribuye en el noroeste del país, principalmente en las regiones montañosas de la Sierra Madre Occidental. Prefiere los hábitats de bosque de pino-encino y a menudo se encuentra a altitudes que van desde los 1500 hasta los 3000 metros sobre el nivel del mar. Este hábitat montañoso proporciona las condiciones climáticas y ecológicas que son ideales para esta especie (Hall, 1981). Habita en bosques mixtos de coníferas. Esta ardilla terrestre es diurna y se la puede observar forrajeando en el suelo en busca de semillas,

frutos, e insectos. Es conocida por su comportamiento de almacenamiento de alimentos, lo cual es una adaptación importante para sobrevivir en su entorno, donde los inviernos pueden ser particularmente duros. La dieta de *C. madrensis* incluye una variedad de material vegetal y animal, lo que refleja su papel como un consumidor generalista en su ecosistema (Best y Thomas, 1991). En cuanto a su Categoría de riesgo se considera "Sujeta a protección especial (Pr)" por la Norma Oficial Mexicana y por la IUCN 2019-1 (DOF, 2019) como Casi amenazada (NT). Es una especie poco conocida en su ambiente natural, lo cual dificulta su conservación y como muchas especies endémicas, enfrenta amenazas debido a la pérdida de hábitat por deforestación y la fragmentación del hábitat y también por el cambio climático (Valdéz-Alarcón, 2014). El propósito de este trabajo generar un mapa de su distribución con base en sus localidades de colecta, y conocer qué localidades están en alguna Área Natural Protegida (ANP), así como obtener el perfil bioclimático de la especie.

PARTE EXPERIMENTAL

Los datos de presencia de la especie se obtuvieron a partir de dos fuentes: 1) literatura especializada y 2) bases de datos digitales: Sistema Nacional de Información sobre Biodiversidad de México (SNIB, <https://www.snib.mx/>) y del Global Biodiversity Information Facility (GBIF, www.gbif.org). Los registros obtenidos sin información correspondiente a la localidad fueron eliminados, mientras que los que no contaban con coordenadas, pero que tuvieran la localidad, fueron georeferenciados por medio de Global Gazetteer Versión 2.3 (<http://www.fallingrain.com>) y Google Earth (<https://earth.google.com/web/>). Las localidades que contaban con coordenadas geográficas fueron verificadas para corroborar que el municipio o estado fueran correctos. Asimismo, la ubicación de los registros fue comparada con mapas de la distribución conocida de la especie publicados en Hall (1981) y Valdéz-Alarcón (2014). Con los registros obtenidos se realizó el mapa de la distribución conocida utilizando el programa ArcMap 10.4.1 (ESRI, 2016), además se solaparon el mapa de las Áreas Naturales Protegidas (ANP) de México de carácter federal y estatal (SEMARNAT-CONANP, 2020)

El análisis del perfil bioclimático proporciona información climática de las zonas donde se recolectó la especie (Fischer, et al., 2001), así como información indirecta acerca del espacio ecológico en el cual se considera que una especie puede sobrevivir bajo condiciones naturales (Flores-Jiménez et al., 2017). Para generar el perfil bioclimático se usaron 19 capas climáticas para México en formato ráster, las cuales contienen información mensual de precipitación y temperatura promedio durante el período de 1910 a 2009, con una resolución espacial de ~1 km² (30 segundos de arco, Cuervo-Robayo et al., 2014, Tabla 1). Se utilizó la herramienta Extract by mask del menú Spatial Analyst del programa ArcMap 10.4.1 (ESRI, 2016). Mediante la misma se extrajeron los valores de las 19 variables bioclimáticas para cada registro. Posteriormente, se calcularon sus promedios, mínimos, máximos y desviaciones estándar para obtener la información climática que hay en localidades de colecta (Villaseñor y Téllez-Valdés, 2004, Tabla 1)

RESULTADOS

En total se obtuvieron 69 localidades de registro, 53 en el estado de Chihuahua (en los municipios de Balleza, Batopilas, Bocoyna, Guachochi, Guadalupe y Calvo, Guerrero, Hidalgo del Parral, Morelos y Temósachic) y 16 en Durango (en los municipios de Durango, Guanaceví y Ocampo). Cabe mencionar que la mayoría de los registros son antiguos, comenzando con las primeras colectas a finales del siglo XIX realizadas por E. W. Nelson del Smithsonian National Museum of Natural History (USMN) hasta los de mediados y finales del siglo XX.

En cuanto a las ANP, tan solo tres localidades se encuentran resguardadas en dos ANP federales: 1) Áreas de Protección de Flora y Fauna (APFF) Cerro Mohinora (dos localidades) y la APFF Tutuaca Papiogochic (una localidad), ambas en el estado de Chihuahua (fig. 1). El APFF Cerro Mohinora se localiza en el municipio de Guadalupe y Calvo al sur del estado de Chihuahua, cerca de los límites con los estados de Sinaloa y Durango a una elevación de 3 mil 307 metros sobre el nivel del mar que es la más alta de la Sierra Madre Occidental, Comprende ecosistemas de bosques de pino y pino-encino que constituyen relictos de bosques maduros en el estado de Chihuahua en buen estado

de conservación (SEMARNAT-CONANP, 2017a). La APFF Papigochi se ubica en los municipios de Bocoyna y Guerrero en Chihuahua, la altitud de las montañas que forman parte de esta reserva y su latitud hacen que predominen los climas semifrío subhúmedo con lluvias en verano y templado subhúmedo con vegetación de son bosques de coníferas mixto y bosque de encino (SEMARNAT-CONANP, 2017b). Y la APFF Tutuaca, establecida en los terrenos de la región sur de Temósachic, Chihuahua, cuyo buen estado de conservación se debe principalmente a su accidentada topografía, se caracteriza por la presencia de bosques de pino-encino, encino y pastizal encino (SEMARNAT-CONANP, 2014).

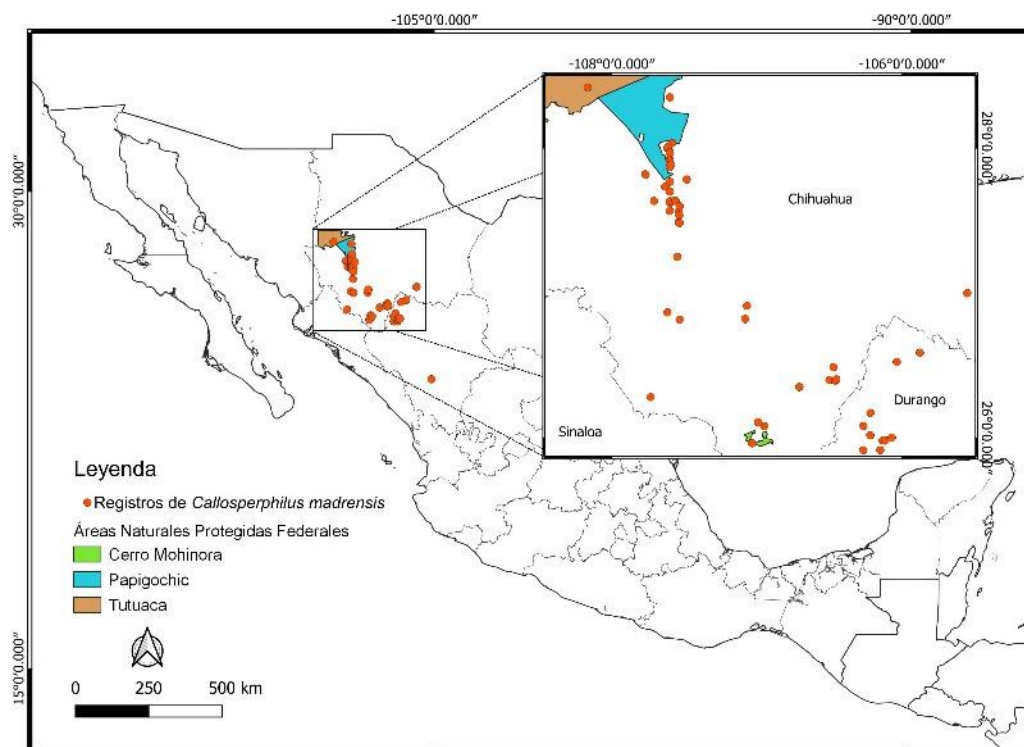


Figura 1. Localidades de registro de *Callospermophilus madrensis* (puntos rojos) y las Áreas Naturales Protegidas.

Los resultados del perfil bioclimático muestran las condiciones ambientales de las localidades donde fue registrada la especie. Estos sitios presentan un intervalo de temperatura promedio anual de 11.3°C en promedio, temperatura promedio del cuatrimestre más cálido 16.8 °C y del trimestre más frío de 5.8°C, mientras que la precipitación anual en promedio fue de 738.8 mm, la precipitación del cuatrimestre más húmedo 445 mm y la precipitación del cuatrimestre más seco de 0 mm, los valores de las 19 variables se encuentran en el Tabla 1, estos datos corresponden a un tipo de clima C templado y de vegetación de bosques templados. Estos datos podrían ser estudiados para analizar si las tolerancias de la especie a ciertas condiciones climáticas podrían impactar en su distribución geográfica, ya que se estima que, en el futuro debido al cambio climático los bosques de coníferas y de encinos (bosques templados) alrededor de entre 65 y 70% de la superficie total de los bosques templados resultaría afectado por el incremento en la temperatura (Villers y Trejo, 2001)

Tabla 1. Variables utilizadas para determinar el perfil bioclimático de las localidades de registro de *Callospermophilus madrensis*. Se presentan los valores mínimos y máximos; entre paréntesis el promedio y la desviación estándar. Las variables climáticas marcadas con asterisco (*) fueron empleadas en la modelación del nicho ecológico.

CÓDIGO	DESCRIPCIÓN	VALORES
BIO1	Temperatura promedio anual (°C)	8.5 – 23.30 (11.3 ± 2.3)
BIO2	Oscilación diurna de la temperatura (°C)	15.0 - 19.2 (16.8 ± 0.6)
BIO3 *	Isotermalidad (°C) (cociente entre parámetros 2 y7)	0.53 - 0.64 (0.6 ± 0.03)
BIO4	Estacionalidad de la temperatura (coeficiente de variación, en %)	1.15 - 1.82 (1.6 ± 0.2)
BIO5	Temperatura máxima promedio del periodo más cálido (°C)	21.1 - 38.0 (25.7 ± 2.6)
BIO6	Temperatura mínima promedio del periodo más frío (°C)	-5.1 – 7.2 (-3.6 ± 1.9)
BIO7	Oscilación anual de la temperatura (°C) (cociente entre parámetros 5 y 6)	25.6 – 33.9 (29.3 ± 1.5)
BIO8	Temperatura promedio del cuatrimestre más lluvioso (°C)	12.8 - 27.5 (16.5 ± 2.4)
BIO9	Temperatura promedio del cuatrimestre más seco (°C)	7.5 - 23.4 (10.2 ± 2.3)
BIO10	Temperatura promedio del cuatrimestre más cálido (°C)	13.2 – 28.3 (16.8 ± 2.5)
BIO11	Temperatura promedio del cuatrimestre más frío (°C)	4.0 – 17.2 (5.8 ± 2)
BIO12	Precipitación anual (mm)	414 -1053 (738.8 ± 122.7)
BIO13	Precipitación del periodo más lluvioso (mm)	45-71 (57.9 ± 6.3)
BIO14	Precipitación del periodo más seco (mm)	0
BIO15 *	Estacionalidad de la precipitación (coeficiente de variación, en %)	74 - 115 (89.4 ± 10)
BIO16	Precipitación del cuatrimestre más lluvioso (mm)	295 - 657 (445 ± 78.8)
BIO17	Precipitación del cuatrimestre más seco (mm)	0 – 6 (41 ± 13.6)
BIO18 *	Precipitación del cuatrimestre más cálido (mm)	212 – 628 (397.8 ± 79.4)
BIO19	Precipitación del cuatrimestre más frío (mm)	21 - 160 (104.3 ± 28.8)

CONCLUSIONES

Los resultados de la distribución podrían ser utilizados para verificar si aún está presente la especie en dichos sitios, además se hace evidente la necesidad de incrementar los muestreos en regiones poco estudiadas, así como aumentar el área de protección. En cuanto a tener datos de las condiciones climáticas en las que se encuentra esta ardilla podría permitir analizar los impactos que el calentamiento global tendrá sobre su distribución. La protección y estudio de esta especie no solo es vital para conservar el capital natural de México, sino también para comprender mejor los ecosistemas donde estas ardillas desempeñan roles fundamentales. La investigación continua y las estrategias de conservación adecuadas son esenciales para asegurar que estas especies únicas prosperen en su entorno natural.

BIBLIOGRAFÍA

1. T. L. Best y H.H. Thomas. "*Spermophilus madrensis*", Mammalian Species No. 378. 1991.
2. A. P. Cuervo-Robayo, O. Téllez-Valdés, M. A. Gómez-Albores, C. S. Venegas-Barrera, J. Manjarrez y E. Martínez-Meyer. "An update of high-resolution monthly climate surfaces for Mexico". International Journal of Climatology, 34, 2004, pp. 2427–2437. <https://doi.org/10.1002/joc.3848>
3. DOF (Diario Oficial de la Federación), "Modificación del Anexo Normativo III, Lista de especies en riesgo de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-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",

- publicada el 30 de diciembre de 2010. Publicada el 30 de diciembre de 2010. Diario Oficial de la Federación. México, 14 de noviembre del 2019.
4. ESRI (Environmental Systems Research Institute). "ArcGIS Desktop: Release 10". 2016. California, USA: Environmental Systems Research Institute. <https://www.esri.com/es-es/arcgis/products/arcgis-desktop/resources>
5. J. Fischer, D. B. Lindenmayer, H. A. Nix, J. L. Stein y J. A. Stein. "Climate and animal distribution: a climatic analysis of the Australian marsupial *Trichosurus caninus*". Journal of Biogeography, 28, 2001, pp. 293-304.
6. A. Flores-Jiménez, D. Reyes-López, D. Jiménez-García, O. Romero Arenas, J. A. Rivera Tapia, M. Huerta-Lara y A. Pérez Silva. "Diversidad de *Vanilla* spp. (Orchidaceae) y sus perfiles bioclimáticos en México". Revista de Biología Tropical, 64, 2017, pp. 975-987
7. E. R. Hall. *The Mammals of North America* (New York: John Wiley y Sons, 1981).
8. J. E. Koprowski, K. Goldstein, K. Bennett y C. Pereira. "Family Sciuridae", in *Handbook of the Mammals of the World* (Lynx Editions in association with Conservation International and IUCN, 2016), Volumen 6 Lagomorphs and Rodents, pp. 648–987.
9. SEMARNAT-CONANP (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales y Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas). "Programa de Manejo Área de Protección de Flora y Fauna Tutuaca". Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Ciudad de México, México. 2014. https://simec.conanp.gob.mx/pdf_libro_pm/50_libro_pm.pdf
10. SEMARNAT-CONANP (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales y Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas). "Programa de Manejo Área de Protección de Flora y Fauna Cerro Mohinora". Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Ciudad de México, México. 2017a. <https://www.conanp.gob.mx/acciones/advoc/PMCerroMohinora.pdf>
11. SEMARNAT-CONANP (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales y Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas). "Programa de Manejo Área de Protección de Flora y Fauna Papigochic". Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Ciudad de México, México. 2017b. https://simec.conanp.gob.mx/pdf_libro_pm/43_libro_pm.pdf
12. SEMARNAT-CONANP (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales y Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas). "Áreas Naturales Protegidas Federales de México, agosto 2020", edición: 2020. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Ciudad de México, México. 2020. <http://geoportal.conabio.gob.mx/metadatos/doc/html/anp2020gw.html>
13. M. Valdéz-Alarcón. "Las ardillas de México". Biodiversitas 51, 2003, pp 1-7.
14. M. Valdéz-Alarcón, M. 2014. "Sierra Madre ground squirrel". pp. 565-566 in *Mammals of Mexico* (Johns Hopkins University Press, Baltimore, 2014), pp.146-147
15. J. L. Villaseñor y O. Téllez-Valdés O. "Distribución potencial de especies del género *Jefea* (Asteraceae) en México". Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica, 75, 2004 pp. 205-220.
16. Villers, L. y I. Trejo. 2001. "El cambio climático y la vegetación en México" in *México: una visión en el siglo XXI. El cambio climático en México*. (PUMA-INE, 2001), pp 57-64

ANÁLISIS FISCOQUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO DEL AGUA DE LLUVIA CAPTADA EN LA ESCUELA DE NIVEL MEDIO SUPERIOR DE GUANAJUATO (ENMSGTO)

Mario Enrique Sandoval Vergara, Cynthia Jareth Torres García, Nancy Edith Pacheco Guerra, José Juan Carreón Barrientos

¹Escuela de Nivel Medio Superior de Guanajuato, Colegio del Nivel Medio Superior, Universidad de Guanajuato.
me.sandovalvergara@ugto.mx.

RESUMEN

El creciente estrés hídrico que afecta al Estado de Guanajuato hace necesario el buscar soluciones para abatir la escasez de agua y contribuir al manejo eficiente de este recurso vital. Dentro de estas medidas se llevó a cabo la implementación de un Sistema de Captación de Agua de Lluvia (SCALL) en la ENMSGTO, cuya agua colectada se utilizará en sanitarios, la limpieza de las instalaciones y el riego de áreas verdes. En este trabajo se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de los parámetros de calidad del agua de lluvia recolectada por este sistema. La evaluación fisicoquímica realizada incluye pH, conductimetría, presencia de iones, sólidos totales, etc., y la detección de coliformes en el estudio microbiológico considerando la normativa mexicana vigente. Los resultados muestran que el agua de lluvia captada posee las características fisicoquímicas adecuadas para su consumo, mientras que el análisis microbiológico muestra la presencia de coliformes, por lo que el SCALL debe adecuar un sistema de desinfección que asegure la calidad e inocuidad microbiológica.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, ha sido noticia de impacto la gran crisis hídrica a la que nos estamos enfrentando día con día, las actividades humanas y la sobreexplotación de este valioso recurso ha llevado a nuestro planeta a un desequilibrio, es por eso por lo que, en este contexto, la lluvia ha surgido como una prometedora fuente natural de agua que puede abordar este desafío, pero solo si se trata adecuadamente.

En México ha existido un crecimiento poblacional sostenido del 1.4% desde el 2015 que es posible que se mantenga hasta el 2030. Este aumento demográfico significa un aumento del gasto hídrico en las principales actividades productivas que dependen del agua, como la agricultura, energía, doméstico e industrial, principalmente. De acuerdo con Rodríguez y colaboradores (2022). en el contexto de México existen varios retos que se deben afrontar para resolver esta crisis hídrica que no solo es la escasez o la contaminación, sino el impacto del cambio climático sobre el ciclo hidrológico, mejorar la administración del recurso y el fortalecimiento del sistema de ciencia y tecnología del país. Debido a esto, los proyectos que buscan soluciones a estos retos son cada vez más necesarios, ya que es un problema multifacético que se debe abordar de manera integral.

El agua de lluvia es una fuente de agua dulce que puede ser utilizada para consumo humano, riego, o para otros fines. Sin embargo, su calidad puede verse afectada por diversos factores, como la contaminación atmosférica, la escorrentía superficial, y la proximidad a fuentes de contaminación, los materiales de los que está construido el techo, etc. El objetivo de este trabajo es evaluar algunos de los parámetros para determinar la calidad del agua de lluvia que fue recolectada por el SCALL y compararlos con la normatividad mexicana vigente. La meta es hacer las adecuaciones necesarias al sistema instalado y hacer uso del agua acumulada en el riego de áreas verdes y en los sanitarios de la ENMSG, disminuyendo así el gasto económico de este servicio y ayudando a una mejor gestión de este recurso.

PARTE EXPERIMENTAL

METODOLOGÍA

a) Obtención de muestra de agua.

En primer lugar, se obtuvieron las muestras de agua recolectada del SCALL instalado en la ENMSG. Este sistema consta de un contenedor con capacidad de 200 litros, donde el agua de lluvia es captada en primera instancia. A su vez, este recipiente 1 está conectado por un sistema de tubos de PVC a un tanque de almacenamiento con capacidad de 750 litros (recipiente 2), donde se almacena el agua hasta su uso. Para fines de este experimento, se tomaron muestras tanto del recipiente 1 como del recipiente 2 para medir sus parámetros físicos y poder tener un punto de referencia para la eficiencia del filtro una vez filtrada el agua. Se obtuvieron 2 muestras de 100mL en frascos de vidrio lavados y esterilizados (autoclave a 120°C durante 15 min). Las muestras se obtuvieron del recipiente 1 y 2 a una profundidad de 30 cm evitando tomar el agua superficial

Las muestras destinadas para las pruebas fisicoquímicas se almacenaron en refrigeración a 4°C. Por otro lado, las muestras microbiológicas fueron analizadas inmediatamente después de haber sido obtenidas.

b) Pruebas Fisicoquímicas.

Para preparar las muestras, se realizó un filtrado de una muestra del recipiente 2 con un papel filtro de porosidad baja, únicamente con el objetivo de eliminar materia orgánica como restos de insectos, ramas y hojas y otros contaminantes macroscópicos. Se utilizó agua destilada y agua de la llave como muestras de control para ser comparadas con las del recipiente 1 y 2.

Para los análisis se eligieron los parámetros fisicoquímicos principales y aquellos que más probablemente pudieran afectar al agua capturada como lo son el pH, concentración de sólidos disueltos, conductimetría y temperatura. Para la composición química del agua se determinó la dureza por carbonatos y la concentración de cloruros.

- Medición de pH, sólidos disueltos totales, Conductimetría y Temperatura en diferentes muestras de agua. Para estas determinaciones se empleó el medidor de bolsillo HI98130 marca HANNA Instruments.

- Determinación de dureza. La dureza es un parámetro que se define como la medida del agua para precipitar jabón y se debe a la presencia de calcio y magnesio, por lo que la determinación de la dureza se define en base a la concentración de estos dos iones, indicando su cálculo final en concentración de carbonato de calcio.

Para la determinación se emplea la complexometría (titulación) usando el ácido etildiaminotetraacético (EDTA) y el negro de ericromo T como indicador, basándonos en el método de la NORMA Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-2021, Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de la calidad del agua.

- Determinación de cloruros. Se utilizó el método de Mohr indicado en la NOM- el cual consiste en la titulación con una solución estándar de nitrato de plata y cromato de sodio como indicador. En este procedimiento los cationes Ag^+ del titulante, reaccionan con los aniones Cl^- de la muestra, formando un precipitado sólido color rojizo de Ag_2CrO_4 una vez que se consumen todos los Cl^- .

c) Pruebas Microbiológicas.

Para el análisis microbiológico se tomó como referencia la NOM- haciendo la prueba presuntiva de coliformes por el método del Número Más Probable (NMP), la prueba confirmatoria de coliformes fecales, el cultivo de los microorganismos en agar nutritivo y su tinción de Gram y la observación microscópica de la muestra de agua en fresco.

- Prueba presuntiva de coliformes. Como primer paso se realizaron diluciones seriadas de la muestra de agua de muestra, las diluciones quedaron en valores 10-1, 10-2, 10-3, para cada dilución se hizo un triplicado. Se realizó la prueba presuntiva utilizando Caldo Lactosado con el objetivo de detectar bacterias coliformes y *Escherichia coli* (E. coli). La presencia de gas y turbidez en el medio indica la posible presencia de microorganismos. El caldo se preparó mezclando 1.3 g de caldo Lactosado en 100 mL de agua destilada, después se añadieron 9 mL de medio a los tubos de ensayo con taparrosca junto con 1 mL de las diferentes diluciones de la muestra, y se incubaron durante 24 horas a 37°C, se incluyó un tubo control sin inocular. En estos tubos se le colocaron campanas de Durham para la observación de la formación de gas (Arana I., Oruño M., Barcina I.).
- Prueba confirmatoria de presencia de coliformes fecales. Para esta prueba se utilizó el Medio EC (Triptosa: 20 g, Lactosa: 5 g, Mezcla de Sales Biliares: 1.5 g, Fosfato Dipotásico: 4 g, Fosfato Monopotásico: 1.5 g, Cloruro de Sodio: 5 g). El Medio EC es utilizado en la prueba de NMP (Número Más Probable) para coliformes fecales. El medio se preparó de acuerdo con lo indicado por el fabricante y se inocularon con los microorganismos obtenidos de la prueba presuntiva en las diluciones 10-1, 10-2, 10-3, así como un tubo control sin inocular. Los tubos se incubaron a 44.5 °C durante 24h y posteriormente a 48h.
- Cultivo en agar nutritivo y tinción de Gram. Se realizó la siembra de los microorganismos obtenidos en las pruebas de coliformes en medio de cultivo de agar nutritivo en cajas de Petri para identificar bacterias Gram negativas y Gram positivas, incluyendo su morfología. Se realizó un estriado mediante el agotamiento del asa en un medio nutritivo a una temperatura de 37°C durante 24 horas. Se realizó la tinción y la observación en el microscopio.
- Observación microscópica de la muestra de agua en fresco. Se realizó una extracción de agua sin someterla a ninguna dilución u otro tipo de tratamiento. Se tomó una gota de esta agua y se observó al microscopio para detectar microorganismos. Se realizó una observación adicional utilizando una gota de Lugol para contrastar.

RESULTADOS

a) Pruebas Fisicoquímicas.

En las Tablas 1 a 3 se muestran los resultados obtenidos de las pruebas de calidad fisicoquímica del agua captada. Se puede apreciar que los parámetros determinados están dentro de los parámetros permitidos por la normativa vigente.

A pesar de que estas características son óptimas, el proceso de captación debería incluir una etapa de filtración donde se capturen partículas ambientales para mejorar sus características organolépticas, como color, olor.

Tabla 1. Medias de pH, sólidos disueltos totales (SDT), Conductimetría y Temperatura en diferentes muestras de agua

Muestra de Agua	pH	SDT (ppm)	Conductimetría (μS/cm)	Temperatura (°C)
Agua Destilada	±6.783	±3.333	±6.333	±29
Agua de la llave	±7.407	±188.667	±377.333	±29.067
Recipiente 1	±7.423	±41.667	±83.667	±28.467
Recipiente 2 sin filtrar	±7.283	±76.333	±153	±29.033
Recipiente 2 filtrado	±7.283	±71.667	±143.667	±29.6

Tabla 2. Determinación de Dureza total (mg/L de carbonato de calcio)

Muestra	Repetición 1 (mg/L)	Repetición 2 (mg/L)	Repetición 3 (mg/L)	Promedio (mg/L)
Recipiente 1	180.1638	200.182	240.2184	±206.85
Recipiente 2 sin filtrar	400.364	460.4186	420.3822	±427.05
Recipiente 2 filtrado	420.3822	420.3822	400.364	±413.71

Tabla 3. Determinación de cloruros

Titulación	Muestra 1 (ppm)	Muestra 2 (ppm)	Muestra 3 (ppm)	Promedio (mg/L)
Recipiente 1	95.7231	88.6325	81.5419	±88.63
Recipiente 2 sin filtrar	223.3539	205.6274	212.718	±213.90
Recipiente 2 filtrado	205.6274	198.5368	216.2633	±206.81

b) Pruebas microbiológicas.

- Prueba presuntiva de coliformes. Después de un periodo de incubación de 24 horas, se observó turbidez en el agua en diferentes muestras, siendo más notable en la muestra con la dilución 10⁻¹ y disminuyendo gradualmente hasta la dilución 10⁻³. Sin embargo, no se detectó ninguna evidencia de fermentación.

El crecimiento con formación de gas es una indicación presuntiva de la presencia de coliformes. Dado que no se observó fermentación, nos inclinamos a suponer que no hay presencia de coliformes. A pesar de este resultado se decidió realizar la prueba confirmatoria.

Los resultados de crecimiento en los tubos y de acuerdo con la tabla del NMP indicada en la norma, se obtuvo un valor de 240 NMP/mL (NOM-127-SSA1-2021, Camacho, A., M. Giles, A. Ortigón, M. Palao, B. Serrano y O. Velázquez, 2009).

Tabla 4. Lectura de resultados del crecimiento en los tubos inoculados para la prueba presuntiva de coliformes.

Dilución	Tubos positivos
10 ⁻¹	3
10 ⁻²	3
10 ⁻³	0

- Prueba confirmatoria de coliformes fecales. Después de un periodo de incubación de 24 horas, se observó turbidez en el agua en todas las muestras, pero también se pudo notar una variación en el color. Algunas muestras presentaron un color ámbar más pronunciado que otras. No se detectó la formación de gas en las campanas de Durham durante esta prueba. Al igual que en la prueba presuntiva, la ausencia de fermentación sugiere la falta de presencia de coliformes en las muestras.

Dado que el agua recolectada por este tipo de sistemas está muy expuesta, es muy posible que este contaminado por coliformes fecales. Por lo que el crecimiento observado podría indicar la presencia de estas bacterias a pesar de no observar los gases de fermentación. Debido a esto se buscó confirmar la presencia de bacterias Gram negativas características mediante la tinción de estas bacterias.

- Crecimiento en agar nutritivo y tinción de Gram. La observación al microscopio de la tinción reveló la presencia de bacterias Gram negativas. Las células observadas tienen una morfología alargada, semejante a bastones o cilindros, y que se encuentran agrupadas, ya sea en pares o de forma solitaria. Basándonos en estas características y en la tinción que se utilizó, determinamos que se encuentra presencia de bacterias coliformes, probablemente *Escherichia coli*, aunque faltaría realizar pruebas para confirmarlo.

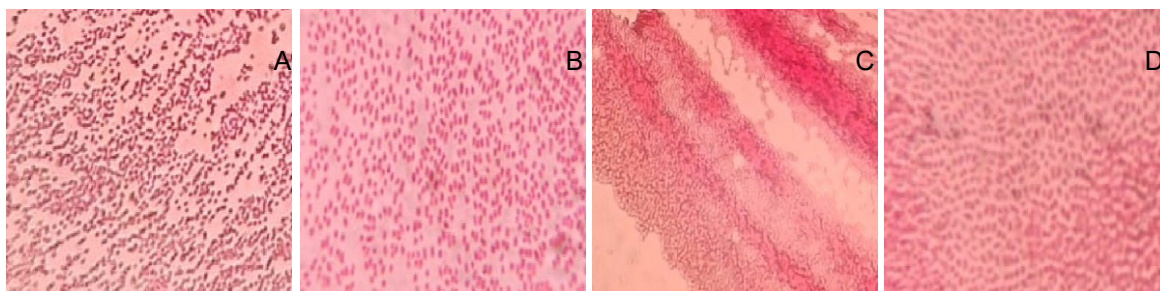


Figura 1. Muestra de cultivo de las pruebas presuntivas de coliformes con tinción de Gram a través de microscopio óptico. (A) Muestra de la dilución 10^{-1} objetivo 40X. (B) Muestra de la dilución 10^{-1} objetivo 100X. (C) Muestra de la dilución 10^{-2} objetivo 40X. (D) Muestra de la dilución 10^{-2} objetivo 100X.

- Observación microscópica en fresco. La muestra de agua obtenida directamente del contenedor del SCALL muestra la presencia de muchos componentes de diferentes naturalezas, desde fibras vegetales, restos de insectos e incluso objetos con morfologías muy similares a diversos nemátodos y protozoarios cuando fueron observados usando Yodo Lugol para generar contraste. Esto indica que es necesario el uso de un filtro para eliminar la presencia de estos contaminantes que afectan la calidad del agua.

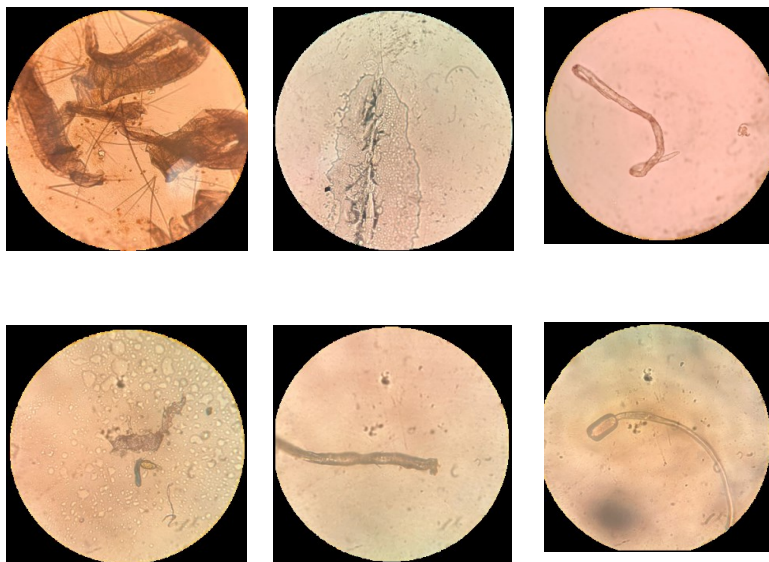


Figura 3. Algunos cuerpos observados en las muestras de agua. Arriba: Muestras observadas en fresco objetivo 40X. Abajo: Observación en fresco con yodo Lugol objetivo 40X.

CONCLUSIONES

Las propiedades fisicoquímicas de pH, SDT, conductimetría y temperatura son adecuadas y están dentro de los parámetros establecidos en la norma.

La dureza total y concentración de cloruros se encuentran dentro de los parámetros adecuados de acuerdo con la norma.

Para las pruebas microbiológicas los resultados mostraron niveles que excedían los límites permitidos por la NOM-127-SSA1-1994. Las pruebas presuntivas y confirmatorias mostraron la presencia de crecimiento, pero no de formación de gas, por lo que es necesario realizar nuevas pruebas y confirmar las coliformes fecales.

Al observar la tinción de gran de los microorganismos se observan bacterias Gram negativas con morfología muy similar a *E. coli* lo que hace más probable la presencia de estos microorganismos.

La observación en fresco del agua muestra la presencia de muchos restos animales y vegetales.

Dados los resultados obtenidos, es necesario procesar el agua del sistema a través de un filtro que elimine partículas de origen vegetal y animal, que además mejoren las características organolépticas. Además, es imprescindible la aplicación de hipoclorito de sodio para disminuir la cantidad de microorganismos patógenos, como las coliformes fecales que fueron detectadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rodríguez Haros, B., Bustamante Lara, T. I., & León Andrade, M. (2022). Captación de agua de lluvia ante la crisis hídrica regional.
2. Análisis de agua - determinación de dureza total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166788/nmx-aa-072-scfi-2001.pdf> (Consultado: 24/Jul/23).
3. Camacho, A., M.Giles, A.Ortegón, M.Palao, B.Serrano & O.Velázquez. (2009). Método para la determinación de bacterias coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli* por la técnica de diluciones en tubo múltiple (Número más Probable o NMP) [Archivo PDF] http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/acym/TecnicBasicas-Colif-tot-fecales-Ecoli-NMP_6529.pdf
4. Norma Oficial Mexicana NOM-230-ssa12002, salud ambiental. Agua para uso y consumo humano, requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua. Procedimientos sanitarios para el muestreo. DOF. Available at: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=2081772&fecha=12%2f07%2f2005 (Consultado: 23 July 2023).

ANÁLISIS DE ASPECTOS DE LA DINÁMICA POBLACIONAL DE *ABIES RELIGIOSA* EN EL CHICO ESTADO DE HIDALGO, MÉXICO

Rocío Zárate-Hernández¹, Selene Ortiz-Burgos³, Claudia Ballesteros-Barrera¹, Bárbara Vargas-Miranda¹, Angelica Martínez-Bernal¹

¹Departamento de Biología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. C.P.: 09340, San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, D.F. México., ²Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México. Batalla 5 de mayo S/N, Col. Ejército de Oriente, CP 09230. México, D.F.

RESUMEN

El Parque Nacional "El Chico", se localiza en el estado de Hidalgo, es un área que se caracteriza por poseer uno de los bosques relictos de oyamel, que encontramos en la cuenca del Valle de México. El bosque de *Abies religiosa* o bosque de oyamel se distribuye en parches aislados y sus áreas continuas más extensas se localizan en la Faja Volcánica Transmexicana. Es importante considerar que hay diversos estudios que aportan información sobre aspectos ecológicos y florísticos del bosque de oyamel en México, no obstante, se debe hacer un seguimiento continuo de la dinámica poblacional de los mismos debido a la gran presión ambiental y antropogénica que se ejerce sobre ellos. El objetivo de este trabajo es hacer un análisis de aspectos poblacionales de este tipo de vegetación y determinar cómo es su estructura de edades y las repercusiones en su dinámica poblacionales. Se establecieron cinco sitios de muestreo mediante la utilización del punto centro cuadrado para analizar la población de *A. religiosa* y estimar la variación en su estructura poblacional. Un total de 100 árboles fueron evaluados, se registró el diámetro a la altura del pecho (DAP), mediante esta información se determinó que el diámetro se encontró entre 3.1 y 212 cm, con un promedio de 38.6cm. Se realizó un análisis descriptivo de las observaciones y se encontró que la estructura de tamaños considerando la regla de Sturges estableciéndose 8 clases de edad, mostrando un alto número de individuos en las dos primeras, observándose así un alto número de individuos en estadios juveniles. Un análisis comparativo del DAP entre sitios determinó que no existían diferencias significativas entre sitios ($P>0.09$), mostrando una homogeneidad en entre los individuos de la población de oyameles. De acuerdo con la información recabada, podemos definir a esta población de *Abies* en el Parque Nacional El Chico, como dinámica, lo que implica que predominan los individuos jóvenes, lo que caracteriza a una población que puede mantenerse a largo plazo. La importancia de estos estudios contribuye al conocimiento de la dinámica poblacional de la especie, pero además proporciona información que puede ser utilizada en la conservación y manejo de los bosques de oyamel los cuales se encuentran bajo una intensa presión antropogénica, así como a la debida a las grandes variaciones ambientales resultado del cambio climático actual.

INTRODUCCIÓN

México cuenta con una gran cantidad de ecosistemas, de los cuales los forestales son de gran relevancia debido a la gran cantidad de servicios ecosistémicos que proporciona, que van desde los de aprovisionamiento, regulación, soporte y culturales. Dentro de estos sistemas tenemos naturalmente las formas vegetales más conspicuos son los árboles, los cuales determinan la fisonomía de estos ambientes, lo que hace relevante el análisis de su distribución y frecuencia de tamaños los cuales son un buen indicador del estado de estos ecosistemas. Un bosque templado especial presente en México es el bosque de *Abies* o también llamado bosque de oyamel, que se presenta en la zona templada subhúmeda de México, se establecen entre los 2400 y 3600 msnm, considerados bosques de alta montaña, son de gran importancia ecológica, económica y social. En estos ambientes se establecen micrositios con características ecológicas específicas que permiten formar parte en el ciclo de los nutrientes, la protección, estabilización y regulación de la temperatura, así como en la escorrentía del suelo, la recarga de mantos acuíferos y el suministro de agua. Al mismo tiempo, los bosques de oyamel son el hábitat de una importante diversidad de organismos como hongos, briofitas y algunos grupos de vertebrados. Así, como aportar valiosos dividendos al sector industrial ya que se aprovechan, entre otras cosas, para la elaboración de pulpa para papel, y desde el punto de vista social constituyen áreas notables de recreación y esparcimiento. A lo largo

de su distribución, los bosques de *Abies*, tienden a estar aislados y a confinarse en laderas de cerros o barrancas con microclimas especiales (Zepeda Gómez *et al.*, 2023). Es importante considerar que hay diversos estudios que aportan información sobre aspectos ecológicos y florísticos del bosque de oyamel en México, no obstante, se debe hacer un seguimiento continuo de la dinámica poblacional de los mismos debido a la gran presión ambiental y antropogénica que se ejerce sobre ellos. El objetivo de este trabajo es hacer un análisis de aspectos poblacionales de este tipo de vegetación y determinar cómo es su estructura de tamaños y las repercusiones en su dinámica poblacional.

PARTE EXPERIMENTAL

El estudio se realizó dentro del Parque Nacional El Chico que se ubica en el extremo occidental de la Sierra de Pachuca en el estado de Hidalgo, México entre las coordenadas extremas de los 20°10'10" a 20°13'25" de latitud Norte y los 98° 41' 50" a 98° 46' 02" de longitud Oeste (Figura 1), comprende una superficie total de 2739 ha (CONANP, 2005).

Con base al sistema de Köppen modificado por García (1981), en el Parque Nacional se presenta un clima C(m)(w)b(i)gw" que corresponde a un templado subhúmedo con lluvias en verano, la temperatura media anual oscila entre 12 y 18 °C, existiendo influencia de monzón y presentándose un porcentaje de lluvia invernal menor de 5 % de la total anual. El verano es fresco y largo, con inviernos fríos con poca oscilación térmica y presencia de canícula.

El tipo de roca predominante es ígnea extrusiva del tipo brecha volcánica y andesita. Los suelos predominantes son del tipo Cambisol humico, Regosol districo y Andosol humico de textura media. La vegetación en la mayor parte del parque está formada por bosques de oyamel, con distintas condiciones de productividad. Las principales especies arbóreas son *Abies religiosa*, *Quercus* spp. y *Pseudotsuga macrolepis* (Razo-Zárate *et al.*, 2013)

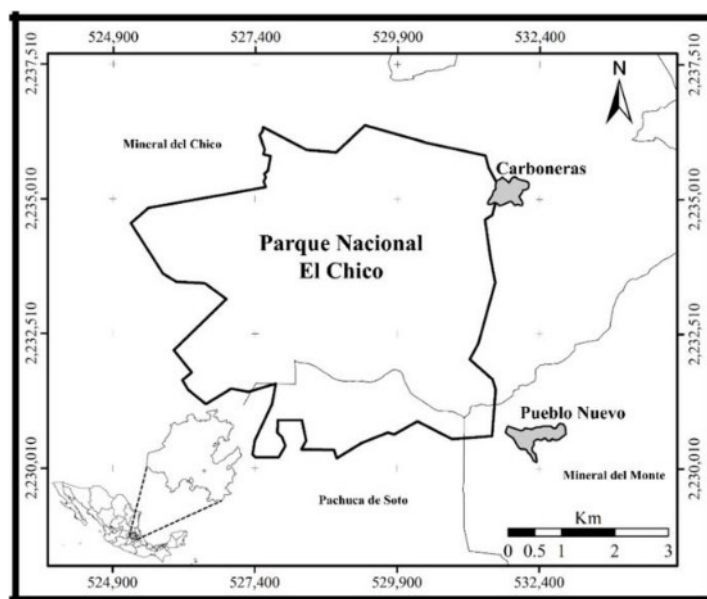


Figura 1. Ubicación geográfica del Parque Nacional El Chico, Hidalgo (Tomado de Ortega Meza *et al.*, 2023).

Se establecieron cinco sitios de muestreo mediante la utilización del punto centro cuadrado (Figura 2) para analizar la población de *A. religiosa* y estimar la variación en su estructura poblacional. Un total de 100 árboles fueron evaluados, a los cuales se les determinó y registró el diámetro a la altura del pecho (DAP). Además, se realizó un análisis comparativo entre los sitios comparando el DAP, se aplicaron pruebas para evaluar los supuestos de Normalidad (Omnibus) y homocedasticidad (Levene modificada), al no cumplirse estos se aplicó la prueba paramétrica de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS

Un total de 100 árboles fueron evaluados, se registró el diámetro a la altura del pecho (DAP), mediante esta información se determinó que el diámetro se encontró entre 3.1 y 212 cm, con un promedio de 38.6cm (Tabla 1). Se realizó un análisis descriptivo total y por sitio.

Tabla 1. Análisis descriptivo de los sitios de muestreo y total del diámetro de *Abies religiosa* en el Parque Nacional El Chico.

SITIOS	N	PROMEDIO	MEDIANA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
1	20	28.81	26.98	17.68
2	20	55.11	47.68	47.29
3	20	44.08	38.39	29.17
4	20	33.11	32.96	17.67
5	20	31.68	33.36	13.88
Total	100	38.56	34.19	29.08

Se registró un total de 100 individuos de *A. religiosa*, mediante estas evaluaciones se realizó un análisis descriptivo total y por sitio de las observaciones y se encontró que la estructura de tamaños considerando la regla de Sturges estableciéndose 8 clases de edad, mostrando un alto número de individuos en las dos primeras, observándose así un alto número de individuos con pequeño diámetro (Figura 2).

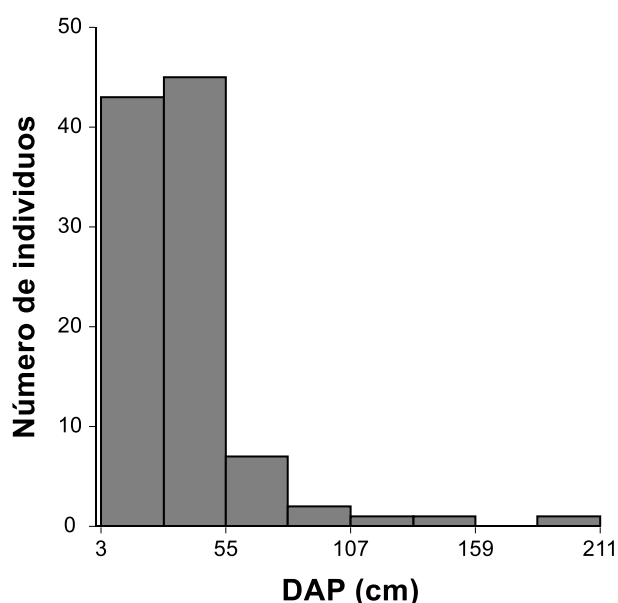


Figura 2. Histograma del Diámetro a la altura del pecho de *A. religiosa*.

Se determinó que la muestra no presentaba una distribución normal y no era homocedástica ($P > 0.0001$), el análisis comparativo (aplicado al DAP entre sitios determinó que no existían diferencias significativas entre sitios ($P > 0.09$), mostrando una homogeneidad en entre los individuos de la población de oyameles (Figura 3).

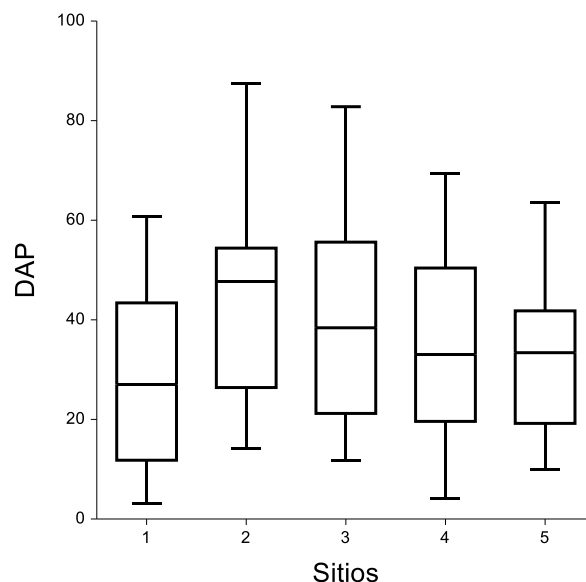


Figura 3. Graficas de caja y bigote entre sitios del Diámetro a la altura del pecho de *A. religiosa*.

CONCLUSIONES

De acuerdo con la información recabada, podemos definir a esta población de *Abies* en el Parque Nacional El Chico, como dinámica, lo que implica que predominan los individuos jóvenes, lo que caracteriza a una población que puede mantenerse a largo plazo. La importancia de estos estudios contribuye al conocimiento de la dinámica poblacional de la especie, pero además proporciona información que puede ser utilizada en la conservación y manejo de los bosques de oyamel los cuales se encuentran bajo una intensa presión antropogénica, así como a la debida a las grandes variaciones ambientales resultado del cambio climático actual.

BIBLIOGRAFÍA

1. CONANP (Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, MX). (2005). Programa de Conservación y Manejo Parque Nacional El Chico. D. F. México. 236 p
2. E. García. (1981). Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía UNAM. México. 166p.
3. E. Melo Guerrero, R. Rodríguez Laguna, M.Á. Martínez Damián, J. Hernández Ortiz, L.M. Valenzuela Núñez, N. Ronquillo Gorgúa. (2023). Disponibilidad a pagar en escenarios alternativos de mejora en el Parque Nacional El Chico, Hidalgo, México. BOSQUE 44(2): 425-435.
4. D. Ortega-Meza, M.T. Pulido Silva, C.J. da Costa de Arruda, Joari; Silva, Carolina, N. Leal Sander, A. Gómez Aiza. (2021). Conocimiento local acerca del laurel silvestre (*Litsea glaucescens* Kunth) en el Parque Nacional El Chico, Hidalgo, México. Madera y bosques, 27(2): 1-15.
5. R. Razo-Zárate, A. J. Gordillo-Martínez, R. Rodríguez-Laguna, C.C. Maycotte-Morales, O.A. Acevedo-Sandoval. (2013). Escenarios de carbono para el bosque de oyamel del Parque Nacional El Chico, Hidalgo, México. Revista Latinoamericana de Recursos Naturales, 9(1): 17-21.
6. L.M. Valenzuela-Núñez, R. Trucíos-Caciano, J.C. Ríos-Saucedo, A. Flores Hernández, J.L. Gonzáles-Barrios. (2011). Caracterización dasométrica y delimitación de rodales de mezquite (*Prosopis* sp) en el estado de Coahuila. Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente, XVII: 87-96.

7. C. Zepeda Gómez, M.E. Estrada Zúñiga, C. Burrola Aguilar, J. Manjarrez, L. White Olascoaga. (2023). Diversidad, estructura y regeneración del bosque de *Abies religiosa* en una zona de hibernación de la mariposa monarca del centro de México. *Madera y Bosques*, 29(2): 1-19.

CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE NURITE (*CLINOPODIUM MACROSTEMUM*, MOC. & SESSÉ EX. BENTH.) ORIGINARIA DE MICHOACÁN, MÉXICO

Carlos Alberto Zornoza Caro¹, Rafael Zamora Vega², José Octavio Rodiles López³ Eréndira Valencia Avilés⁴, ^{1,2,3}

Facultad de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, ⁴
Universidad Politécnica de Uruapan.
2251427a@umich.mx

RESUMEN

El Nurite (*Clinopodium macrostemum* Moc. & Sessé Ex. Benth) es una planta endémica de México empleada desde hace tiempo por la cultura Purépecha en Michoacán. Esta es usada para mejorar la digestión, ya que baja los niveles de flatulencia, es decir, es un agente carminativo. Ésta produce metabolitos secundarios importantes para la comunicación celular y mecanismos de defensa como respuesta a condiciones de estrés de carácter biótico y abiótico. Hoy en día se buscan alternativas naturales empleando estos metabolitos secundarios ante la creciente resistencia de los microorganismos patógenos hacia los productos químicos y farmacológicos, incluyendo a los antibióticos, y buscando menores efectos adversos hacia el paciente. En esta investigación se propone el uso de extractos etanólicos de la planta nurite como alternativa al control microbiano. Ésta fue colectada en el Cerro del Águila, municipio de Paracho de Verduzco, Michoacán, México. Esta se secó a una humedad final del 10%, y se realizaron 3 extractos usando etanol y diferentes partes de la planta, extracto de hoja (EH), extracto de tallo (ET), y extracto hoja + tallo (EHT) a una proporción de 1:1 en este último. Los extractos fueron macerados en etanol al 96% durante 10 días, después se filtraron y posteriormente se concentraron en un rotavapor para eliminar el etanol, para posteriormente disolverlos en agua destilada. El estudio antimicrobiano se realizó utilizando las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, y el hongo *Candida albicans*. En el caso de las bacterias se utilizó como control positivo ampicilina y para el hongo nistatina a una concentración de 1 mg/mL. Se realizó la técnica propuesta por Kirby-Bower, que se basa en la formación de un halo de inhibición. Los resultados mostraron que para *E. coli* la mayor inhibición fue con el extracto del tallo a una concentración de 10 mg/mL y con un valor de 100% con respecto al testigo; para *C. albicans* la mayor inhibición se presentó usando el extracto de hoja a 10 mg/mL y con una inhibición de $75.5 \pm 5.3\%$; para *S. aureus* la mayor inhibición fue del $66.1 \pm 0.1\%$ con el extracto de hoja/tallo a una concentración de 10 mg/mL. Por otro lado, usando la técnica de sembrado en placa, se determinó que la Concentración Mínima Inhibitoria, MIC, fue de 55 mg/mL para *E. coli* para tallo; 23 mg/mL para *C. albicans* con hoja; y 25 mg/mL para *S. aureus* con hoja/tallo. Los resultados obtenidos nos permiten sugerir el uso de estos extractos en el área alimentaria, cosmética o farmacéutica, para el control microbiano.

INTRODUCCIÓN

El Nurite (*Clinopodium macrostemum* Moc. & Sessé Ex. Benth) conocido en Michoacán como Té Nurite es una planta endémica de México perteneciente a la familia de las Lamiaceae o labiadas y al igual que la mayoría de las especies de esta familia presentan propiedades de interés para la salud humana. En Michoacán es bien conocida por los pueblos purépechas ya que funge como símbolo y tradición de su cultura, para ellos es considerado símbolo de fertilidad y cabe resaltar que es utilizada hasta la actualidad para tratar diversos padecimientos involucrados con la indigestión, siendo consumida en infusiones como agua de uso (Carbajal et al, 2023). Las plantas producen diversos compuestos provenientes de su metabolismo primario y secundario donde actualmente por sus aplicaciones se han mantenido en auge las investigaciones y el uso de los metabolitos secundarios los cuales son sustancias que las plantas producen y utilizan para soportar factores bióticos y abióticos de su entorno (Lustre, 2022). Dichos metabolitos han sido investigados en el Nurite de los cuales se documenta que contienen una mezcla de compuestos químicos denominados flavonoides, los cuales fueron estudiados de manera extensa en los últimos años, sobre todo por su efecto antioxidante (Catapano, 1997; Pérez-Gutiérrez y Gallardo-Navarro, 2010); entre aquellos que se han extraído de sus hojas se citan a la naringenina, y ciertos terpenos: limoneno, pulegona,

carvacrol y timol, considerados antimicrobianos (Bello, 2006). Gracias a su diversidad y tipo de compuestos encontrados en sus extractos diversas investigaciones donde se ha estudiado su aceite esencial se ha demostrado su efecto antimicrobiano, planteando que el Nurite podría fungir como un excelente candidato para ser probado frente a microorganismo ya que es bien sabido que los terpenos y los flavonoides en los que esta planta es abundante dañan la pared celular y la membrana celular de los microorganismos lo cual subsecuentemente generaría la muerte de las células (Nazzaro, 2013). En esta investigación diferentes tratamientos de extractos etanólicos de Nurite fueron probados contra microorganismos patógenos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* para probar su efecto antimicrobiológico. La elección de dichos microorganismos fue debido a que en diversos alimentos crudos prioritariamente en carnes presentan incidencia por una deficiente higiene y al no ser erradicados pudieran llegar a dañar el alimento y en el peor de los casos generar resistencia a los antimicrobianos convencionales (antibióticos).

MARCO TEÓRICO

El Nurite

El Nurite es una planta perteneciente a la familia de las labiadas. Las labiadas son una familia botánica que tiene unas 3000 especies de plantas distribuidas por las zonas cálidas y templadas de todo el planeta. Este tipo de plantas pueden medir hasta 3 metros de altura. Tienen importancia nutricional y terapéutica. Cuentan con aplicaciones en lo ornamental, en la gastronomía y en la salud, (Masats, 2021).

Gracias a una investigación presentada por Martínez-Gordillo, *et al* (2017), se sabe que las lamiáceas tienen un endemismo del 66.2% de 33 géneros y 598 especies en México, donde cabe resaltar que el género *Salvia* con 306 especies es el más diverso. El estado con mayor diversidad es Oaxaca, no obstante, el que presenta mayor número de especies endémicas es Jalisco. Dichos datos hacen que las lamiáceas sean la octava familia con mayor diversidad en México en donde sus especies representan el 5.5% de esta familia a nivel mundial.

Dentro de sus características físicas se sabe que sus hojas son alargadas, ovaladas y puntiagudas. En el anverso son color verde oscuro y en el reverso verde pálido con muchos pelos (pubescencias) y sus flores son de color rosa-amarillento las cuales aparecen al inicio del año (Muñoz, 2012). Existen diversos nombres coloquiales o sinónimos para referirse al Nurite y estos dependerán de la zona, estado o municipio donde se encuentre o se utilice (Muñoz, 2012). En el estado de México y CDMX por ejemplo se le conoce como: “Tabaquillo” y “Toronjil”; en Oaxaca “Hierba de Borracho”, “Té de Monte” y “Poleo”. Este último también es utilizado en el estado de Michoacán donde también le llama “Té Nurite”, “Nurhitén” y “Nurite” (Rzedowski y Rzedowski, 2010). También se le conoce por estos nombres: “Atochietl”, “Borracho”, “Menta”, “Nurhitini te (purépecha)”, “Tragorigano quauhnahuacense” y “Tunché” por mencionar algunos (González, 2014). Por esta basta diversidad de nombres informales es importante esclarecer su nombre científico actual el cual es: *Clinopodium macrostemum* (Moc. & Sessé ex Benth). Kuntze (naturalista, 2022).

El Nurite (*Clinopodium macrostemum*) se distribuye en México en las áreas montañosas generalmente en el occidente de México (Sinaloa, Nayarit, Colima, Jalisco, Michoacán y Guerrero) pero existen reportes que también se ha encontrado en Oaxaca, Puebla y Estado de México (Turner, 2008).

El Nurite, es conocido en Michoacán por sus propiedades curativas ya que mejorar la digestión y combate infecciones estomacales por lo que es usada como carminativo. Es una planta ampliamente utilizada en la meseta Purépecha desde hace mucho tiempo la cual se prepara generalmente en infusión y se bebe como agua de tiempo, cabe resaltar que hasta la actualidad sirve para complementar platillos típicos de la región, tal es el caso del chile atole y guisados con frijol. (Pérez y Gallardo, 2010). Dentro de los compuestos encontrados en el aceite esencial de Nurite analizado por cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas (CG-EM) se mencionan como los mayoritarios: pulegona (25.50%), linalool (16.62%), timol (14.64%), limoneno (5.53%), cariofileno (3.98%) y mentona (3.09%) (Torres, 2018). Dichos compuestos pueden ser los responsables de sus propiedades curativas.

Mecanismos de acción de los metabolitos secundarios contra los microorganismos

El uso de compuestos derivados de las plantas ha estado en auge debido a que se buscan alternativas para disminuir el uso de antibióticos en la población humana obteniendo menores efectos secundarios tras el consumo de algún antimicrobiano. Los aceites esenciales generalmente tienen efectos antimicrobianos mayores en las bacterias Gram positivas ya que estas no tienen la doble capa externa de fosfolípidos la cual está unida a la membrana interna por LPS (lipopolisacárido), haciendo de esta peculiaridad el quid que define que un género de bacterias sea más susceptible o no a los extractos de plantas como los aceites esenciales. La actividad antibacteriana de los aceites esenciales puede ser debida por su hidrofobicidad la cual hace incapaz su separación de las paredes celulares bacterianas llegando a dañar su estructura y si penetran la célula su objetivo secundario sería su citoplasma el cual pueden llegarlo a coagular. Al dañar la pared celular permite la fuga de componentes celulares aumentando su permeabilidad reduciendo la fuerza motriz de protones, reduciendo sus reservas de ATP por la reducción de su síntesis por la acción de la célula para realizar hidrólisis reduciendo así su potencial de membrana (Nazzaro, 2013).

De igual manera los aceites esenciales y compuestos fenólicos en los hongos dañan su pared celular modificando su funcionalidad y estructura. A bajas concentraciones se observan cambios en la estructura celular, en su respiración y en su permeabilidad. En concentraciones altas pueden llegar a destruir o generar daños graves en la membrana, pérdida de homeostasis y hasta muerte celular. Los extractos pueden atravesar la pared celular y generar fugas de macromoléculas y mezclarse con enzimas y proteínas resultando en cambios en la célula. El estado tóxico provocado en los hongos es el resultado de los aceites esenciales y sus componentes debido a la formación de enlaces de hidrógenos entre los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos. Estos componentes pueden aumentar la concentración de peróxidos lipídicos, como radicales hidroxilos, alcoholes y alcoperoxis, dando lugar a la destrucción de células. Se sabe que compuestos que contienen el núcleo aromático y el grupo OH fenólico se caracterizan por tener alta actividad antimicrobiana por lo que resulta una ventaja contar con compuestos con presencia del anillo bencénico y grupos acetato, por ejemplo, acetato de geranilo y acetato de bornilo, oxígeno en monoterpenos y compuestos carbonilados. Dentro de los aceites esenciales con mayor actividad antifúngica tenemos al carvacrol, eugenol, timol (Kumar *et al.*, 2017).

Cepas oportunistas en la salud humana y en los alimentos

En los alimentos es imprescindible evitar la contaminación de estos por microorganismos ya que pueden dañar la calidad del alimento y en el peor de los casos poner en riesgo la salud del consumidor. Por tal motivo existen diversas medidas de higiene que evitan su contaminación. Existen cepas hospederas en el hombre las cuales por un déficit en el manejo de los alimentos pudieran llegar a ser contaminarlos. Dentro de las cepas hospederas de transmisión habitual en los alimentos tenemos a *Staphylococcus aureus* (bacteria Gram positiva) y *Escherichia coli* (bacteria Gram negativa). Al hablar de antecedentes de contaminación por *S.a* se tiene registro de un estudio realizado en el mercado 10 de agosto en la ciudad de Cuenca en Ecuador donde afirman la presencia de este microorganismo en carnes de: pollo, res y cerdo. En dicho estudio se analizaron diversos puestos de los cuales durante tres semanas de muestreo analizando las UFC y se concluyó la prevalencia de *S.a* en un 100% (Ordoñez y Peñafiel, 2022). En un estudio realizado en un mercado del municipio de Piendamó Cauca en Colombia 1 de cada 5 establecimientos presentaban contaminación por *E.coli* multirresistente (Fernández y Ordóñez, 2021). De igual manera en la venta de Carne molida en Perú se encontró presencia de *E.coli* (Moncayo de Freitas, 2019).

Al contar ya con dos tipos de bacterias para probarlas con los extractos de *Nurite* una Gram positiva y otra negativa. Se seleccionó una cepa fúngica que también es oportunista en el hombre la cual es *Candida albicans* la cual en un estudio se reportó que de 1059 manipuladores de alimentos el 30.7% presentaba contaminación por algún tipo de microorganismo de los cuales el 12.4% pertenecía a *Candida albicans* (Bazán – Mora *et al.*, 2001).

Estos 3 tipos de microorganismo además de estar presentes en alimentos y ser hospederos en el ser humano han logrado obtener resistencia a los antibióticos en los últimos años debido a su uso inadecuado (Chambers y De Leo., 2009; Cordova *et al.*, 2023 y Pinilla *et al.*, 2020).

PARTE EXPERIMENTAL

Material biológico y maceración en alcohol

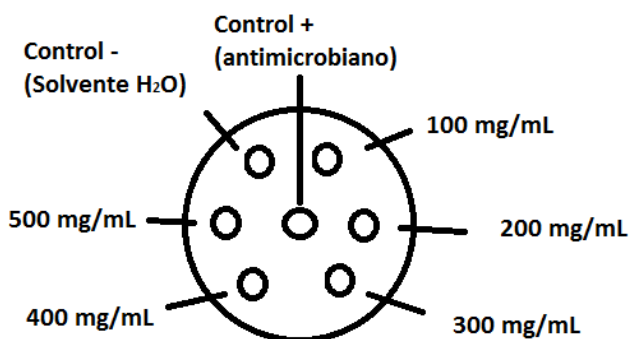
El Nurite (*Clinopodium macrostemon*) fue obtenido del cerro del Águila (2816 msm, 19°34'60" N y 102°3'0" W) en Paracho de Verduzco. En el Herbario EBUM de la UMSNH se determinó taxonómicamente la planta y se secó a la sombra durante 15 días y fue almacenada. Se pulverizaron hojas, tallos y la combinación de estos. Se pesaron 40 g de cada tratamiento y se adicionó 400 mL de etanol 96% dejando macerar en frío (4-10°C) durante 10 días en frascos ámbar. Los macerados fueron filtrados con W.No 1 y el residuo fue nuevamente macerado con 200 mL durante 5 días más para posteriormente volver a ser filtrado y juntado con el primer macerado. Posteriormente se llevaron a sequedad en rotavapor a presión reducida, rotación nivel 7 del equipo y temperatura de 40°C. El extracto seco fue resuspendido en agua destilada en concentración de 1g/mL.

Evaluación de la inhibición de *C. albicans*, *S. aureus* y *E. coli* por el método de Kirby Bower.

Se prepararon soluciones seriadas con agua estéril de cada tratamiento en concentración de: 100,200,300,400,500 mg/mL. Se tomaron alícuotas de las soluciones seriadas de Hojas, tallo/hojas y tallo por separado de *Clinopodium macrostemon* y se impregnaron discos de papel filtro de 5 mm con 25 µL de cada solución.

En cajas con Agar nutritivo se adicionaron 500 µL de los inóculos estandarizados al 0.5 de la escala de McFarland y con un esparcidor de células de acero inoxidable se distribuyeron los inóculos por toda la caja de Petri rotándola a 60° en dos oportunidades más y dejando secar durante 10 min antes de colocar los discos. Estos se ubicaron en la placa de agar.

Los discos se ubicaron en la placa de agar con una pinza anatómica estéril a 15 mm del borde de la placa, presionando suavemente sobre el agar para permitir su adherencia. Los discos fueron ubicados como se aprecia en la figura 9. En cada caja se colocaron 2 discos de control. En todos los casos se utilizó un control negativo o control de solvente el cual fue agua estéril y como control positivo se utilizó nistatina en concentración de 1mg/mL de los cuales se tomaron 10 µL que en teoría tendrían 0.01 mg/mL para *Candida albicans*, para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* se utilizó ampicilina a la misma concentración (0.01 mg/mL). Se incubaron a 37 °C durante 24 y 48 h, de manera invertida. La lectura de la prueba de sensibilidad se hizo por medio de un pie de rey y regla de medición y se calcularon los resultados como porcentaje de inhibición considerando como 100% de inhibición los halos de los controles positivos para cada caso.



Distribución de discos de papel filtro impregnados con varias soluciones.

Técnica de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bacteriana (CMB) y fúngica (CMF) por macrodilución en caldo.

Se ajustó el inóculo de cada microorganismo a 0.1 de absorbancia a 625 nm con caldo nutritivo. Después se prepararon las soluciones madre de cada tratamiento. El ensayo para la obtención de la CMI incluyó 3 concentraciones de los extractos estas determinadas por la prueba anterior (10mg/ml, 12.5 mg/mL y 15 mg/mL). Los extractos seleccionados para cada microorganismo fueron determinados de igual manera por la prueba cualitativa de Kirby-Bower para cada microorganismo.

con mayor actividad antimicrobiana: *C. albicans* el extracto de hoja, para *S.aureus* el extracto hoja/tallo y para *E.coli* el extracto de tallo. Como control positivo se empleó Nistatina (1mg/mL) para el hongo y para las bacterias Ampicilina (1mg/mL) y para control negativo (agua destilada estéril 660 μ L + 440 μ L de caldo nutritivo). Cada concentración fue probada por triplicado, incluyendo los controles. Se emplearon tubos ependorf a los cuales se agregaron 70 μ L de inóculo bacteriano ajustado y se aforaron a 1 mL con extracto de cada dilución donde cada concentración probada se realizó por triplicado. Cada tubo ependorf preparado fue medido antes y después de su incubación para apreciar el comportamiento de los microorganismos. La variable de respuesta fue la absorbancia (Gutiérrez, 2015; Guadalupe, 2021)

La concentración mínima bacteriana y fúngica fue determinada por la siembra de cada tubo y establecida en μ g/mL del extracto al observar la ausencia del microorganismo tras ser incubado a 37°C/24h – 48 h. De igual manera se sembraron los controles: positivo, negativo, de crecimiento de cada inóculo ajustado (Taroco *et al.*, 2006; Guadalupe, 2021).

RESULTADOS

Evaluación de la inhibición de *C. albicans*, *S. aureus* y *E. coli* por el método de kirby bower.

En la tabla 1 se muestra la inhibición de *Candida albicans* con extractos de hoja, hoja/tallo y tallo de Nurite donde el valor con 10 mg de peso seco en el disco del extracto de hoja presentó el valor mayor de inhibición con un 75.44 ± 3.04 % y al compararlo con las diferentes concentraciones del mismo extracto resultó ser estadísticamente diferente ($p \leq 0.05$). Este valor al compararlo con los demás tratamientos de extractos (tallo y hoja/tallo) no presenta diferencia estadística ($p \leq 0.05$) en concentraciones que van del 7.5 a 12.5 mg en disco. En todos los casos, el control Nistatina, tuvo resultados estadísticamente significativos distintos a los demás tratamientos y concentraciones probadas, siendo este el mejor en todos los casos, obteniendo el % de inhibición mayor con una concentración menor que los extractos de Nurite.

Las concentraciones de 2.5 y 5 mg de los extractos de hoja y hoja/tallo, presentaron nula inhibición contra la levadura *C.albicans*. El extracto de tallo, presentó inhibición en todas las concentraciones utilizadas.

Tabla 1. Comparación de la Inhibición de *Candida albicans* con extracto de hoja, hoja/tallo y tallo de *Clinopodium macrostemon*.

Concentración del extracto en disco mg	% Halo de inhibición hoja	% Halo de inhibición hoja/tallo	% Halo de inhibición tallo
2.5	0.000 ± 0 ^{d D}	0 ± 0 ^{c D}	52.63 ± 5.26 ^{b C}
5	0.000 ± 0 ^{d D}	0 ± 0 ^{c D}	54.39 ± 5.26 ^{b C}
7.5	36.842 ± 0 ^{c C}	62.71 ± 3.6 ^{b BC}	63.16 ± 0 ^{b BC}
10	75.44 ± 3.04 ^{b B}	59.32 ± 7.77 ^{b BC}	64.91 ± 3.72 ^{b BC}
12.5	52.63 ± 3.04 ^{d C}	66.10 ± 0 ^{b BC}	68.42 ± 8.04 ^{b BC}
Nistatina (control +) 1mg/mL	100 ± 0 ^{a A}	100 ± 10.58 ^{a A}	100 ± 8.04 ^{a A}

Nota. - ANOVA 1 vía (1 factor) y prueba post hoc de Tukey. Los valores son medias del % de inhibición $\pm$ DE (n=3) de los extractos de Nurite contra *Candida albicans* respecto al control + (Nistatina). Medias con una letra minúscula diferente indican diferencia significativa entre el mismo tratamiento y las letras con una letra mayúscula diferente indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los diferentes tratamientos.

En la tabla 2 se muestra la comparación de la inhibición de *Escherichia coli* con extractos de hoja, hoja/tallo y tallo de Nurite donde el valor de 10 mg de peso seco en el disco del extracto de tallo

presentó la cantidad mayor de inhibición 124.390 ± 0 % en su mismo tratamiento y entre los tratamientos con un valor incluso mayor al control Ampicilina, siendo significativamente distinto ($p \leq 0.05$).

La concentración del extracto de hoja de 10 mg en el disco presentó la mayor inhibición con un 97.06 ± 8.82 % y comparado con el mismo tratamiento a 7.5 mg el porcentaje de inhibición fue de 85.29 ± 5.09 % donde no existió diferencia significativa ($p \leq 0.05$) ni con las concentraciones de 5 y 12.5 mg ($p \leq 0.05$).

En el extracto tallo/hoja la concentración de 12.5 mg en disco presentó inhibición del 80 ± 8.66 % siendo este menor que el control, presentando diferencia significativa ($p \leq 0.05$). En concentraciones de 2.5 a 10 mg no fue clara la inhibición con este tipo de extracto.

Tabla 2. Comparación de la Inhibición de *Escherichia coli* con extracto de hoja, hoja/tallo y tallo de *Clinopodium macrostemon*.

Concentración del extracto en disco mg	% Halo de inhibición hoja	% Halo de inhibición tallo/hoja	% Halo de inhibición tallo
2.5	0 ± 0 c,D	0 ± 0 c, D	0.000 ± 0 d, D
5	79.41 ± 8.82 b,BC	0 ± 0 c, D	0.000 ± 0 d, D
7.5	85.29 ± 5.09 ab,BC	0 ± 0 c, D	78.05 ± 8.45 c, C
10	97.06 ± 8.82 a,BC	0 ± 0 c, D	124.390 ± 0 a, A
12.5	85.29 ± 5.09 ab,BC	80 ± 8.66 b, BC	97.56 ± 15.23 bc, BC
Ampicilina (Control +)	100 ± 5.09 a,B	100 ± 11.46 a, B	100 ± 8.45 b, B

Nota. - ANOVA 1 vía (1 factor) y prueba post hoc de Tukey. Los valores son medias del % de inhibición $\pm$ DE (n=3) de los extractos de Nurite contra *Escherichia coli* respecto al control + (Ampicilina). Medias con una letra minúscula diferente indican diferencia significativa entre el mismo tratamiento y las letras con una letra mayúscula diferente indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los diferentes tratamientos.

En la tabla 3, se muestra la comparación de la inhibición de *Staphylococcus aureus* con extractos de hoja, hoja/tallo y tallo de Nurite, donde la concentración de 12.5 mg de peso seco del extracto de tallo presentó la cantidad mayor de inhibición 66.43 ± 0.58 en el mismo tratamiento y entre los tratamientos. Esta no presentó diferencia significativa entre las concentraciones de tallo que van de 5 a 12.5 mg. Al compararlo con el extracto de hoja no presento diferencia significativa entre 7.5 a 12.5 mg con un valor incluso mayor al control Ampicilina, siendo significativamente distinto ($p \leq 0.05$). En el extracto de tallo al comparar sus concentraciones en su mismo tratamiento se nota que no existe diferencia significativa entre las concentraciones probadas ($p \leq 0.05$).

En el extracto de hoja las concentraciones de 7.5 a 12.5 mg no presentaron diferencia significativa, pero estas al compararlas con la concentración de 5 mg si presentaron diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$).

En la concentración de 2.5 mg del extracto de hoja y en el extracto hoja/tallo en las concentraciones de 2.5 a 7.5 mg no existió halo de inhibición visible.

Tabla 3. Comparación de la Inhibición de *Staphylococcus aureus* con extracto de hoja, hoja/tallo y tallo de *Clinopodium macrostemum*.

Concentración del extracto en disco mg	% Halo de inhibición hoja	% Halo de inhibición tallo/hoja	% Halo de inhibición tallo
2.5	0 ± 0 ^{d, D}	0 ± 0 ^{c, D}	44.12 ± 0 ^{b, C}
5	42.03 ± 3.07 ^{c, C}	0 ± 0 ^{c, D}	47.06 ± 2.55 ^{b, BC}
7.5	49.28 ± 0 ^{bc, BC}	0 ± 0 ^{c, D}	54.41 ± 9.18 ^{b, BC}
10	60.87 ± 0 ^{b, BC}	55.51 ± 1.14 ^{b, BC}	55.88 ± 2.55 ^{b, BC}
12.5	53.62 ± 6.64 ^{bc, BC}	66.43 ± 0.58 ^{b, B}	50 ± 5.09 ^{b, BC}
Ampicilina (Control +)	100 ± 11.5 ^{a, A}	100 ± 10.58 ^{a, A}	100 ± 17.83 ^{a, A}

Nota. - ANOVA 1 vía (1 factor) y prueba post hoc de Tukey. Los valores son medias del % de inhibición ± DE (n=3) de los extractos de Nurite contra *Staphylococcus aureus* respecto al control + (Ampicilina). Medias con una letra minúscula diferente indican diferencia significativa entre el mismo tratamiento y las letras con una letra mayúscula diferente indican diferencias significativas (p≤0.05) entre los diferentes tratamientos.

En la tabla 4 se muestran los extractos de Nurite EH, EHT y ET que presentaron mayor inhibición contra los microorganismos probados (ver figuras, 1, 2 y 3). Siendo el EH con mayor halo de inhibición para *C. albicans* a una concentración de 10 mg obtuvo un % de inhibición del 75.439 ± 5.26, el EHT fue el que tuvo mayor halo de inhibición para *S. aureus* a una concentración de 12.5 mg y ET para *E. coli* con extractos de hoja, hoja/tallo y tallo de Nurite donde la concentración de 12.5 mg de peso seco en el disco obtuvo un porcentaje de inhibición del 66.43 ± 0.58 y con ET fue el que presentó mayor % inhibición contra *E. coli* a una concentración de 10 mg en el disco presentando la inhibición de 46.51 ± 2.88 en su mismo tratamiento (p≤0.05).

Tabla 4. Extractos con mayor inhibición por microorganismo

Concentración del extracto (mg/disco)	EH % inhibición <i>C. albicans</i>	EHT % inhibición <i>S. aureus</i>	ET % inhibición <i>E. coli</i>
2.5	0.000 ^d	0.000 ^c	0.000 ^d
5	0.000 ^d	0.000 ^c	0.000 ^d
7.5	36.842 ± 0 ^c	0.000 ^c	27.44 ± 3.71 ^c
10	75.439 ± 5.26 ^a	51.51 ± 1.14 ^b	46.51 ± 2.88 ^a
12.5	52.632 ± 3.04 ^b	66.43 ± 0.58 ^a	37.56 ± 1.12 ^b

Nota. - ANOVA 1 vía (1 factor) y prueba post hoc de Tukey. Los valores son medias del % de inhibición ± DE (n=3) de los extractos de Nurite contra los microorganismos probados, respecto al control positivo. Medias con una letra minúscula diferente indican diferencia significativa entre el mismo tratamiento (p≤0.05).



Figura 1. Halos de inhibición del EH de Nurite contra *C. albicans*

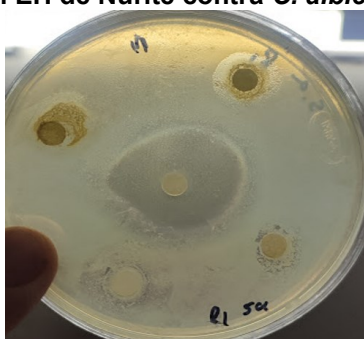


Figura 2. Halos de inhibición del EHT de Nurite contra *S. aureus*



Figura 3. Halos de inhibición del ET de Nurite contra *E. coli*

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB).

En la tabla 5 se muestra el % de inhibición de *S. aureus* con EHT donde el valor máximo fue de 61.33 ± 0.57 a una concentración de 17.5 mg/mL.

Tabla 5.- CMI de *S. aureus* con EHT

Concentración mg/mL	% inhibición
0	0
12.5	44.57 ± 3.06^c
15	56.40 ± 1.11^b
17.5	61.33 ± 0.57^a

Nota. - ANOVA 1 vía (1 factor) y prueba post hoc de Tukey. Los valores son medias del % de inhibición $\pm$ DE (n=3) del EHT de Nurite contra *S. aureus*. Medias con una letra minúscula diferente indican diferencia significativa entre el mismo tratamiento ($p \leq 0.05$).

En la figura 4 se muestra la CMB y la ausencia de crecimiento de *S. aureus* a 17.5 mg/mL aplicando EHT.

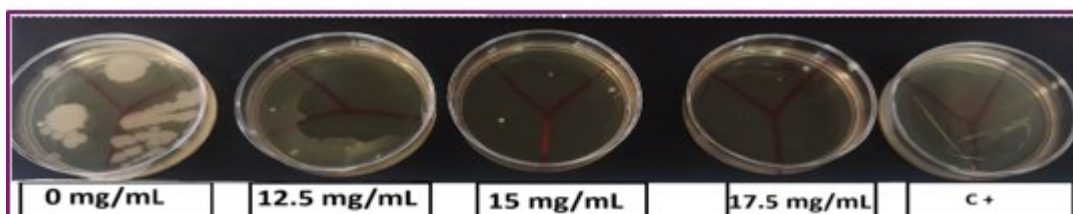


Figura 4.- CMB de *S. aureus* con EHT

En la tabla 6 se muestra el % de inhibición de *C. albicans* con EH donde el valor máximo fue de 64.10 ± 0.98 a una concentración de 17.5 mg/mL.

Tabla 6.- CMI de *C. albicans* con EH

Concentración mg/mL	% inhibición
0	0
12.5	31.93 ± 1.74^c
15	52.62 ± 1.49^b
17.5	64.10 ± 0.98^a

Nota. - ANOVA 1 vía (1 factor) y prueba post hoc de Tukey. Los valores son medias del % de inhibición $\pm$ DE (n=3) del EH de Nurite contra *C. albicans*. Medias con una letra minúscula diferente indican diferencia significativa entre el mismo tratamiento ($p \leq 0.05$).

En la figura 5 se muestra la CMB donde se observa la ausencia de crecimiento de *C. albicans* a 17.5 mg/mL aplicando EH.

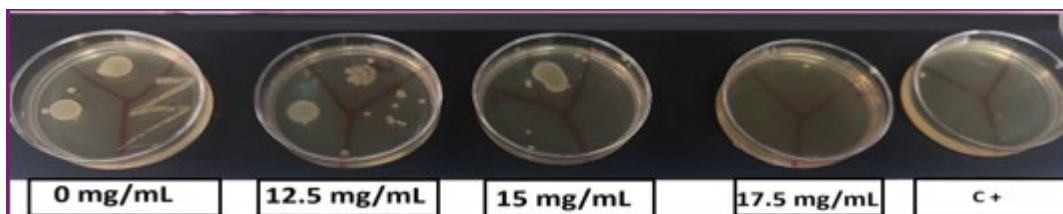


Figura 5.- CMB de *C. albicans* con EH

En la tabla 7 se muestra el % de inhibición de *E. coli* con ET donde el valor máximo fue de 27.29 ± 0.68 a una concentración de 17.5 mg/mL.

Tabla 7.- CMI de *E. coli* con ET

Concentración mg/mL	% inhibición
0	0
12.5	8.33 ± 0.65^c
15	20.12 ± 0.18^b
17.5	27.29 ± 0.68^a

Nota. - ANOVA 1 vía (1 factor) y prueba post hoc de Tukey. Los valores son medias del % de inhibición $\pm$ DE (n=3) del ET de Nurite contra *E. coli*. Medias con una letra minúscula diferente indican diferencia significativa entre el mismo tratamiento ($p \leq 0.05$).

En la figura 6 se muestra la CMB con crecimiento de *E. coli* a 17.5 mg/mL aplicando ET.

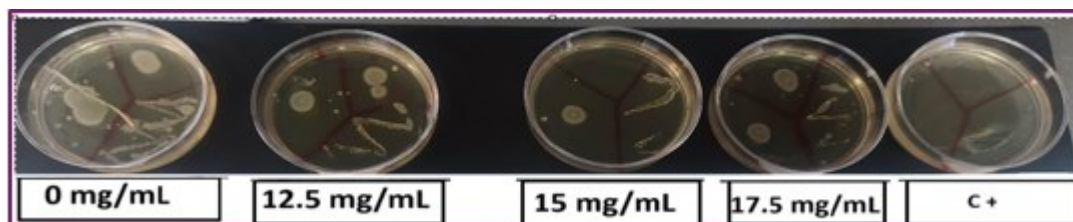


Figura 6.- CMB de *E. coli* con ET

DISCUSIÓN

Acorde a nuestros resultados presentados contra *E. coli* en la prueba de kirby bower y lo reportado por Carbajal *et al* en el 2023, el mejor extracto fue el tratamiento etanólico con tallo. Cabe resaltar que en la CMB y CMI aún presentó crecimiento por lo que se sugiere aumentar la concentración del extracto para obtener una inhibición del 99.9% como lo hizo Carbajal *et al* en el 2023, mostrando así inhibición a 250 mg/mL con el extracto de hoja cen etanol.

Acorde a los resultados presentados contra la bacteria *S. aureus* en la prueba kirby bower y lo reportado por Carbajal *et al* en el 2023, el extracto de hoja presentó mayor inhibición comparado con el tallo y en nuestro estudio fue igual. En la CMI presentó inhibición del 61.33 ± 0.57 y al inocular esta en placa, la CMB fue de 17.5 mg/mL. Carbajal *et al* en el 2023 mostró la mayor inhibición a 225 mg/mL con el extracto de hoja etanólico así como el extracto acuoso. Nuestros resultados fueron menores en cuanto a la concentración mínima de extracto para inhibir al microorganismo. Larrauri, M. (2016) utilizó tegumento de maní donde muestra inhibiciones con 25 mg/mL a 50 mg/mL sobre *S. aureus*. Siendo nuestro valor inferior nuevamente en comparación a este otro estudio.

Acorde a los resultados presentados contra *C. albicans* no existen artículos publicados donde se prueben extractos de Nurite contra *Candida albicans*. En un estudio publicado por Mamani (2018) empleo *Menta spicata* la cual es de la misma familia que el Nurite (Lamiaceae) se obtuvo la inhibición del hongo en un 23.3% y únicamente hicieron la prueba de kirby bower con una solución al 70%.

CONCLUSIONES

Los extractos de Nurite cuentan con compuestos con capacidad antimicrobiana frente a las cepas de microorganismos de *S. aureus*, *E. Coli* y *C. albicans*, siendo este último el más sensible con el tratamiento EH, seguido de *S. aureus* con el extracto de EHT, ambos extractos a 17.5 mg/mL y el menos sensible *E. Coli*, ya que a la máxima concentración probada del ET mostró crecimiento posiblemente por la conformación de su pared celular, ya que cuenta con una capa externa de polisacáridos. Los resultados de esta investigación sugieren las potencialidades de uso en la industria alimentaria y farmacéutica. Se sugiere realizar un ensayo biodirigido, realizando una serie de fraccionamientos con diferentes solventes para determinar el o los compuestos responsables de la inhibición microbiológica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bazán-Mora E, Sánchez-Paredes E, Córdoba-Martínez E, et al. Hallazgo de *Candida albicans* en manos de manejadores de alimentos. *Rev Mex Patol Clin Med Lab*. 2001;48(1):37-41.
2. Carbajal, J., Salmerón, B., Gama M., y Galindo, G. (2023). Actividad antioxidante y antimicrobiana del Nurite (*Satureja macrostema* (Benth), Briq). *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*. 7(1): 425-444. DOI: 10.37811/cl_rcm.v4i1.
3. Córdova Zea, S. P., Marcillo Indacochea, X. E., & Lucas Parrales, E. N. (2023). Infecciones del tracto genitourinario asociadas a *Escherichia coli*: epidemiología en Latinoamérica. *MQRInvestigar*, 7(1), 309–329. <https://doi.org/10.56048/MQR20225.7.1.2023.309-329>.
4. Fernández, D. y Ordóñez, L. (2021). Detección de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp en carne de res distribuida en diferentes expendios del municipio de Piendamó, Cauca. Tesis de Licenciatura. Universidad Antonio Nariño. <http://repositorio.uan.edu.co/handle/123456789/6121>.
5. González (2014). Bases tecnológicas para el aprovechamiento de *Satureja macrostema* en la meseta purépecha, Michoacán. SSRN.
6. Kumar, Amarjeet; Kudachikar, V. B. (2017). *Antifungal properties of essential oils against anthracnose disease: a critical appraisal*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, (), – . doi:10.1007/s41348-017-0128-2

7. Mamani Huayhua, F. S. (2018). Comparación de la inhibición hidroalcohólica de la *Mentha spicata* y la nistatina para inhibir el crecimiento in vitro de *Candida Albicans*, Juliaca 2018.
8. Masats. J. (2021). *Familia de las labiadas*. Botanical-Online. <https://www.botanical-online.com/botanica/familia-labiadas> [Último Acceso 5 de diciembre de 2021].
9. Montero-Recalde, M, Vayas, L, Avilés-Esquivel, D, Pazmiño, P, y Erazo-Gutiérrez, V. (2018). Evaluación de dos métodos para medir la sensibilidad de inhibición de crecimiento de la cepa certificada de *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus*. 29(4): 1543-1547. DOI: 10.15381/rivep. v29i4.15185.
10. Muñoz R. (2012). *Diccionario Enciclopédico de la Gastronomía Mexicana*. Nurite. Ediciones Larousse S.A de C.V.
11. Naturalista (2022) Poleo (*Clinopodium macrostema*) [EN LÍNEA] Disponible en: <https://www.naturalista.mx/taxa/281219-Clinopodium-macrostema>
12. Nazzaro, F., Fratianni, F., Martino, L., Coppola, R. y Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*. 6: 1451-1474. DOI:10.3390/ph6121451.
13. Ordoñez, M y Peñafiel, M. (2022) *Staphylococcus aureus* EN CÁRNICOS EXPENDIDOS EN EL MERCADO 10 DE AGOSTO DE LA CIUDAD DE CUENCA, PERÍODO SEPTIEMBRE 2022-ENERO 2023 [Tesis de Licenciatura, Universidad Católica de Cuenca]. <https://dspace.ucacue.edu.ec/bitstream/ucacue/14089/1/1.%20ANEXO%201.%20TESIS%20PDF.pdf>
14. Perez, R. y Gallardo, Y. (2010). Antioxidant and hepatoprotective effects of the methanol extract of the leaves of *Satureja macrostema*. *Pharmacognosy Magazine*, 22(6), 125-131. DOI: 10.4103/0973-1296.62901
15. Rzedowski, G. y Rzedowski, J. (2010). Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán. Edición digital: INECOL 2010
16. Torres – Martínez, R., García – Rodríguez, Y.M., Ríos – Chávez P., Saavedra – Molina A., López – Meza, J.E., Ochoa – Zarzosa, A. y Salgado – Garciglia, R (2018). Antioxidant Activity of the Essential Oil and its Major Terpenes of *Satureja macrostema* (Moc. and Sessé ex Benth.) Briq. *Pharmacogn. Mag* 13 (52), S875-S880.
17. Turner, B. (2008). Taxonomic status of *Clinopodium macrostema* (Lamiaceae). *Phytologia* 90(3):411-413.

CONSUMO DE HOJAS DE FICUS COMO UNA ESTRATEGIA DE AUTOMEDICACIÓN EN EL MONO AULLADOR DE MANTO (*ALOUATTA PALLIATA*)

Diana Arleth Colio-Martínez^{1,2}, María de Jesús Rovirosa-Hernández¹, Francisco García-Orduña¹, Rael Martín Palestino-Sánchez³, Karen Yetlanezi Juans-Cárdenas⁴, Aracely López-Monteon⁵, Ángel Ramos-Ligonio⁵.

¹Facultad de Biología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, 91000, México

²Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, 91090, México

³Doctorado en Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, 91090, México

⁴Maestría en Biología Integrativa, Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Veracruzana, Xalapa 91090, México

⁵LADISER Inmunología y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Orizaba, Veracruz, 94340 México

dianaamrtzn28@gmail.com

RESUMEN

El parasitismo constituye una de las interacciones más estresantes para los organismos, debido a que la relación entre parásitos y hospederos no siempre alcanza un equilibrio, lo que puede provocar desde un deterioro del bienestar hasta la muerte de los hospederos. Las actividades antrópicas son un factor que afecta el parasitismo en numerosas especies de fauna silvestre, como los primates, ya que actividades como la agricultura o ganadería reducen los hábitats naturales provocando cambios en la riqueza y prevalencia de parásitos gastrointestinales, haciendo más vulnerables a los primates a sufrir infecciones o reinfecciones. En respuesta a esto, los primates han desarrollado diversas estrategias contra el parasitismo, entre las que se incluye la automedicación. Esta conducta ha sido estudiada ampliamente en primates del Viejo Mundo, dicha estrategia considera principalmente el consumo de partes de especies vegetales, con compuestos secundarios presentes que podrían actuar como desparasitantes naturales. Se ha documentado la actividad antihelmíntica que tienen las hojas del género *Ficus* cuando son consumidas, y se le ha prestado una especial atención ya que dicho género es muy representativo dentro de la dieta de muchos primates. Por esta razón, se llevó a cabo un estudio exploratorio en un fragmento de selva en la comunidad de Zapopán perteneciente al municipio de Tatahuicapan de Juárez, Veracruz, México, durante ocho meses con el propósito de investigar si la ingesta de hojas del género *Ficus* tiene algún efecto sobre la carga de parásitos gastrointestinales en una especie de mono del Nuevo Mundo en vida libre, el mono aullador de manto (*Alouatta palliata*). Para lograr este objetivo, se empleó un método de muestreo focal-animal para registrar la conducta de alimentación de los individuos, identificando las partes y especies vegetales consumidas, además de realizar una colecta de muestras fecales para analizar la carga y riqueza de parásitos gastrointestinales. De acuerdo con los resultados obtenidos, no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el consumo de hojas del género *Ficus* y la carga parasitaria del mono aullador ($r_s = -0.16666$; $p = 0.7033$). Sin embargo, se obtuvo una tendencia negativa ($r_s = -0.666$; $p = 0.083$ al asociar el tiempo de consumo de *F. aurea* con la carga parasitaria, es decir se observó que al aumentar el consumo de hojas de esta especie la carga mostro una tendencia a disminuir, probablemente como una estrategia de automedicación. Sin embargo, se requieren realizar más estudios para confirmar esto, debido a que *Ficus* es un género muy explotado como recurso alimenticio por muchos frugívoros y folívoros como el mono aullador.

INTRODUCCIÓN

El parasitismo es una de las interacciones que mayor estrés puede generar en los organismos (Lozano, 1991), ya que el parásito depende en gran medida del hospedero para extraer nutrientes, por lo que, en ocasiones éste puede llegar a ser oportunista y reproducirse rápidamente debilitando anímica o reproductivamente al huésped (Walzer y Genta, 1989). Aunado a esto, existen factores extrínsecos que pueden alterar la densidad y distribución de los parásitos, como la fragmentación del hábitat, ya que la perturbación de los espacios naturales puede alterar los patrones de riqueza y abundancia de los parásitos gastrointestinales de la fauna silvestre (Cristóbal-Azkarate et al., 2005),

a su vez la fragmentación provoca que las áreas de distribución se reduzcan lo que impacta significativamente en los individuos que suelen vivir en grupos sociales porque se aumenta el riesgo de infección y reinfección (Nunn et al., 2003). En respuesta a dichas alteraciones, los organismos hospederos se han visto con la necesidad de desarrollar estrategias para evitar o combatir los posibles efectos negativos del parasitismo (Hart, 1990; Huffman, 2003).

A lo largo de los años, el incremento de evidencias sobre el uso de medidas contra el parasitismo ha dado pauta al estudio de la automedicación en animales o zoofarmacognosia, que se traduce como “*saber*”, “*animal*” y “*fármaco, medicina*”, es decir que los animales utilizan un conocimiento innato para interpretar el entorno con el que interactúan, lo que les permite distinguir entre alimento, veneno o medicina (Rodríguez y Wrangham, 1993; Huffman, 1997; 2001; Engel, 2002). La premisa básica de la zoofarmacognosia se refiere a cómo los animales utilizan compuestos vegetales secundarios u otras sustancias no nutricionales para prevenir, controlar o combatir enfermedades (Huffman, 2003). Dichas adaptaciones pueden incluir respuestas como la evitación de alimentos que pudieran representar una fuente de infección parasitaria, así como el uso de sustancias profilácticas y terapéuticas (Phillips-Conroy, 1986; Lozano, 1991). Algunos ejemplos sobre esta conducta nos hablan sobre la geofagia o consumo deliberado de tierra para aliviar malestares estomacales (Urbani et al., 2019), el “*Anting*” en aves, que consiste en el frotamiento de hormigas en el plumaje para aliviar o calmar la piel irritada o mantenerse libre de ectoparásitos (Ehrlich et al., 1986). En primates, la conducta de automedicación se ha reportado desde los años 80’s, donde se ha registrado desde entonces distintos tipos de respuestas entre las que destacan la selección y consumo de partes vegetales específicas como las hojas para desparasitarse (Wrangham y Nishida, 1983; Huffman y Seifu, 1989).

Pese a que se cuenta con diversos reportes de esta conducta en primates, la mayoría de dichos estudios se centran en primates del Viejo Mundo (De la Fuente et al., 2022), pero para primates Neotropicales son muy escasos los registros (De la Fuente et al., 2022). Sin embargo, se le está prestando especial interés a las especies consumidas por los primates, principalmente enfocadas en la automedicación, ya que dentro de su dieta son muy representativas las especies pertenecientes a la familia Moraceae en particular las del género *Ficus*, debido a que en los últimos años a dichas especies se les han atribuido propiedades antihelmínticas, ya que la mayoría de dichas especies produce un látex que contiene ficina y este compuesto es muy utilizado en la industria farmacéutica (Arévalo y Ubillos, 2012; Mendoza y Chávez, 2019). Además, las hojas del género *Ficus* contienen taninos los cuales también tienen propiedades antihelmínticas (Williams et al., 2014).

Uno de los principales desafíos para interpretar la automedicación en los animales, es poder diferenciar entre los posibles beneficios medicinales indirectos derivados de plantas ricas en compuestos secundarios, donde se debe discriminar si son ingeridos por su aporte nutricional o por sus propiedades medicinales (Huffman, 1997). Por este motivo el estudio del comportamiento de la automedicación en animales adquiere una importancia crucial, ya que puede conducir al desarrollo y aprovechamiento de nuevos compuestos medicinales (Clayton y Wolfe, 1993). Aunque, debido a la falta de recursos resulta casi imposible identificar todas las especies con potencial medicinal, por lo tanto, un paso inicial fundamental consiste en documentar las especies vegetales que podrían estar siendo utilizadas por los animales como los primates, y como estas contribuyen a proporcionar un alivio a diferentes padecimientos como la parasitosis intestinal.

TEORIA

Infecciones parasitarias en monos aulladores

Actualmente los cambios antrópicos en hábitats naturales están promoviendo el aumento de la transmisión de endoparásitos entre los humanos, los animales domésticos y la fauna silvestre (Guillespie y Chapman, 2006). Lo que puede implicar un riesgo para la salud de los animales huésped en estado silvestre, como es el caso del mono aullador de manto (*Alouatta palliata*), dando como resultado una morbilidad y mortalidad mas elevada causando una disminución en la población de dichos individuos (Kowalewski et al., 2015). Los monos aulladores en particular tienden a ser más

susceptibles a las infecciones parasitarias ya que estos se caracterizan por vivir en grupos cercanos con interacciones sociales (Stoner, 1996) lo que promueve la infección o reinfección.

En un estudio reciente que se realizó en Colombia han analizado como la transformación del bosque a pastizales y monocultivos alteró la dinámica parásito-primate no humano, en tres especies de primates Neotropicales entre las que se encontraba una especie de género *Alouatta*, encontrando que la fragmentación del hábitat provocó que existiera una mayor prevalencia parasitaria (Rondón et al., 2017). Por otro lado, en otro estudio que se realizó en el sur de México se comparó las infecciones parasitarias en áreas fragmentadas con áreas conservadas en la Reserva de la Biosfera, Los Tuxtlas, en los estados de Campeche y Chiapas en la especie *A. pigra*, donde encontraron que la prevalencia parasitaria en las poblaciones de monos que se encontraban en hábitats fragmentados eran mayores que en las poblaciones de los monos que se encontraban en hábitats continuos y protegidos (Trejo-Macías, et al., 2007). En consecuencia, de los cambios en el ambiente, falta realizar estudios para determinar si los individuos implementan estrategias como la zoofarmacognosia de manera profiláctica o terapéutica a partir de las especies vegetales o sustancias no nutricionales para evitar o combatir los parásitos.

Automedicación en primates no humanos

A nivel de individuo la automedicación se puede clasificar en dos tipos, en primer lugar, se encuentran aquellos que son de carácter pasivo (profiláctica) es decir, que pueden actuar a manera de prevenir, como la ingesta de plantas y otros elementos (Huffman, 2010). Y, el segundo tipo de automedicación se refiere a los comportamientos terapéuticos, dentro de este tipo se considera principalmente una alteración en el comportamiento cuando aparecen síntomas de enfermedad, y se busca aliviar dichos síntomas como el uso de sustancias medicinales (Huffman, 2010).

Hasta la fecha se han encontrado 576 especies de plantas que evidencian ser potencialmente utilizadas como automedicación en primates no humanos (De la fuente et al., 2022), en este sentido, el estudio de dicha estrategia ha considerado principalmente el consumo de especies vegetales con fines curativos, la primera observación sobre este comportamiento se realizó en chimpancés (*Troglodytes schweinfurthii*) de Tanzania, donde se observó que dichos individuos aumentaban el consumo de *Aspilia* sp., cuando la incidencia de nematodos aumentaba en su población, y reconociendo que es una especie que utilizan los humanos con fines de desparasitación (Wrangham y Nishida, 1983). Posteriormente se volvió a registrar la conducta de automedicación en chimpancés, ahora con el consumo de *Vernonia amigdalina* otra especie muy utilizada por grupos humanos como un antihelmíntico (Huffman y Sheifu, 1989). Pero en dicha especie se realizó el primer análisis fitoquímico en relación con la automedicación animal, marcando así el primer paso para relacionar y combinar la fitoquímica con la ecología y el comportamiento animal (Lindner y Krieff, 2012).

Pese a la importancia que recibió la automedicación en primates no humanos, la mayoría de los estudios y registros se centraron en primates del Viejo Mundo, el estudio de dicha ciencia resulta muy limitado para los primates neotropicales, entre los pocos registros con los que se cuentan, destaca el estudio realizado por Stuart y colaboradores (1993), donde se registró a 2 grupos de monos aulladores en dos sitios diferentes, donde la característica a destacar se basa en que uno de los sitios incluía especies del género *Ficus* y en el otro no, los autores registraron que los individuos que consumían *Ficus* presentaban cargas parasitarias más bajas o inclusive nulas en comparación con los individuos que no consumían *Ficus*. Por ello, en los años siguientes se le comenzó a dar gran importancia a las especies que consumen los primates neotropicales, en especial a las especies del género *Ficus* ya que además de ser muy representativas dentro de la dieta de dichos individuos (Días y Rangel-Negrin, 2015), se ha demostrado a base de estudios en laboratorio como actúan algunas especies de este género como *F. insípida* frente a helmintos, demostrando que algunos compuestos como los taninos y la ficina son eficaces para eliminar dichos parásitos (Williams et al., 2014; Mendoza y Chávez, 2019). Es por ello por lo que este estudio busca indagar si las especies del género *Ficus* que consume el mono aullador de manto (*A. palliata*) pueden actuar como un desparasitante natural y ayudarles a mantener una carga parasitaria que no ponga en riesgo su supervivencia.

PARTE EXPERIMENTAL

El estudio se llevó a cabo en un fragmento de selva media perennifolia perteneciente al municipio de Tatahuicapan de Juárez, Veracruz, México, este sitio se localiza al suroeste de la región de Los Tuxtlas, a una altitud de 10 a 800 metros sobre nivel del mar (INEGI, 2016). El fragmento se ubica en una comunidad de dicho municipio, llamada Zapoapan (18°26'56.2"N y 094°46'31.5"W) el cual cuenta con 13.8 ha de distribución, en este fragmento visualmente se aprecia cierto grado de fragmentación y se llevan a cabo actividades antrópicas como la ganadería.

El clima de dicho municipio es cálido húmedo con lluvias todo el año (65%), con un rango promedio de temperatura de 18-26°C y un rango de precipitación de 2500-4500 mm. En cuanto a la vegetación se puede encontrar selva alta perennifolia y media perennifolia (Hernández-Barón et al., 2019).



Figura 1.- A) fragmento localizado en Zapoapan, B) fragmentación del lugar, C) ganado localizado en el fragmento.

Nuestro sujeto de estudio se trata del mono aullador de manto (*A. palliata*) una especie de primate neotropical. Esta especie es considerada folívora-frugívora, es decir su dieta se basa principalmente en el consumo de hojas y algunos frutos, pero también pueden llegar a consumir otras partes vegetales como los tallos, **peciolos y flores** (Milton, 1980).

Debido al alto consumo de hojas (del 50 al 70%) se encuentran restringidos energéticamente, al no contar con un sistema digestivo especializado, se estima que el tiempo de tránsito intestinal de los monos puede ir de las 20 hasta las 40 horas, dependiendo de la parte vegetal que consuman siendo las hojas la parte vegetal que más tiempo les toma digerir (Espinoza-Gómez et al., 2013), por lo que invierten la mayor parte de su tiempo de actividad diaria al descanso para poder metabolizar y extraer los nutrientes o energía, dedicando aproximadamente el 19% de su tiempo a la conducta de alimentación (Días y Rangel-Negrin, 2015),

En cuanto al grupo de estudio, este se conformo por 2 machos adultos, 3 hembras adultas, 1 juvenil y 1 infante con una $n = 6$, para la toma de datos conductuales y la colecta de muestras fecales solo se tomaron en cuenta los individuos adultos machos y hembras, así como el juvenil dejando fuera del numero de muestra (n) al infante.

Registro conductual

Para registrar el comportamiento de los sujetos de estudio, se siguió al grupo durante 4 días consecutivos por cada mes, durante 8 meses con un esfuerzo de campo de 12 horas diarias (de 6:00

a 18:00 h). Con la ayuda de unos binoculares SELSI 7x35 mm, se observó de manera oportuna la conducta de alimentación por medio del método *Ad libitum* (Altman, 1974), centrándonos en la ingesta de partes vegetales. Entonces cada vez que se logró ver a un individuo iniciar con la conducta de alimentación se aplicó un focal-animal de 5 minutos, esto con la finalidad de identificar la parte y la especie vegetal consumida. En una ficha de registro se anotó para cada focal la fecha, la hora, el individuo, especie y parte vegetal, al terminar el focal se cambiaba de individuo de manera continua, pero, si ya no se encontraba otro individuo alimentándose y solo se alimentaba el sujeto previamente registrado, se daba un intervalo de 5 minutos y se registraba nuevamente.

Recolección y procesamiento de muestras fecales

Para poder determinar la riqueza, prevalencia y carga de helmintos, se colectaron muestras fecales un día posterior al registro conductual, esto tomando en cuenta el tiempo de tránsito intestinal de los individuos (Espinosa-Gómez et al., 2013). Se trató de obtener un mínimo de 10 muestras cada mes. Entonces de manera oportuna cada vez que los individuos defecaban se tomaba de la parte superior con un abatelenguas limpio de 3 a 5 gramos de la excreta, posteriormente se colocaba en un tubo Falcón que contenía formalina al 10% y un buffer de fosfatos, esto con la finalidad de inhibir la patogenicidad y conservar la estructura de los parásitos, así mismo los tubos fueron sellados y rotulados, se guardaron en una hielera y fueron trasladados al Instituto de Neuroetología donde posteriormente se analizaron.

Para el análisis e identificación se realizó un conteo de huevos y larvas por medio del método de frotis directo modificada de Rodríguez-Vivas y Cob-Galera (2005), donde se mezcló 1 ml de la muestra en un tubo de ensayo con 10 ml de agua destilada, el cual se agitó hasta que la excreta estuvo en suspensión, posteriormente se agregó una gota de dicha mezcla más 1 gota de Lugol sobre un portaobjetos, evitando llevar fibras o fragmentos gruesos, para finalmente colocar un cubreobjetos y observar en el microscopio óptico con objetivos de 10X y 40X para identificar los géneros.

Análisis de datos

Para resumir los datos categóricos se agruparon en tablas de contingencia. Donde se obtuvo el número de huevos y larvas de helmintos y el tiempo de consumo de hojas de especies del género *Ficus*. Para calcular la riqueza se utilizó el índice de Shannon-Wiener el cual indica que valores inferiores a 2 son considerados de baja diversidad, para calcular la prevalencia se utilizó la fórmula: $\text{prevalencia} = \text{número de muestras positivas} / \text{número de muestras totales (100)}$ y finalmente la carga parasitaria se obtuvo mediante la fórmula: $\text{carga} = \text{número de huevos o larvas (100)} / \text{gr. de excreta}$. Posteriormente se realizó una prueba de normalidad, al no encontrar una distribución normal en nuestros datos, estos se sometieron a pruebas estadísticas no paramétricas, para comprobar las variables dependientes entre los meses se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis y posteriormente una correlación de *Spearman* para evaluar si existe una relación entre el tiempo de consumo de hojas de *Ficus* con nuestras variables dependientes (prevalencia y carga parasitaria), dichos análisis estadísticos se realizaron mediante el programa R versión 4.3.2 (2023-10-31).

RESULTADOS

Se registró un total de 699.38 minutos dedicados a la ingesta de hojas de especies del género *Ficus* específicamente de 4 especies de dicho género, las cuales fueron: *F. aurea*, *F. cotinifolia*, *F. máxima*, *F. sp.* (figura 4). Con relación a la disponibilidad, a pesar de que los individuos tuvieron una amplia variedad de especies para su consumo, mostraron preferencia hacia el consumo de hojas de *Ficus*, en particular hacia la especie *F. aurea*, al mostrar dicha preferencia podrían estar indicando que están seleccionando y consumiendo no solo por un aporte nutricional.

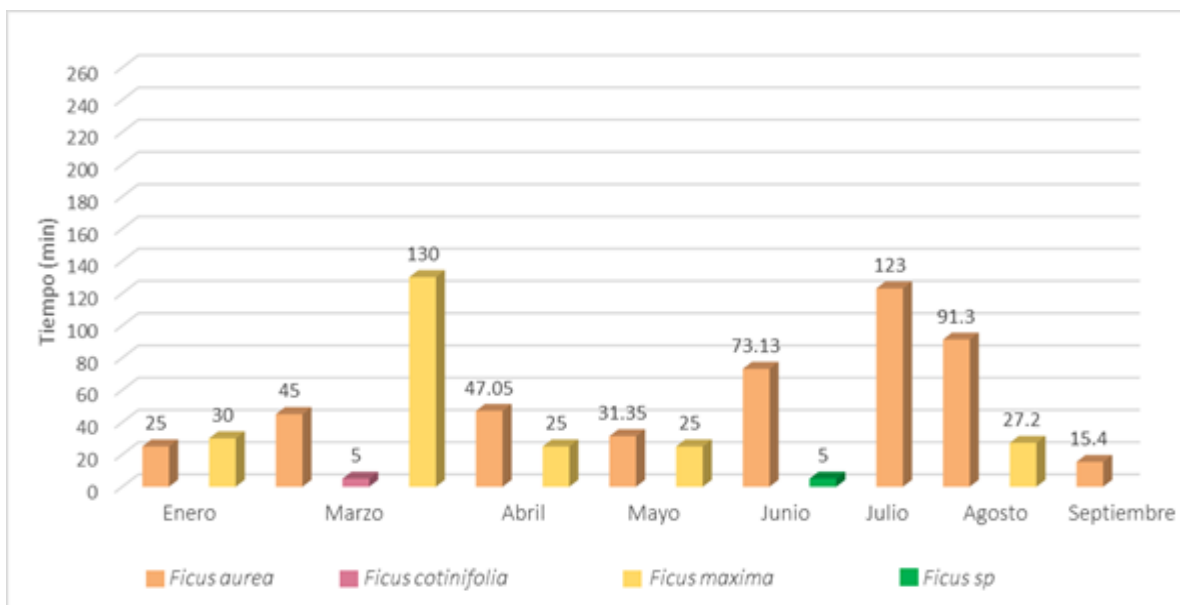


Figura 2. Tiempo de consumo de hojas de especies del género *Ficus* durante los meses de registro en Zapoapan.

En cuanto a la recolección de muestras fecales, se obtuvo un total de 79 muestras durante los 8 meses de registro. Con relación a la riqueza se registró la presencia de 5 géneros de parásitos los cuales fueron; *Ascaris* sp., *Clonorchis* sp., *Controrchis* sp., *Enterobius* sp., y *Strongyloides* sp., (figura 5) encontrando en su mayoría únicamente fase de huevo, a excepción de *Enterobius* sp., que se encontró en fase de larva también, y *Strongyloides* sp que únicamente se identificó en fase de larva. El índice de Shannon obtenido ($H = 0.55$) nos indica que existe una muy baja diversidad en el sitio de estudio, además de que se podría estar evidenciando una muy marcada dominancia de los géneros identificados. La prevalencia se ve representada en la tabla 1, donde se aprecia que el género mas prevalente fue *Ascaris* sp., el cual tiene como reservorio principal al humano, y en según lugar el género *Controrchis* sp., del cual no se cuenta con mucha información sobre éste, sin embargo, ya ha sido reportada su presencia para aulladores en vida libre.

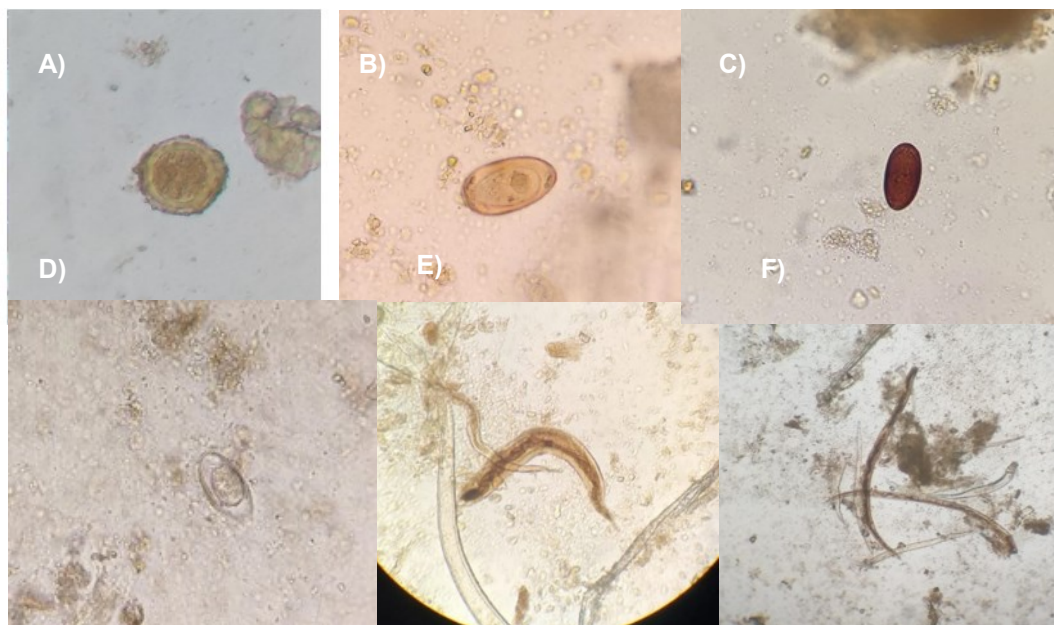


Figura 3. Géneros identificados para ambos sitios, huevos y larvas: A) huevo de *Ascaris*; B) huevo de *Clonorchis*; C) huevo de *Controrchis*; D) huevo de *Enterobius*; E) Larva de *Enterobius*; F) Larva de *Strongyloides*.

Tabla 1. Riqueza y prevalencia de helmintos en Zapopan.

ZAPOAPAN

Mes	Muestras totales	Prevalencia parasitaria (%)					
		<i>Ascaris</i> (huevos)	<i>spClonorchis</i> sp (huevos)	<i>Controrchis</i> sp (huevos)	<i>Enterobius</i> sp (huevos)	<i>Enterobius</i> sp (larvas)	<i>Strongyloides</i> sp (larvas)
Ene	5/10	50	-	-	-	-	-
Mar	10/10	60	30	-	-	10	10
Abr	4/10	30	-	-	10	-	-
May	5/10	20	-	10	20	-	-
Jun	4/10	-	-	40	-	-	-
Jul	1/10	-	-	-	100	-	-
Ago	4/9	-	-	33.3	11.1	-	-
Sep	6/10	-	-	83.3	16.7	-	-
Total	39/79	20.25	3.8	16.5	7.6	1.3	1.3

La carga parasitaria se ve representada en la tabla 2, donde se muestra el numero total de huevos y larvas así como la carga parasitaria a través de los meses, aquí podemos observar que la mayor carga se registró en el mes de marzo, pese a esto, los datos proporcionados por Jiménez-Capera (2014) nos dicen que cargas parasitarias igual o menores a 500 HPG (huevos por gramo) no ponen en riesgo el bienestar de los individuos.

Tabla 2. N° de huevos y larvas, así como la carga de parásitos gastrointestinales indicada en número de huevos por gramo (HPG)

ZAPOAPAN									
Mes		Enero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre
N°	de	21	16	7	8	6	2	11	15
huevos									
N°	de	0	8	0	0	0	0	0	0
larvas									
Carga		420	500	140	160	120	40	120	300
parasitaria									
(HPG)									

De manera descriptiva se aprecia en la tabla 2, el tiempo de consumo de hojas de las especies de *Ficus* así como el número de huevos y larvas a través de los meses, como se puede apreciar pareciera que mientras aumenta el tiempo de consumo, disminuye el número de parásitos, al realizar la asociación del tiempo de consumo de todas las especies de *Ficus* con las variables de riqueza ($rs = -0.012$; $p = 0.976$), prevalencia ($rs = -0.240$; $p = 0.563$) y carga parasitaria ($rs = -0.166$; $p = 0.703$), estadísticamente no se encontraron diferencias Sin embargo, al tomar en cuenta únicamente la especie más consumida es decir *F. aurea* con dichas variables se encontró una tendencia negativa entre el tiempo de consumo y la carga parasitaria (Figura 4), se observó que al aumentar el consumo de hojas de dicha especie la carga pareciera disminuir, lo cual podría estar relacionado con una conducta de automedicación, sin embargo, no se puede asegurar que únicamente *F. aurea* este involucrada, ya que los individuos consumieron una gran variedad de especies vegetales diferentes al género *Ficus*.

Tabla 2. Tiempo de consumo de especies de *Ficus*, numero de huevos y larvas registrados mensualmente, en Zapopan

Zapopan				
Mes	Sp de <i>Ficus</i>	Tiempo de consumo (min)	N° huevos	N° larvas
Ene	<i>F. aurea</i>	25	21	-
	<i>F. maxima</i>	30		
Mar	<i>F. aurea</i>	45	17	8
	<i>F. cotinifolia</i>	5		
	<i>F. maxima</i>	130		
Abr	<i>F. aurea</i>	47.05	7	-
	<i>F. maxima</i>	25		
May	<i>F. aurea</i>	31.35	11	-
	<i>F. maxima</i>	25		
Jun	<i>F. aurea</i>	73.13	6	-
	<i>F. sp.</i>	5		
Jul	<i>F. aurea</i>	123	2	-
Ago	<i>F. aurea</i>	91.3	13	-
	<i>F. maxima</i>	27.2		
Sep	<i>F. aurea</i>	15.4	15	-

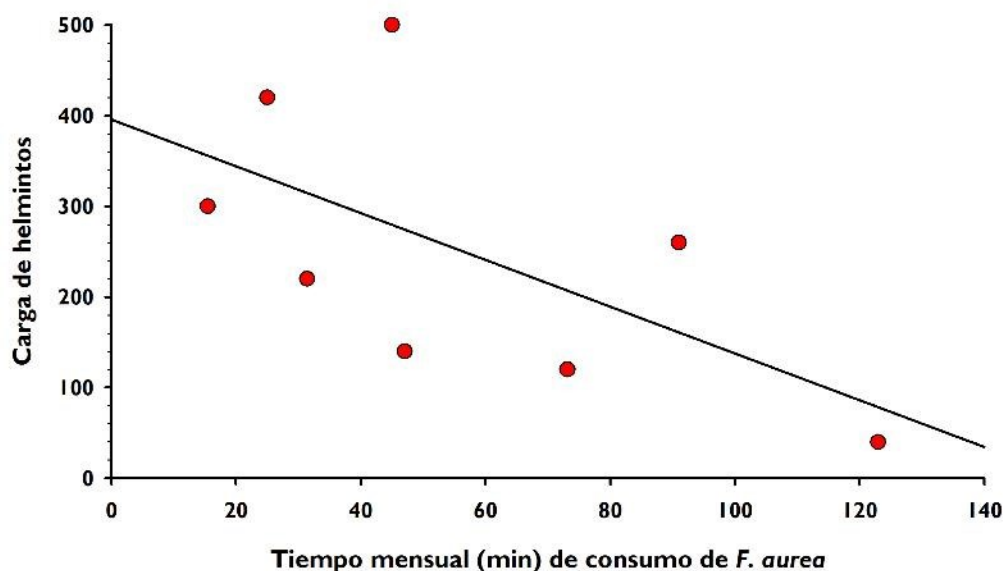


Figura 4. Asociación entre el tiempo mensual de consumo de *F. aurea* y la carga mensual de helmintos en Zapopan.

CONCLUSIONES

Se registro el consumo de 4 especies del género *Ficus*; *F. aurea*, *F. cotinifolia*, *F. maxima* y *F. sp.*, de las cuales *F. aurea* fue la especie mas consumida.

Se identificó una riqueza de 5 géneros de helmintos (*Ascaris* sp, *Clonorchis* sp, *Controrchis* sp, *Enterobius* sp y *Strongyloides* sp), que en su mayoría parasitan principalmente al humano o la fauna doméstica.

Las cargas parasitarias que se registraron parecieran no representar un riesgo para el bienestar de los individuos.

Se registro una tendencia negativa entre el tiempo de consumo de *F. aurea* y la carga parasitaria, lo que pudiera indicar que existe una conducta de automedicación, sin embargo, se necesitan más estudios para asegurar que efectivamente el consumo de hojas de *Ficus* pueda fungir como un deparasitante natural en *A. palliata*.

BIBLIOGRAFIA

1. Altmann, Jeanne. "Observational study of behavior: sampling methods." *Behaviour* 49.3-4 (1974): 227-266.
2. Arévalo Romaina, Jorge Manrique, and Selene Katuska Ubillus Ríos. "Actividad anticoagulante in vitro del látex de *Ficus insípida* (willd.)" oje" sobre la cascada de la coagulación sanguínea-CS San Juan (2012).
3. Clayton, Dale H., and Nathan D. Wolfe. "The adaptive significance of self-medication." *Trends in Ecology & Evolution* 8.2 (1993): 60-63.
4. Cristóbal-Azkarate, Jurgi, et al. "Biogeographical and floristic predictors of the presence and abundance of mantled howlers (*Alouatta palliata* mexicana) in rainforest fragments at Los Tuxtlas, Mexico." *American Journal of Primatology: Official Journal of the American Society of Primatologists* 67.2 (2005): 209-222.
5. Dias, Pedro Américo D., and Ariadna Rangel-Negrín. "Diets of howler monkeys." *Howler monkeys: Behavior, ecology, and conservation* (2015): 21-56.
6. De la Fuente, María Fernanda, et al. "Self-medication in nonhuman primates: A systematic evaluation of the possible function of the use of medicinal plants." *American Journal of Primatology* 84.11 (2022): e23438.
7. Ehrlich, Paul R., David S. Dobkin, and Darryl Wheye. "The adaptive significance of anting." *Auk* 103.4 (1986): 835.
8. Espinosa-Gómez, Fabiola, et al. "Digestive strategies and food choice in mantled howler monkeys *Alouatta palliata* mexicana: bases of their dietary flexibility." *Journal of Comparative Physiology B* 183 (2013): 1089-1100.
9. Jiménez Capera, Elisa Johana. "Parásitos intestinales en monos churucos *Lagothrix lagotricha lugens* del Parque Nacional Natural Cueva de los Guacharos." (2014).
10. Hart, Benjamin L. "Behavioral adaptations to pathogens and parasites: five strategies." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 14.3 (1990): 273-294.
11. Barón, Gerald Matus Hernández, Verónica Juárez Jaimes, and Álvaro Campos Villanueva. "La subfamilia Asclepiadoideae (Apocynaceae) de la región de Los Tuxtlas, Veracruz, México." *Revista Mexicana de Biodiversidad* 90.4 (2019): 1-26.
12. Huffman, Michael A., and Mohamedi Seifu. "Observations on the illness and consumption of a possibly medicinal plant *Vernonia amygdalina* (Del.), by a wild chimpanzee in the Mahale Mountains National Park, Tanzania." *Primates* 30 (1989): 51-63.
13. Huffman, Michael A. "Current evidence for self-medication in primates: A multidisciplinary perspective." *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists* 104.S25 (1997): 171-200.
14. Huffman, Michael A. "Animal self-medication and ethno-medicine: exploration and exploitation of the medicinal properties of plants." *Proceedings of the Nutrition Society* 62.2 (2003): 371-381.
15. Huffman, Michael A. "Self-medication: passive prevention and active treatment." *Encyclopedia of animal behavior* 3 (2010): 125-131.
16. INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e informática). "Panorama sociodemográfico de Veracruz de Ignacio de la Llave. México": INEGI, (2016).
17. Stoner, K. E., A. M. González-Di Pierro, and S. Maldonado-López. "Infecciones de parásitos intestinales de primates: implicaciones para la conservación." *Universidad y Ciencia* 11 (2005): 61-72.
18. Kowalewski, Martín M., et al., eds. "Howler monkeys": *behavior, ecology, and conservation*. Springer, (2014).
19. Krief, Sabrina. "Do animals use natural properties of plants to self-medicate?." *Applied equine nutrition and training*. Wageningen Academic, (2011). 159-170.

20. Lozano, George A. "Optimal foraging theory: a possible role for parasites." *Oikos* (1991): 391-395.
21. Mahaney, William C., and R. Krishnamani. "Understanding geophagy in animals: standard procedures for sampling soils." *Journal of chemical ecology* 29 (2003): 1503-1523.
22. Mendoza Elías, Natalia Andrea, and José Luis Chávez Lozada. "Efecto cicatrizante del gel elaborado a partir de la combinación del aceite de copaífera paupera (copaiba) y el extracto metanólico del látex de *Ficus insípida* willd (ojé) en heridas inducidas en ratones albinos." (2019).
23. Milton, Katharine. *The foraging strategy of howler monkeys: a study in primate economics*. Columbia University Press, 1980.
24. Mountain range, Veracruz, Mexico. *American Journal of Primatology: Official Journal of the American Society of Primatologists*, (2010), 72(6), 539-548.
25. Nunn, Charles L., et al. "Comparative tests of parasite species richness in primates." *The American Naturalist* 162.5 (2003): 597-614.
26. Rangel, N. "Estudio de la conducta social del mono aullador (*Alouatta pigra*) en el estado de Campeche; México". [Tesis de Doctorado, datos no publicados]. Universidad de Barcelona. Barcelona, España. (2006).
27. Rivillas Carmona, Maria Alejandra, and Valeria Jiménez Guevara. "Estrategia alimentaria y conductual de monos aulladores en respuesta a la heterogeneidad espacio temporal de los recursos en un bosque montano." (2022).
28. Rodriguez, Eloy, and Richard Wrangham. "Zoopharmacognosy: the use of medicinal plants by animals." *Phytochemical potential of tropical plants*. Boston, MA: Springer US, 1993. 89-105.
29. Galera, Ligia Amira Cob. *Técnicas diagnósticas en parasitología veterinaria*. Vol. 6. UADY, 2005.
30. Rondón, Silvia, et al. "Seasonality, richness and prevalence of intestinal parasites of three neotropical primates (*Alouatta seniculus*, *Ateles hybridus* and *Cebus versicolor*) in a fragmented forest in Colombia." *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 6.3 (2017): 202-208.
31. Stoner, Kathryn E. "Prevalence and intensity of intestinal parasites in mantled howling monkeys (*Alouatta palliata*) in northeastern Costa Rica: implications for conservation biology." *Conservation Biology* 10.2 (1996): 539-546.
32. Stuart, Michael D., Karen B. Strier, & Suzanne M. Pierberg. (1993). A coprological survey of wild muriquis, Brachyteles arachnoides, and Brown howling monkeys, *Alouatta fusca*. *Journal of the Helminthological Society* (in press).
33. Trejo-Macías, Genoveva, Alejandro Estrada, and Miguel Ángel Mosqueda Cabrera. "Survey of helminth parasites in populations of *Alouatta palliata mexicana* and *A. pigra* in continuous and in fragmented habitat in southern Mexico." *International Journal of Primatology* 28 (2007): 931-945.
34. Urbani, Bernardo, Marilyn A. Norconk, and Franco Urbani. "Geofagia e ingestión de ortópteros y avisperos por monos viudo (*Pithecia pithecia*) en Guri, sureste de Venezuela." *La primatología en Venezuela*, 1st edn. *Editorial Equinoccio*, Caracas (2019): 241-270.
35. Walzer, Peter D., and Robert M. Genta. *Parasitic infections in the compromised host*. Vol. 1. CRC Press, 1988.
36. Williams, A., Fryganas, C., y Ramsay, A. Effects of condensed tannins from diverse Plant sources against ascaris sunn. Direct anthelmintic. (2014).
37. Wrangham, Richard W., and Toshisada Nishida. "*Aspilota* spp. leaves: a puzzle in the feeding behavior of wild chimpanzees." *Primates* 24 (1983): 276-282.

APORTACIÓN HÍDRICA DE LAS PARTES VEGETALES CONSUMIDAS POR *ALOUATTA PALLIATA* EN DOS TEMPORADAS CLIMÁTICAS

Francisco García Orduña¹, Mariana Morteo-Nava², María de Jesús Rovirosa-Hernández¹,
Casandra Velasco-Jácome², Rael Martín Palestino-Sánchez³, Claudia Janeth Juárez Portilla⁴,
Rossana Citlali Zepeda Hernández⁴.

¹Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, 91090, México

²Facultad de Biología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, 91000, México

³Doctorado en Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, 91090, México

⁴Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, 91090,
México

fragarcia@uv.mx

RESUMEN

La hidratación es muy importante para todos los individuos, debido a que el agua es esencial para el organismo a lo largo de la vida, porque ayuda a regular la temperatura corporal, transporta nutrientes hacia las células, mantiene un equilibrio de electrolitos, etc., los individuos pueden obtener el agua de forma directa (bebiéndola), o a través de la humedad que contienen los alimentos. Para el caso de los primates del género *Alouatta*, se ha asociado que éstos obtienen el agua que requieren principalmente del alimento; pero se ha observado que algunas especies como *A. caraya* y *A. pigra* pueden llegar a consumirla también de manera directa conforme aumenta la temperatura ambiental o el alimento no les provee la necesaria. El objetivo del presente estudio fue evaluar si los individuos *A. palliata* se hidratan a través de las partes vegetales que consume. El estudio se realizó en dos sitios [zapopan (n=8) y mirador pilapa (n=9), en Los Tuxtlas, Ver.], durante 8 meses, 4 en la temporada húmeda, y 4 en la temporada seca, por 4 días por sitio. Por medio de un muestreo focal-animal de 10 min se registró la alimentación y se obtuvo el 80% de las partes vegetales consumidas, posteriormente se colectaron partes vegetales similares a las ingeridas, se pesaron (10 gr), y se secaron para obtener el porcentaje de humedad. Además, se analizó la gravedad específica en la orina (GEO), para analizar si los monos se encontraban en un estado de hidratación o no. Nuestros resultados no mostraron diferencias significativas entre la edad y el sexo de los individuos, y los datos se analizaron de forma grupal. El análisis del porcentaje de humedad ($U = 292.500$; $p = 0.225$) y el tiempo de alimentación ($U = 64370.000$; $p = 0.063$) no presentaron diferencias significativas por temporadas. Sin embargo, la GEO sí mostró diferencias significativas ($t = 7564.000$; $p \leq 0.020$), siendo más alta en la temporada seca en ambos sitios, sin embargo, estos valores están dentro de los rangos ya reportados para la especie. En conclusión, se observó que, los individuos consumieron partes vegetales con un porcentaje de humedad similar en ambas temporadas, sin embargo, en la temporada seca presentaron una geo más alta, lo que podría sugerir que durante esta temporada ellos podrían requerir un mayor aporte de agua de las partes vegetales consumidas para cubrir sus necesidades hídricas.

INTRODUCCIÓN

Los cambios en la temperatura ambiental tienen un enorme impacto en los ecosistemas y la biología de las especies, como la fisiología, el comportamiento, la fenología, la distribución y abundancia de los animales y plantas (Peterson et al 2003; Watts et al., 2021). La asociación entre los cambios ambientales y los efectos negativos sobre los rasgos fisiológicos de los mamíferos está bien establecida (Collins et al., 2013). Este fenómeno puede atribuirse a la exposición a altas temperaturas y a la disponibilidad limitada de recursos como los alimentos y agua, lo que tiene efectos negativos sobre la hidratación (Gardner et al., 2014).

Las estaciones climáticas se refieren a condiciones atmosféricas y fenómenos meteorológicos típicos o promedios que ocurren durante meses específicos (Cervantes-Pérez, 2017). Estas estaciones suelen dividirse en dos: temporada húmeda y la temporada seca (Cervantes-Pérez, 2017). Las principales diferencias entre las 2 estaciones son la temperatura y las precipitaciones, la temporada

seca se caracteriza por temperaturas más altas y casi ninguna lluvia en comparación con la temporada húmeda (Collins et al., 2013).

Durante la estación seca, el aumento de las temperaturas conduce a una mayor pérdida de agua en los organismos, lo que requiere que los individuos ajusten su equilibrio hídrico (Barboza et al., 2009). Por lo tanto, si no se realizan ajustes, puede conducir a un desequilibrio térmico (Brian y Mitchell, 1999). Por tanto, la ingesta de agua se considera un método eficaz para reducir la temperatura corporal y restablecer la homeostasis (Barboza et al., 2009; Díaz et al., 2014)

Los seres vivos pueden obtener agua para su hidratación de tres fuentes principales: 1) agua libre en el medio ambiente (como lagos, lluvias o nieve); 2) agua contenida en los alimentos; 3) agua producida durante el metabolismo oxidativo de compuestos orgánicos que contienen hidrógeno; (Consejo Nacional de Investigaciones, 2003). Dado que el agua es el componente principal del cuerpo, representando aproximadamente el 60% del peso corporal, es muy importante mantenerse adecuadamente hidratado (Sánchez et al., 2005). Este importante líquido participa activamente en la mayoría de las reacciones corporales, se considera el disolvente universal del cuerpo y desempeña un papel importante como el medio de transporte para las funciones circulatorias (Aranceta-Bartrina et al., 2018)

La cantidad de agua en un organismo se mantiene estable a través de mecanismos fisiológicos y comportamentales, que ayudan a regular la ganancia y pérdida de agua, aunque este equilibrio puede verse afectado por factores como la disponibilidad de la propia agua, o la temperatura ambiente (Barquera et al., 2008). El proceso de deshidratación comienza cuando una organismo pierde una gran cantidad de agua y no puede recuperarla. La deshidratación es la pérdida de líquidos que no se reponen adecuadamente (Castañeda et al., 2019) Una forma no invasiva de controlar el estado de hidratación en un individuo es medir la gravedad específica de su orina (Treseler, 1998; Hendrix y Sirois, 2007). Donde una mayor densidad se asocia con un estado de deshidratación, mientras que una menor densidad indica un estado de hidratación (Hendrix y Sirois, 2007)

La mayoría de los organismos suelen consumir agua directamente; sin embargo, en el caso del mono aullador de manto (*Alouatta palliata*), no se ha informado que baje del dosel para beber agua (Glander, 1978), lo que sugiere que puede obtenerla de los alimentos que consume, ya que al igual que las especies folívoras, suelen alimentarse de hojas ricas en humedad (Mella et al., 2019). Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar si los individuos de la especie *A. palliata* se hidratan a través de las partes vegetales que consume en dos temporadas climáticas diferentes.

TEORIA

Las variaciones ambientales tienen un impacto sobre los ecosistemas y seres vivos, como en su fisiología y conducta (Pereira y Cooper, 2006, Collins et al., 2013). Con respecto a la fisiología, los animales intentan siempre mantener en equilibrio su homeostasis, por ello, cuando incrementa la temperatura ambiental, los animales aumentan la ingestión de agua para mantener un equilibrio hídrico (Díaz y Cortés, 2003). Este incremento en la ingestión de agua es para mantener estable el funcionamiento del organismo (Díaz et al., 2014). Porque el agua es vital para responder al incremento del calor, lo que permite disipar la temperatura corporal por medio de procesos como la sudoración o la transpiración (Barboza et al., 2009).

Para mantener estable la homeostasis, es necesario mantener un equilibrio en los líquidos (Aranceta et al., 2018). El consumo de agua se regula por medio del metabolismo, los cambios en la osmolaridad en el plasma, y los cambios ácido, básico del organismo (Rojo-Gómez, 2015). Cuando existe un correcto balance hídrico, se denomina como un estado de hidratación, que es cuando el organismo cuenta con la correcta cantidad de agua en las células, órganos, y tejidos (Rodríguez y Alfaro, 2010).

El balance hídrico se mantiene ingiriendo el agua que se va consumiendo en procesos fisiológicos, la pérdida en forma de orina o heces, a través de la piel, sudor, o respiración (Campos-Nonato et al., 2013; Aranceta et al., 2018). Cuando se pierde agua el organismo manda señales como la sed, o la secreción de la hormona antidiurética para que se comience el consumo de agua (Rhoades y Bell, 2012; Picón-Jaimes et al., 2020). Aunque los requerimientos para mantener estable el balance hídrico pueden variar entre individuos, especies, o características como la edad o el sexo (Barboza et al., 2009).

Pero cuando el organismo no mantiene un equilibrio térmico, se inicia un proceso de deshidratación, que es la pérdida o escasez de agua y sodio en el organismo (Soto et al., 2011). La deshidratación tiene efectos negativos en los organismos, como una presión arterial baja, fiebre, taquicardia, desorientación, y en el peor de los casos, calambres, golpe de calor, o incluso la muerte (Coyle y Hamilton, 1990; Aragón-Vargas, 1996).

El agua que requiere un individuos puede provenir de dos formas, la que ingiere directamente y la que se obtiene a través de los alimentos (Gil-Antuñano et al., 2009), aunque la ingesta directa es la más utilizada por casi todos los animales, pero existen algunos mamíferos que tienen dietas folívoras que obtienen el agua principalmente de los alimentos (Mella et al., 2019). Sin embargo, esto no quiere decir que no beban agua directa, ya que se ha observado que, conforme aumenta la temperatura ambiental, estos animales pueden llegar a beber agua directamente (Dias et al., 2014). En el caso de los primates, como los monos aulladores (*Alouatta* spp.) que presenta una dieta folívora-frugívora, y que se cree que obtienen el agua de los alimentos, se ha observado con poca frecuencia que pueden llegar a ingerir agua directamente (Carpenter, 1934; Glander, 1975; 1978; Bicca-Marques, 1992), cuando a través de la dieta no se está obteniendo la humedad necesaria. Aunque los monos aulladores (*Alouatta* spp.) pueden llegar a seleccionar partes vegetales específicas dentro de su dieta para obtener agua, como las hojas jóvenes o frutos maduros (Glander, 1975; Bicca-Marques, 1992), o flores (Chaves et al., 2021), las cuales pueden presentar una mayor cantidad de agua.

Para la especie *A. palliata* sólo existe un reporte de la ingesta de agua directamente, de aquella que se encuentra almacenada en los troncos (Glander, 1978). Porque por lo general se hidrata a partir del alimento, por medio del consumo principalmente de hojas jóvenes y frutos maduros (Dias y Rangél-Negrín, 2015). Estas partes vegetales les brindan además de los nutrientes necesarios, también el agua, por ejemplo, prefieren consumir hojas jóvenes con mayor humedad que hojas maduras (Glander, 1975), lo que sugiere que posiblemente *A. palliata* está seleccionando estas partes vegetales específicas para hidratarse (Glander, 1975). Aunque, se desconoce si en verdad *A. palliata* selecciona partes vegetales para mantenerse hidratado en condiciones ambientales específicas.

Una de las maneras de evaluar el estado de hidratación en mamíferos es por medio de la sangre y orina, aunque en la orina se puede hacer de forma no invasivo utilizando métodos como los uroanálisis, que son unos exámenes que pueden evaluar diversos analitos en la orina como el pH, proteínas, bacterias, y entre ellos, los relacionados con la hidratación como la gravedad específica (Hendrix y Sirois, 2007). La gravedad específica mide la cantidad de solutos como sales y minerales en un volumen equivalente al del agua destilada, donde una orina más densa se asocia a un estado de deshidratación y viceversa (Hendrix y Sirois, 2007, 2010). Aunque cada método presenta limitaciones; como la cantidad de orina, por ejemplo, la urodensitometría requiere un mínimo de 20 mL de muestra, a diferencia del refractómetro o las tiras reactivas, que solo necesitan una gota de orina (Costa et al., 2010).

La relación de la gravedad específica con el estado de hidratación en una mamífero, se debe a que, este parámetro aumenta cuando el individuo no está consumiendo la suficiente agua para cubrir sus demandas hídricas, y disminuye cuando este se encuentre hidratado (Treseler, 1998). Aunque casi no hay información al respecto de cómo se hidrata la especie *A. palliata*, existe un solo reporte en esta especie que puede llegar a ingerir el agua libre (Glander, 1978), lo que sugiere que, se hidratan principalmente del alimento que consumen. Por ello, este estudio busca observar y analizar si *A.*

palliata se hidrata principalmente a través de su dieta, por medio de la selección y consumo de alimentos o partes vegetales específicas, que contengan porcentajes de humedad más altos cuando esta especie lo requiere, como en la temporada seca.

PARTE EXPERIMENTAL

Sitio de estudio

Este trabajo se realizó en dos fragmentos de selva pertenecientes a la región de Los Tuxtlas, Veracruz México. Ubicados en las comunidades de Zapoapan y Mirador Pilapa, ambos sitios pertenecen al municipio de Tatahuicapan de Juárez, Veracruz, México. Geográficamente Mirador Pilapa (18.9 ha) se ubica entre las coordenadas 18°21'55.4"N y 0924°44'50.6"W, y Zapoapan (13.8 ha) entre las coordenadas 18°26'56.2"N y 094°46'31.5"W. En ambos fragmentos se presenta una vegetación principal de selva alta perennifolia, selva mediana subcaducifolia y vegetación secundaria.

Sujetos de estudio

Para este estudio se trabajó con dos grupos de *A. palliata*, el primero está ubicado el fragmento de Mirador Pilapa, conformado por 11 individuos (4 hembras adultas, 4 machos adultos, 1 juvenil y 2 infantes). El segundo grupo, ubicado en el fragmento de Zapoapan, lo conformaron 9 individuos (4 hembras adultas, 3 machos adultos, 1 juvenil y 1 infante). Para este estudio sólo se registraron a los individuos adultos y juveniles ya que, los infantes se alimentan principalmente de leche materna, y esto podría ocasionar un sesgo en la interpretación de nuestros resultados, quedando los grupos de la siguiente manera Mirador Pilapa (n=9) y para Zapoapan (n=8).

Esta especie tiene hábitos diurnos y establece jerarquías sociales (Goldsmith y Winkler, 1999), presentan una dieta folívora-frugívora, donde consumen principalmente hojas inmaduras, seguido de frutos maduros, y complementan su dieta con flores, tallos, frutos inmaduros, hojas maduras, pecíolos, o brotes (Días y Rangel-Negrín, 2015).

Registro conductual

Para coleccionar los datos de alimentación, se coleccionaron datos durante 4 días consecutivos en cada sitio por mes, por 8 meses, cuatro meses de la temporada húmeda (agosto, septiembre, octubre, enero) y cuatro meses en la temporada seca (marzo, abril, mayo, junio), en un periodo entre los años 2022 y 2023. Se obtuvo un esfuerzo de campo de 12 horas diarias en un horario de 5:00 a 17:00 horas. El registro conductual se hizo por medio de un registro focal-animal de 10 minutos (Altmann, 1974), que consistió en observar a un individuo durante 10 minutos, registrando la conducta que realizó, pero en este caso, nos enfocamos a registrar la alimentación, anotando el tiempo de inicio y final de esta conducta (para obtener el tiempo total invertido a la ingestión), así como la parte vegetal (hoja inmadura o madura, fruto inmaduro o maduro; flor; peciolo; o tallo) y la especie vegetal

Obtención del porcentaje de humedad de las partes vegetales consumidas

Para determinar el porcentaje de humedad de las partes vegetales, se recolectaron 10 g de cada una (peso inicial). La recolecta se hizo siguiendo los lineamientos propuestos por Rothman et al. (2012), donde mencionan que se debe de recolectar las partes vegetales siempre que se pueda del mismo individuo arbóreo que consumieron los monos aulladores, en un horario similar a cuando se registró su consumo, e intentando coleccionar las partes vegetales lo más similares a las observadas durante la ingestión.

Las partes vegetales recolectadas se pesaron en una báscula granataria (marca Scout-Pro, OHAUS, Nänikon, Switzerland), posteriormente se almacenaron en bolsas herméticas, y se congelaron a -4 °C, hasta que se trasladaron al laboratorio del Instituto de Neuroetología donde fueron secadas en una estufa para secado (marca Avantor® by VWR International, United States) a 50° C aproximadamente durante 24 horas, hasta que su peso fue constante (peso final), y por último, se

obtuvo el porcentaje de humedad de cada parte vegetal (Álvarez-Reyes et al., 2007), con la siguiente formula:

$$(P_i - P_f) / P_i \times 100$$

En donde:

P_i = peso inicial

P_f = peso final

Colecta y análisis de la orina

Para determinar la gravedad específica en la orina (GEO) de *A. palliata*, se recolectaron muestras de orina de forma oportuna, inmediatamente después de la micción, y siguiendo los métodos propuesto por Hodges y Heistermann (2003), el primer método consistió en colocar plásticos por debajo de donde se encontraron los individuos para capturar la muestra, y el segundo método fue, por medio de aspiraciones con una pipeta se recolectó la orina salpicada en hojas o estancadas en alguna parte vegetal. Las muestras que se colectaron se almacenaron en tubos eppendorf de 2 ml, posteriormente se tomó una gota de muestra que se colocó en un refractómetro portátil marca RHS-10ATC, el cual mide la densidad o gravedad específica en la orina con un rango entre 1.000 a 1.070 g/dL, los valores se interpretaron como: más cercanos a 1.000 se consideró un estado de hidratación, y más alejados a 1.000 se consideró como un estado de deshidratación, cuando los valores sobrepasaron el rango, se registraron como 1.071 g/dL.

Después de analizar cada una de las muestras, se limpió el refractómetro con agua por decantación, secando con papel absorbente y sin dejar residuos. Como el índice de refracción puede variar por la temperatura ambiental, el refractómetro se calibró diariamente con agua destilada, la cual tiene una densidad de 1.000 g/dL, esto para corroborar que la lectura que se obtuvo de las muestras de orina fuera correcta (Hendrix y Sirois, 2007).

Análisis de datos

Para analizar los datos, se ordenaron en tablas de contingencia y se clasificaron por sitio y mes de acuerdo con el tiempo de alimentación, el porcentaje de humedad de las partes vegetales consumidas, y la GEO. Esto para obtener los análisis descriptivos correspondientes, para posterior realizar la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, e identificar si nuestros datos se ajustan o no a una distribución normal, para comparar por medio de una prueba de t-Student o U de Mann-Whitney.

Posteriormente, se comparó si el sexo y la edad podrían ser factores que influyeron en nuestros resultados, pero al no ser así, se decidió realizar el análisis de forma grupal. Se comparó el tiempo de alimentación, la humedad de las partes vegetales, y la GEO entre temporadas, para determinar si las condiciones ambientales de cada temporada climática, influyen en nuestras variables dependientes, se consideró una significancia de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

Durante 704 horas de esfuerzo de campo, se obtuvieron un total de 766 registros de alimentación (336 para Mirador Pilapa y 430 para Zapoapan). En ambos sitios de estudio, se observó un ligero mayor porcentaje de tiempo invertido a la alimentación en la temporada seca, respecto a la húmeda, sin embargo, no hubo diferencias entre si ($U = 64370.00$; $p = 0.063$).

Con respecto al porcentaje de humedad de las partes vegetales consumidas, se analizó un total de 29 partes vegetales de 18 especies en Mirador Pilapa, y 25 partes vegetales de 14 especies en Zapoapan. Dentro de las partes vegetales consumidas en Mirador Pilapa (Tabla 1) y Zapoapan (Tabla 2) se registraron hojas inmaduras, frutos maduros e inmaduros, y flores, las cuales variaron

en el porcentaje de humedad entre temporadas climáticas. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre temporadas en ambos sitios (Mirador Pilapa [$t = 1.013$; $p = 0.320$]; Zapoapan [$t = -0.078$; $p = 0.938$])

.Tabla 1. Porcentaje promedio de humedad de las partes vegetales que consumió *A. palliata* en Mirador Pilapa en ambas temporadas climáticas

Temporada	Parte vegetal	Humedad (%)	Tiempo de consumo (min)	Promedio total de la humedad (%)
Húmeda	HI	71.1	585	61.3
	FM	59.8	107	
	FI	52.9	99.3	
Seca	HI	65.4	589.6	69.7
	FM	74.6	171.6	
	FL	69.8	38	
	F	68.9	37.5	

Tabla 2. Porcentaje promedio de humedad de las partes vegetales que consumió *A. palliata* en Zapoapan en ambas temporadas climáticas

Temporada	Parte vegetal	Humedad (%)	Tiempo de consumo (min)	Promedio total de la humedad (%)
Húmeda	HI	71.8	217	68.8
	FM	69.1	56.6	
	FI	67.9	33	
Seca	HI	68.5	774.6	68.5
	FM	62.8	298.3	
	F	65.9	77.5	

Con respecto a la gravedad específica de la orina, se colectó un total de 276 muestras (126 en la temporada húmeda y 150 en la temporada seca entre ambos sitios). Al comparar la GEO entre temporadas por sitio, se observó que hubo diferencias ($t = -3031.00$; $p \leq 0.003$) en Mirador Pilapa, y ($t = 4686.00$; $p \leq 0.009$) en Zapoapan. Esto quiere decir que, a pesar de que no hubo diferencias en el porcentaje de humedad que obtuvieron los monos aulladores de las partes vegetales que consumieron en ambas temporadas climáticas, si hubo diferencias en el aporte hídrico que estas les proporcionaban, posiblemente por el efecto de la temperatura, que suele ser más cálida durante la temporada seca respecto a la húmeda, donde posiblemente el organismo requiere consumir más agua para mantener estable su temperatura corporal.

CONCLUSIÓN

Los monos aulladores (*A. palliata*) seleccionaron partes vegetales con diferentes porcentajes de humedad en ambas temporadas, sin embargo, no hubo diferencia en el tiempo invertido a alimentarse, ni en la humedad obtenida en el alimento. Pero a pesar de esto, la GEO fue más alta durante la temporada seca, lo que representó que los monos aulladores estaban obteniendo menos agua a partir del alimento en comparación del agua que obtuvieron de lo que consumieron durante la temporada húmeda. Sin embargo, a pesar de las diferencias en la GEO, los valores que se encontraron no demostraron que existiera un estado de deshidratación, esto es, que *A. palliata* se mantiene hidratado en ambas temporadas climáticas.

BIBLIOGRAFÍA

1. J. Altmann. "Observational study of behavior: Sampling methods". Behavior, 49, 1974, pp. 227–267.
2. A. Álvarez-Reyes, J. A. González-Lavaut, A. Urquiola, M. García, y R. Monteagudo. "Influencia del método de secado y el tiempo de almacenamiento en estante de las hojas de *Erythroxylum*

- minutifolium* Griseb sobre la actividad citotóxica y antiherpética tipo 1". Revista Cubana de Química, 1, 2007, pp. 33-35.
3. L.F. Aragón-Vargas. "Hidratación para la actividad física. *Memoria del III Simposio en Ciencias del Ejercicio y la Salud*", 1996.
4. J. Aranceta-Bartrina, J. A. Aldrete-Velasco, E. G. Alexanderson-Rosas, R. J. Álvarez-Álvarez, M. G. Castro-Martínez, I. L. Ceja-Martínez, ... y J. H. Sánchez-Mijangos. "Hidratación: importancia en algunas condiciones patológicas en adultos". Medicina interna de México, 34, 2, 201, pp. 214-243.
5. P. S. Barboza, K. L. Parker, y I. D. Hume. "Integrative wildlife nutrition". (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009).
6. S. Barquera, L. Hernandez-Barrera, M. L. Tolentino, J. Espinosa, S. W. Ng, J. A. Rivera, y B. M. Popkin. "Energy intake from beverages is increasing among Mexican adolescents and adults". *The Journal of nutrition*, 138, 12, 200 2454-2461.
7. J. C. Bicca-Marques. "Drinking behavior in the black howler monkey (*Alouatta caraya*)". *Folia Primatol*, 58, 1992, pp. 107-111
8. C. Brain y D. Mitchell. "Body temperature changes in free-ranging baboons (*Papio hamadryas ursinus*) in the Namib Desert, Namibia". *International Journal of Primatology*, 20, 1999, pp. 585-598.
9. I. Campos-Nonato, L. Hernández-Barrera, R. Rojas-Martínez, A. Pedroza, C. Medina-García, y S. Barquera-Cervera. "Hipertensión arterial: prevalencia, diagnóstico oportuno, control y tendencias en adultos mexicanos". *Salud pública de México*, 55, 2013, pp. S144-S150.
- 10 C. R. Carpenter. "A field study of the behavior and social relations of howling monkeys (*Alouatta palliata*)". *Comp Psychol Monogr.*, 10, 1934, pp. 1-168.
11. A. V. Castañeda, A. F. C. Saldívar, D. R. R. Hernández, Y. A. Martínez, R. A. Moreno, M. J. Daniel, y A. Aragón, A. "Principales fuentes de hidratación en población mexicana: Caso CDMX". *Urbana*, 3, 2.7, 2019.
12. J. Cervantes-Pérez. "Estaciones y temporadas climáticas". Ciencia y Luz, 2017.
13. M. Collins, R. Knutti, J. Arblaster, J. L. Dufresne, T. Fichet, P. Friedlingstein, ... y M. Wehner. "Long-term climate change: projections", *Commitments and Irreversibility*, 2013.
14. C. E. Costa, C. Bettendorff, S. Bupo, S. Ayuso, y G. Vallejo. "Medición comparativa de la densidad urinaria: Tira reactiva, refractómetro y densímetro". *Archivos argentinos de pediatría*, 108, 3, 2010, pp. 234-238.
15. E. F. Coyle, y M. Hamilton. "Fluid replacement during exercise: effects on physiological homeostasis and performance". En; C.V. Gisolfi y D.R. Lamb (eds.). *Perspectives in exercise science and sports medicine*, volume 3: Fluid homeostasis during exercise. (Benchmark press, Indianapolis, IN, U.S.A, 1990), pp. 281-308.
16. P. A. D. Dias, y A. Rangel-Negrín. "Diets of howler monkeys". *Howler monkeys: Behavior, ecology, and conservation*, 2015, pp. 21-56.
17. P. A. D. Dias, A. Rangel-Negrín, A. Coyohua-Fuentes, y D. Canales-Espinosa. "Factors affecting the drinking behavior of black howler monkeys (*Alouatta pigra*)". *Primates*, 55, 2014, pp. 1-5.
18. G. B. Diaz, y A. Cortés. "Pequeños mamíferos en ambientes desérticos: los problemas de conservación de agua". *Fisiología Ecológica y Evolutiva. Conceptos y Casos de Estudio en Animales*, 2003, pp. 357-376.
19. J. L. Gardner, T. Amano, P. R. Backwell, K. Ikin, W. J. Sutherland, y A. Peters, A. "Temporal patterns of avian body size reflect linear size responses to broadscale environmental change over the last 50 years". *Journal of Avian Biology*, 45, 6, 2014, pp. 529-535.
20. N. P. Gil-Antuñano, Z. M. Zenarruzabeitia, A. M. R. Camacho. "Alimentación, nutrición e hidratación en el deporte". Consejo Superior de Deportes, 2009.
21. K. E. Glander. "Habitat description and resource utilization: A preliminary report on mantled howling monkey ecology". *Socioecology and Psychology of Primates*, 1975, pp.37-57.
22. K. E. Glander. "Howling monkey feeding behavior and plant secondary compounds: A study of strategies". *The Ecology of Arboreal Folivores*, 1978, pp.561-574.
23. S. Goldsmith y L. Winkler L. "Shifting social dynamics in a group of mantled howler monkeys (*A. palliata*) on the island of Ometepe, Nicaragua". *Am. J. Phys. Anthropol.*, 28, 1999, pp. 137.
24. Hendrix, y Sirois. "*Laboratory Procedures for Veterinary Technicians*". (MOSBY ELSEVIER. St. Louis, Missouri, United States of America, 2007).
25. C. Hendrix. "Laboratory procedures for veterinary technicians". (4th. ed. Mosby, St. Louis, Missouri, 2002).

26. J. K. Hodges, y M. Heistermann. "Field endocrinology: Monitoring hormonal changes in free-ranging primates". En: Setchell, J.M. y D.J. Curtis (eds.). *Field and laboratory methods in primatology: A practical guide*. Cambridge University Press. Cambridge, UK. 2003, pp. 282-294.
27. V. S. A. Mella, C. McArthur, M. B. Krockenberger, R. Frend, y M. S. Crowther. "Needing a drink: Rainfall and temperature drive the use of free water by a threatened arboreal folivore". PLoS ONE, 14, 5, 201, pp. e0216964.
28. National Research Council. "Nutrient requirements of nonhuman primates: Second revised edition". (The National Academies Press, Washington, D.C., 2003).
29. H. M. Pereira, y H. D. Cooper. "Towards the global monitoring of biodiversity change". Trends in ecology & evolution, 21, 3, 2006, pp. 123-129.
30. A. T. Peterson. "Predicting the geography of species' invasions via ecological niche modeling". The quarterly review of biology, 78, 4, 2003, pp. 419-433.
31. Y. A. Picón-Jaimes, J. E. Orozco-Chinome, J. Molina-Franky, y M. P. Franky-Rojas. "Control central de la temperatura corporal y sus alteraciones: fiebre, hipertermia e hipotermia". Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud. 23, 1, 2020, pp. 118-130.
32. R. A. Rhoades, y D. R. Bell. "Fisiología médica: Fundamentos de medicina clínica" (Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, PA, United States. 2012, pp. 42-471)
33. D. Rodríguez Palomo, y A. Alfaro Benavides. "Actualización de la fisiología gástrica". Medicina Legal de Costa Rica, 27, 2, 2010, pp. 59-68.
34. A. Rojo-Gómez. "El agua en nutrición animal: fisiología, requerimientos e implicaciones prácticas en granja", 2015. Tomado de: <https://www.porcicultura.com/destacado/El-agua-en-nutricion-animal:-fisiologia,-requerimientos-e-implicaciones-practicas-en-granja>.
35. J. M. Rothman, C. A. Chapman, y P. J. Van Soest. "Methods in primate nutritional ecology: a user's guide". International Journal of Primatology, 33, 2012, pp. 542-566.
36. C. Sánchez, P. López, y E. Pichardo. "Agua". Recomendaciones de Ingestión de Nutrientes para la Población Mexicana. (Editorial Panamericana, Tomo 1, 2005).
37. I. B. Soto, A. F. Marín, y B. S. Garibay. "Deshidratación en niños". An Médicos, 56, 3, 2011, pp. 146-55.
38. K. M. Treseler. "Laboratorio clínico y pruebas de diagnóstico". El Manual Moderno. (D.F., México, 1998).
39. N. Watts, M. Amann, N. Arnell, S. Ayeb-Karlsson, J. Beagley, K. Belesova, M. Boykoff, W. Cai, D. Campbell-Lendrum, S. Capstick, J. Chambers, S. Coleman, C. Dalin, M. Daly, N. Dasandi, S. Dasgupta, M. Davies, C. Di Napoli, P. Dominguez-Salas, P. Drummond, R. Dubrow, K. L. Ebi, M. Eckelman, P. Ekins, L. E. Escobar, L. Georgeson, S. Golder, D. Grace, H. Graham, P. Haggard, I. Hamilton, S. Hartinger, J. Hess, S. Hsu, N. Hughes, S. J. Mikhaylov, M. P. Jimenez, I. Kelman, H. Kennard, G. Kiesewetter, P. I. Kinney, T. Kjellstrom, D. Kniveton, P. Lampard, B. Lemke, Y. Liu, Z. Liu, M. Lott, R. Lowe, J. Martinez-Urtaza, M. Maslin, L. McAllister, A. McGushin, C. McMichael, J. Milner, M. Moradi-Lakeh, M. Nilsson, M. O. Sewe, T. Oreszczyn, M. Otto, F. Owfi, O. Pearman, D. Pencheon, R. Quinn, M. Rabbaniha, E. Robinson, J. Rocklöv, M. Romanello, J. C. Semenza, J. Sherman, L. Shi, M. Springmann, M. Tabatabaei, J. Taylor, J. Triñanes, J. Shumake-Guillemot, B. Vu, P. Wilkinson, M. Winning, P. Gong, H. Montgomery, y A. Costello. "The 2020 report of The Lancet Countdown on health and climate change: responding to converging crises". The Lancet., 2021.

ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE HAEMATOXYLUM BRASILETTO (PALO DE BRASIL) Y SU TOXICIDAD FRENTE A ERITROCITOS HUMANOS

Jorge Arturo Llaca González¹, David Gilberto García Hernández¹, Michel Stéphane Heya², Joel Horacio Elizondo Luévano³, David Mizaël Ortiz Martínez¹.

Universidad Autónoma de Nuevo León. ¹Facultad de Ciencias Biológicas, ²Facultad de Salud Pública y Nutrición, ³Facultad de Agronomía.
david.garciahrz@uanl.edu.mx.

RESUMEN

La resistencia bacteriana a los fármacos se ha transformado en un problema global cada vez más preocupante y urgente de abordar debido a la amenaza creciente que presenta para la salud pública dado que las infecciones causadas por estas bacterias son cada vez más difíciles de tratar. Debido a lo anterior, es crucial desarrollar y promover alternativas terapéuticas que complementen o incluso reemplacen a estos fármacos. Muchas de estas alternativas aún se encuentran en etapas de investigación, es vital impulsar su desarrollo para contar con un arsenal terapéutico diverso frente a las bacterias farmacorresistentes. El uso de extractos metanólicos presenta una alternativa en esta contingencia. El objetivo del presente estudio fue la determinación de la actividad del extracto metanólico de *Haematoxylum brasiletto* frente a bacterias de interés en salud pública, así como su toxicidad frente a eritrocitos humanos. La extracción se realizó mediante maceración estática durante una semana. Se realizó una prueba de concentración mínima inhibitoria (CMI) para determinar su actividad bactericida, y para la prueba de toxicidad se realizó mediante la prueba de hemólisis. Mediante el CMI se determinó que este extracto presenta actividad en concentraciones de hasta 250 partes por millón (ppm), teniendo una mayor inhibición en *Enterococcus faecalis* con 92.44%. Con respecto a su toxicidad este presentó una hemólisis del 7.8% a una concentración de 31.25 ppm. Se concluye que la actividad del extracto de *H. brasiletto* está presente inclusive en concentraciones tan bajas como 250 ppm, sin embargo, este también demuestra hemólisis de 7.8% en concentraciones de 31.25 ppm.

INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antibióticos se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que para el año 2050, las infecciones causadas por bacterias resistentes a los fármacos podrían causar la muerte de hasta 10 millones de personas anualmente (OMS, 2019). Esto ha llevado a la búsqueda de alternativas terapéuticas que puedan hacer frente a esta amenaza.

Las enfermedades nosocomiales causadas por bacterias resistentes a los fármacos representan un desafío particular en el ámbito de la salud. Estas infecciones, adquiridas durante la estancia hospitalaria, son especialmente difíciles de tratar debido a la capacidad de las bacterias para formar biofilms (Sharma et al., 2019). Los biofilms son comunidades microbianas adheridas a superficies, embebidas en una matriz extracelular que les confiere protección contra los antibióticos y el sistema inmune del huésped (Jamal et al., 2018). Las bacterias formadoras de biofilm, como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, están frecuentemente implicadas en infecciones nosocomiales y representan una amenaza significativa para los pacientes hospitalizados (Vickery et al., 2021).

Debido a ello, los metabolitos secundarios de las plantas han surgido como una potencial fuente de nuevos compuestos antimicrobianos (Sánchez-Maldonado et al., 2021). Estos metabolitos, producidos por las plantas como mecanismo de defensa contra patógenos y herbívoros, han demostrado tener actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral (Górniak et al., 2019).

Uno de los procesos usados para la obtención de estos metabolitos es la extracción con solventes orgánicos, siendo el metanol uno de los más empleados debido a su alta polaridad y capacidad para extraer una amplia gama de compuestos (Azwanida, 2015). Los extractos metanólicos de diversas

especies vegetales han mostrado resultados prometedores en la inhibición del crecimiento de bacterias resistentes a antibióticos convencionales (Khameneh et al., 2019).

Haematoxylum brasiletto, conocido coloquialmente como palo de Brasil, genera interés para la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos. Esta especie ampliamente distribuida en México ha sido utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas afecciones infecciosas (Gómez-Gurrola et al., 2020). Estudios recientes han demostrado que los extractos metanólicos de la corteza y hojas de *H. brasiletto* poseen una potente actividad antibacteriana contra cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, así como actividad antifúngica contra *Candida albicans* (Cristóbal-Luna et al., 2018; Gómez-Gurrola et al., 2020). Esto sugiere que los metabolitos secundarios presentes en esta planta podrían ser una fuente prometedora de nuevos agentes para tratar con esta problemática.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo determinar la actividad del extracto metanólico de *H. brasiletto* frente a distintas bacterias de importancia en salud pública, así como su toxicidad frente a eritrocitos humanos.

PARTE EXPERIMENTAL

Obtención del extracto

La obtención de *H. brasiletto* se realizó mediante la distribuidora Pacalli. Para la extracción se maceró vertiendo 250 g de la muestra y 500 mL de metanol en un matraz Erlenmeyer de un litro el cual se dejó en reposo durante una semana a temperatura ambiente. Se obtuvo el extracto líquido de la maceración mediante el uso de un papel filtro para separar la muestra sólida. La concentración del extracto se realizó mediante la extracción del solvente por presión reducida haciendo uso de un rotavapor.

Actividad inhibitoria

Para la actividad antibacteriana se realizó la técnica de microdilución en placa para determinar la concentración mínima inhibitoria, de acuerdo con la metodología planteada por el CLSI (CLSI, 2012).

Esta prueba se realizó con las cepas, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063, *Acinetobacter baumannii* ATCC 15803, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-44 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Se inocularon en tubos con caldo de cultivo Müller-Hinton y se dejaron incubando a 37°C durante 18 horas.

Transcurrido este tiempo, el inóculo se ajustó entre 0.080 y 0.12 de absorbancia a una longitud de 625 nm para concordar con el tubo 0.5 de la escala de McFarland. El CMI se realiza mediante microdiluciones en microplacas de 96 pocillos, y por triplicado. Las concentraciones del extracto metanólico de *H. brasiletto* durante este ensayo fueron: 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62.5 ppm y 31.25 ppm. Una vez hechas las diluciones, estas se inoculan con la suspensión bacteriana previamente ajustada y se lleva a incubación durante un máximo de 24 h a 37°C. Posteriormente se lleva la placa a un lector de microplacas para su lectura.

Prueba de toxicidad.

Para la prueba de toxicidad se realizó un bioensayo hemolítico de acuerdo con la metodología descrita por Espinoza Mijangos (2023)

Se prepara un paquete globular con PBS al 5%. Este se coloca en microtubos para posteriormente agregarse el extracto teniendo como concentraciones finales, de los tratamientos; 1000, 800, 600, 400, 200 y 100 ppm. Los tratamientos se llevan a incubación a 37°C durante 30 minutos. Una vez terminado, los microtubos se llevan a centrifugar a 13,500 revoluciones por minuto, a 4°C. Se extrae el sobrenadante y se colocan en microplacas de 96 pocillos, las cuales se llevan a un lector de microplacas para su posterior interpretación.

RESULTADOS

Actividad inhibitoria:

Mediante la prueba de CMI, se determinó que esta se presenta a una concentración de 250 partes por millón en cada una de las cepas bacterianas utilizadas. Presentando una inhibición superior al 85% en todos los casos, con el porcentaje más alto siendo *E. faecalis* con un porcentaje del 92.44%.

	Concentración mínima inhibitoria (ppm)	Porcentaje de inhibición
Klebsiella pneumoniae ATCC 70063	250	88.29%
Acinetobacter baumannii ATCC 15803	250	85.95%
Escherichia coli ATCC 25922	250	87.86%
Staphylococcus aureus ATCC BAA-44	250	85.53%
Enterococcus faecalis ATCC 29212	250	92.44%

Tabla 1: Concentración mínima inhibitoria del extracto de *H. brasiletto*

Prueba de toxicidad:

Durante este bioensayo, se obtuvo que el extracto de *H. brasiletto* presenta un porcentaje de hemólisis del 7.8% a una concentración de 100 partes por millón.

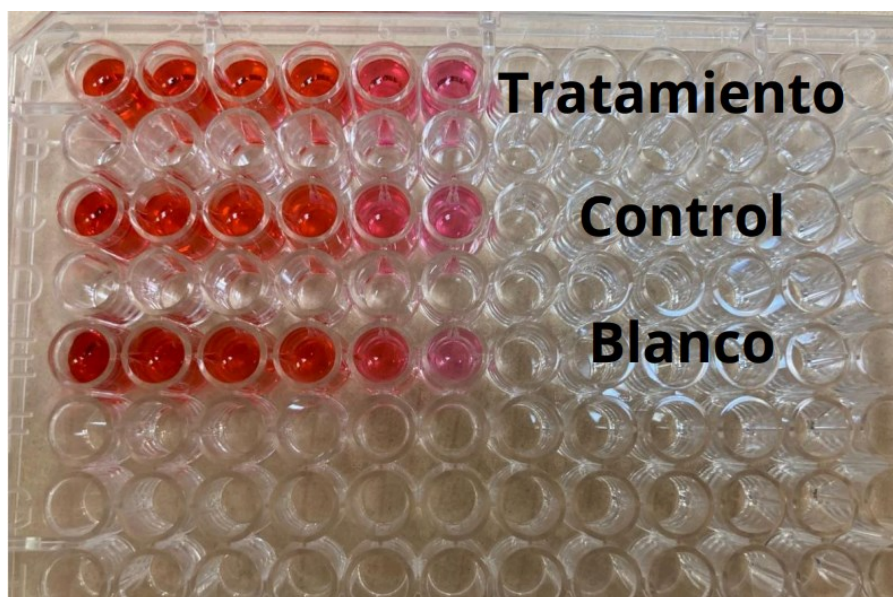


Imagen1: Microplaca del tratamiento de hemólisis

CONCLUSIONES

El extracto metanólico de *H. brasiletto* demostró una potente actividad inhibitoria, incluso a bajas concentraciones de 250 ppm, siendo esta la mínima donde su actividad es significativa. La bacteria más susceptible a este extracto fue *E. faecalis*, exhibiendo el mayor porcentaje de inhibición. No obstante, el extracto también presentó cierta actividad hemolítica, lo que lo coloca como ligeramente tóxica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Azwanida, N. N. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 04(03). <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>
2. Cristóbal-Luna, J. M., Álvarez-González, I., Madrigal-Bujaidar, E., & Chamorro-Cevallos, G. (2018). Antigenotoxic Capacity of Beta-Caryophyllene in Mouse, and Evaluation of Its Antioxidant and Antiinflammatory Activities in Human Cells. *Food and Chemical Toxicology*, 111, 36-44. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.10.060>
3. Gómez-Gurrola, A., Hernández-Fuentes, A. D., Hernández-Ortega, S., Martínez-Hernández, G. B., Campos-Arias, M. P., Jiménez-Estrada, M., & Hernández-Sánchez, H. (2020). Antimicrobial Activity of *Haematoxylum brasiletto* Extracts against Foodborne Bacteria and Characterization of Their Phytochemical Profiles. *Processes*, 8(12), 1648. <https://doi.org/10.3390/pr8121648>
4. Górniak, I., Bartoszewski, R., & Króliczewski, J. (2019). Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews*, 18(1), 241-272. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9591-z>
5. Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., & Kamil, M. A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(1), 7-11. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>
6. Khameneh, B., Iranshahy, M., Soheili, V., & Fazly Bazzaz, B. S. (2019). Review on plant antimicrobials: A mechanistic viewpoint. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1), 118. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0559-6>
7. Sharma, D., Misba, L., & Khan, A. U. (2019). Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0533-3>
8. Vickery, S. B., Dunn, L., Vergara, M., Satola, S. W., & Read, T. D. (2021). Nosocomial Infections Caused by Multidrug-Resistant Bacteria: Epidemiology, Prevention, and Treatment. *Annual Review of Medicine*, 72, 69-84. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-080819-015553>

EFFECTO DEL MATERIAL PARTICULADO EN LA RESPUESTA INMUNE PULMONAR CONTRA LA INFECCIÓN POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* EN UN MODELO MURINO

Nancy Solís Torres¹, Claudia Escudero Lourdes², Irma González Curiel³, Bruno Rivas Santiago⁴, Álvaro Osornio Vargas⁵, Raúl Quintana Belmares⁶, Fuensanta Reyes Escobedo⁷ y César Rivas Santiago⁸

¹Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas, UASLP, SLP., ²Departamento de Inmunotoxicología, UASLP, SLP., ^{3,8}Laboratorio de Inmunotoxicología, UAZ, Zac., ⁴Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas, IMSS Zacatecas, Zac., ⁵Departamento de Pediatría, Universidad de Alberta., ⁶Instituto Nacional de Cancerología, CDMX., ⁷Unidad Académica de Ciencias Químicas, UAZ, Zac. nnancy_618@hotmail.com

RESUMEN

La contaminación del aire de exteriores representa un importante problema de salud pública mundial, que se asocia con más de cuatro millones de muertes alrededor del mundo. Dentro de los diversos contaminantes en el aire, el Material Particulado (PM) es al que se le han atribuido mayores efectos adversos sobre la salud humana. El PM es una mezcla de partículas sólidas y líquidas suspendidas en el aire con composición y tamaño heterogéneo. La exposición a estas partículas se asocia con efectos negativos para la salud humana, principalmente a nivel pulmonar. Asimismo, diversos estudios indican que la exposición a PM afecta negativamente diferentes mecanismos de la respuesta inmune innata, lo cual podría favorecer el desarrollo de enfermedades infecciosas. Un buen modelo para el estudio del efecto del PM sobre las enfermedades infecciosas es la infección con *Pseudomonas aeruginosa*, bacteria oportunista de gran importancia médica, siendo la cuarta causa de muertes por infecciones en el mundo.

En los últimos años, se ha visto que en países desarrollados como en vías de desarrollo, existe un incremento en el número de casos de enfermedades pulmonares infecciosas aunado a las altas concentraciones de partículas en el ambiente. Se ha reportado que la exposición a PM afecta negativamente distintos parámetros de la respuesta inmune innata, sin embargo, no se ha profundizado en los efectos sobre enfermedades oportunistas bacterianas. En el presente trabajo, se estudiará el efecto de la exposición prolongada a PM sobre la infección por *P. aeruginosa* en un modelo murino. Objetivos: Determinar si la exposición a PM_{2.5} induce mayor daño en el ejido pulmonar en los distintos grupos de ratones tratados en comparación con los no tratados, determinar si la exposición a PM_{2.5} favorece la infección de los pulmones por *P. aeruginosa* y si la exposición a PM_{2.5} induce modificaciones en diferentes parámetros de la respuesta inmune en el tejido pulmonar de los ratones expuestos. Metodología: En nuestro modelo murino se incluyeron cuatro grupos: control, infección, PM y PM+infección; se realizó la pre-exposición a PM durante 28 días intratraquealmente (con 64µg) al término de los 28 días, se realizó la inoculación con *P. aeruginosa* (bacterias/ratón); los animales se sacrificaron a los 3 y 7 días post-infección. Resultados: La exposición prolongada a PM urbano indujo una reducción en el peso con diferencia significativa de los grupos de pre-exposición a PM en comparación con el grupo control, además, pudimos observar una mayor carga bacteriana en pulmones de animales infectados y expuestos a PM en los días 3 y 7 en comparación con animales solo infectados con *P. aeruginosa*. Conclusiones preliminares: La exposición prolongada a PM afecta negativamente la respuesta inmune pulmonar de ratones BALB/c, favoreciendo el desarrollo de la enfermedad por *P. aeruginosa*.

INTRODUCCIÓN

La contaminación del aire se considera como un problema de salud pública que afecta a millones de personas en todo el mundo, además, estimaciones realizadas en el año 2019, mencionan que el 99% de la población respiraba aire insalubre que no cumplía con las normas de calidad del aire declaradas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Sierra-Vargas & Teran, 2012; WHO, 2018b). En el 2020, en el Reporte sobre el Estado del Aire Global, estimó que cada año mueren alrededor de 6.67 millones de personas como consecuencia a la exposición crónica a ésta (HEI, 2020). Los países en vías de desarrollo (por ejemplo; Pakistán, India, México) son los más afectados

por este tipo de contaminación, sin embargo, algunos países desarrollados como, China, también se ven afectados por este problema debido a sus altos niveles de industrialización, aunque en los últimos años la contaminación ha disminuido, las concentraciones de sus contaminantes siguen superando los límites sugeridos por la OMS (HEI, 2020; Mannucci & Franchini, 2017).

Los contaminantes del aire más comunes que se encuentran en nuestra vida diaria son el Material Particulado (PM), el Dióxido de Azufre (SO₂), Óxidos de Nitrógeno (NO_x) y el Ozono (O₃), a los cuales se les considera como contaminantes clásicos (B. Chen & Kan, 2008). De los anteriores, el PM es el contaminante con una mayor cantidad de efectos adversos para la salud. Además, según el informe de la Carga Mundial de Morbilidad, las partículas asociadas a la contaminación del aire se asocian con 4.14 millones de muertes al año (Lozano et al., 2012).

La contaminación del aire de exteriores produce un estimado de 4.2 millones de muertes al año, las cuales se relacionan principalmente con cardiopatía isquémica y accidente cerebrovascular (37%), enfermedades de vías respiratorias bajas (23%), EPOC (18%), y, finalmente, cáncer de pulmón (11%) (Figura 1) (WHO, 2018a).

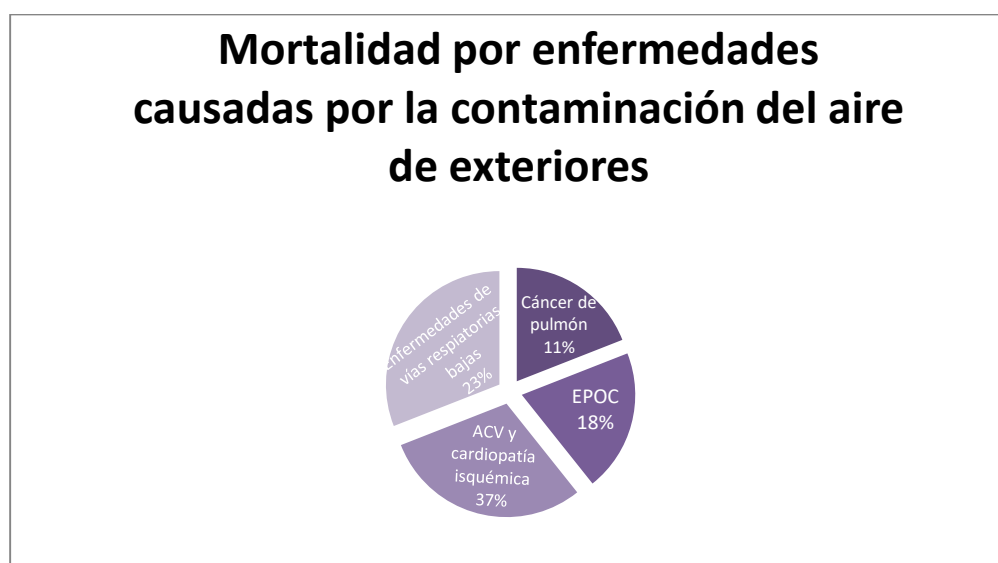


Figura 1. Enfermedades relacionadas con la mortalidad por la exposición a contaminación del aire de exteriores (WHO, 2018a).

La contaminación del aire de exteriores es una mezcla heterogénea de sustancias de origen natural y antropogénico, dichas sustancias se pueden dividir en contaminantes primarios y secundarios. Los contaminantes primarios son emitidos directamente a la atmósfera por su fuente, ya sea natural o antropogénica. Algunos ejemplos de contaminantes primarios son; partículas de hollín, CO, PM, NO_x y SO₂. Los contaminantes secundarios, son formados cuando los contaminantes primarios reaccionan o interactúan entre sí en la atmósfera, y éstos incluyen principalmente al O₃ y PM (Contreras, 2013; Mannucci & Franchini, 2017). El PM forma parte tanto de los contaminantes primarios como de los secundarios, lo cual, puede explicar la variación en su composición, así como su amplia distribución alrededor del mundo. Existe evidencia que demuestra que la exposición a este contaminante se asocia con un gran número de enfermedades infecciosas (por ejemplo, con tuberculosis e influenza, causantes de infecciones graves en pulmón) (Feng, Li, Sun, & Wang, 2016; Smith, Schoenbach, Richardson, & Gammon, 2014) además de neumonía, asociándose con un mayor riesgo por infección por *Pseudomonas aeruginosa* por aceleración de la colonización bacteriana.

TEORÍA

El PM es una mezcla de partículas sólidas y líquidas suspendidas en el aire que varían en forma, composición química y origen por lo que es muy difícil clasificarlo utilizando estos factores. Por lo tanto, se ha optado por clasificarlo de acuerdo a su diámetro aerodinámico en; material particulado grueso (PM_{10}); con un diámetro aerodinámico igual o menor a $10\ \mu m$, material particulado fino ($PM_{2.5}$); con un diámetro aerodinámico igual o menor a $2.5\ \mu m$ y, material particulado ultrafino ($PM_{0.1}$); con un diámetro aerodinámico igual o menor a $0.1\ \mu m$ (Figura 2) (Hiraiwa & van Eeden, 2013).

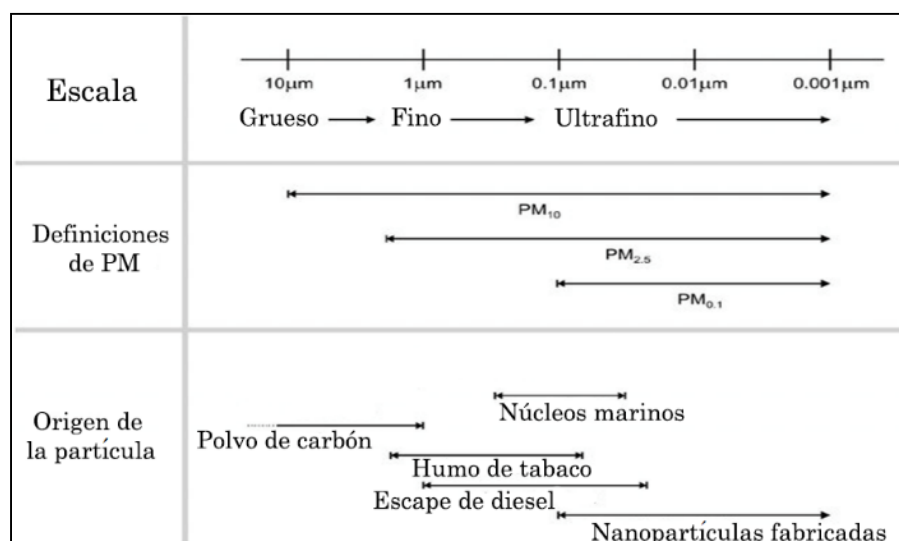


Fig. 2 Clasificación de PM. Tomada y modificada de (Muhlfeld et al., 2008). El material particulado se clasifica de acuerdo con su diámetro aerodinámico en: PM_{10} o grueso, $PM_{2.5}$ o fino y $PM_{0.1}$ o ultrafino, además, su composición química varía de acuerdo con su origen.

Fuentes de PM

Las fuentes de PM abarcan desde las emisiones naturales hasta las fuentes antropogénicas. Las primeras incluyen polvo, sal de mar, ceniza volcánica, bioaerosoles (líquidos que contienen microorganismos); productos de incendios forestales y tormentas de arena, mientras que en las fuentes antropogénicas se encuentran la combustión de combustibles fósiles (especialmente en hogares, vehículos y centrales eléctricas), procesos industriales, trabajos de construcción, actividades agrícolas y ganaderas (Brook et al., 2010; Morakinyo, Mokgobu, Mukhola, & Godobedzha, 2019).

La fracción gruesa se origina principalmente del proceso de abrasión de las carreteras, así como del desgaste de neumáticos, del polvo de construcciones y de actividades agrícolas. Además, se ha reportado que el PM_{10} es el tipo de PM que presenta mayor cantidad de endotoxina dentro de sus componentes (Rao, Zhong, Brook, & Rajagopalan, 2018).

El $PM_{2.5}$ tiene su origen principalmente en actividades antropogénicas, tales como procesos de combustión derivados de industrias, de vehículos, así como de la quema de combustibles sólidos, de actividades agrícolas y ganaderas. Es importante mencionar que el $PM_{2.5}$ ha sido reconocido como carcinógeno del grupo 1 por parte de la OMS y el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) (Loomis, Huang, & Chen, 2014).

Las partículas ultrafinas presentan típicamente un origen de tipo antropogénico como actividades industriales y de combustión, se ha reportado que contiene una gran cantidad de compuestos reactivos tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (Rao et al., 2018).

Es importante tomar en cuenta que los niveles de PM en un lugar específico van a variar dependiendo de diversos factores tales como, la fuente de origen, condiciones meteorológicas, estación del año, actividades que se realicen en esa locación así como la ubicación geográfica del mismo (Adams, Greenbaum, Shaikh, van Erp, & Russell, 2015).

La exposición a PM ha sido identificada como la causa de numerosos problemas de salud, asociados con ingresos hospitalarios y visitas a la sala de emergencia siendo las principales causas; síntomas respiratorios, exacerbación de enfermedades crónicas y cardiovasculares, disminución de la función pulmonar y mortalidad prematura (Paulin & Hansel, 2016; Sun, Hong, & Wold, 2010). Además, existen estudios que sugieren que la exposición a altos niveles de partículas también puede conducir a diversas complicaciones, incluyendo bajo peso de los bebés al nacer, partos prematuros y posibles muertes en fetos (K. H. Kim et al., 2015; Yang et al., 2018).

Diferentes estudios han reportado que la exposición a PM afecta negativamente la respuesta inmune y, por lo tanto, la exposición a este contaminante se relaciona con el incremento en el riesgo (o la susceptibilidad) para desarrollar infecciones de las vías aéreas respiratorias, algunos mecanismos afectados son los siguientes:

Se ha reportado que la exposición a PM induce la disrupción de barrera epitelial; Duan Z. y colaboradores, encontraron que ratas expuestas a PM_{2.5} mostraban daños en el sistema mucociliar bronquial, además demostraron una menor capacidad para eliminar *Klebsiella pneumoniae* favoreciendo el desarrollo de la infección (Duan et al., 2013). Otros estudios han demostrado que la exposición a PM induce una mayor adhesión de los patógenos a las células epiteliales respiratorias; por ejemplo, Mushtaq N. y colaboradores, encontraron en células epiteliales A549 (células epiteliales alveolares tipo II) tratadas con PM₁₀ y posteriormente infectadas con *S. pneumoniae*, un incremento en la adhesión de la bacteria a estas células (Mushtaq et al., 2011).

Además, existe evidencia que demuestra que la exposición a PM altera las uniones estrechas de la barrera epitelial de las vías respiratorias; Kim S. y colaboradores, demostraron que la exposición a PM_{2.5} regula de manera negativa la expresión de claudina-1 (S.-S. Kim et al., 2017).

En el estudio llevado a cabo por Sarkar S. y colaboradores se estudió el efecto que tenía la pre-exposición de células polimorfonucleares derivadas de sangre periférica (PBMC) a PM colectado en diferentes estaciones del año, en la respuesta inmune en contra de *Mycobacterium tuberculosis*. Ellos demostraron, que la pre-exposición a PM_{2.5} y PM₁₀ disminuía la fagocitosis de *Mycobacterium tuberculosis* en comparación con las células no expuestas. Además, la pre-exposición a PM suprimió la expresión de IFN- γ e IL-1 β , asociándose con una disminución en el control del crecimiento bacteriano (Sarkar et al., 2019). Resultados similares se observaron células RAW264.7 (macrófagos murinos) expuestas a PM e infectadas con *Streptococcus pneumoniae*; observaron que la exposición a PM_{2.5} disminuía la fagocitosis, así como la expresión de iNOS, IL-1 β y TNF- α . Además, utilizando un modelo murino de infección por *Streptococcus pneumoniae*, encontraron que los ratones expuestos a PM_{2.5} e infectados, tenían mayor carga bacteriana que los animales no expuestos a PM_{2.5} (Y. W. Chen et al., 2020).

Otro mecanismo alterado por la exposición a PM es la respuesta inmune innata, específicamente la expresión de péptidos antimicrobianos, se ha demostrado en células BEAS-2B (células epiteliales bronquiales) pre-expuestas a PM (100 $\mu\text{g/mL}$) y posteriormente infectadas con *P. aeruginosa*, una mayor carga bacteriana en los grupos pre-expuestos a PM. Dicho aumento en la carga bacteriana, fue asociada con una disminución en la expresión de hBD-2 (X. Chen et al., 2018). Resultados similares fueron encontrados por Rivas-Santiago C. y colaboradores, donde observaron que la exposición previa de células A549 a PM_{2.5} y PM₁₀ a concentraciones de: 0.1, 1, 10 y 50 $\mu\text{g/mL}$, seguido de la infección por *M. tuberculosis* a una MOI de 10, causaba una disminución de la expresión de hBD-2 y hBD-3, en comparación con las células solo infectadas (Rivas-Santiago et al., 2015).

Recientemente, nuestro grupo de trabajo encontró que en ratones expuestos de forma prolongada a PM_{2.5} y PM₁₀, mostraban una disminución de β -defensinas 3, 4 y catelicidina, lo cual se asociaba con un incremento en la expresión de IL-10 y una disminución de IL-1 β (Almaraz-De-Santiago et al., 2021).

PARTE EXPERIMENTAL

Modelo murino: Para la realización de este estudio, se utilizó un modelo murino, donde machos de la cepa BALB/c de 6-8 semanas de edad fueron divididos aleatoriamente en los siguientes grupos: control negativo (sin infección, sin PM_{2.5}), control infección (infectados, sin PM_{2.5}), control PM_{2.5} (sin infección, con PM_{2.5}) y experimental (infectados, con PM_{2.5}) y cada tercer día, se anestesiaron con 0.1 mL de sevoflurano y se instiló por vía intratraqueal 0.1 mL de PM (640 μ g/mL) o solución salina mediante una cánula intratraqueal. Los ratones se monitorearon hasta su recuperación, posteriormente, se regresaron a sus jaulas.

Después de 28 días de exposición, los grupos; control infección y experimental, fueron inoculados con *P. aeruginosa* (1.7×10^8 bacterias/ratón) y los grupos control PM_{2.5} y experimental siguieron exponiéndose a PM_{2.5} hasta los días 3 y 7 días de infección, 5 ratones por grupo fueron sacrificados por exanguinación mediante la incisión de la arteria axilar. Se extrajeron los pulmones de la siguiente manera: fueron expuestos a través de un corte sagital en la caja torácica y se almacenaron de la siguiente forma; 3 pulmones derechos o izquierdos se colocaron en un criotubo con RNAlater para su análisis molecular, 3 pulmones derechos o izquierdos fueron perfundidos con etanol absoluto y se almacenaron en un tubo con formol al 10% para su análisis histológico, finalmente 4 pulmones derechos o izquierdos fueron almacenados en un tubo con PBS e inhibidor de proteasas y se utilizaron para conteo de Unidades Formadoras de Colonias y para la determinación de citocinas Th1, Th2 y Th17 a través de Citometría de Flujo; para el siguiente ratón, se invirtió el orden del destino de los pulmones, de tal manera que existiera rotación para el tratamiento de los mismos.

RESULTADOS

La pre-exposición a PM_{2.5} indujo una disminución en el peso corporal de los ratones

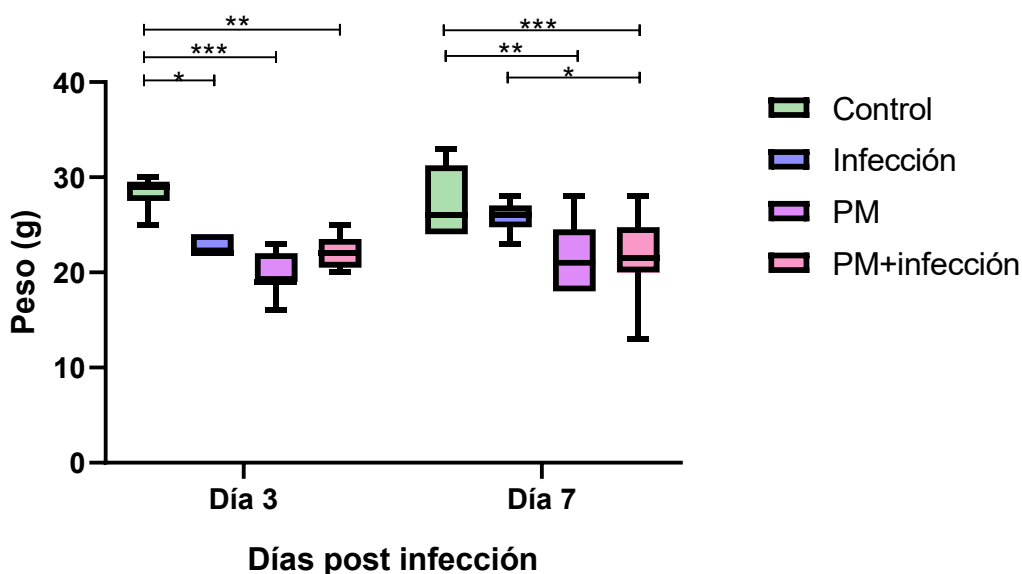


Figura 3: Peso de los distintos grupos de ratones durante la pre-exposición a PM_{2.5} y posterior infección con *P. aeruginosa*.

La disminución del peso en los grupos expuestos a $PM_{2.5}$, podría deberse al proceso inflamatorio que podría estar sucediendo como respuesta a estas partículas. Además del peso, observamos la presencia de otros signos clínicos de enfermedad como pelo hirsuto y aletargamiento y pudimos ver que el grupo infección, presentó una mejora de estos signos clínicos en el día 7 post-infección, no siendo el caso para los grupos expuestos a $PM_{2.5}$.



Figura 4: Signos clínicos de enfermedad en los ratones de distintos grupos en el día 3 post-infección con *P. aeruginosa*.



Figura 5: Signos clínicos de enfermedad en los ratones de distintos grupos en el día 7 post-infección con *P. aeruginosa*.

Posteriormente, procesamos los tejidos pulmonares de los distintos grupos de ratones y realizamos diluciones seriadas del homogenizado pulmonar para determinar si la exposición a $PM_{2.5}$ inducía una mayor carga bacteriana, pudimos observar que la pre-exposición a $PM_{2.5}$ si se relacionaba con un incremento en la carga bacteriana pulmonar.

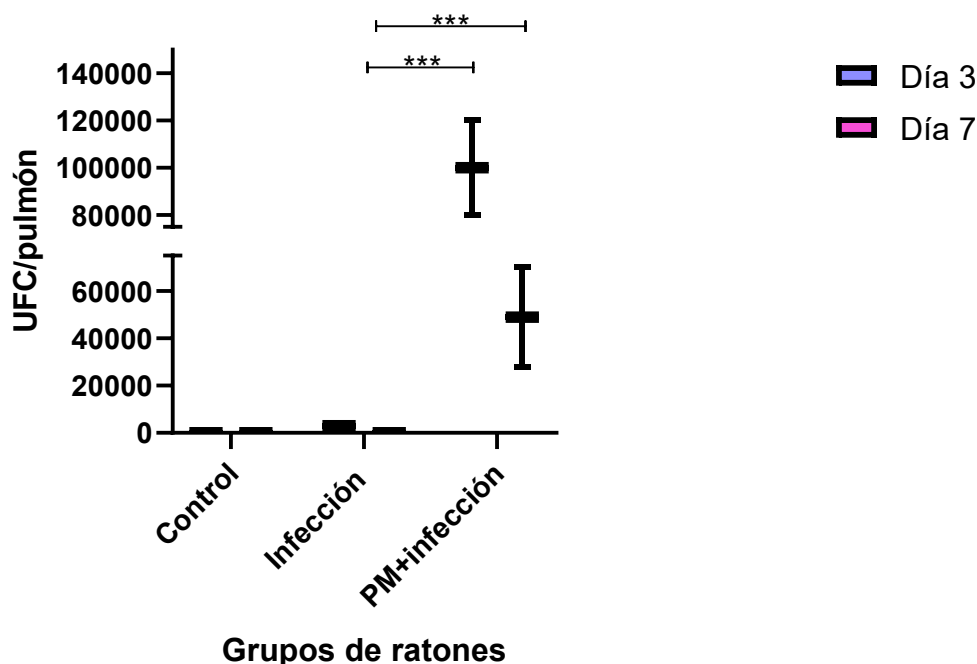


Figura 6: Carga bacteriana pulmonar en los distintos grupos de ratones expuestos y no expuestos a $PM_{2.5}$ e infectados o no con *P. aeruginosa*.

Al realizar la cuantificación de la carga bacteriana, se tenía la interrogante si la pre-exposición de ratones a $PM_{2.5}$ inducía mayor daño en el tejido pulmonar en comparación con los ratones no pre-expuestos a través de tinción de Hematoxilina y Eosina y se pudo observar que en el día 3 post-infección, existía una mayor infiltración de células inflamatorias en el parénquima pulmonar en los grupos infección, PM y PM + Infección en comparación con el grupo control y también en comparación con los distintos grupos de ratones del día 7 post-infección.

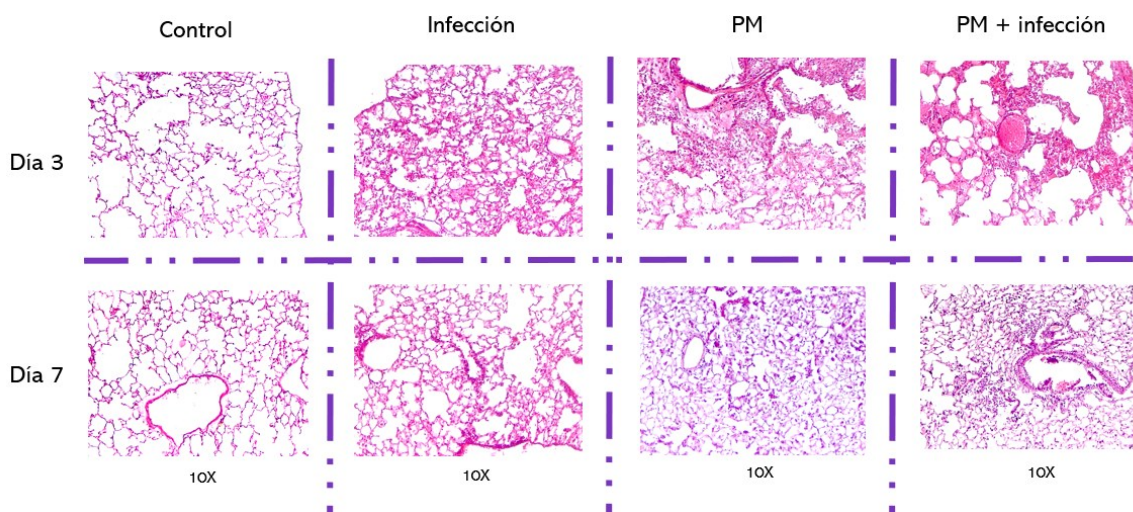


Figura 7: Micrografías del tejido pulmonar de los distintos grupos de ratones expuestos o no a $PM_{2.5}$ e infectados o no con *P. aeruginosa*. Tinción H y E.

CONCLUSIONES

La exposición prolongada a PM_{2.5} afecta negativamente la respuesta inmune pulmonar de ratones BALB/c, incrementando la carga bacteriana de los ratones pre-expuestos a las partículas, favoreciendo el desarrollo de enfermedad por *P. aeruginosa*.

La exposición prolongada a PM_{2.5} induce mayor infiltración de células inflamatorias en el parénquima pulmonar en los grupos de ratones de Infección, PM y PM + infección en el día 3 post-infección en comparación con los grupos de ratones del día 7 post-infección.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, K., Greenbaum, D. S., Shaikh, R., van Erp, A. M., & Russell, A. G. (2015). Particulate matter components, sources, and health: Systematic approaches to testing effects. *J Air Waste Manag Assoc*, 65, 544-558.
2. Brook, R. D., Rajagopalan, S., Pope, C. A., 3rd, Brook, J. R., Bhatnagar, A., Diez-Roux, A. V., . . . Metabolism. (2010). Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 121(21), 2331-2378. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20458016>
3. Chen, B., & Kan, H. (2008). Air pollution and population health: a global challenge. *Environ Health Prev Med*, 13(2), 94-101. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19568887
4. Contreras, A. M., et. al. (2013). Calidad del aire: una práctica de vida. SEMARNAT. Retrieved from <http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/Libros2013/CD001593.pdf>
5. Duan, Z., Du, F. Y., Yuan, Y. D., Zhang, Y. P., Yang, H. S., & Pan, W. S. (2013). [Effects of PM_{2.5} exposure on Klebsiella pneumoniae clearance in the lungs of rats]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*, 36(11), 836-840.
6. Feng, C., Li, J., Sun, W., & Wang, Q. (2016). Impact of ambient fine particulate matter (PM_{2.5}) exposure on the risk of influenza-like-illness: a time-series analysis in Beijing, China. *Environmental Health*, 15, 1-12.
7. HEI. (2020). *State of Global Air 2020. Special Report*.
8. Hiraiwa, K., & van Eeden, S. F. (2013). Contribution of lung macrophages to the inflammatory responses induced by exposure to air pollutants. *Mediators Inflamm*, 2013.
9. Loomis, D., Huang, W., & Chen, G. (2014). The International Agency for Research on Cancer (IACR) evaluation of the carcinogenicity of outdoor air pollution: focus on China. *Chin J Cancer*, 33, 189-196.
10. Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., . . . Memish, Z. A. (2012). Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380(9859), 2095-2128.
11. Mannucci, P. M., & Franchini, M. (2017). Health Effects of Ambient Air Pollution in Developing Countries. *Int J Environ Res Public Health*, 14(9).
12. Morakinyo, O. M., Mokgobu, M. I., Mukhola, M. S., & Godobedzha, T. (2019). Biological composition of respirable particulate matter in an industrial vicinity in South Africa. *Int J Environ Res Public Health*, 16, 1-14.
13. Mushtaq, N., Ezzati, M., Hall, L., Dickson, I., Kirwan, M., Png, K. M., . . . Grigg, J. (2011). Adhesion of Streptococcus pneumoniae to human airway epithelial cells exposed to urban particulate matter. *J Allergy Clin Immunol*, 127(5), 1236-1242 e1232. doi:10.1016/j.jaci.2010.11.039
14. Paulin, L., & Hansel, N. (2016). Particulate air pollution and impaired lung function. *F1000Res*, 5. doi:10.12688/f1000research.7108.1
15. Rao, X., Zhong, J., Brook, R. D., & Rajagopalan, S. (2018). Effect of particulate matter air pollution on cardiovascular oxidative stress pathways. *Antioxid Redox Signal*, 28, 797-818.

16. Rivas-Santiago, C. E., Sarkar, S., Cantarella, P. t., Osornio-Vargas, A., Quintana-Belmares, R., Meng, Q., . . . Schwander, S. (2015). Air pollution particulate matter alters antimycobacterial respiratory epithelium innate immunity. *Infect Immun*, 83(6), 2507-2517. doi:10.1128/IAI.03018-14
17. Sarkar, S., Rivas-Santiago, C. E., Ibironke, O. A., Carranza, C., Meng, Q., Osornio-Vargas, A., . . . Schwander, S. (2019). Season and size of urban particulate matter differentially affect cytotoxicity and human immune responses to Mycobacterium tuberculosis. *PLoS One*, 14(7)
18. Sierra-Vargas, M. P., & Teran, L. M. (2012). Air pollution: impact and prevention. *Respirology*, 17(7), 1031-1038. doi:10.1111/j.1440-1843.2012.02213.x
19. Smith, G., Schoenbach, V. J., Richardson, D. B., & Gammon, M. D. (2014). Particulate air pollution and susceptibility to the development of pulmonary tuberculosis disease in North Carolina: an ecological study. *Int J Environ Health Res*, 24, 103-112.
20. Sun, Q., Hong, X., & Wold, L. E. (2010). Cardiovascular effects of ambient particulate air pollution exposure. *Circulation*, 121(25), 2755-2765. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20585020>
21. WHO. (2018b). Nueve de cada diez personas de todo el mundo respiran aire contaminado. Retrieved from <http://www.who.int/es/news-room/detail/02-05-2018-9-out-of-10-people-worldwide-breathe-polluted-air-but-more-countries-are-taking-action>
22. Yang , S., Tan, Y., Mei, H., Wang, F., Li, N., Zhao, J., . . . Li, Y. (2018). Ambient air pollution the risk of stillbirth: A prospective birth cohort study in Wuhan, China. *Int J Hyg Environ Health*, 221(3), 502-509.

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN EL TIEMPO QUE DEDICA *ALOUATTA PALLIATA* A INGERIR ALIMENTO

María de Jesús Rovirosa-Hernández¹, Casandra Velasco-Jácome², Francisco García-Orduña¹, Rael Martín Palestino-Sánchez³, Mariana Morteo-Nava,² Juan Francisco Rodríguez-Landa⁴.

¹Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, 91090, México

²Facultad de Biología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, 91000, México

³Doctorado en Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, 91090, México

⁴Laboratorio de Neurofarmacología, Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, 91090, México
jrovirosa@uv.mx

RESUMEN

Ante el incremento de la temperatura ambiental *Alouatta palliata* prolonga el tiempo de descanso para mantener su equilibrio térmico, esto podría sugerir como una disminución en el tiempo que invierte a otras actividades como la alimentación. De ser así, traería como consecuencia un catabolismo de sus reservas de grasas para adquirir energía cuando ésta no es obtenida del alimento que consume, y este catabolismo se vería reflejado en la presencia de cetonas en su orina. Cabe resaltar que las cetonas sólo se eliminan en la orina cuando ocurre un desbalance energético. El objetivo del presente estudio fue analizar el efecto de la temperatura ambiental entre temporadas climáticas sobre la ingestión de alimento en *A. palliata*. Se registró por medio de un análisis focal-animal de 10 minutos, el patrón diario de actividad de *A. palliata* localizados en dos fragmentos de selva [Zapoapan (n=8) y Mirador Pilapa (n=9), en Los Tuxtlas, Ver.], durante cuatro días consecutivos por sitio, a lo largo de cuatro meses de la temporada húmeda y cuatro de la seca. Así también, se tomó la temperatura ambiental al inicio de cada registro conductual. El registro del patrón diario de los individuos fue para obtener el tiempo total invertido a la ingestión de alimento. Para analizar los cambios en la ingesta de alimento, se colectaron de manera oportuna, muestras de orina inmediatamente después de la micción. El uroanálisis se realizó por medio de tiras reactivas para obtener la concentración de cetonas. Los resultados muestran que en Zapoapan se encontraron diferencias significativas en el tiempo invertido a la ingesta de alimento entre temporadas ($U=27158.00; p \leq 0.001$), pero no en la presencia de cetonas. En Mirador Pilapa no se reportaron diferencias en el tiempo invertido a la ingesta de alimento entre temporadas, pero sí una significativa concentración de cetonas en la temporada húmeda ($U=911.500; p \leq 0.047$), con respecto a la temporada seca. Los resultados sugieren que los monos aulladores de ambos sitios muestran un desbalance energético debido a la presencia de cetonas en su orina en ambas temporadas climáticas, independientemente del tiempo que éstos dedican a su alimentación. Esto probablemente se deba a que la temperatura pudo influir en la disponibilidad o fenología de las partes vegetales de las especies que consume *A. palliata*; considerando que estos tienen una dieta folívora-frugívora, se puede sugerir que una menor disponibilidad y consumo de frutos y hojas jóvenes, tendrán una menor contribución de carbohidratos que les dan el aporte energético que requieren, y esto pudo provocar un desequilibrio energético, observado con la presencia de cetonas en la orina de estos monos aulladores.

INTRODUCCIÓN

El cambio acelerado del clima ocurrido en los últimos años debido a las actividades antrópicas, ha tenido un impacto en la biodiversidad (Díaz-Cordero, 2012; Corwin, 2020; Ogaya y Peñuelas, 2021; IPCC, 2022). Estudios recientes han demostrado que los cambios en el clima, modifican la fenología de las especies vegetales, alterando sus períodos de floración, fructificación y foliación de éstas (van Schaik y Pfannes, 2009). Esto impacta en la disponibilidad de alimento para las diversas especies animales que dependen de ellas por tener una dieta folívora y/o frugívora; como es el caso particular de los primates de México. Los cambios en la disponibilidad de alimento, también tiene un efecto en el patrón de actividades diaria de los individuos (Ning *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021), como ocurre en el mono aullador de manto (*Alouatta palliata*), que reduce el tiempo que dedica a

alimentarse o desplazarse y aumenta su tiempo de descanso, cuando la temperatura incrementa (Hill, 2006; Palestino-Sánchez *et al.*, 2024).

Se sugiere que esta respuesta conductual, es una estrategia adaptativa de los primates para evitar que incremente su temperatura corporal (Stelzner, 1988). Sin embargo, la disminución en el tiempo dedicado a la ingesta de alimento, puede tener un efecto en el balance energético de los individuos. Esto se refiere a que los períodos de ayuno provocan que los individuos empiecen a utilizar sus reservas de energía, incentivando sus procesos catabólicos para producir ésta (De Cabo y Mattson, 2019). Es entonces que los organismos utilizan los cuerpos cetónicos provenientes de la hidrólisis proteica como fuente de energía (Lignot y LeMaho, 2012), para cubrir sus requerimientos energéticos, que le permiten llevar a cabo sus funciones vitales (Laffel, 2000; Puchalska y Crawford, 2021).

Una vez que es utilizada esta energía alterna, los excedentes de cetonas son expulsados en la orina, y su presencia representa una señal del catabolismo de la reserva de energía ya que no suelen presentarse de forma normal en la orina, y únicamente se presentan cuando sucede este proceso (Knott, 1998; Puchalska y Crawford, 2021). Estudios en primates han asociado la presencia de cetonas con los cambios en la disponibilidad de alimento por temporada fenológica (Knott, 1998; Wich *et al.*, 2006), o por las demandas nutricionales que generan los estadios reproductivos de las hembras (Leendertz *et al.*, 2010). Sin embargo, no se ha explorado el efecto de la temperatura ambiente sobre la ingestión de alimento, por consiguiente, el objetivo del presente estudio fue analizar el efecto de la temperatura ambiental entre temporadas climáticas sobre la ingestión de alimento en *A. palliata*.

TEORIA

Se ha definido al clima como el producto de la interacción entre la atmosfera, los océanos, el relieve, las capas de hielo y nieve y los continentes, las cuales pueden variar a lo largo del tiempo de forma natural (Martínez-Arroyo, 2013) o por las actividades antrópicas (IPCC, 2022).

En lo particular, el clima de la República Mexicana presenta dos temporadas climáticas bien diferenciadas, una cálida o seca y una fría o húmeda. Este tipo de clima monzónico tiende a tener un período de meses con temperaturas ambientales más altas un poco antes del período de lluvias (Vidal, 2005; López-Quiroz *et al.*, 2022). Los cambios en las condiciones ambientales entre temporadas tienen un efecto tanto en las especies vegetales (fenología; Chu *et al.*, 2023), como en los animales (periodos reproductivos; Loretto y Vieira, 2005).

Se ha reportado que los primates son los mamíferos más vulnerables a los cambios adversos del clima (Bernard y Marshall, 2020), aunque algunas especies presentan cierta flexibilidad conductual, que les permite adaptarse y sobrevivir en hábitats fragmentados (Estrada *et al.*, 2017). Sin embargo, para otras especies como los primates, les es difícil adaptarse al cambio climático, debido a los largos tiempos entre generaciones o su limitada capacidad de dispersarse (Korstjens y Hillyer, 2016; Estrada *et al.*, 2017; Bernard y Marshall, 2020). Aunado a esto, los factores antrópicos como la deforestación deja más expuestos a los primates al incremento de la temperatura (Carvalho *et al.*, 2019), lo que puede impactar en la disminución de sus poblaciones (Almeida de Lima *et al.*, 2019), e incluso a su probable extinción en años próximos (da Silva *et al.*, 2022).

Por su parte, los organismos desarrollan algunas estrategias que les permite hacer frente a las variaciones del clima, entre las que se encuentra la flexibilidad conductual (Lindshield, 2017), la cual se reporta esta presente en la mayoría de los primates, lo que les permite adaptarse a los cambios en la variación de la temperatura. Por ejemplo; los monos aulladores de manto (*Alouatta palliata*), invierten más tiempo a descansar durante la temporada seca cuando las temperaturas son más elevadas en comparación de la temporada húmeda (Serio-Silva, 1992). Además, durante el descanso ocupan posturas corporales y descansan a diferentes estratos arbóreos que les permite exponerse o no al sol, como una estrategia de termorregulación (Bicca-Marques y Calegario-Marques, 1998; Palestino-Sánchez *et al.*, 2020; Palestino-Sánchez, 2021).

Dentro del patrón diario de actividades, *A. palliata* dedica aproximadamente el 74% de su tiempo al descanso, y se ha reportado que esta conducta está relacionada con su dieta folívora-frugívora (Estrada, 1984; Dias y Rangel-Negrín, 2015), ya que al consumir las diversas especies silvestres que forman parte de su dieta y carecer de un tracto gastrointestinal especializado para fermentar, digerir y extraer la energía de los carbohidratos estructurales que se encuentran en las hojas que consume (Janiak et al., 2019; Milton 1981), este primate debe dedicar más tiempo a descansar mientras este proceso sucede (Milton, 1981; Estrada, 1984). Por otro lado, estudios recientes han reportado que *A. palliata*, también invierte más tiempo a descansar aun cuando hay suficiente disponibilidad de alimento, cuando las temperaturas se incrementan. Sugiriendo que este descanso pudiera estar asociado al costo energético que les causa termorregular con el ambiente (Serio-Silva, 1992; 1996; Aristizabal et al., 2018; Palestino-Sánchez et al., 2020; Palestino-Sánchez, 2021), sin embargo, esta inversión de tiempo al descanso puede influir en la reducción de tiempo a otras actividades como la alimentación, lo cual podría causar un posible desbalance energético como resultado de una baja compensación nutricional.

Por otro lado, los factores climáticos también tienen un efecto en la fenología de las especies vegetales, y pueden influir en los períodos de floración, fructificación o foliación (van Schaik y Pfannes, 2009), dichos cambios también pueden afectar a las especies que dependen de estas y de sus nutrientes para alimentarse como es el caso de los primates (Masi et al., 2009). Estudios en el género *Alouatta* mencionan que su alimentación varía en respuesta a la estacionalidad en que se presenta la disponibilidad de sus recursos alimentarios (Chaves y Bicca-Marques, 2016), como son los frutos, debido a que muchos de ellos son ricos en carbohidratos, por lo cual son una fuente importante de energía para los primates que tienen una dieta folívora-frugívora (Milton, 1979; Lambert y Rothman, 2015), lo que indica que los primates no tienen un balance energético estático, por lo que la energía que obtienen de los alimentos podría no ser siempre suficiente para realizar sus actividades diarias (Knott, 1998; Kaur y Huffman, 2004; Wich et al., 2006; MacIntosh et al., 2012; Naumenko et al., 2019; Bergstrom, et al., 2020).

Es importante destacar que cuando se da una reducción en la ingestión de alimento ocurre un catabolismo de los ácidos grasos, lo cual genera la presencia de cetonas en el organismo, (Robinson et al., 1980), este proceso puede medirse mediante un uroanálisis. Los cuerpos cetónicos se encuentran presentes en el torrente sanguíneo; sin embargo, se incrementan como resultado de un ayuno, y son eliminadas en la orina (Puchalska y Crawford, 2021). Este incremento de cetonas puede causar en los organismos patologías como cetosis, cetoacidosis diabética o hipoglucemia (Paoli et al., 2015; Botham y Meyes, 2018). Los análisis de la presencia de cetonas en primates se han asociado con disponibilidad de alimento y balances energéticos negativos (Knott, 1998; Kaur y Huffman, 2004; Wich et al., 2006; MacIntosh et al., 2012; Naumenko et al., 2019).

Considerando el efecto de la temperatura, sobre el tiempo que dedica *A. palliata* para alimentarse, y sobre la fenología de las especies que forman parte de su dieta; es importante analizar si estos factores pueden impactar en el balance energético de los monos aulladores de manto, provocando la presencia de cetonas en su orina.

PARTE EXPERIMENTAL

El estudio se llevó a cabo en 2 fragmentos de selva en la región de los Tuxtlas, Ver., ubicados en las comunidades de Zapoapan que consta de 13.8 ha y Mirador Pilapa con 18.9 ha, Ambos sitios pertenecen al municipio de Tatahuicapan de Juárez, Veracruz, México. Prevalece una temperatura promedio entre los 19 y 32°C, donde los meses de febrero a junio conforman la temporada seca, donde mayo es el mes más cálido del año con una temperatura máxima es de 32 y una mínima de 24°C, mientras que la temporada húmeda ocurre en los meses de julio a enero; siendo enero el mes más frío con una temperatura mínima de 19°C y máxima de 24°C.

Nuestro grupo de estudio en el fragmento de Mirador Pilapa estuvo conformado por 4 hembras adultas de las cuales 2 estaban gestante y lactante a lo largo del estudio, además de 4 machos

adultos y 1 juvenil (n=9). Mientras que en Zapopan había 4 hembras adultas de las cuales 1 estaba gestante y lactante durante el estudio, 3 machos adultos y 1 juvenil (n=8).

Se realizó un estudio previo para conocer la disponibilidad de alimento de ambos fragmentos (Palestino-Sanchez, 2024). Además, se registró el tiempo de la conducta de ingesta de alimento durante 4 días consecutivos por mes, por sitio, durante 8 meses; mediante un registro focal-animal de 10 min, registrando la parte vegetal consumida (hoja madura, hoja inmadura, fruto, flor, y/o peciolo), así como la especie consumida, cada vez que un individuo se alimentaba. Además, se tomaron los datos ambientales al inicio de cada muestreo focal, mediante una estación climática portátil Kestrel® 3000, la cual registra la temperatura con una precisión de $\pm 0.5^\circ\text{C}$.

Se colectaron muestras de orina de los individuos, después de la micción. La orina fue colectada con una pipeta desechable de las hojas o de un plástico colocado por debajo donde se encontraban los individuos (Knott, 1997; Bergstrom *et al.*, 2020). Se colocaron en un tubo Eppendorf de 2ml., e inmediatamente después de la colecta fueron analizadas mediante tiras reactivas marca Siemens Multistix 10 SG, (Siemens Healthineers, formerly Siemens Healthcare, Erlangen, Germany), Después de 60 segundos posterior a colocada la muestra de orina, la almohadilla viró de coloración indicando la concentración de cetonas que va de 0 a 160 mg/dL. El método ya ha sido validada en una especie de primate neotropical (Bergstrom *et al.*, 2020).

Los datos fueron analizados mediante una prueba de Kolmogorov-Smirnov, seguida de una prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney y una prueba de correlación de Spearman para analizar la presencia de cetonas con el tiempo invertido a la ingestión de alimento, considerando una significancia de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Se obtuvieron 2,598 registros conductuales (433 h), de los cuales 696 datos registrados fueron de la conducta de alimentación (69.911h). No se encontraron diferencias estadísticas en la ingestión de alimento por sitios de muestreo ($U=42005.500$; $p=0.944$), pero si se encontraron diferencia en la concentración de cetonas por sitios ($U=6289.500$; $p \leq 0.005$). Hubo una mayor presencia de cuerpos cetónicos en Mirador Pilapa (4.794 ± 11.085 mg/dL) con respecto a Zapopan (3.323 ± 13.830 mg/dL), (Fig. 1).

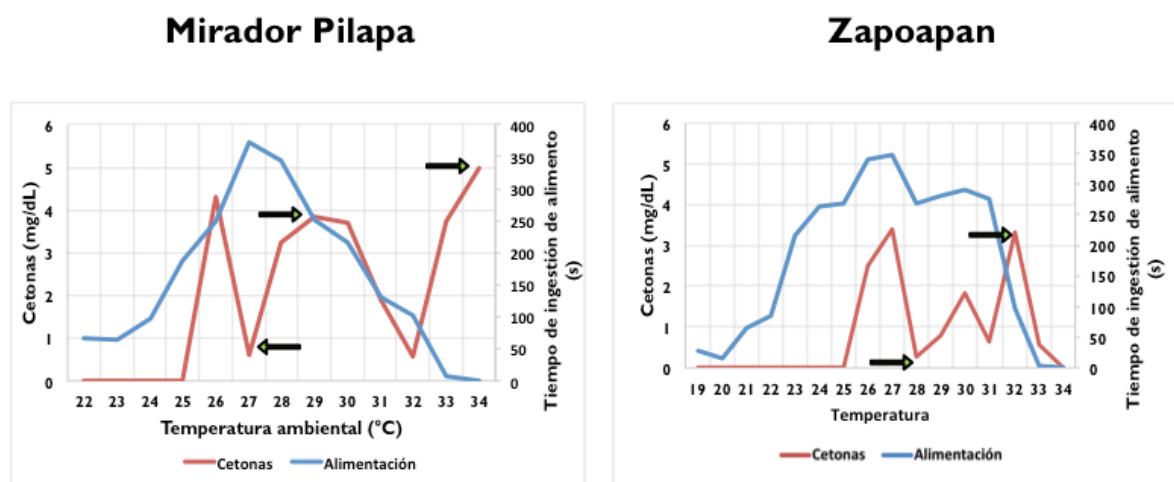


Figura 1. Distribución de cetonas (mg/dL) y el tiempo invertido a la ingestión de alimento (s) en rangos de temperatura ambiental (°C) registrados en Mirador Pilapa y Zapopan

En Mirador Pilapa, se registró un rango de temperatura durante la temporada húmeda y seca de 22 - 35°C, y la ingestión de alimento se registró durante la temporada seca entre los 22 – 33°C, mientras que en la temporada húmeda fue de 22 - 29°C (tabla 1).

Tabla 1. Tiempo dedicado a la alimentación con respecto a la temperatura ambiental por temporadas, en Mirador Pilapa.

Temperatura ambiental (°C)	Tiempo de ingestión de alimento en la temporada seca (s)	Tiempo de ingestión de alimento en la temporada húmeda (s)
22	540.000	600.000
23	120.000	600.000
24	325.000	280.000
25	360.000	350.000
26	280.000	357.777
27	359.259	343.200
28	316.774	475.714
29	356.150	256.666
30	435.135	0.000
31	414.444	0.000
32	323.333	0.000
33	180.000	0.000
34	0.000	0.000
35	0.000	0.000

No se encontraron diferencias significativas en el tiempo invertido en la ingestión de alimento entre temporadas climáticas (Figura 13; $U=8522.50$; $p=0.671$), aunque en la temporada seca se registraron temperaturas ambientales más altas de 23 a 35°C con respecto a la temporada húmeda. En Zapoapan, se registró un rango de temperatura durante la temporada húmeda de 19 - 41°C, observándose que la ingestión de alimento se registró entre los 21 – 32°C, mientras que en la temporada seca el rango de temperatura fue de 21 - 41°C y la ingestión de alimento ocurrió de los 21 - 33°C (tabla 2)

Tabla 2. Tiempo dedicado a la alimentación con respecto a la temperatura ambiental por temporadas, en Zapoapan.

Temperatura ambiental (°C)	Tiempo de ingestión de alimento en la temporada seca (s)	Tiempo de ingestión de alimento en la temporada húmeda (s)
19	0.000	220.000
20	0.000	120.000
21	153.333	370.000
22	345.714	340.000
23	400.000	410.000
24	400.000	368.000
25	435.000	317.894
26	382.500	321.538
27	417.368	314.545
28	370.857	215.789
29	412.105	271.666
30	399.649	262.500
31	398.421	245.454
32	460.000	262.000
33	200.000	0.000
34	0.000	0.000
35	0.000	0.000

36	0.000	0.000
37	0.000	0.000
38	0.000	0.000
39	0.000	0.000
40	0.000	0.000
41	0.000	0.000

Se encontró un mayor tiempo invertido a la ingestión de alimento, durante la temporada seca ($U=27158.00$; $p\leq 0.001$), y con temperaturas ambientales más altas de 21 a 41°C ($U=27377.00$; $p\leq 0.001$), con respecto a la temporada húmeda de 19 a 32°C.

El consumo de partes vegetales también varió entre ambas temporadas climáticas en ambos sitios de estudio, observándose un mayor consumo de éstas en la temporada seca con respecto a la húmeda (tabla 3).

Tabla 3. Consumo de partes vegetales entre temporadas climáticas en ambos sitios de estudio.

Parte vegetal	Mirador Pilapa		Zapoapan	
	Tiempo de consumo temporada seca (min)	Tiempo de consumo temporada húmeda (min)	Tiempo de consumo temporada seca (min)	Tiempo de consumo temporada húmeda (min)
Hojas jóvenes	676	467	821	515
Hoja madura	0	0	10	15
Frutos maduros	214	135	772	149
Frutos inmaduros	42	13	0	0
Flores	43	0	150	5
Brotes	0	10	37	32
Tallo	0	0	7	30

Los resultados de la correlación de Spearman, para Mirador Pilapa mostraron una asociación negativa significativa entre la presencia de cetonas y el tiempo invertido a la ingestión de alimento en la temporada seca ($R_s = -0.814$; $p\leq 0.001$), mientras que en la temporada húmeda no se mostró una correlación significativa, pero sí una tendencia a la disminución de cetonas conforme aumentó la ingestión de alimento ($R_s = -0.591$; $p=0.066$; Figura 2).

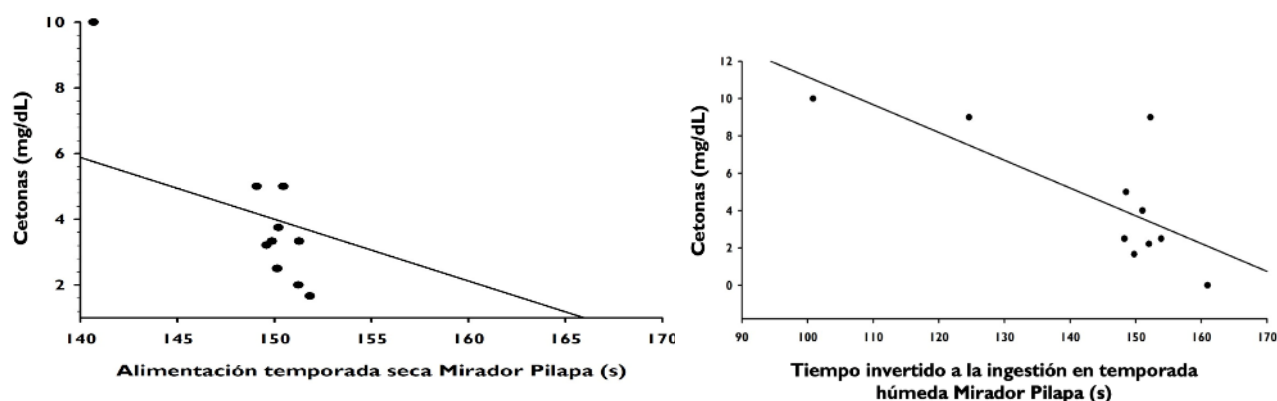


Fig. 2. Correlación entre cetonas (mg/dL) y el tiempo invertido a la ingestión de alimento (s) en la temporada húmeda en Mirador Pilapa.

En Zapopan tampoco se observó una correlación significativa entre ambas variables para la temporada seca ($R_s = -0.192$; $p = 0.501$) y la húmeda ($R_s = -0.490$; $p = 0.071$), sin embargo, si se mostró una tendencia a la disminución de cetonas conforme aumentaba la ingestión de alimento (Figura 3).

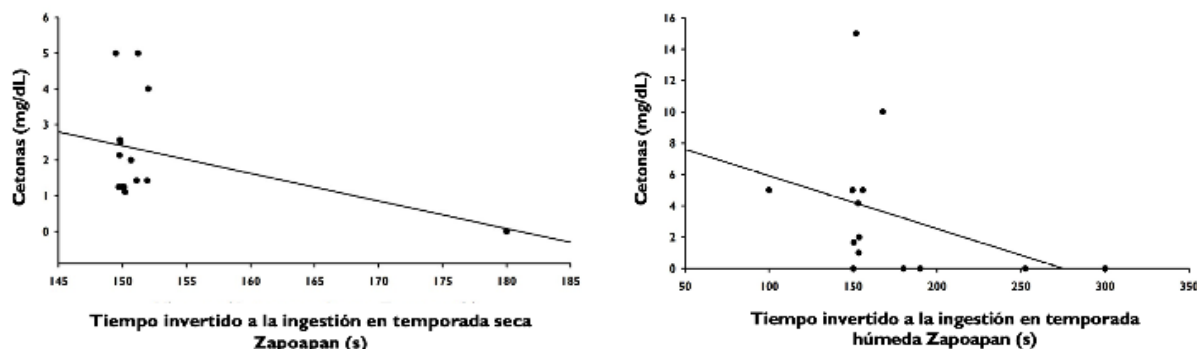


Fig. 3. Correlación entre cetonas (mg/dL) y el tiempo invertido a la ingestión de alimento (s) en la temporada húmeda en Zapopan

CONCLUSIONES

El incremento en la temperatura ambiental, provoca una reducción en el tiempo que dedicó *A. palliata* a la ingestión de alimento, lo cual generó un desequilibrio energético observado en la presencia de cetonas en la orina.

El efecto de la temperatura no fue exclusivo a la temporada seca, debido a que durante la temporada húmeda también se observó un desbalance energético en todos los individuos, a pesar de tener disponibilidad de alimento en ambas temporadas.

El clima juega un papel importante en los procesos fenológicos y en la calidad nutricional de las partes vegetales que consume *A. palliata*, lo que originó que consumieran sus reservas de energía cuando estos las requerían conforme aumentaba la temperatura ambiental.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. Almeida de Lima, M.C. Ribeiro, C.E. de Viveiros, M. Plaza-Pinto. Impacts of climate changes on spatio-temporal diversity patterns of Atlantic Forest primates. *Perspectives in Ecology and Conservation*, 2019, 17 (2), 50-56.
2. J. Aristizabal, L. Lévesque, C.A. Chapman, J.C. Serio-Silva. Impacts of temperature on behaviour of the mexican endangered black howler monkey *Alouatta pigra* Lawrence, 1933 (*Primates: Atelidae*) in a fragmented landscape. *Acta Zoológica Bulgarica*, 2018, 70(3), 377-382.
3. M.L. Bergstrom, U. Kalbitzer, F.A. Campos, A.D. Melin, M. Emery-Thompson, L.M. Fedigan. Non-invasive estimation of the costs of feeding competition in a neotropical primate. *Hormones and Behavior*, 2020, 118, 104632.
4. A. Bernard, A. Marshall. Assessing the state of knowledge of contemporary climate change and primates. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews*, 2020, 29 (6), 317-331.

5. J.C. Bicca-Marques, C. Calegario-Marques. Behavioral thermoregulation in a sexually and developmentally dichromatic neotropical primate, the black-and-gold howling monkey (*Alouatta caraya*). American Journal of Physical Anthropology, 1998, 106, 533-546.
6. K.M. Botham, P.A. Mayes. Oxidation of fatty acids: Ketogenesis. In: V. W. Rodwell, D. A. Bender, K. M. Botham, P. A. Kennelly y P. A. Weil (Eds.), *Haper's Illustrated Biochemistry*, (McGraw-Hill Education, 2018), pp.223-231.
7. J.S. Carvalho, B. Graham, H. Rebelo, G. Bocksberger, C.F. Meyer, S. Wich, H.S. Köhl. A global risk assessment of primates under climate and land use/cover scenarios. Global Change Biology, 2019, 25 (9), 3163-3178.
8. D. Corwin. Climate change impacts on soil salinity in agricultural areas. European Journal of Soil Science, 2020, 72 (2), 842-862.
9. O.M. Chaves, J.C. Bicca-Marques. Feeding strategies of brown howler monkeys in response to variations in food availability. Plos One, 2016, 11(2): e0145819
10. X. Chu, R. Man, Q. Dang, Spring phenology, phenological response, and growing season length. Front. For Glob. Change, 2023, 6:1041369.
11. L.B. Da Silva, G.L. Oliveira, R.G. Frederico, R. Loyola, D. Zacarias, B.R. Ribeiro, A.C. Mendes-Oliveira. How future climate change and deforestation can drastically affect the species of monkeys endemic to the eastern Amazon, and priorities for conservation. Biodiversity and Conservation, 2022, 31, 971-988.
12. R. De Cabo, M.P. Mattson. Effects of Intermittent Fasting on Health, Aging, and Disease. New England Journal of Medicine. 2019, 381(26): 2541-2551.
13. G. Díaz-Cordero. El cambio climático. Ciencia y Sociedad, 2012, 37(2), 227-240.
14. P.A.D. Dias, A. Rangel-Negrín. Diets of Howler Monkeys. En M. Kowalewski, P. Garber, L. Cortés, B. Urbani and D. Youlatos (Eds.), *Howler Monkeys*, (Louise Barrett: Springer, 2015), pp. 21-56.
15. A. Estrada, P.A. Garber, A.B. Rylands, C. Roos, E. Fernandez-Duque, A.D. Fiore, A.I. Nekaris, V. Nijman, E.W. Heymann, J.E. Lambert, F. Rovero, C. Berelli, J.M. Setchell, T.R. Gillespie, R.A. Mittermeier, L.V. Arreaga, M. Guinea, S. Gouveia, R. Dobrovolski, S. Shantee, N. Shantee, S.A. Boyle, A. Fuentes, K.C. MacKinnon, K.R. Amato, A.L.S. Meyer, S. Wich, R.W. Sussman, R. Pan, I. Kone, B. Li. Impending extinction crisis of the world's primates: why primates matter. Science Advances, 2017, 3 (1), e1600946
16. A. Estrada. Resource use by howler monkeys (*Alouatta palliata*) in the rain forest of Los Tuxtlas, Veracruz, Mexico. International Journal of Primatology, 1984, 5, 105-131.
17. R.A. Hill Thermal constraints on activity scheduling and habitat choice in baboons. American Journal of Physical Anthropology, 2006, 129 (2), 242-249.
18. IPCC. Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change 2022, [H.-O. Pörtner, D.C.
19. M. Janiak, A.S. Burrell, J.D. Orkin, T.R. Disotell. Duplication and parallel evolution of the pancreatic ribonuclease gene (RNASE1) in folivorous non-colobine primates, the howler monkeys (*Alouatta* spp.). Scientific reports, 2019, 20366 (9).

20. T. Kaur, M.A. Huffman Descriptive urological record of chimpanzees (*Pan troglodytes*) in the wild and limitations associated with using multi-reagent dipstick test strips. *Journal of medical primatology*, 2004, 33 (4), 187-196.
21. C.D. Knott. Changes in orangutan caloric intake, energy balance, and ketones in response to fluctuating fruit availability. *International Journal of Primatology*. 1998, 19: 1061–1079.
22. C.D. Knott. Field collection and preservation of urine in orangutans and chimpanzees. *Tropical Biodiversity*, 1997, 4(11), 95-102.
23. A. Korstjens, A. Hillyer. Primates and climate change: a review of current knowledge. En A. Wich y A. Marshall (Eds.), *An introduction to primates conservation*, 2016, 175-192.
24. L. Laffel. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 2000, 15 (6), 412–426.
25. J.E. Lambert, J.M. Rothman Fallback foods, optimal diets, and nutritional targets: Primate responses to varying food availability and quality. *Annual Review of Anthropology*, 2015, 44, 493-512.
26. S.A. Leendertz, S. Metzger, E. Skjerve, T. Deschner, C. Boesch, J. Riedel, F.H. Leendertz. A longitudinal study of urinary dipstick parameters in wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*) in Côte d'Ivoire. *American journal of primatology*, 2010, 72(8), 689–698.
27. Y. Li, G. Ma, Q. Zhou, Z. Huang. Seasonal variation in activity budget of assamese macaques in limestone forest of Southwest Guangxi, China. *Folia Primatologica*, 2020, 91(5), 1–17.
28. J.H. Lignot, Y. Le Maho. A history of modern research into fasting, starvation, and inanition. In *Comparative Physiology of Fasting, Starvation, and Food Limitation 2012*, Chapter 2. p 7–21.
29. S.M. Lindshield Behavioral flexibility. *The International Encyclopedia of Primatology*. (John Wiley and Sons, Inc 2017).
29. M. López-Quiroz, Y. Loranca-Domínguez, A.G. Zavala-Farjado, A.E. Martínez-Melgajero, J. Gómez-Camacho, O.A. Farias-Núñez, V.I. Olmos-Caballero. J.A. López-Trujillo *Reporte anual del clima en México 2022*. Ciudad de México: Comisión Nacional del Agua.
30. D. Loretto, M.V. Vieira The effects of reproductive and climatic seasons on movements in the black-eared opossum (*Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826). *Journal of Mammalogy*, 2005, 86(2), 287-293.
31. A.J.J. MacIntosh, M.A. Huffman, K. Nishiwaki, T. Miyabe-Nishiwaki. Urological screening of a wild group of japanese macaques (*Macaca fuscata yakui*): Investigating trends in nutrition and health. *International Journal Primatology*, 2012, 33, 460-478.
32. A. Martínez-Arroyo *Cambio climático. Agenda ciudadana de ciencia, tecnología e innovación* (16), 2013, CDMX: Academia Mexicana de Ciencias A.C.
33. S. Masi, C. Cipolletta, M.M. Robbins Western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) change their activity patterns in response to frugivory. *American Journal of Primatology*, 2009, 71(2), 91-100.
34. K. Milton. (1981). Food choice and digestive strategies of two sympatric primate species. *The American Naturalist*, 117 (4), 496-505.
35. Milton K. Factors influencing leaf choice by howler monkeys: a test of some hypotheses of food selection by generalist herbivores. *The American Naturalist*, 1979, 114 (3), 362-378.

36. D.J. Naumenko, M. Watford, S.S.U. Atmoko, W.M. Erb, E.R. Vogel. Evaluating ketosis in primate field studies: Validation of urine test strips in wild Bornean orangutans (*Pongo pygmaeus wurmbii*). *Folia Primatologica*, 2019, 91(2), 159-168.
37. W.H. Ning, Z.H. Guan, B. Huang, P.F. Fan, X.L. Jiang. Influence of food availability and climate on behavior patterns of western black crested gibbons (*Nomascus concolor*) at Mt. Wuliang, Yunnan, China. *American Journal of Primatology*, 2019, 81 (12), e23068.
38. R. Ogaya, J. Peñuelas. Climate change effects in a Mediterranean forest following 21 consecutive years of experimental drought. *Forests*, 2021, 12 (3), 306.
39. R. Palestino-Sánchez. N.S. Huerta-Pacheco, F. García-Orduña, J.F. Rodríguez-Landa, M.A. Cruz-Aguilar, M.J. Roviroso-Hernández. Effect of climate on thermoregulatory strategies and rest time in mantled howler monkeys (*Alouatta palliata*). *American Journal of Primatology* (en prensa, 2024).
40. R. Palestino-Sánchez *Influencia de la temperatura ambiental y humedad sobre estrategias termorreguladoras y conducta diaria de los monos aulladores (Alouatta palliata)*. [Tesis de maestría, Instituto de Neuroetología, 2021]. Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz. México.
41. R. Palestino-Sánchez, F. García-Orduña, D. Canales-Espinosa, F. López-Flores, J.F. Rodríguez-Landa, A.R. Sandoval-Jiménez, M.J. Roviroso-Hernández. Efecto de la temperatura ambiental sobre las posturas de descanso del mono aullador (*Alouatta palliata*). *Neotropical Primates*, 2020, 26(2), 125-130.
42. A. Paoli, G. Bosco, E.M. Camporesi, D. Mangar. Ketosis, ketogenic diet, and food intake control: a complex relationship. *Frontiers in Psychology*, 2015, 6:27.
43. P. Puchalska, P.A. Crawford. Metabolic and signaling roles of ketones bodies in health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 2021, 41, 49-77.
44. A.M. Robinson, D.H. Williamson. Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiological reviews*, 1980, 60 (1), 143–187.
45. J.C. Serio-Silva. *Calidad del alimento consumido por Alouatta palliata en condiciones de semilibertad*. [Tesis de maestría 1996], Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz, México.
46. J.C. Serio-Silva. *Patron diario de actividades y hábitos alimenticios de Alouatta palliata en semilibertad*. [Tesis de licenciatura 1992], Universidad Veracruzana. Cordoba, Veracruz, México.
47. C. Van Schaik, K. Pfannes Tropical climates and phenology: A primate perspective. En D. Brockman, C. Schaik (Eds.), *Seasonality in Primates: Studies of Living and Extinct Human and Non-Human Primates* (23-54). Cambridge: Cambridge University Press, 2009.
48. R. Vidal. *Las regiones climáticas de México*. México, D.F. 2005, Instituto de Geografía. UNAM.
49. S.A. Wich, S.S. Utami-Atmoko, T. Mitra-Setia, S. Djoyosudharmo, M.L. Geurts. Dietary and energetic responses of *Pongo abelli* to fruit availability fluctuations. *International Journal of Primatology*, 2006, 27(6), 1535-1550.
50. K.C. Zhang, Q.H. Zhou, H.L. Xu, Z.H. Huang. Diet, food availability, and climatic factors drive ranging behavior in white-headed langurs in the limestone forests of Guangxi, southwest China. *Zoological research*. 2021, 42(4), 406–411.

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO ACADÉMICO AL IMPLEMENTAR AUXILIARES DIDÁCTICOS DE TICS EN LAS PRÁCTICAS DE QUÍMICA BÁSICA EN EDUCACIÓN SUPERIOR

Luis Ricardo Morales Juárez, Verónica Machorro Sánchez, María Guadalupe Araceli Rosas Paleta, Karina Rosas Paleta, Sebastián Miguel Varela López.

Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Puebla.
ricardo.morales@puebla.tecnm.mx

RESUMEN

El Instituto Tecnológico de Puebla (ITP) atiende 7934 alumnos de licenciatura, no ajeno a la problemática de reprobación de las áreas de ingeniería reporta deserciones del 35% en los primeros tres semestres, siendo una de las causas la reprobación, en donde las materias del área de ciencias básicas tienen un peso importante. Entre las cuatro materias con reprobación de más del 70% están fundamentos de química y química.

Como parte de las estrategias para mejorar el desempeño académico se desarrolla un sitio WEB con materiales de soporte académico y actividades multimedia, acordes a los temas del programa y prácticas de la materia, sin embargo, a la fecha existe la controversia sobre su empleo, o continuar con las clases tradicionales.

Para proporcionar información fehaciente para la toma de decisiones asertivas, se desarrolla este trabajo que tiene como objetivo determinar la diferencia en la eficiencia académica de los alumnos de grupos de química del ITP, al implementar en clases elementos de TIC como herramienta didáctica auxiliar; el trabajo se desarrolló para el periodo agosto diciembre 2023, bajo un tipo de investigación cuantitativa, con enfoque no experimental, transeccional, explicativa y correlacional.

La información se obtuvo con instrumentos de medición desarrolladas en Google forms y de registros de calificaciones de docentes, en una muestra de tres grupos que optan por el empleo de las TIC's como auxiliar didáctico y tres grupos que no los utilizan, siendo analizados estadísticamente.

El total de alumnos evaluados fue de 168, 81 de grupos donde se empleó la herramienta de TIC's, y el resto en grupos que no la emplearon. De estos, solo 115 (68%) aprobaron. Los grupos que utilizaron TIC's presentaron un porcentaje de aprobación del 75%, con 13 unidades porcentuales arriba de los que no llevaron TIC's.

El grupo con menor porcentaje de aprobación se ubicó en aquellos que no emplearon TIC's con el 50% de aprobados y el de mayor aprovechamiento en los que si emplearon las TIC's obteniendo un 87% de aprobación.

Se concluye que el desempeño académico grupal mejoró en aquellos que usaron las TIC's presentando menor reprobación y un grupo con diferencia significativa en el promedio de calificaciones en el análisis ANOVA. Sin embargo, los resultados indican un nivel de aprovechamiento bajo para las prácticas de laboratorio al tener un promedio general de 59.5.

Con base en la experiencia de los docentes que impartieron la materia utilizando las TIC's y con el análisis de la información aportada, se determina que el empleo de las TIC's como herramienta didáctica facilita el proceso de enseñanza aprendizaje, ya que al acercar la información a los alumnos utilizando los medios y procesos que son cotidianos a ellos, se genera mejor comunicación y se forman redes de aprendizaje.

INTRODUCCIÓN

Este trabajo se enmarca en el tema de estudio de la efectividad académica del uso de TIC en las prácticas de química para alumnos del ITPuebla, y se desarrolla para atender el problema que se presenta en la academia de ciencias básicas de la misma institución, sobre la falta de información pertinente para la toma de decisiones al respecto de la implementación del uso de las TIC's en los cursos de química y cumplir con las disposiciones del Tecnológico Nacional de México referentes a dar impulso al empleo de las TIC's en el proceso de enseñanza – aprendizaje. Este trabajo tiene como objetivo determinar la diferencia en la eficiencia académica de los alumnos de grupos de química, al implementar en cursos de clases presenciales los elementos de TIC como herramienta didáctica auxiliar en su proceso de aprendizaje.

Planteamiento del problema

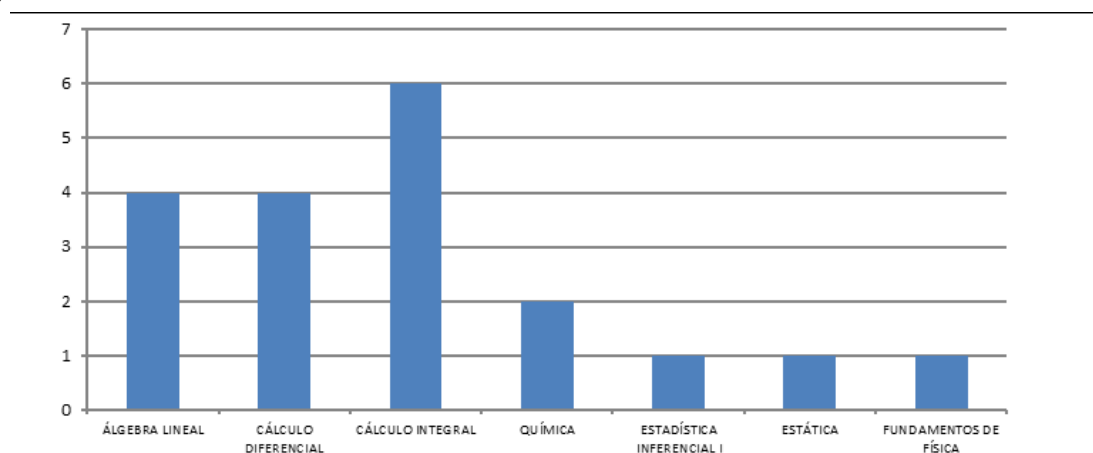
El ITP físicamente se ubica en el Municipio de Puebla que es la capital del Estado y a cincuenta años de su fundación da respuesta pertinente a las necesidades de la región brindando servicio a un total de 8320 alumnos, distribuidos en los programas académicos de: Ingeniería en Tecnologías de la Información y las Comunicaciones, Ingeniería Electrónica, Ingeniería Mecánica, Ingeniería Industrial, Ingeniería Eléctrica, Ingeniería en Logística, Ingeniería en Gestión Empresarial y Administración, todos estos acreditados por los diferentes organismos evaluadores como son CACEI, CACECA, CIIES.

Como en muchas de las instituciones de educación superior, en el ITP, las áreas de ingeniería presentan altos índices de reprobación, y es en mucho el área de ciencias básicas a la que se le atribuyen estos resultados, que como efecto final genera los mayores porcentajes en la causalidad de la deserción de alumnos de ingeniería en los primeros cuatro semestres.

Las estadísticas de deserción reportadas por el Departamento de Servicios Escolare, indican que para el ITP en promedio en los tres primeros semestres se tiene una deserción del 35%, aunque varía entre cada departamento, y a partir del 5to semestre la deserción fluctúa entre un 1 y 2% por semestre, así mismo la carga en materias de ciencias básicas en los primeros tres semestres es de hasta el 80% como el caso del departamento de metal mecánica.

Para el semestre enero - junio de 2019, Los departamentos que reportaron grupos con reprobación mayor al 70% fueron: Ingeniería Industrial con un grupo; Ciencias económico-administrativas con 4 grupos y ciencias básicas con 19 grupos, y de estos las materias del área de química se ubicaron en el tercer lugar con dos grupos (ver figura 1).

Figura 2



Materias que presentaron grupos con reprobación > 70% de alumnos

Cabe mencionar que las materias de fundamentos de química y química pertenecen al módulo de ciencias básicas siendo materias complementarias a los perfiles profesionales de las ingenierías y licenciaturas impartidas.

La pasada condición sanitaria causada por el COVID-19, generó la necesidad de implementar la educación en línea para atender los procesos educativos, en el Instituto Tecnológico de Puebla (ITP) se inició dejando libertad de uso de medios y tecnología a los docentes, ya que no se cuenta con una plataforma oficial para educación en línea, empleando estos diferentes plataformas y herramientas que fueron desde el Whatsapp, Zoom, Skype, FaceBook, hasta Moodle, Teams, Google drive entre otros.

La realización de prácticas de laboratorio se vio obstaculizada y ante tal situación se generaron materiales multimedia que apoyaran el proceso de enseñanza-aprendizaje.

A la fecha, existe la controversia en la academia de ciencias básicas y en específico en el área de química de continuar con su uso, o regresar a un manual de prácticas plano bajo el contexto de la dinámica de las clases tradicionales.

Hipótesis.

¿Si se emplean materiales didácticos utilizando las tecnologías de la información y comunicación como apoyo didáctico en el proceso de enseñanza - aprendizaje de la materia de química el rendimiento académico de los alumnos aumentará?

Variables.

Variable Independiente: Uso de las TIC en el proceso de enseñanza – aprendizaje del curso de química

Variable dependiente: Rendimiento académico de los alumnos en el curso de química

Justificación

En la actualidad la educación requiere que los diferentes elementos de la comunidad educativa revisen, evalúen, determinen y atiendan, en el plazo inmediato las necesidades de los maestros y de los alumnos que cada vez se presentan más heterogéneas y variadas. Toda acción de mejora educativa debe considerar que las estrategias de intervención que se propongan tengan como base un análisis completo y en riguroso del proceso, los docentes y el alumnado en sus diversos contextos.

En la actualidad el uso de las TIC es algo común y además globalizado, los proceso de enseñanza-aprendizaje tienen la necesidad de transformarse al ritmo de la tecnología y adaptarse a las demandas que surgen de los nuevos modelos de aprendizaje, los estudiantes bajo su contexto histórico cultural tienen una preferencia por uso de estos medios y desarrollan habilidades y distintos estilos de aprendizaje, por lo que se hace oportuno verificar las aportaciones reales al rendimiento académico de los alumnos por el uso de las TIC en la materia de química.

El desarrollo del proyecto “Evaluación de la efectividad académica del uso de TIC en las prácticas de química para alumnos del ITPuebla” permite conocer la conveniencia o no de modificar el proceso de enseñanza – aprendizaje tradicional por un modelo que genere materiales y se apoye en ellos mediante el uso de las TIC, para elevar el rendimiento académico de los alumnos en la materia.

Considerando que existe un bajo rendimiento académico en la materia de química, y que esto se constituye como uno de los factores de deserción escolar, el realizar innovaciones en el proceso de enseñanza aprendizaje que estén soportadas en el uso de la TIC beneficiará a los alumnos de las ingenierías impartidas en el ITPuebla, quienes podrán incrementar sus posibilidades de egreso de la institución como profesionistas, así como su inserción social, sin embargo la toma de decisiones para el cambio debe estar soportada por una evaluación rigurosa de su efectividad.

La aportación de este proyecto de investigación es significativa ya que ayudará a una toma de decisiones al evaluar la conveniencia de seguir bajo un modelo tradicional de aprendizaje o migrar a un proceso con un enfoque diferente, desarrollado con el apoyo de las TICs y en su caso permitirá identificar cuáles son los cambios que se deben realizar y cuáles son las prácticas docentes y de aprendizaje en las prácticas de laboratorio que deben mantenerse y mejorar.

En un primer plano el desarrollo del proyecto generará aportaciones para un promedio de 750 alumnos por semestre, que se puede ver incrementado por el aumento de la matrícula de nuevo ingreso, al mejorar su rendimiento escolar los alumnos mejoran su autoestima y confianza en sí mismos y sus posibilidades de éxito, que serán transmitidos en el corto plazo a sus ámbitos sociales más cercanos.

El éxito de los alumnos al mejorar su desempeño académico redundará en mejores indicadores para la institución, al disminuir la reprobación y la deserción, lo que se traduce en un aliciente y mayor compromiso de autoridades y docente para seguir en la mejora de los procesos educativos.

En un segundo plano y considerando un mejor aprendizaje del alumno y por tanto que este se apropie de los conocimientos y herramientas que pueden ser requeridos en su desempeño profesional, las empresas, instituciones u organismos donde se desempeñen contarán con un profesionista con un valor agregado.

Objetivo general.

Determinar la diferencia en la eficiencia académica de los alumnos de grupos de química, al implementar en cursos de clases presenciales los elementos de TIC como herramienta didáctica auxiliar en su proceso de aprendizaje.

Objetivos específicos.

- Determinar el nivel de aprovechamiento académico de los alumnos al emplear las TIC's como auxiliar didáctico en las prácticas de química.
- Evaluar el impacto en el rendimiento académico para la materia de química, en una muestra de tres grupos que durante el desarrollo de las clases presenciales opten por el empleo de las TIC como herramienta didáctica auxiliar y tres grupos que no los utilicen.

TEORÍA

Reprobación y deserción escolar

La reprobación es uno de los indicadores que desde siempre han llamado la atención de las autoridades educativas a nivel central y en las direcciones de cada uno de los planteles escolares, de igual forma los docentes al impartir los cursos establecen diagnósticos para plantear estrategias y acciones tendientes a abatir los niveles de reprobación.

Al respecto de la reprobación, se tiene de acuerdo al reporte emitido por el Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI), que la deserción escolar a nivel nacional por nivel educativo corresponde al 0.4% para primaria, 2.5% para secundaria, 9.2% para la educación media superior y 8.5% para la educación superior (INEGI, 2022).

De lo anterior se puede observar que los índices de mayor deserción se encuentran en la educación media superior y superior, y aunque existen otros factores que inciden en la deserción, es importante que se atienda lo correspondiente a la reprobación ya que como comentan Torres-Zapata et al. (2020) la reprobación genera baja autoestima y se considera una variable asociada con la deserción escolar.

Existen diferentes factores que inciden en el rendimiento académico de los alumnos, la presencia de estos puede ubicar al alumno como un estudiante rezagado o irregular donde inicialmente se deben recurrir materias hasta lograr las competencias establecidas por los programas académicos,

dependiendo de las políticas institucionales el alumno puede recurrir en diferentes ocasiones la asignatura, pero siempre se ocasionará un retraso en el plazo establecido por el programa y si las deficiencias no se atienden no se logrará la permanencia del alumno derivando en la deserción del programa sin alcanzar el éxito académico propuesto, Torres-Zapata et al. (2020) determina que existe una fuerte relación entre la reprobación y la deserción escolar.

La reprobación no se debe entender como un simple retraso en los tiempos de culminación de los objetivos planteados, ya que sus efectos son negativos y se potencian, porque se relacionan especialmente con lo emocional y conductual, según (González y Daza, 2010, como se citó en Vargas et al., 2015, p. 1) los aspectos referidos son disgusto consigo mismo, inseguridad hacia el futuro, frustración y alteración de las relaciones con los demás ya que generan baja autoestima (Piratoba y Barbosa, 2013, como se citó en Torres-Zapata, 2020, p. 5).

Por tanto, la relación que guarda la reprobación con el rezago académico y con la deserción, se acentúa en los alumnos en riesgo y además del impacto personalizado sobre el estudiante al truncar sus estudios por reprobación, se genera una merma en los indicadores de eficiencia terminal de las instituciones poniendo en riesgo la calidad educativa que esta ofrece.

La reprobación, rezago académico y deserción escolar han sido una constante preocupación para los docentes, directivos y las instituciones, las investigaciones sobre su causalidad indican que existen diferentes factores para que esto se presente, en el caso de las ingenierías las investigaciones de diferentes autores permiten conceptualizar la problemática, Ocampo et al. (2010) identifican que los cursos de las competencias genéricas e interdisciplinarias son los que tienen el mayor impacto sobre la deserción.

Aguilar et al. (2018) consideran que en las ingenierías, el mayor peso de las causas de reprobación se atribuye a las variables personales como pueden ser bajo nivel de conocimientos en los requisitos previos de la asignatura, malos hábitos de estudio, rechazo a las asesorías e inasistencia a clases y en segundo término las variables propias del docente como pueden ser deficiencias didácticas y pedagógicas; Murillo-García et al. (2021) menciona que para la educación superior en las áreas de la Ingeniería y la Tecnología es en el primer año (tronco común) donde se presenta el mayor índice de reprobación y establece que, “Los programas con mayor rezago pertenecen al área de conocimiento de la Ingeniería y la Tecnología e incluyen cinco programas educativos; Ingeniero Químico, Ingeniero Eléctrico, Licenciado en Sistemas Computacionales, Ingeniero en Computación y Químico Industrial” (Murillo-García et al., 2021, p. 13) por área, las ciencias duras aplicadas inanimadas son las que presentan mayor proporción de estudiantes rezagados.

Ambientes de aprendizaje con apoyo de las TIC y TACS

Los procesos cotidianos en los que los alumnos se desempeñan conllevan el uso de las TIC's y la tecnología asociada a ellas por lo que es de esperarse que en sus clases les sea mucho más atractivo y deseable el empleo de estos medios, ya que forma parte de su vida diaria (nativos digitales), esto obliga a los docentes a hacer uso de esta herramienta como parte del proceso de enseñanza aprendizaje, sin embargo la acción requiere de recursos, medios y capacitación, así como del desarrollo de investigación en educación que promueva nuevos modelos epistemológicos que apliquen a estas surgentes formas de adquisición de conocimiento.

Es necesario que el modelo tradicional de educación de relación unidireccional ya que este, tiene una alta demanda de tiempo y no permite una visión amplia de trabajo individual de los alumnos. El empleo de la TIC's permite que el alumno pueda a su ritmo y bajo una supervisión adecuada alcanzar sus objetivos.

Como menciona Kruchinina et al. (2016) el modelo de computación contribuye al desarrollo de técnicas cognitivas tales como el análisis de la situación problemática y, por tanto, la identificación de las relaciones y patrones que proporcionan el funcionamiento del sistema, por lo que el uso de las TICs didácticas si son diseñadas bajo un sustento pedagógico y técnico adecuado y se articulan para dar seguimiento a los programas de la formación profesional del estudiante y son aplicados por

personal capacitado, serán seguramente un punto de apoyo para el desarrollo adecuado de los alumnos dentro de sus contexto actual.

En términos del empleo de la tecnología como un auxiliar didáctico no se puede hablar de un marco teórico si no se mencionan las tecnologías emergentes por mencionar algunas la realidad virtual (VR) y la realidad aumentada (AR) o la robótica, así como la investigación pedagógica por el empleo de estas en los procesos de enseñanza aprendizaje.

Un acercamiento al empleo de las tecnologías emergentes aplicadas en la educación química lo muestra Chiu (2021) al realizar la revisión de 534 artículos obtenidos de la base de datos de Web of Science (WoS), Scopus y Eric y aplicar restricciones de selección, determinando que el periodo fuera de 2010 a 2021, el idioma inglés, acceso al texto completo, que el documento tratara de tecnologías relevantes adoptadas en educación química en la era de inteligencia artificial.

Bajo estos criterios, de una muestra de 534 artículos, se encontraron 40 repetidos y se excluyeron 286 al no cubrir los filtros establecidos por el autor, por lo que sobre la base de 280 publicaciones se seleccionaron 45 artículos para su revisión, las temáticas van desde experimentos de química con apoyo de laboratorios virtuales, aplicaciones móviles, uso de realidad aumentada, realidad virtual, software educativo en química, evaluación de los aprendizajes por el uso de elementos de realidad virtual, juegos de simulación basados en un laboratorio de química, robots basados en lego para manejo de sustancias en experimentos de química, rastreadores de movimientos oculares, análisis de aprendizaje para evaluar el grado de participación de los estudiantes en el aprendizaje en línea en materias de química, la evaluación del aprovechamiento académico por el uso de plataformas digitales específicas para la química, evaluación desde la óptica del alumno y el docente para el empleo de RV y RA en la enseñanza de la química, implementación y evaluación de un laboratorio virtual multimodal, experimentos de química bajo el concepto de realidad mixta (Chiu, 2021).

Por lo que respecta a las implicaciones pedagógicas Chiu (2021) coincide con otros autores al aseverar que: El uso de tecnologías emergentes en esta era digital ha generado beneficios sustanciales en la enseñanza y el aprendizaje de la química. Sin embargo, la mera adopción de tecnología en la educación química no es suficiente para una educación química exitosa (p. 21).

El vertiginoso avance de las TIC's en este siglo XXI ha generado nuevos esquemas sociales, culturales, económicos, educativos ya que estas herramientas se emplean en casi cualquier ámbito y el sector educativo no ha sido la excepción, actualmente ya es difícil definir el tipo de modelo educativo apoyado en las TIC's, ya que en las diferentes modalidades desde la presencial hasta la netamente en línea se emplean estas herramientas y se siguen organizando y mezclando.

El sector educativo no puede ser la excepción, por lo que esta herramienta tecnológica se presenta en un primer plano, sin embargo, se ha establecido una diferencia entre lo que se considera la tecnología y el constructo educativo, por lo que es necesario definir lo que se entiende por TIC's y TAC's.

Las TIC son un término plural que agrupa un amplio espectro de tecnologías (audiovisuales, de telecomunicaciones e informáticas) relacionadas con el procesamiento, elaboración, almacenamiento y difusión de información a través de redes informáticas.

Las TAC son los procesos mediante los que el individuo logra a través de un proceso formativo adquirir el conocimiento, es decir estas se presentan cuando las TIC se orientan a usos formativos, tanto para el alumno como el docente, con el objetivo de aprender más y mejor (López, 2023).

Las herramientas digitales TIC's ofrecen grandes oportunidades para lograr un entorno que permita explotar esta herramienta y generar condiciones en la sociedad que permitan un crecimiento y mejor calidad de vida, sin embargo, los actores tienen el reto de establecer las acciones necesarias para solventar las dificultades que se presentan para la implementación de las TIC's y TAC's en el proceso educativo.

PARTE EXPERIMENTAL

Tipo de investigación

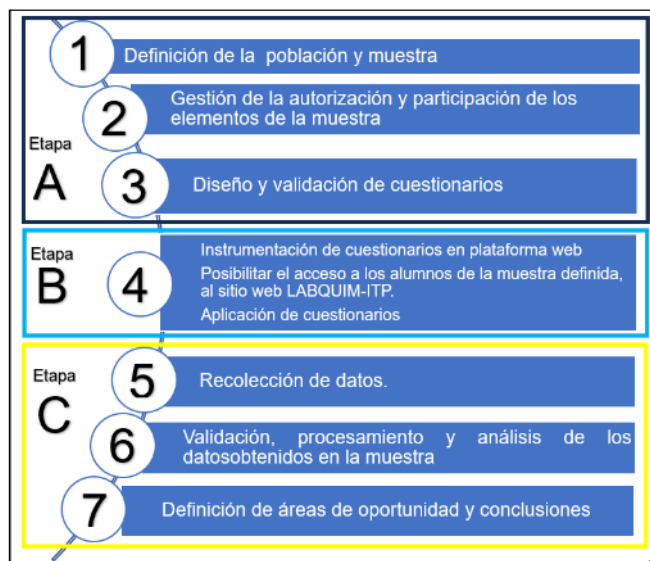
El proyecto que se presenta se desarrolla bajo un enfoque cuantitativo debido a que utiliza la recopilación de los datos para contrastar la hipótesis planteada con base a la medición estadística y el análisis numérico, con la finalidad de establecer el comportamiento de las variables de la investigación, asimismo, por sus características queda definido como una investigación: *No experimental, transeccional, explicativa y correlacional*.

Procedimiento

Las actividades se desarrollarán principalmente de manera secuencial, aunque algunas de ellas por su naturaleza pueden efectuarse de manera paralela, la figura 2 presenta de forma esquemática los trabajos a realizarse para la gestión de la información, la obtención de la misma, su análisis y conclusiones, a fin de lograr los objetivos planteados en este trabajo, se establecen tres etapas:

La etapa A se refiere a la definición de los trabajos, los elementos participantes y la gestión administrativa y técnica para el desarrollo de los mismos; la etapa marcada como B se distingue por la aplicación de los instrumentos de medición, corresponde a los denominados trabajos de campo para que los diferentes instrumentos estén disponibles para los sujetos seleccionados y adecuados y así poder obtener la información necesaria y suficiente de acuerdo a lo establecido en el proyecto; la etapa C considera el desarrollo de los trabajos de gabinete, que en este caso es el acopio de información, su validación y análisis que permita obtener información relevante para la toma de decisiones.

Figura 2



Definición de la Población y muestra.

Se considera una población de 750 alumnos inscritos en primer semestre de ingeniería que corresponden a Ingeniería Industrial, Ingeniería Mecánica, Ingeniería Eléctrica-Electrónica y Gestión Empresarial, para realizar el acopio de la información se considera el semestre agosto a diciembre de 2023.

Se toma una muestra de 3 grupos de alumnos que empleen los auxiliares didácticos de TIC's para la evaluación del rendimiento académico en las prácticas de química. Por lo que corresponde a la evaluación del aprovechamiento escolar en la materia de química se realiza el comparativo global

en 6 grupos considerando los tres grupos evaluados en el aprovechamiento de las prácticas de química con los apoyos didácticos de TIC's y 3 grupos en donde no se implementó su uso.

Gestión de la autorización y participación de los elementos de la muestra.

Dado el interés de la jefatura del departamento de ciencias básicas para la realización de esta investigación se considera que no existen interferencias para la consecución de la información y para la realización de este, por lo que una vez definida la muestra, con el apoyo de la jefatura de ciencias básicas se gestiona la información y participación de los grupos.

Diseño y validación de cuestionarios.

Se emplean las técnicas de diseño de cuestionario, con la finalidad de identificar el nivel de apropiación de conocimientos en el periodo de realización de las prácticas de laboratorio. El instrumento de evaluación una vez diseñado se valida por tres pares docentes del área de química.

Se propone cada uno de los cuestionarios de prácticas de laboratorio de química los que se constituyen por los datos de identificación de los alumnos y un promedio de cinco preguntas de teoría y práctica de química tocando los temas marcados en el programa, que van desde seguridad e higiene y uso de materiales, hasta reacciones inorgánicas.

Las interrogantes varían en su forma ya que para no hacerlo tedioso al alumno y así mismo para verificar en algunos casos más de un concepto, se estructuran los cuestionarios con preguntas de verdadero y falso, opción múltiple, correlación de conceptos e identificación de elementos, el tiempo estimado para su llenado es de 30 minutos, aunque se otorga un tiempo de 60 minutos al alumno. El cuestionario para la evaluación de las prácticas se diseña para ser contestado en línea utilizando Google Forms.

Aplicación de instrumentos de medición

Para la etapa B, la respuesta a los cuestionarios se realiza en línea, para lo cual se realizarán las siguientes actividades:

Se instrumentan en plataforma WEB (Google Form) los reactivos que corresponden a cada práctica, estableciendo una conexión con el sitio web LABQUIM-ITP, para que se tenga un apartado específico para aplicación de los cuestionarios.

- Se posibilita el acceso a los alumnos de la muestra definida, con las ligas de enlace al sitio web LABQUIM-ITP.
- Se avisa a los alumnos en las diferentes fechas para que contesten los cuestionarios que correspondan según el avance del curso.
- Se supervisa que los grupos piloto vayan contestando los diferentes cuestionarios, a fin de garantizar los elementos mínimos establecidos en la muestra.

Recolección de datos

Los registros de las respuestas a los cuestionarios, así como los correspondientes a las calificaciones una vez terminado el curso serán los insumos para el desarrollo de la etapa C del proyecto; los primeros se tiene control sobre la base de datos al ser un proyecto académico operado por la coordinación de ciencias básicas y los docentes; en el caso de las calificaciones finales de las materias, la fuente de suministro será el departamento de servicios escolares del Instituto Tecnológico de Puebla, por lo que se pide el apoyo de la jefatura de ciencias básicas para solicitar y tener acceso a esta información.

Método de análisis de datos

Se realiza el registro y la organización de los datos en el programa Microsoft Excel y las gráficas pertinentes y necesarias, para un mejor tratamiento y análisis de estos. Una vez ordenados los datos, se exportan al software MINITAB, para que mediante esta herramienta se realice el tratamiento

estadístico de los mismos, además del análisis de cada variable de acuerdo con cada uno de los objetivos planteados dentro de la investigación.

Se evalúa el rendimiento académico de los alumnos a través de los cuestionarios en línea de las prácticas de laboratorio, por lo que se toman datos de tres grupos diferentes de alumnos que emplearon los materiales de TIC's como auxiliar didáctico y se analizan las medidas de tendencia central, dispersión y aplicación de la técnica de ANOVA.

El análisis de ANOVA para evaluar los conocimientos de alumnos en las prácticas y saber si el planteamiento de hipótesis es significativo, se aplica con diseño de una vía (ecuaciones 1, 2, 3, 4 y 5) y análisis de correlación basado en la regresión lineal, que de acuerdo con Lind, Marchal, & Wathen., (2019) cuando se estudia la relación entre dos o más variables de escala de intervalo (o de razón) es usual comenzar con un diagrama de dispersión y predecir el supuesto de normalidad de los datos.

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^{n_j} n_j \bar{X}_j}{n} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$S^2 = \frac{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (X_{ij} - \bar{X})^2}{n - 1} \quad \text{Ecuación 2}$$

$\bar{X}$ = Media Global

S^2 = Varianza Global

$$SCT = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} X_{ij}^2 - \frac{(\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} X_{ij})^2}{n} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$SCE = \sum_{j=1}^k \frac{\sum_{i=1}^{n_j} X_{ij}^2}{n_j} - \frac{(\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} X_{ij})^2}{n} \quad \text{Ecuación 4}$$

$$SCD = SCT - SCE \quad \text{Ecuación 5}$$

SCT = Suma de cuadrados totales

SCE = Suma de cuadrados entre las muestras

SCD = Suma de cuadrados dentro de la muestra

Este procedimiento proporciona una representación visual de la relación entre las variables. El siguiente paso es calcular el coeficiente de correlación, que brinda una medida cuantitativa de la fuerza de la relación entre las variables (Devore, 2014). Y por medio de prueba t (ecuación 6) y análisis de ANOVA corroborar la relación de estas, considerando un intervalo de confianza del 95%.

$$t = \frac{\bar{X} - \mu_0}{\frac{S_X}{\sqrt{n}}} \quad \text{Ecuación 6}$$

$\bar{X}$ = Media Muestral

μ_0 = Media Poblacional

S_X = Desviación estándar muestral

n = Número de elementos en la muestra

RESULTADOS

Conocimientos en las prácticas de química y química.

En la Tabla 1 se reportan los datos (docente, licenciatura y número de alumnos) de los grupos considerados en el proyecto, se reserva la identidad de los docentes involucrados, por lo que solo se identifican con siglas y número.

Tabla 1

Docentes que no emplearon la herramienta de TIC's como auxiliar didáctico		
Docente	Licenciatura	No. de alumnos
M1G	Ingeniería en Gestión empresarial	22
M2M	Ingeniería Mecánica	31

OI	Ingeniería Industrial	34
Docentes que emplearon la herramienta de TIC's como auxiliar didáctico		
VI	Ingeniería Industrial	49
AI	Ingeniería Industrial	56
EM	Ingeniería Mecánica	21

Relación de docentes seleccionados para la evaluación y análisis

Los parámetros estadísticos de la evaluación de prácticas se reportan en la Tabla 2, en ella se puede determinar que el rango de valores de calificaciones considerando el total de grupos y prácticas es de 88.9 unidades y la práctica con mayor amplitud de rango corresponde a la cuatro.

EL promedio general de aprovechamiento en las prácticas de laboratorio fue de 59.5, la práctica con el valor promedio de calificaciones más bajo considerando los tres grupos fue la cuatro sería la de menor valor en la evaluación con 51.7 y que corresponde al tema de radiaciones y espectros.

El promedio por grupo considerando las cuatro prácticas evaluadas fue de 67.43 para el grupo VI, de 57.15 para el grupo AI y de 54 para el grupo EM, lo que indica un mejor aprovechamiento global en los grupos de Ingeniería industrial que el grupo correspondiente a mecánica y así mismo la práctica y grupo con el menor desempeño fue la práctica cuatro con una evaluación de 44.4.

Tabla 2

Resumen de parámetros estadísticos descriptivos por práctica y docente semestre AG – DIC 2023

Parámetro	P3			P4			P5			P6		
	P3 VI	P3 AI	P3 EM	P4 VI	P4 AI	P4 EM	P5 VI	P5 AI	P5 EM	P6 VI	P6 AI	P6 EM
Media	78.6	68.8	54.8	62.8	48.0	44.4	58.9	57.3	63.5	69.4	54.5	53.3
Mediana	83.3	66.7	50.0	66.7	44.4	44.4	60.0	60.0	80.0	73.3	53.3	53.3
Moda	83.3	66.7	66.7	66.7	55.6	44.4	60.0	80.0	80.0	73.3	40.0	53.3
D.estándar	17.0	19.3	15.9	22.2	20.1	14.9	19.4	19.8	20.3	12.1	15.8	13.3
Varianza	289.4	370.9	254.0	491.0	402.9	222.2	376.6	392.2	411.8	147.3	249.1	177.8
Rango	66.7	66.7	50.0	77.8	66.7	55.6	80.0	60.0	60.0	53.3	60.0	46.7
Valor mínimo	33.3	33.3	33.3	22.2	22.2	11.1	20.0	20.0	20.0	33.3	26.7	33.3
Valor máximo	100.0	100.0	83.3	100.0	88.9	66.7	100.0	80.0	80.0	86.7	86.7	80.0
Suma	3850.0	3783.3	1150.0	2511.1	1344.4	933.3	2180.0	1260.0	1080.0	3193.3	1253.3	1066.7
Cuenta	49.0	55.0	21.0	40.0	28.0	21.0	37.0	22.0	17.0	46.0	23.0	20.0

En las Figuras 3, 4, 5 y 6, se muestra el comportamiento de las medias de cuatro prácticas evaluadas donde se puede visualizar de forma gráfica lo descrito en los párrafos anteriores, donde se resalta el comportamiento de los resultados en la práctica número cuatro y el grupo de mecánica.

Figura 3

Diagrama de caja del comportamiento de las medias de los tres grupos, práctica tres

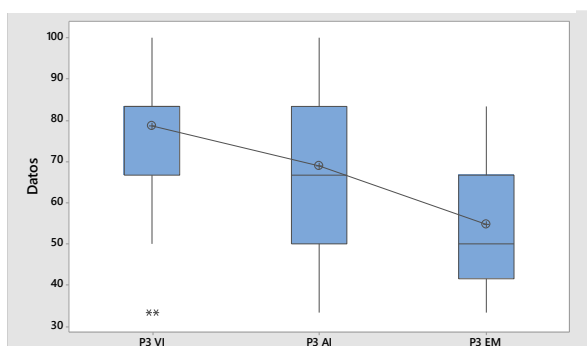


Figura 4

Diagrama de caja del comportamiento de las medias de los tres grupos, práctica cuatro

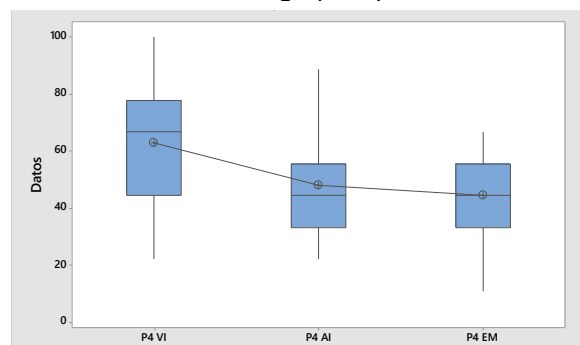


Figura 5

Diagrama de caja del comportamiento de las medias de los tres grupos, práctica cinco.

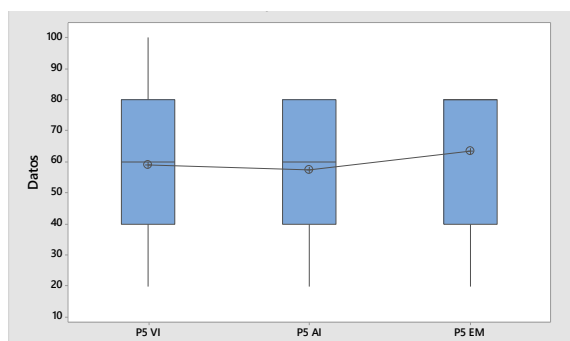
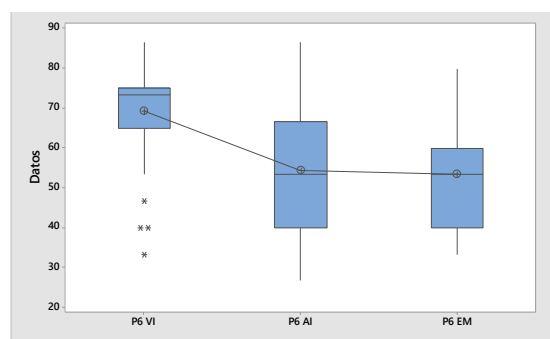


Figura 6

Diagrama de caja del comportamiento de las medias de los tres grupos, práctica seis



Los

Los

Los cálculos de los parámetros estadísticos descriptivos permiten conocer cuáles son los valores dentro de los que se desarrolla el desempeño de los alumnos en las cuatro prácticas seleccionadas, dejando ver la complejidad que representa la práctica número cuatro en general para las carreras analizadas y en especial el desempeño de los alumnos de la carrera de ingeniería mecánica.

Para la aplicación de la técnica del ANOVA se plantea como hipótesis que las medias de aprovechamiento escolar en las prácticas de química son iguales, se presentan en la Tabla 3 los resultados de la corrida para la práctica 4, y en las figuras 7,8,9,10 la representación gráfica de las prácticas 3, 4, 5 y 6.

Los datos de la Tabla 3 corresponden al comportamiento de la comparación de medias bajo el análisis de ANOVA de un factor con un valor de $\alpha=0.05$ (valor de significancia) y la prueba LSD con un intervalo de confianza del 95%, se observa bajo la hipótesis nula H_0 de que todas las medias son iguales en el experimento planteado, donde la variable en cuestión es el rendimiento académico de los alumnos en la práctica cuatro del curso de química.

Tabla 3
Resultados del análisis ANOVA de un factor para práctica número cuatro

INFORMACIÓN DEL FACTOR								
FACTOR	3 VI, AI, EM							
ANÁLISIS DE VARIANZA								
FUENTE	GL	SC SEC	CONTRIB	SC AJUST.	MC AJUST.	VALOR F	VALOR P	
FACTOR	2	5999	14.82%	5999	2999.4	7.48	0.001	
ERROR	86	34470	85.18%	34470	400.8			
TOTAL	88	40469	100.00%					
MEDIAS								
FACTOR	N	MEDIA	DESV. EST.	IC DE 95%				
P4 VI	40	62.78	22.16	(56.48, 69.07)				
P4 AI	28	48.02	20.07	(40.49, 55.54)				
P4 EM	21	44.44	14.91	(35.76, 53.13)				
COMPARACIONES EN PAREJAS DE FISHER								
Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%								

Figura 7
Análisis ANOVA de un factor para evaluación de conocimientos de la práctica tres

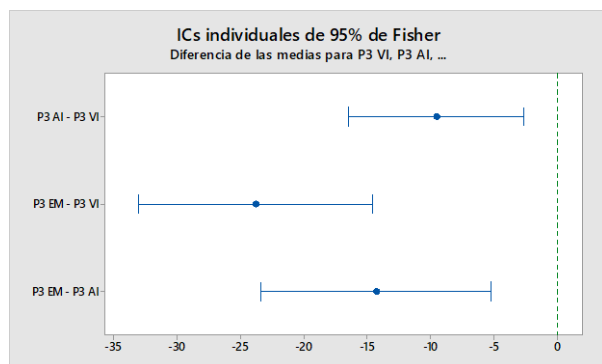


Figura 8
Análisis ANOVA de un factor para evaluación de conocimientos de la práctica cuatro

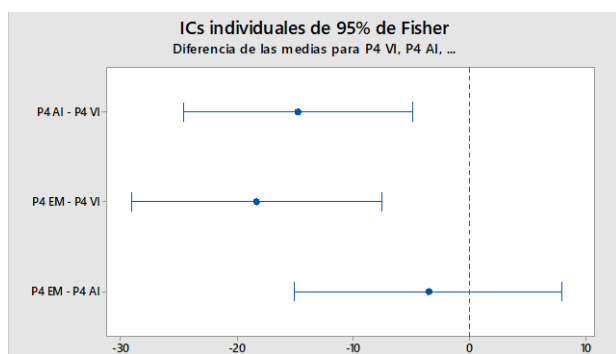


Figura 9
Análisis ANOVA de un factor para evaluación de conocimientos de la práctica cinco

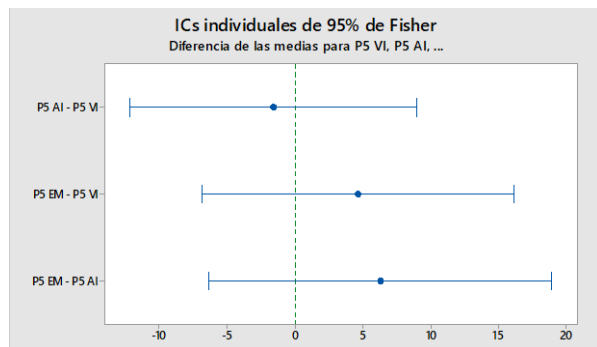
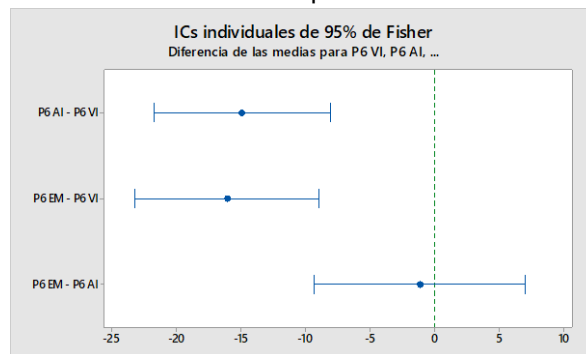


Figura 10
Análisis ANOVA de un factor para evaluación de conocimientos de la práctica seis



Nota: Si un intervalo no contiene cero, las medias correspondientes son significativamente diferentes.

Desempeño académico en la materia de química de grupos que emplean TIC's como herramienta didáctica y grupos que no la emplean.

Los registros de las calificaciones obtenidas por los alumnos en el curso de química en el periodo agosto-diciembre de 2023, corresponden a los seis grupos tomados como muestra para el análisis, donde tres de ellos no emplearon las herramientas de didácticas de TIC's para las prácticas del curso y tres si lo utilizaron.

Los grupos variaron en el número de alumnos, el de menor cantidad correspondió a la carrera de ingeniería mecánica con 22 y el de mayor número de alumnos fue de 34 alumnos, para el análisis de los datos se presenta en la Tabla 4 los resultados de los cálculos de los parámetros de la estadística descriptiva, para este caso el total de alumnos evaluados fue de 168, donde 81 de ellos estuvieron inscritos en grupos de química donde se empleó como apoyo didáctico la herramienta de TIC's en las prácticas de la materia, y el resto (87 alumnos) en grupos que no emplearon la herramienta de TIC's.

El rango que se presenta es muy amplio ya que varía desde cero hasta cien unidades, con una desviación estándar por arriba de 25 en todos los grupos, lo que indica una dispersión muy amplia.

El valor promedio de calificaciones más alto de la serie de datos se presentó en el grupo OI ubicado en los que emplean TIC's con un valor de 64.4, seguido del grupo VI con un valor de 63.1, correspondiente a los que no usaron TIC's.

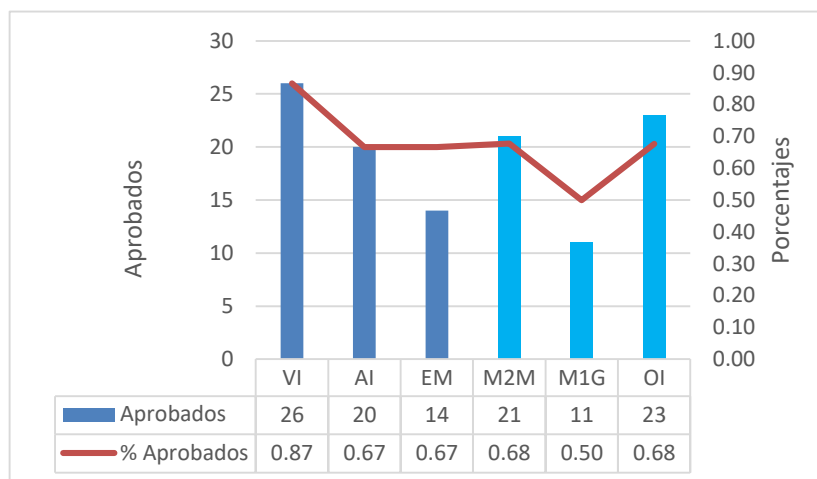
Tabla 4

Resumen de parámetros estadísticos descriptivos materia de química en grupos muestra semestre agosto – diciembre 2023

Tipo	Grupos con uso de TIC's			Grupos sin uso de TIC's		
Parámetro	VI	AI	EM	M2M	M1G	OI
Media	63.1	48.9	56.7	57.1	36.1	64.4
Mediana	70.0	70.0	82.0	70.0	35.0	80.0
Moda	70.0	70.0	0.0	0.0	0.0	80.0
Desviación estándar	25.8	35.4	41.5	41.0	37.1	34.0
Varianza	664.9	1252.0	1719.1	1680.0	1376.0	1152.7
Rango	94.0	86.0	98.0	98.0	80.0	100.0
Valor mínimo	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Valor máximo	94.0	86.0	98.0	98.0	80.0	100.0
Suma	1894.0	1467.0	1191.0	1771.0	795.0	2190.0
Cuenta	30.0	30.0	21.0	31.0	22.0	34.0
Aprobados	26	20	14	21	11	23
% aprobados	0.87	0.67	0.67	0.68	0.50	0.68

De los datos trabajados se puede resaltar que el promedio general de calificaciones fue de 54.40, el total de aprobados fue de 115, donde 60 de ellos correspondieron a los grupos que emplearon TIC's y 55 a los que no lo emplearon, el grupo que presentó menor porcentaje de aprobación se ubicó en aquellos que no emplearon la herramienta de TIC's con el 50% de aprobados y el de mayor aprovechamiento se ubicó en donde se emplearon las TIC's obteniendo un 87% de aprobación (ver Figura 11).

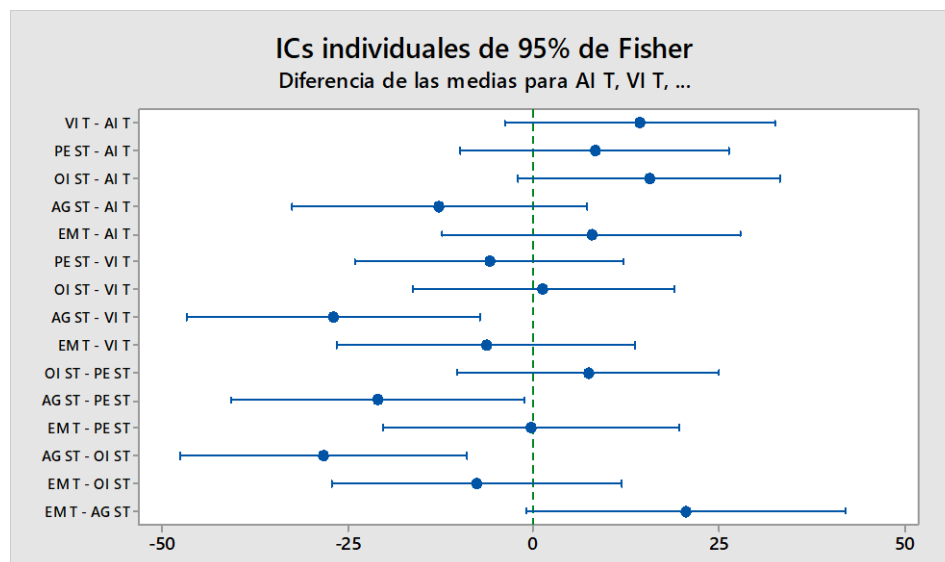
Figura 11
Número de aprobados y porcentaje de aprobados por grupo



El comportamiento de la comparación de medias de los resultados de los alumnos en la materia de química en grupos que emplearon TIC's y grupos que no, se observa del análisis de ANOVA de un factor con un valor de $\alpha=0.05$ (valor de significancia) y la prueba LSD con un intervalo de confianza del 95%, se observa bajo la hipótesis nula H_0 de que todas las medias son iguales en el experimento planteado, donde la variable en cuestión es el rendimiento académico de los alumnos en la materia de química.

Los resultados muestran un valor de p aproximadamente igual a 0.05, lo que indica que se cuenta con suficiente información para aceptar la hipótesis nula, es decir se puede dar por válido que las medias no son significativamente diferentes, lo que se puede observar en la Figura 12, donde la mayoría de las relaciones o comparaciones de medias entre grupos incluyen el valor de cero en su intervalo de confianza.

Figura 12
Análisis ANOVA de un factor para evaluación de conocimientos del curso de química



CONCLUSIONES

El análisis estadístico realizado permiten concluir que la práctica cuatro es la de menor calificación en promedio influyendo de manera importante en el promedio general, y por otra parte es la práctica que en el análisis ANOVA presenta diferencias significativas entre los grupos, por lo que se concluye que la falta de antecedentes académicos en esta y otras áreas del conocimiento como las matemáticas, así como el desempeño académico de los alumnos y docente en el devenir del curso aporta de manera significativa a los resultados en el aprovechamiento académico del curso.

Existe una mejora al evaluar el desempeño académico entre grupos que utilizaron TIC's y los que no, ya que el mayor porcentaje ponderado de alumnos aprobados se presentó en uno de los grupos que utilizó la herramienta, donde se alcanzó un 87% de aprobación siendo el más alto, con un promedio de calificaciones de (63.13) solo un punto porcentual debajo del mejor promedio grupal, pero con una desviación estándar mucho menor (el más bajo de la colección), lo que indica una mayor uniformidad en el desempeño de los alumnos, así mismo el promedio ponderado grupal de aprobación en los que emplearon TIC's se ubicó 12 puntos porcentuales arriba de los que no la emplearon.

El desempeño académico de los alumnos que emplearon las herramientas didácticas de TIC's en las prácticas de química se incrementó, aunque no de manera significativa, ya que solo se alcanzaron tres puntos porcentuales más en el promedio general de calificaciones, concluyendo que las deficiencias presentadas por los alumnos no se han logrado resarcir con el empleo de las herramientas en TIC's en la materia.

BIBLIOGRAFÍA

Aguilar, W. E., De Las Fuentes, M., Rivera, R. E., & Iñiguez-Monroy, C. G. (2018). Perfiles de estudiantes asociados a las características de reprobación de las asignaturas de ciencias básicas en ingeniería. *Boletín Redipe*, 7(8), 129-145.

Chiu, W.-K. (2021). Pedagogy of Emerging Technologies in Chemical Education during the Era of Digitalization and Artificial Intelligence: A Systematic Review. *Education Sciences*, 11. <https://eric.ed.gov/?id=EJ1321295>

Devore, J. (2014). Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias (8.a ed.). CENGAGE Learning.

INEGI. (2022). Tasa de abandono escolar por entidad federativa según nivel educativo, ciclos escolares seleccionados de 2000/2001 a 2021/2022. <https://www.inegi.org.mx/app/tabulados/interactivos/?pxq=9171df60-8e9e-4417-932e-9b80593216ee>

Kruchinina, G. A., Tararina, L. I., Sokolova, E. E., Limarova, E. V., Muskhanova, I. V., Arsaliyev, S. M., Bazayeva, F. U., & Tagirova, N. P. (2016). Information and Communication Technologies in Education as a Factor of Students Motivation. 6.

López, J. V. L. (2023). LAS TIC, TAC, TEP, TRIC EN LAS SITUACIONES DE APRENDIZAJE. *Supervisión* 21, 68(68), Article 68. <https://doi.org/10.52149/Sp21/68.13>

Torres-Zapata, Á. E., Domínguez, J. R., Flores, P., Reyes, M. del P. G., & Trejo, D. A. C. (2020). Reprobación, síntoma de deserción escolar en licenciatura en Nutrición de la Universidad Autónoma del Carmen. *RIDE Revista Iberoamericana para la Investigación y el Desarrollo Educativo*, 10(20), Article 20. <https://doi.org/10.23913/ride.v10i20.60>

PROTEÍNAS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* QUE PARTICIPAN EN LA CAPTACIÓN Y SON REGULADAS POR HIERRO. ANÁLISIS *IN SILICO*

Marco Antonio González-López*¹, Elena Marcia Gutiérrez Cárdenas¹, Edubiel Arturo Alpizar Sosa²

¹ Departamento Atención a la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Xochimilco.

² Biosciences department, Durham University. England.

*marconyqfb@yahoo.com.mx

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa, es una bacteria Gram negativa, aerobia y móvil, se distingue como un patógeno oportunista intrahospitalario, especialmente en pacientes con trastornos respiratorios y enfermedades crónicas, pudiendo incluso llegar a invadir el torrente sanguíneo, lo que conlleva un riesgo mortal. Requiere hierro para su supervivencia, pero dado que este micronutriente es escaso en el organismo humano, la bacteria desarrolla factores de virulencia que le permiten obtenerlo, como la capacidad de invadir y lisar células sanguíneas que contienen proteínas con la mayor carga de hierro, como la hemoglobina.

P. aeruginosa posee proteínas de membrana que facilitan la captación de hierro, documentándose dos de ellas (HasR y PhuR), por lo que se presume la existencia de más proteínas con esta capacidad. Ante esta suposición, se llevó a cabo una investigación *in silico* con el objetivo de localizar proteínas de *P. aeruginosa* con la capacidad de unir hierro. Inicialmente, se realizó una búsqueda en el servidor de secuencias del proteoma de *P. aeruginosa* en <https://www.uniprot.org>, utilizando como referencia la proteína ChuA de *E. coli*, conocida por su capacidad para unir proteínas con hierro, seguido de un enfoque en la búsqueda de secuencias motivo necesarias para la unión de grupos hemo (FRAP y NPNL) en <https://www.genome.jp/>.

Durante este proceso, se identificaron 47 secuencias en el proteoma de *P. aeruginosa* con características propias de proteínas captadoras de grupos hemo. Sin embargo, solo el 19.1% conservaba los motivos FRAP y NPNL, aunque todas mantenían la caja *TonB Box*, esencial para la funcionalidad de estas proteínas al captar y transportar los grupos hemo al citoplasma bacteriano. Además, se determinó, mediante la búsqueda de la caja *Fur Box*, que estas proteínas podrían estar reguladas por hierro.

Estos hallazgos sugieren la capacidad de *P. aeruginosa* para aprovechar el hierro presente en los grupos hemo, lo que abre la posibilidad de utilizar estas proteínas como blancos terapéuticos potenciales. La inhibición de estas proteínas podría llevar a la muerte bacteriana al privarla de este micronutriente esencial para sus funciones metabólicas.

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) es una bacteria bacilo Gram negativa relacionada con enfermedades oportunistas nosocomiales

Esta bacteria patógena requiere de hierro para realizar sus procesos metabólicos y poder sobrevivir. Sin embargo, este metal en el humano se encuentra secuestrado o almacenado en diferentes proteínas como la hemoglobina, por ello *P. aeruginosa* ha generado estrategias para obtenerlo, como los sideróforos y hemóforos. Además, utiliza diferentes proteínas localizadas a nivel de membrana que tienen la capacidad de unir grupos hemo (Cornelis, P., & Dingemans, J. 2013).

El hierro es un micronutriente vital para todo organismo como las bacterias, funciona como catalizador y acarreador de electrones para la síntesis de ATP, transporte de oxígeno. Sin embargo, el hierro puede ser fuente de especies reactivas de oxígeno que pueden generar daño a macromoléculas por ello este se almacena en el humano en proteínas como la transferrina, lactoferrina y hemoglobina (Krewulak, 2008)

Con respecto a los grupos hemo estos se localizan en las proteínas humanas como la hemoglobina hemoglobina-haptoglobina hemo-albumina hemo-hemopexina y mioglobina, las bacterias pueden tomar este hierro a través de proteínas de membrana que son dependientes de energía, por lo que también se les conoce como proteínas TonB dependientes (Cornelis P. et al 2010)

Hasta ahora en *P. aeruginosa* se han documentado la presencia de tres proteínas con la capacidad de unir grupos hemo, estas son: PhuR, HasR y Hxu (Yang, F et al 2022, Otero-Asman, J. R 2019)

Sin embargo, creemos que, *P. aeruginosa* por sus condiciones de crecimiento, la competencia por el hierro que tiene contra otras bacterias y la escasa cantidad de hierro libre por hallarse almacenado y por lo tanto no disponible para su uso. *P. aeruginosa*, podría contar con más proteínas capaces de obtener y sustraer el hierro a partir de proteínas que contengan grupos hemo como la hemoglobina, que le permiten su sobrevivencia como un patógeno y generar daño a nivel celular (Wooldridge et al 1993). Por lo que nuestro objetivo fue analizar el proteoma de *P. aeruginosa* para localizar proteínas con la capacidad de unir grupos hemo

PARTE EXPERIMENTAL

Se utilizó la secuencia Chua de *E. coli* y FrpB2 de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) como base para realizar la búsqueda de secuencias similares en la base de datos **Expasy blast** (<https://www.uniprot.org/blast/>) y la secuencia HasR de *P. aeruginosa* como control. La búsqueda se restringió al taxon de *P. aeruginosa*

Las secuencias obtenidas fueron analizadas para encontrar los **motivos** FRAP y NPNL lo cuales son esenciales para que estas proteínas puedan unir grupos hemo esto realizó en la plataforma **Clustal omega** (<https://www.ebi.ac.uk/dispatcher/msa/clustalo>)

Además, las secuencias fueron analizadas en el servidor <https://www.genome.jp/tools/motif/> para determinar si las mismas pertenecen a la familia de **proteínas TonB** que proporciona la energía protón motriz

Se usó el servidor **HemoQuest** (<http://131.220.139.55/SeqDHBM/>) para determinar probables residuos involucrados en la unión del grupo hemo

El servidor **ProFunc** también fue utilizado para localizar *heme binding sites* <https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/profunc/>

Se utilizó el servidor **Hdock** (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>) para modelar la posible interacción entre las proteínas de interés y la fracción alfa de la hemoglobina que contiene al grupo hemo

Para poder usar este sistema las proteínas deben ser modeladas en el espacio para ello se usó el servidor **Swiss model** (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)

En la base de datos **KEEG** (<https://www.genome.jp/kegg/>) se realizó la búsqueda de la secuencia consenso *FurBox* para determinar si los genes que codifican para estas proteínas son posiblemente regulados por hierro

RESULTADOS

Al realizar la búsqueda en Expasy blast de proteínas con los motivos FRAP y NPNL en el taxon de *P. aeruginosa*, encontramos que la base localizó un total de 49 secuencias. Este resultado fue similar al utilizar la secuencia Chua *E. coli* y FrpB2 de *H. pylori*. Al analizar, de manera manual las secuencias, solamente 8 de estas conservaban los motivos FRAP y NPNL o aminoácidos similares (Figura 1)

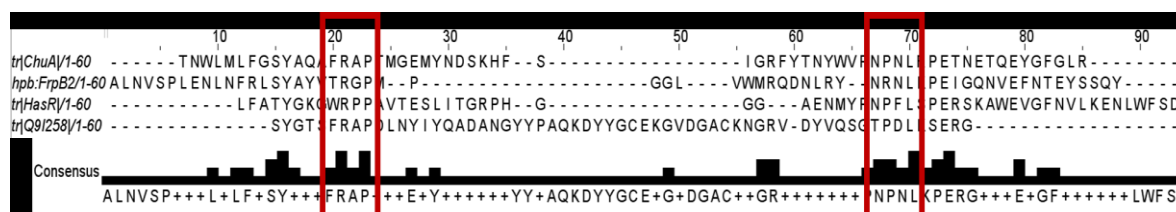


Figura 1. Alineamiento de secuencias. Se muestra un fragmento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas ChuA de *E. coli*, FrpB2 de *H. pylori*, HasR de *P. aeruginosa* y la secuencia Q91258 de *P. aeruginosa*. En el rectángulo rojo se muestran las secuencias consenso FRAP, NPNL, se puede observar que en algunos casos varían los aminoácidos presentes.

Por otro lado, se determinó que estas proteínas poseen características para ser consideradas proteínas de membrana TonB dependientes (Figura 2).

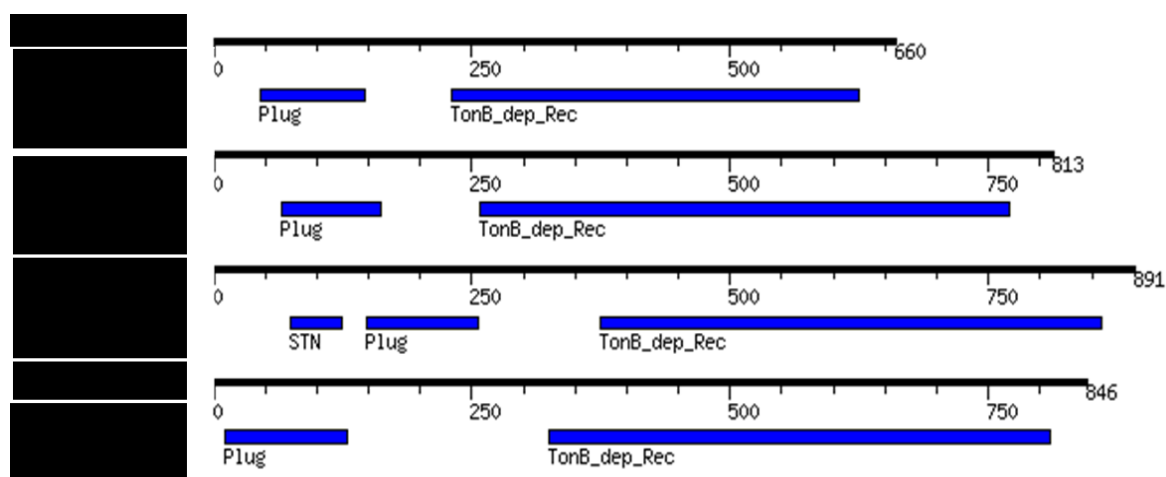


Figura 2. proteínas TonB dependientes. Se analizaron las proteínas ChuA de *E. coli*, FrpB2 de *H. pylori*, HasR de *P. aeruginosa* y la secuencia Q91258 de *P. aeruginosa*. Se puede apreciar que todas las proteínas poseen una secuencia (*TonB_dep_Rec*) por la cual se hipotetiza que para llevar a cabo su función requieren de energía, la cual es proporcionada por el sistema TonB

Al realizar el modelaje de las proteínas se puede visualizar (Figura 3) que todas las proteínas poseen los motivos FRAP y NPNL (o similares) expuestos lo que puede facilitar su interacción con los grupos hemo.

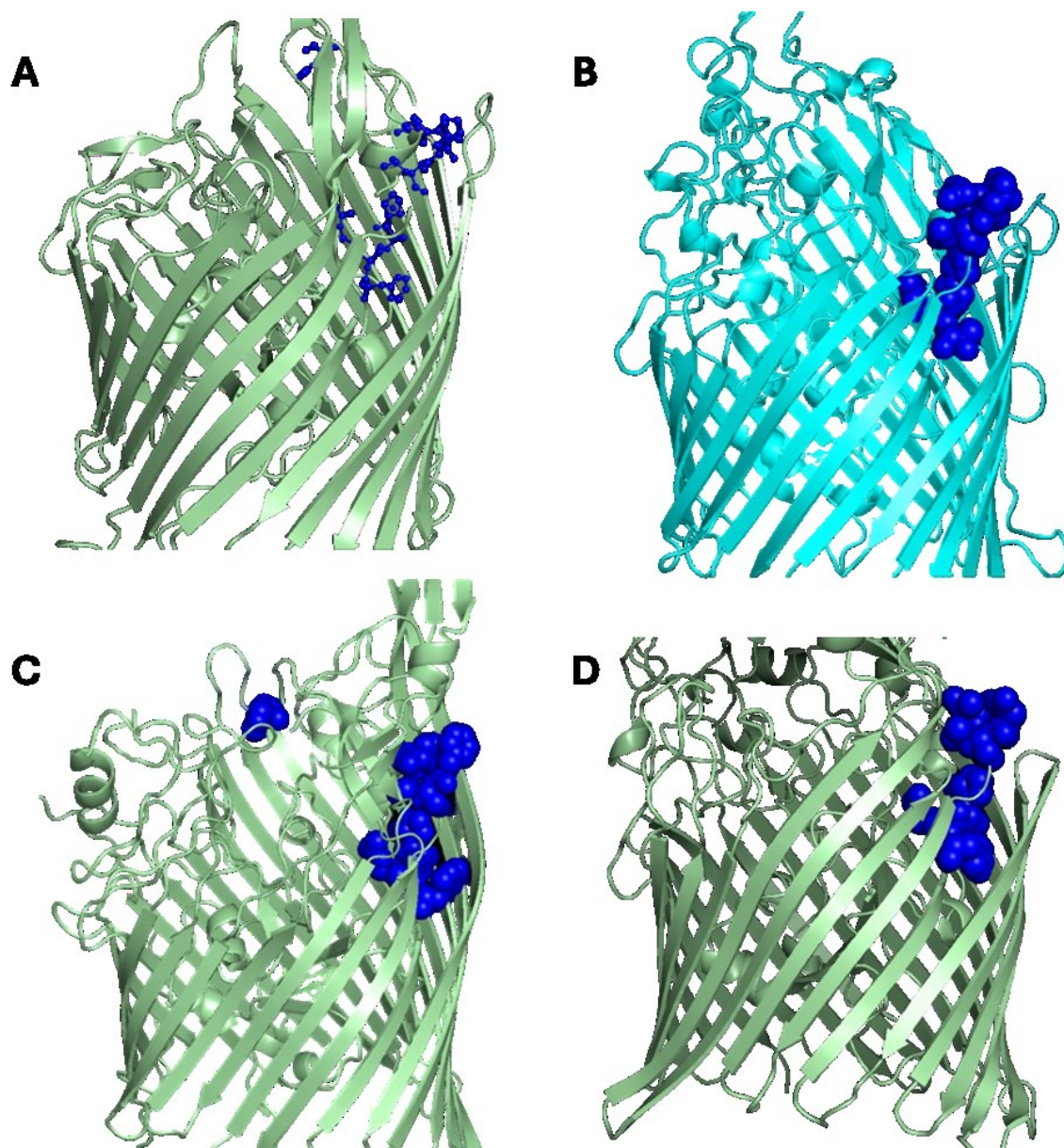


Figura 3. Modelado de proteínas. Se realizó el modelo de las proteínas (A) ChuA de *E. coli*, (B) FrpB2 de *H. pylori*, (C) HasR de *P. aeruginosa* y la secuencia (D) Q9I258 de *P. aeruginosa* donde se muestran en azul las secuencias conservadas FRAP y NPNL. se puede apreciar que en todos los casos dichas secuencias se encuentran expuestas, lo que puede facilitar su interacción con los grupos hemo.

Además, al analizar los residuos que, se ha documentado, intervienen en la unión del hierro (histidina (H)) se observa que todas las proteínas analizadas cuentan con este residuo y con base al análisis se puede determinar que podrían participar en la unión del hierro del grupo hemo y a su vez de la hemoglobina (Tabla 1)

Tabla 1. Residuos de unión al hierro. Se muestran los diferentes aminoácidos que tienen la capacidad de unir hierro del grupo hemo

ChuA				
S. No	Coord. residue	9mer motif	Net charge	Predicted K_D (μ M)
5	H596	DRSTHISS	+1	5.15
6	Y601	ISSYSKQP	+1	10.88

FrpB2				
S. No	Coord. residue	9mer motif	Net charge	Predicted K_D (μ M)
6	Y258	KINGYLSER	+1	13.97
8	H434	HTIDHKNDN	+1	10.71
10	C486	MNGRCQRNG	+2	11.68
12	C729	RPSNCPKTP	+2	10.92
13	H737	PGIFHVHKP	+3	9.55

HasR				
S. No	Coord. residue	9mer motif	Net charge	Predicted K_D (μ M)
1	H3	MKHRGWS	+3	9.51
4	H624	TGRPHGGGA	+2	15.77

Q9I258				
S. No	Coord. residue	9mer motif	Net charge	Predicted K_D (μ M)
1	H724	LVLSHDYKQ	+1	8.51

Finalmente, al analizar corriente arriba el gen de las secuencias que codifican para estas proteínas se observó que conservan el motivo *FurBox*, lo que sugiere que estas proteínas se pueden expresar dependiendo de las condiciones de hierro disponible (Figura 4), de manera interesante se observó que todas las secuencias poseen el motivo *FurBox*, excepto Q9I258, esto podría decirnos que esta proteína podría captar hierro a través de grupos hemo pero no se haya regulada por el hierro, lo cual posiblemente nos indique la que se trata de una proteína constitutiva.

```

    ||              10              20              30              40              50              60
trChuA/1-120 ATATTATCGCTCTGAATTTAAATAAATTTATTTTCGCCAGCCAC-CCCGGTATTAACCCAC
hpb:FrpB2/1-60 -TTTTTTAAGAGAAATTATTATAATAAGTAGGATTTT--AAGAATGAATG-----AC/
trHasR/1-120 -----TCCATTTGATAATTATTTGCATTAGCGTTTTCTGGCAGTACCTTGTCGCCCGGAC/
trQ9I258/1-60 -----GATAATGATAATCATTATC-----GCCGCTGGCGGCGAAAG---CGGAGCAG/
trFurBox1/1-19 -----GATAATGATAATCATTATC-----
    
```

Figura 4. Caja *FurBox*. Se observa un fragmento corriente arriba de las secuencias de los genes *ChuA* de *E. coli*, *FrpB2* de *H. pylori*, *HasR* de *P. aeruginosa* y la secuencia *Q9I258* de *P. aeruginosa* que codifican para las proteínas analizadas. En la parte de abajo se muestra la secuencia consenso de la caja *FurBox*, la cual se alinea con las secuencias de los genes analizados, excepto en el caso de la secuencia *Q9I258*.

CONCLUSIONES

El análisis *in silico* muestra que la bacteria *P. aeruginosa* cuenta con por lo menos una proteína más que tendría la capacidad de unir grupos hemo, lo cual apoyaría la idea de que, bajo las condiciones ambientales en que vive esta bacteria al infectar al ser humano, podría sobrevivir al ser capaz de obtener hierro a partir de proteínas humanas como la hemoglobina. En el caso de *Q9I258* parece ser que, a través del análisis *in silico*, no es regulada por hierro, creemos que podría tratarse de una proteína constitutiva lo cual abre la puerta a nuevos análisis para poner a prueba esta hipótesis.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Krewulak, K. D., & Vogel, H. J. (2008). Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochimica et biophysica acta*, 1778(9), 1781–1804. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.026>
2. Wooldridge, K. G., & Williams, P. H. (1993). Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 12(4), 325–348. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00026.x>
3. Schalk, I. J., & Mislin, G. L. A. (2017). Bacterial Iron Uptake Pathways: Gates for the Import of Bactericide Compounds. *Journal of medicinal chemistry*, 60(11), 4573–4576. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00554>

4. Hamad, A. S., Edward, E. A., Sheta, E., Aboushleib, H. M., & Bahey-El-Din, M. (2022). Iron Acquisition Proteins of *Pseudomonas aeruginosa* as Potential Vaccine Targets: In Silico Analysis and In Vivo Evaluation of Protective Efficacy of the Hemophore HasA. *Vaccines*, 11(1), 28. <https://doi.org/10.3390/vaccines11010028>
5. Cornelis P. (2010). Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(6), 1637–1645. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2550-2>
6. Kümmerli R. (2023). Iron acquisition strategies in pseudomonads: mechanisms, ecology, and evolution. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 36(4), 777–797. <https://doi.org/10.1007/s10534-022-00480-8>
7. Sánchez-Jiménez, A., Marcos-Torres, F. J., & Llamas, M. A. (2023). Mechanisms of iron homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa* and emerging therapeutics directed to disrupt this vital process. *Microbial biotechnology*, 16(7), 1475–1491. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14241>
8. Reinhart, A. A., & Oglesby-Sherrouse, A. G. (2016). Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence by Distinct Iron Sources. *Genes*, 7(12), 126. <https://doi.org/10.3390/genes7120126>
9. Yang, F., Zhou, Y., Chen, P., Cai, Z., Yue, Z., Jin, Y., Cheng, Z., Wu, W., Yang, L., Ha, U. H., & Bai, F. (2022). High-Level Expression of Cell-Surface Signaling System Hxu Enhances *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infection. *Infection and immunity*, 90(10), e0032922. <https://doi.org/10.1128/iai.00329-22>
10. Otero-Asman, J. R., García-García, A. I., Civantos, C., Quesada, J. M., & Llamas, M. A. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* possesses three distinct systems for sensing and using the host molecule haem. *Environmental microbiology*, 21(12), 4629–4647. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14773>
11. Ochsner, U. A., Johnson, Z., & Vasil, M. L. (2000). Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, phu and has, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, England)*, 146 (Pt 1), 185–198. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-1-185>
12. Krieg, S., Huché, F., Diederichs, K., Izadi-Pruneyre, N., Lecroisey, A., Wandersman, C., Delepelaire, P., & Welte, W. (2009). Heme uptake across the outer membrane as revealed by crystal structures of the receptor-hemophore complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(4), 1045–1050. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809406106>

PREVALENCIA Y AISLAMIENTO DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS (SARM) EN LAS FOSAS NASALES DE ESTUDIANTES DE LA FACULTAD DE QFB, UMSNH; UN ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

¹Rodrigo Díaz Balcázar ¹Judith Ayala García ¹Elvia Corona Álvarez.

¹Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
rodrigo.diaz@umich.mx

RESUMEN

El *Staphylococcus aureus*, es un patógeno frecuente que se ha convertido en una de las principales causas de infecciones en la población humana. La presencia asintomática de este microorganismo en la comunidad estudiantil plantea riesgos significativos para la salud, la capacidad de subsistir en diversos entornos ha elevado su relevancia clínica y epidemiológica. El *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), es un tipo de bacteria potencialmente peligrosa ya que el tratamiento resulta complicado por su capacidad de resistencia a algunos antibióticos. La infección comienza con el contacto directo con el patógeno ocasionando diversas afecciones que de no tratarse pudieran agravarse y en casos graves causar la muerte. El objetivo fue aislar e identificar *Staphylococcus aureus* (SARM) de las fosas nasales de los estudiantes, para determinar la prevalencia en estadios de portadores asintomáticos. La metodología es de tipo cuantitativa transversal y descriptiva, se realizó la toma de muestras de ambas fosas nasales, las muestras se transportaron al Laboratorio de Microbiología, se hizo un frote para tinción Gram, se sembraron en los medios de Gelosa Sangre y Sal-Manitol. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas, al crecimiento microbiano se le practicó una segunda tinción Gram, para su identificación se utilizaron diferentes pruebas bioquímicas convencionales y finalmente la prueba D-test. En el presente estudio se analizaron 40 muestras, en las cuales se observó un crecimiento escaso en 21 pacientes, en 13 pacientes de forma moderada y 3 de manera abundante en el medio de gelosa sangre, en relación a la beta hemólisis solo se observó en 9 muestras. 21 muestras crecieron en el medio Sal y manitol, 6 crecieron de manera abundante, 7 moderado y 8 con escaso crecimiento y todas dieron positivo a la fermentación de manitol; a estas muestras se les realizó la prueba de la coagulasa siendo positivas 13 muestras a las que posteriormente se le realizó la prueba D-test para la búsqueda intencionada de SARM, en la que en todas dieron un resultado negativo. Por lo tanto, la prevalencia de *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina (SARM) en las fosas nasales de estudiantes de la Facultad de Químico Farmacobiología es del 0%. Se concluye que, aunque la falta de resistencia a la meticilina es alentadora, la prevalencia de esta bacteria sugiere la necesidad de medidas de control continuas. Este estudio enfatiza la importancia de comprender y abordar la presencia de SARM en entornos académicos, puesto que nuestros estudiantes se han de desempeñar posteriormente en el área de salud, señalando su impacto potencial en la salud individual y comunitaria. La identificación de portadores asintomáticos y la evaluación de cepas resistentes proporcionan información valiosa para el desarrollo de estrategias preventivas, evitando la transmisión y diseminación de este tipo de patógenos.

INTRODUCCIÓN

El *Staphylococcus aureus*, es un patógeno frecuente que se ha convertido en una de las principales causas de infecciones en la población humana ⁽¹⁾. La presencia asintomática de este microorganismo en la comunidad estudiantil plantea riesgos significativos para la salud, la capacidad de subsistir en diversos entornos ha elevado su relevancia clínica y epidemiológica ⁽²⁾. El *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) ⁽³⁾, es un tipo de bacteria potencialmente peligrosa ya que el tratamiento resulta complicado por su capacidad de resistencia a algunos antibióticos ⁽⁴⁾. La infección comienza con el contacto directo con el patógeno ⁽³⁾, ocasionando diversas afecciones que de no tratarse pudieran agravarse y en casos graves causar la muerte ⁽⁵⁾.

En el ámbito académico, específicamente en la Facultad de Químico Farmacobiología, la interacción constante entre estudiantes en laboratorios, aulas y espacios compartidos podría propiciar la transmisión de SARM. La identificación de portadores asintomáticos en esta población estudiantil de

la Facultad de QFB es esencial, ya que estos individuos pueden actuar como reservorios de la bacteria, y estos al realizar su servicio social o prácticas profesionales en los hospitales tanto públicos como privados se aumenta el riesgo de contagio, especialmente en pacientes inmunocomprometidos, oncológicos o neonatos.

TEORÍA

El *Staphylococcus aureus* se encuentra ampliamente distribuidos de manera habitual en la naturaleza, se puede encontrar como microbiota normal en piel y mucosas tanto en seres humanos como en los animales, una de las características importantes que tiene es que puede sobrevivir durante largos periodos de tiempo en superficies inanimadas, objetos, ropa, secreciones purulentas y esputos desecados, son altamente resistentes a muchas condiciones adversas, a pesar de que no tiene la capacidad de formar esporas, tienen capacidad térmica de resistir temperaturas de 60° C o más, por tiempos de hasta una hora y capacidad de resistir o tolerar algunos desinfectantes comunes (1,3).

Taxonómicamente pertenece al dominio Bacteria, reino Eubacteria, filo Firmicutes, clase Bacilli, orden Bacillales, familia Staphylococcaceae, género *Staphylococcus*, especie *aureus*. Morfológicamente son células cocoides, no móviles de 0,5 a 1 µm, se disponen en racimos de uvas, Gram positivos, no forman esporas y algunas cepas poseen capsula, en gelosa sangre las colonias son cremosas, con una coloración amarillo dorado (aureus) y pueden manifestar una hemolisina del tipo beta (5).

Desde su descubrimiento en 1880 por Alexander Ogston, se ha considerado un patógeno de gran potencial para ocasionar deferentes infecciones, en particular la especie aureus es considerada como una de las más virulentas de este género, las infecciones que ocasiona van desde la piel, hasta tejidos blandos y además pueden tener o bien generar resistencia a algunos antimicrobianos (2,7). Las formas más comunes de contagio son por contacto directo con un individuo infectado, compartir un objeto contaminado o bien por inhalación de diminutas gotitas infectadas que se expulsan al toser o estornudar, en infecciones de piel o cutáneas, puede generar ámpulas, abscesos y eritemas localizados, lo complejo es que fácilmente puede pasar al torrente circulatorio generando bacteremia afectando así diferentes órganos y tejidos (5). En pacientes hospitalizados se asocia a cuadros de neumonía relacionada con la ventilación mecánica que provoca a su vez cuadros graves de endocarditis y osteomielitis (6,4).

Además de los procesos infecciosos previamente mencionados, esta bacteria es la responsable de padecimientos relacionados con toxinas que generan el síndrome de shock tóxico, manifestando de manera repentina algunos signos y síntomas como: fiebre, sarpullido parecido a quemaduras por exposición solar, en particular en manos y plantas de los pies, hipotensión, vómitos, diarrea, enrojecimiento de ojos, boca y garganta y dolores musculares, el síndrome de la piel escaldada es otro padecimiento ocasionado por otra toxina que posee este microorganismo que se caracteriza por el desprendimiento de la piel, afecta principalmente a bebés, niños de edad escolar, y personas inmuno suprimidas o inmuno comprometidas. El éxito que posee el *Staphylococcus aureus* de su patogenia se debe en gran medida a sus factores de virulencia (8).

En el marco de las infecciones intrahospitalarias *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM) representa un severo problema de salud pública de gran trascendencia económica y social, esto por la capacidad de resistencia que posee hacia los antimicrobianos (1). El estadio de portador nasal asintomático es una de las razones en la epidemiología y la patogenia de la infección. El estafilococo se caracteriza por tener un gen llamado mecA que le confiere la resistencia a meticilina pudiendo ser sensible a su vez a otros antibióticos no betalactámicos. Su virulencia esta asociada principalmente a la toxina denominada leucocidina de Panton-Valentine (PVL) la cual provoca destrucción de leucocitos y necrosis tisular; PVL es uno de los principales factores de virulencia y al mismo tiempo responsable de su elevada patogenicidad, provocando así infecciones simples en piel y tejidos blandos, hasta enfermedades graves como neumonía, sepsis, y fascitis necrosante, que ponen en riesgo la vida de quien lo padece. La aparición y diseminación de SARM se ve favorecida,

por la falta de medidas higiénicas, todo esto conlleva a una elevación en el consumo de antimicrobianos y por consiguiente la aparición de mecanismos de resistencia ⁽¹⁾.

PARTE EXPERIMENTAL

El **objetivo** fue aislar e identificar *Staphylococcus aureus* (SARM) de las fosas nasales de los estudiantes, para determinar la prevalencia en estadios de portadores asintomáticos.

La **metodología** es de tipo cuantitativa transversal y descriptiva.

Previo a la toma de muestra se les explicó a los estudiantes la finalidad del estudio, a los que decidieron participar se les solicitó leer y firmar el consentimiento informado.

Se les indicó la forma de preparación del paciente y posteriormente se realizó la toma de muestras de ambas fosas nasales, las muestras debidamente identificadas se transportaron al Laboratorio de Microbiología de QFB-UMSNH, se hizo un frote para tinción Gram, se sembraron en los medios de Gelosa Sangre y Sal-Manitol. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas, al crecimiento microbiano se le practicó una segunda tinción Gram, para su identificación se utilizaron diferentes pruebas bioquímicas convencionales y finalmente la prueba D-test.

RESULTADOS

En el presente estudio se analizaron 40 muestras, en las cuales se observó un crecimiento escaso en 21 pacientes, en 13 pacientes de forma moderada y 3 de manera abundante en el medio de gelosa sangre, en relación a la beta hemólisis solo se observó en 9 muestras. 21 muestras crecieron en el medio Sal y manitol, 6 crecieron de manera abundante, 7 moderado y 8 con escaso crecimiento y todas dieron positivo a la fermentación de manitol; a estas muestras se les realizó la prueba de la coagulasa siendo positivas 13 muestras a las que posteriormente se le realizó la prueba D-test para la búsqueda intencionada de SARM, en la que en todas dieron un resultado negativo.

Tabla 1. Crecimiento en Gelosa Sangre y Sal y manitol

Gelosa Sangre	Escasa	Moderada	Abundante
Total	21	13	3
Agar Sal y Manitol	Escasa	Moderada	Abundante
Total	8	7	6

Fuente: Elaboración propia de datos obtenidos del Laboratorio de Microbiología UMSNH.

Fig. 1 Crecimiento Bacteriano en Muestras de Gelosa Sangre.

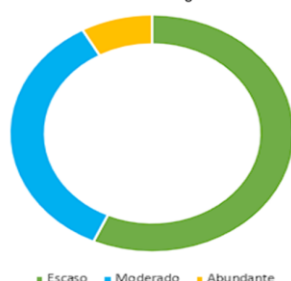
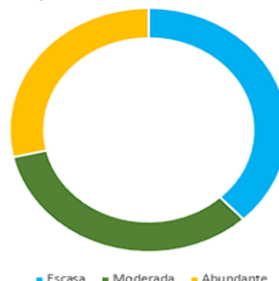


Fig. 2 Crecimiento Bacteriano en medio Sal y Manitol.

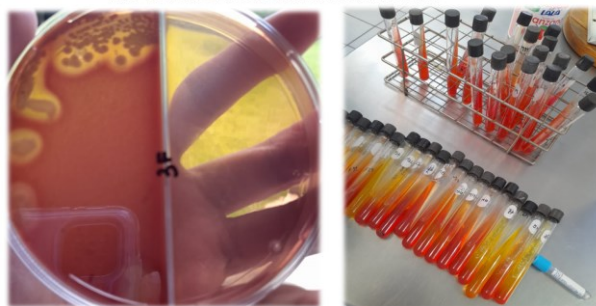


Fuente: Muestras procesadas por el Laboratorio de Microbiología QFB-UMSNH.

Otro aspecto importante en la valoración del crecimiento microbiano de las muestras es observar si en el medio agar sangre se presenta hemólisis y en relación con la beta hemólisis solo se observó

en 9 muestras (Placa de la figura 3) y en el medio de agar sal y manitol, todas fermentaron el manitol. Ver figura 3

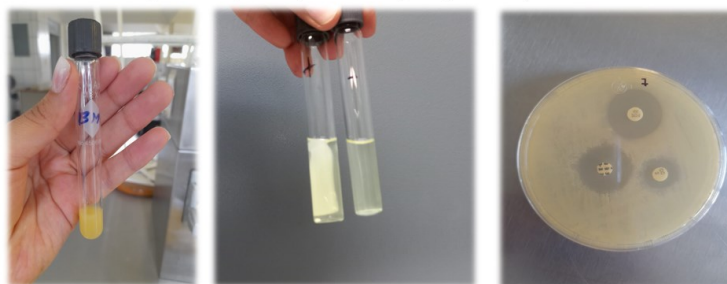
Fig.3 β -hemolisis en placa y fermentación de manitol en tubo.



Fuente: Muestras procesadas por el Laboratorio de Microbiología QFB-UMSNH.

A las 21 muestras positivas en el medio Sal y manitol se les realizó la prueba de la coagulasa, dando como resultado 13 positivas, posteriormente se realizó la prueba D-test para la búsqueda intencionada de SARM, en la que en todas arrojaron un resultado negativo. Ver figura 4

Fig.4 Las dos primeras prueba de coagulasa y la tercera prueba del D-test.



Fuente: Muestras procesadas por el Laboratorio de Microbiología QFB-UMSNH.

De todos los que participaron en el estudio se tiene que la prevalencia obtenida por la presencia de *Staphylococcus aureus* fue que 3 de cada 10 alumnos presentan en las fosas nasales al microorganismo, y una prevalencia de 0 de 10 alumnos la presencia de *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina, este último resultado es muy favorable, ya que se puede decir que si se llega aislar en las fosas nasales de los estudiantes, pero que de los *Staphylococcus aureus* que se aislaron no son cepas resistentes a meticilina.

CONCLUSIONES

Por lo tanto, la prevalencia de *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina (SARM) en las fosas nasales de estudiantes de la Facultad de Químico Farmacobiología es del 0%. Se concluye que, aunque la falta de resistencia a la meticilina es alentadora, la prevalencia de esta bacteria sugiere la necesidad de medidas de control continuas. Este estudio enfatiza la importancia de comprender y abordar la presencia de SARM en entornos académicos, puesto que nuestros estudiantes se han de desempeñar posteriormente en el área de salud, señalando su impacto potencial en la salud individual y comunitaria. La identificación de portadores asintomáticos y la evaluación de cepas resistentes proporcionan información valiosa para el desarrollo de estrategias preventivas, evitando la transmisión y diseminación de este tipo de patógenos

REFERENCIAS

1. Cervantes García E. *Staphylococcus aureus* asociado a la comunidad (CA-MRSA). Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio. 2015 Abril; 62(2): p. 100-111
2. Adame- Gómez R, Vences-Velázquez A, Parra-Rojas I, Rodríguez-Bataz E, Muñoz-Barrios S, Ramirez -Peralta A, *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM) y productores de

- enterotoxina A aislados de portadores nasales asintomáticos entre estudiantes universitarios de México. *Kasmera*. 2018 Septiembre 3; 47(1): p. 14-20.
3. Larry M. Bush MFCES. Infecciones por estafilococos. Manual MSD. 2023.
 4. Alvarado-Gamarra AG, Alcalá-Marcos KM, Alvarado-Gamarra PK, Champi Merino R. Riesgo de aparición de cepas *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina en pacientes hospitalarios. *CIMEL Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana*. 2010; 15(2): p. 59-62.
 5. Ricardo Hernández-Sarmiento, Lizeth Bustamante-Gómez, Luis Pablo Lesport-Castro, Natalia Nassar-Mendoza, Iván Méndez-Rodríguez. Prevalencia y perfil de susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente de fenotipo comunitario en jóvenes deportistas. *Revista Mexicana de Pediatría*. 2018 Jun 03; 86(1): p. 13-17.
 6. Estrella Cervantes García, Rafael García González, Paz María Salazar Schettino. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*. 2014 Jan 17;; p. 28-40.
 7. Carlos Alberto Castañón-Sánchez. Patogenia molecular de *Staphylococcus aureus*. *Evidencia Médica e Investigación en Salud*. 2012 Septiembre 3; 5(3): p. 79-84.
 8. Rebeca Vargas Olmos, Ángel Flores Gutiérrez. Frecuencia de portadores de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM) en cavidades nasales en el personal de discentes de la Escuela Militar de Medicina. *Revista de sanidad militar*. 2023 Enero; 75(1).

LA INACTIVACIÓN DEL RECEPTOR GABAÉRGICO UNC-49 ESTA INVOLUCRADA EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO EN *C. ELEGANS*

Gabriela Camargo Hernández¹, Sergio Sánchez Enriquez¹, Luis Antonio Ramírez Contreras², Leonardo Hernández Hernández³

¹Departamento de Ciencias de la Salud del Centro Universitario de los Altos de la Universidad de Guadalajara, ² Doctorado en Biociencias del Centro Universitario de los Altos de la Universidad de Guadalajara, ³Departamento de Fisiología del Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara..
gabriela.camargo@academicos.udg.mx

RESUMEN

Las investigaciones en el *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) para dilucidar la Fisiología endocrina se han centrado en estudiar los mecanismos reguladores de la respuesta al estrés. Estos mecanismos se encuentran conservados en la evolución, lo que sugiere un mecanismo hormonal común en el control del envejecimiento y el estrés. Entre estos mecanismos, la vía de señalización insulina/IGF-1 (IIS) es central en temas como la reproducción, la resistencia al estrés y la etapa de desarrollo Dauer, además de prolongar la esperanza de vida. El objetivo de este estudio fue determinar la influencia del estrés por choque térmico (HS) sobre la actividad GABAérgica en *C. elegans*. Para este propósito, probamos el efecto de la exposición a Picrotoxina (PTX), Ácido Gammaaminobutírico (GABA), Peróxido de Hidrógeno y HS sobre la aparición de una respuesta de contracción (SR) después del estímulo del toque a la nariz (Nose Touch Response) en nematodos N2 (WT). Además, se analizó el efecto de HS sobre la expresión de UNC-49 (ortólogo del receptor GABAA) en la cepa EG1653 y el efecto de la exposición a GABA y PTX sobre la expresión de HSP-16.2::GFP (proteína de respuesta a estrés en *C. elegans*) en la cepa TJ375. Los gusanos expuestos a PTX 1 mM o H₂O₂ 0,7 mM mostraron una SR en aproximadamente el 80 % de los ensayos. La exposición a GABA no provocó una SR. HS provocó la aparición de una SR al igual que la exposición a PTX 1 mM o H₂O₂ 0,7 mM. Además, HS aumentó la expresión de UNC-49 y la PTX aumentó la expresión de HSP-16.2. Por lo tanto, los resultados sugieren que el estrés oxidativo, ya sea a través de la exposición al H₂O₂ o la aplicación de un choque térmico, inactiva el sistema GABAérgico, lo que posteriormente afectaría la respuesta al estrés oxidativo, tal vez al incrementar la actividad de los factores de transcripción DAF-16 y HSF-1, ambos regulado por la vía IIS y relacionado con la expresión de HSP-16.2.

Palabras clave: Receptor GABAA UNC-49, Estrés oxidativo, HSP-16.2, Vía de señalización de insulina/IGF-1 (IIS) y *C. elegans*

INTRODUCCIÓN

El estrés es un repentino cambio ambiental que induce daño a nivel molecular, celular y del organismo entero [1]. Sin embargo, también induce una respuesta adaptativa que usualmente compensa al daño [2]. Este es un efecto benéfico del estrés que habilita al organismo para hacer frente a un estrés más severo en el futuro. Esta capacidad es llamada tolerancia al estrés. Sin embargo, si el daño supera a la adaptación, induce una declinación funcional, llamado estrés negativo [1]. Así pues, un estímulo estresante puede estar involucrado en la patofisiología básica que subyace a enfermedades específicas. En este sentido, existe evidencia que apoya la existencia de una conexión entre el estrés y las enfermedades mentales y neurodegenerativas. Gilad y Gilad [3] han sugerido un vínculo entre la intensidad de la respuesta al estrés, la velocidad de neurodegeneración dependiente de la edad, y la esperanza de vida. Se ha propuesto que una hiperactividad inherente a estresores está ligada a una vida más corta y a una acelerada neurodegeneración dependiente de la edad [4].

En concordancia con lo anterior, se han encontrado la aparición citopatológica de agregados de proteínas intracelulares y extracelulares en el cerebro de personas afectadas por diversas

enfermedades tales como: la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, la Esclerosis Amiotrófica Lateral, la corea de Huntington y otras neuropatías. Sin embargo, es cada vez más claro, que la base fisiopatológica en estas enfermedades neurodegenerativas es una mutación tóxica de ganancia de función asociada con la operación de oligómeros y otros agregados tóxicos del péptido β -amiloide, β -synucleína, superóxido dismutasa (SOD), y huntingtina, respectivamente. La manera en la cual se forman estas especies tóxicas, los procesos que determinan su persistencia o eliminación y las bases moleculares de su toxicidad son críticas para los mecanismos de estas enfermedades [5].

En el cerebro ocurren cambios moleculares, estructurales y funcionales en respuesta al estrés o durante el envejecimiento. De este modo, las neuronas pueden sucumbir a cascadas neurodegenerativas o pueden adaptarse a estos cambios, empleando mecanismos múltiples para mantener la integridad de los circuitos nerviosos, facilitando las respuestas a demandas ambientales y/o promoviendo la recuperación de la función después del daño [5]. Estos mecanismos incluyen la producción de factores neurotróficos y citoquinas; la expresión de varias proteínas que promueven la sobrevivencia celular (es decir, proteínas chaperonas, enzimas antioxidantes, Bcl-2 y proteínas inhibidoras de la apoptosis), la preservación de la integridad genómica por la telomerasa y proteínas para reparar el ADN (Ácido Desoxirribonucleico), así como la movilización de células nerviosas troncales para reemplazar a las neuronas y a las células de la glía dañadas. Las células troncales neurales que residen en el cerebro adulto son también sensibles a demandas ambientales y parecen capaces de reemplazar neuronas perdidas o disfuncionales, quizás aún en el cerebro en envejecimiento [6]. Por otro lado, existen mecanismos protectores del daño que pueden ser reforzados por la dieta (restricción calórica y suplementación con ácido fólico y antioxidantes) y por modificaciones en la conducta (actividades intelectuales y físicas). A nivel celular y molecular, la protección puede ser facilitada activando una respuesta de hormesis en la cual las neuronas incrementan la producción de factores neurotróficos y proteínas del estrés.

Hormesis

La Hormesis es un término usado por toxicólogos para referirse a la dosis respuesta bifásica a un agente ambiental, caracterizado por una estimulación o efecto benéfico a bajas dosis y un efecto inhibitorio o tóxico a altas dosis [7-9]. En los campos de la biología y de la medicina la hormesis es definida como una respuesta adaptativa de los organismos y de las células a un estrés moderado (usualmente intermitente) [7]. Los ejemplos incluyen preconditionamiento isquémico, ejercicio, restricción calórica y exposiciones a bajas dosis de ciertos fitoquímicos. Hallazgos recientes han dilucidado las vías de señalización celular y los mecanismos moleculares que median las respuestas horméticas, los cuales típicamente involucran enzimas; tales como cinasas y desacetilasas, y factores de transcripción. Como resultado, las células incrementan su producción de proteínas citoprotectoras y restaurativas, incluyendo, factores de crecimiento, enzimas de la fase 2 antioxidantes, y chaperonas proteicas. Una mejor comprensión de los mecanismos de la hormesis a nivel molecular y celular está dirigida hacia nuevos enfoques para la prevención y tratamiento de diferentes enfermedades [8, 9].

Receptores GABA y *C. elegans*

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 [10], 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 gammaaminobutirico (GABA), como ocurre en los vertebrados. Los receptores a GABA son parte del más importante sistema de neurotransmisión inhibitoria, tanto en el sistema nervioso de vertebrados como en el de invertebrados. Estos receptores ionotrópicos contienen cinco subunidades que están dispuestas alrededor de un poro central selectivo a los iones cloro. La unión del GABA causa un cambio conformacional en el receptor que abre el poro y permite el flujo de iones cloro hacia el interior de la célula, causando una hiperpolarización de la membrana, lo que resulta en la reducción de la excitabilidad celular. Los receptores GABA son de importancia médica y económica, puesto que en humanos, estos receptores son blanco terapéutico de muchos fármacos que reducen la excitabilidad neuronal. Y que son usados para tratar padecimientos como ansiedad, epilepsia, insomnio, y para producir anestesia.

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).

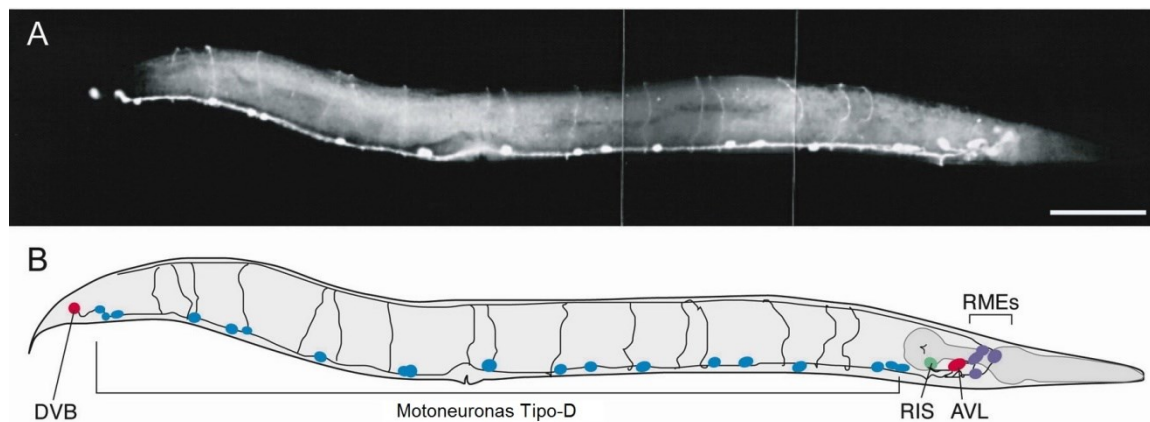


Figura 3. El sistema nervioso GABAérgico. (A) microfotografía fluorescente de un *C. elegans* hermafrodita adulto teñido con antisuero antiGABA. Se muestran las 26 neuronas teñidas para GABA. En el lado derecho de la imagen se observa la parte anterior y lado derecho del *C. elegans*. Barra escala = 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).

UNC-49: el receptor GABA_A

El sistema GABAérgico en *C. elegans* puede presentar actividad excitatoria e inhibitoria. La actividad GABAérgica inhibitoria está dada por la activación del receptor GABA_A del *C. elegans*. Estos receptores GABA_A son canales de cloro que al activarse por el GABA inhiben la actividad celular. El receptor GABA_A, que inhibe la contracción de los músculos del cuerpo del nemátodo está codificado por el gen *unc-49*. El gen *unc-49* codifica para tres distintas subunidades del receptor GABA: UNC-49A, UNC-49B y UNC-49C. Estos productos alternativos del gen corresponden a las subunidades de un canal iónico activado por ligando. La subunidad UNC-49A es casi indetectable in vivo, y no forma un heterómero con las subunidades UNC-49B o UNC-49C para formar un receptor funcional in vitro. Por otro lado, el receptor GABA en la unión neuromuscular es un heterómero compuesto de las subunidades B y C. La subunidad B se requiere para la localización del receptor en las uniones neuromusculares y la subunidad C imparte propiedades farmacológicas específicas al receptor heteromérico.

PARTE EXPERIMENTAL

Cepas de *C. elegans*

Se utilizaron las siguientes cepas: la cepa N2 (Wild type) del tipo Bristol, la cepa TJ375 [hsp-16-2::GFP(gpls1)], la cepa EG1653 oxIs22 [Punc-49:UNC-49::GFP, lin-15(+)] II, que se obtuvieron del Caenorhabditis Genetics Center (Minneapolis, MN, EUA).

Todos los experimentos fueron realizados sobre animales con la edad sincronizada. Dicha sincronización de la edad de la población de las cepas fue obtenida por la colección y el cultivo de los huevos puestos por los sujetos adultos provenientes de la fase Dauer según métodos estándar.

Métodos de Cultivo

Los stocks de las cepas de gusanos fértiles, fueron cultivados, de acuerdo a técnicas estándar, en placas de agar con medio de crecimiento estándar de nemátodo o NGM y fueron mantenidos a 20°C de acuerdo a lo descrito por Brenner. Se seleccionaron y tomaron los nemátodos con un alambre de platino estéril aplanado en su extremo a manera de paleta. La fuente de alimento usada para el mantenimiento de los nemátodos fue la cepa de *E. coli* OP50 (obtenida del Caenorhabditis Genetics Center Minneapolis, MN, EUA).

RESULTADOS

La toxicidad del estrés térmico se ha asociado con la acumulación de especies reactivas de oxígeno y por consiguiente por el estrés oxidativo, puesto que incrementa la producción y el flujo de radicales libres al desacoplar a las mitocondrias y activar enzimas que están involucradas en la generación de radicales libres. Además, se ha reportado desde hace algunos años la susceptibilidad de los receptores GABA_A a la actividad de agentes oxidantes, incluidos el receptor UNC-49 en el nematodo *C. elegans*. En todos estos casos, la oxidación induce una inhibición del receptor GABA_A.

CONCLUSIONES

1. El estrés por calor induce inactivación de la función de los receptores GABA_A en *C. elegans*.
2. La administración del fármaco antagonista del RGABA_A induce inactivación de los receptores GABA_A del nematodo *C. elegans*.
3. El choque de calor induce un incremento de la expresión de las proteínas UNC-49 en *C. elegans*.
4. El bloqueo de los receptores GABA_A provoca un incremento de la expresión de la proteína de respuesta al choque de calor HSP-16.2 en el nemátodo *C. elegans*.

BIBLIOGRAFÍA

1. C. Soti, Protein stress and stress proteins: implications in aging and disease. *J Biosci* 2007, 32(3):511-515.
2. E.J. Calabrese, The failure of dose-response models to predict low dose effects: a major challenge for biomedical, toxicological and aging research. *Biogerontology* 2006, 7(2):119-122.
3. G.M. Gilad, V.H. Gilad, Strain, stress, neurodegeneration and longevity. *Mechanisms of ageing and development* 1995, 78(2):75-83.
4. G.B. Esch T, Stefano, G.L. Fricchione, H Benson, The role of stress in neurodegenerative diseases and mental disorders. *Neuro endocrinology letters* 2002, 23(3):199-208.
5. R.I. Morimoto, Stress, aging, and neurodegenerative disease. *The New England journal of medicine* 2006, 355(21):2254-2255.

6. M.P. Mattson, S.L. Chan, W. Duan, Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet, and behavior. *Physiological reviews* 2002, 82(3):637-672.
7. Mattson MP, Hormesis defined. *Ageing Res Rev* 2008, 7(1):1-7.
8. M.A. Nascarella, E.J. Calabrese, A method to evaluate hormesis in nanoparticle dose-responses. *Dose Response* 2012, 10(3):344-354.
9. E.J. Calabrese, K.A. Bachmann, *et al*, Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007, 222(1):122-128.
10. J.E. Sulston, E. Schierenberg, J.G. White, J.N. Thomson, The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* 1983, 100(1):64-119.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE SENNA ALEXANDRINA (SEN), VALERIANA OFFICINALIS (VALERIANA), TAGETE LUCIDA (YERBANIZ) Y MENTHA PIPERITA (MENTA) SOBRE CEPAS MULTIFARMACORRESISTENTES

Fernanda Godínez Herrera¹, Catalina Rivas Morales², Catalina Leos Rivas², David Gilberto García Hernández², Angela Jaquelin Espinoza Mijangos²

¹Facultad de Ciencias Biológicas, UANL., ²Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.
Fernanda.godinezha@uanl.edu.mx

RESUMEN

Actualmente se ha reportado un incremento en los niveles de resistencia de microorganismos causantes de diversas enfermedades en el humano. Los antibióticos es el recurso más utilizado para combatir este tipo de infecciones, los cuales han generado resistencia bacteriana en tercera generación. En 2021, la Organización Mundial de la Salud (OMS) modificó la lista de patógenos prioritarios, colocando a bacterias causantes de infecciones nosocomiales como lo son *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Klebsiella pneumoniae* encabezando la lista, debido a su incremento en la resistencia superior al 50%. A su vez, la OMS en el 2017 estableció la perspectiva llamada 2030-2050, donde indica las consecuencias ocasionadas por el incremento de las cepas con farmacoresistencia, tales como: aumento en defunciones, saturación de hospitales y un receso económico a nivel mundial. Para combatir esta problemática se ha implementado el uso de plantas medicinales que contiene metabolitos secundarios bioactivos como alternativa en el tratamiento y/o coadyuvante con los fármacos convencionales. Según indicó la OMS, alrededor del 40% de los productos farmacéuticos actuales tienen una base de productos naturales, a su vez, este resaltó la necesidad de integrar los conocimientos y las tecnologías de la medicina tradicional en la prestación de atención primaria. El objetivo de este trabajo fue identificar los grupos funcionales y metabolitos secundarios de extractos metanólicos de *Senna alexandrina* (Sen), *Valeriana officinalis* (Valeriana), *Tagete lucida* (Yerbaniz) y *Mentha piperita* (Menta) mediante un tamizaje fitoquímico por pruebas colorimétricas, obteniendo la presencia de taninos y esteroides para *S. alexandrina*; saponinas, quinonas, sesquiterpenlactonas, taninos y triterpenos para *V. officinalis*, en el caso de *T. lucida* se obtuvo la presencia de flavonoides, taninos, carbohidratos y triterpenos; *M. piperita* dio positivo para sesquiterpenlactonas, saponinas, flavonoides, taninos, carbohidratos, alcaloides y triterpenos. Se evaluó la actividad antimicrobiana con bacterias farmacoresistentes: Gram negativas (*K. pneumoniae* 700603, *E. coli* 25922, *A. baumannii* 15308, y *P. aeruginosa* 27853) y Gram positiva (*E. faecalis* 29212) Solamente presentó actividad antimicrobiana el extracto de *T. lucida* (Yerbaniz) con halos de inhibición de 2 mm para *A. baumannii*, 3 mm para *E. faecalis*, y 12 mm para *P. aeruginosa*.

INTRODUCCIÓN

La manifestación de infecciones causadas por agentes patógenos se remonta a casi el inicio de los tiempos, pese a esto, no fue hasta hace más de tres siglos, con el descubrimiento del primer microscopio, que se logró identificar a las bacterias como agente causante de infección (Vidaver, A. K. & Lambrecht P.A., 2004). A pesar de dicho descubrimiento, el registro de uso de medicinas o remedios contra los efectos causados por las infecciones data de antes de 1500 a.c. por civilizaciones antiguas.

Los egipcios son considerados pioneros en el área médica, brindándonos textos médicos; conteniendo “recetas” o prescripciones para diferentes “dolencias” presentadas en esos tiempos. Los ingredientes principales utilizados eran minerales, plantas, productos animales y diversos rezos; siendo el uso de plantas el más primordial. En el famoso papiro Ebers se habla de una farmacia muy desarrollada, donde podemos encontrar el uso de plantas como ajo, opio, café, cannabis y variedades con propiedades purgantes. Desgraciadamente, mucho de este conocimiento se fue perdiendo al momento de traducir los papiros, llegando al punto de no saber a qué especie se vienen refiriendo (NatGeo, 2021). Así mismo la civilización griega también contaba con conocimientos

médicos estructurados, teniendo como base creencias mitológicas y la inferioridad del ser ante el poder divino. Su principal consumo para realizar los rituales consistía en el uso de plantas con propiedades alucinógenas como el opio, cannabis, mandrágora, belladona y beleño (Carod-Artal, F.J., 2013).

En México, al igual que estas civilizaciones, se tenía conocimientos médicos estructurados; el empleo de plantas medicinales era una práctica conocida y estudiada en las civilizaciones antiguas de la región. A pesar de que estos conocimientos datan de antes de la colonización, es una práctica que se mantiene vigente hoy en día. Podríamos decir que el conocimiento sigue “vivo” en las diversas culturas que componen al país; manteniéndolo como un legado que se pasa de generación en generación. Abigail Aguilar Contreras (2022), en el X Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales, menciona que “Ellos son los curanderos y las curanderas que tienen el conocimiento que en el aula universitaria no tuvimos”, refiriéndose al conocimiento que poseen en cuestión de la implementación de las plantas para tratamientos médicos.

En la actualidad, contamos con métodos como los antibióticos para combatir infecciones microbianas, los cuales tienen como función evitar o aplazar el crecimiento de microorganismos en los humanos, animales y plantas. Aunque en su momento llegaron a ser un método innovador y altamente efectivos el uso innecesario de ellos, al igual que la mala administración de dosis y tiempos de medicación, han llegado a generar una resistencia en los microorganismos (CDC, 2020). Esta resistencia a los antimicrobianos (RAM) aparece como respuesta a la adaptación en bacterias, virus, hongos y parásitos, dando como resultado una ineficiencia en antibióticos y otros medicamentos antimicrobianos, dando como

resultado un incremento en el riesgo de propagación de enfermedades, el incremento de aparición complicaciones en las enfermedades e incluso la muerte (OMS, 2021).

La Organización Mundial de la Salud (2021) declaró la resistencia a los antimicrobianos como una de las principales amenazas a la salud pública, haciendo énfasis en que esta resistencia amenaza los logros de la medicina moderna. Así mismo, el Grupo de Coordinación Interorganismos sobre Resistencia a los Antimicrobianos (IACG) de las Naciones Unidas (2019) enfatiza en que, si no se toman medidas adecuadas, las enfermedades farmacorresistentes podrían causar 10 millones de defunciones anuales en 2050 y ocasionar que la economía se vea perjudicada a tal punto de causar una crisis financiera mundial, estimando que para el 2030, la farmacorresistencia suma en pobreza extrema a hasta 24 millones de personas.

TEORÍA

En México, el uso de plantas medicinales a través de la medicina tradicional es ancestral. Se utilizan las diferentes partes de la planta, según sea la afectación o la receta en cuestión. Lo más común es usar las hojas y las flores y esporádicamente, el tallo o la raíz. Las plantas medicinales se consumen directamente o pueden prepararse como infusiones o en presentación homeopática (Plantas Medicinales La Realidad De Una Tradición Ancestral. S. Horacio Guzmán Maldonado Rocío S. Díaz Huacuz Mario M. González Chavira 2017).

ANTECEDENTES DE CADA PLANTA ESTUDIADA

Senna alexandrina



Fig 1. *Senna alexandrina*

TAXONOMÍA:

Reino: **Plantae**

Clase: **Eudotyledoneae**

Subclase: **Rosidae**

Orden: **Fabales**

Familia: **Fabaceae**

Subfamilia: **Caesalpinioideae**

Tribu: **Cassieae**

Género: ***Senna***

Especie: ***Senna alexandrina***

Senna alexandrina también conocida como sen de Alejandría o sen, es originaria de Egipto. Se conoce que es una planta nativa de África tropical que fue naturalizada en América, donde actualmente tiene una región biogeográfica en las amazonas. Esta planta se caracteriza por crecer en suelos húmedos o con muy mal drenaje, en zonas con sol directo y zonas semiáridas, aunque la mayoría de los jardineros prefieren sembrar en suelos secos para limitar su desarrollo a 3 ft de altura. Sen de Alejandría es un arbusto que tiende a medir unos 2 ft de alto, tiene un tallo erecto y liso color verde pálido, con ramas largas y extendidas, contando con folletos en cuatro o cinco pares de una pulgada de largo, en forma lanceoladas u obovadas y mucilaginosas de un sabor dulzón. Sus flores son pequeñas y amarillas. Las vainas son oblongas con un largo de 2 in y de 7 a 8 in de ancho, conteniendo 6 semillas en su interior (Viswanathan, S. & Nallamuthu, T., 2012).

En partes como Sudán, Sinaí, Nilo y el sur de la India se utiliza las hojas secas y pulverizadas en heridas y quemaduras, así como una infusión de las hojas secas para combatir la fiebre. En México, se utiliza la infusión de las hojas secas para generar un laxante o purgante. Así mismo, se ha encontrado que sirve para purificar la sangre, función desobstruyente, purgante de flemas, bilis amarilla y negra, así como, para la ascitis y la dispepsia. Por lo que en Europa el HMPC de la Agencia Europea de Medicamentos realizó la obtención de componentes que le brindan las propiedades medicinales; en los cuales se pueden identificar senósidos, antraquinonas libres con sus glucósidos O y C, aloe-emodina, ácido catártico, catartina, kaempferol, catharkaempferol, ácido crisofánico, reína, isorhamnetina, emodina, kaempferina, mucílago, feoretina, sennacrol, sennapicrina y azúcares libres. Cabe recalcar que especificaron que en las hojas recién brotadas después de la lluvia tienen un alto contenido de senósidos, los cuales disminuyen a medida que las hojas maduran (Akbar, S., 2020).

Valeriana officinalis



Fig 2. *Valeriana officinalis*

TAXONOMÍA:

Reino: **Plantae**

División: **Magnoliophyta**

Clase: **Magnoliopsida**

Subclase: **Asteridae**

Orden: **Dipsacales**

Familia: **Caprifoliaceae**

Subfamilia: **Valerianoideae**

Género: ***Valeriana***

Especie: ***Valeriana officinalis***

Valeriana officinalis, también conocida como Valeriana o Hierba de los gatos, es originaria de Europa y Asia occidental, actualmente cultivada entre Bélgica, Holanda y Alemania. Esta planta crece en prados bajos y arenosos, en zonas montañosas de hasta 2000 m de altura, al igual que en sitios húmedos y sombreados como bosques y zonas cercanas a cursos de agua (Hernández, A., 2022). La Valeriana es una hierba permanente que puede llegar a medir de altura hasta 2 m en forma de rizomas. Tiene tallos verdes y acanalados; sus hojas son opuestas y divididas, con los folíolos lanceolados, dentados y pilosos en el envés. Las flores de la valeriana son blancas con tonalidades rosadas, agrupadas en inflorescencias densas terminales. El fruto de esta hierba es seco, coronado de una pelusa plumosa, la cual contiene una semilla de 3 mm. La parte subterránea viene siendo un rizoma vertical de entre 1 y 2 cm de ancho con brotes laterales más delgados y largos, del cual salen numerosas raicillas (Hernández, A., 2022).

Entre el siglo V y IV a.c., los discípulos de Hipócrates utilizaban la valeriana como método médico en la rama de la ginecología para estimular las menstruaciones. A lo largo de los siglos la Valeriana fue utilizada como tratamiento antipirético y diurético, así mismo, se utilizaba para el bazo, la peste, el sistema circulatorio, dolores dorsales, tos, problemas oculares y en método de compresas para úlceras y condilomas. No fue hasta el siglo XVII que se empezó a utilizar en la zona de Italia como antiespasmódico para el tratamiento de la epilepsia. Actualmente se utiliza la Valeriana en infusiones con fin sedante y somnífero para trastornos nerviosos como la ansiedad, insomnio y dolor de cabeza. También es conocida por aliviar trastornos digestivos, como el colon irritable y cólicos intestinales, trastornos respiratorios como el asma y trastornos derivados de la menopausia (A. Vogel., 2020).

Tagete lucidaFig 3. *Tagete lucida*

TAXONOMÍA:

Reino: **Plantae**División: **Magnoliopsida**Orden: **Asterales**Familia: **Asteraceae**Tribu: **Tageteae**Género: ***Tagetes***Especie: ***Tagete lucida***

Tagetes lucida, también conocida como yerbanis o pericón, es nativa de México y Guatemala, donde crece en llanos, campos y a orillas de las carreteras; también se le ha encontrado en zonas de bosques templados. En la república mexicana se puede encontrar en los estados de climas templados, como por ejemplo en zonas de bosque pino-encino, selva baja caducifolia y zonas de transición, donde crece silvestremente (INAH, 2019).

El yerbanis es una hierba permanente que llega a medir 80 cm de alto, tiene tallos glabros medianamente ramificados desde la base, y sus hojas son enteras, sésiles, de forma lineal a oblanceoladas, con un margen aserrado y el ápice redondeado. Las inflorescencias son cabezuelas agrupadas en corimbos, estos contienen flores de color amarillo ligadas de 3 a 4 y en el disco de 5 a 8, las cuales al momento de estrujarse segregan un olor característico a anís. El fruto tiende a ser una cipsela negruzca linear claviforme con un vilano de dos escamas aristiformes. Su temporada de floración radica desde septiembre hasta noviembre (Calderón de Rzedowski, G., & Jerzy Rzedowski, 2010).

El yerbanis se ha utilizado a lo largo de los años como planta medicinal para problemas digestivos como cólicos intestinales, diarrea, disentería, parásitos, flatulencias, vomito, empacho y tifoidea. También, se tiene registro de su uso para contrarrestar padecimientos del sistema circulatorio como son las varices, en problemas respiratorios como resfriados y asma, y a su vez para problemas ginecológicos, ya que tiene propiedades abortivas. Cabe mencionar que en algunas culturas se sigue utilizando para los temazcales y las “limpias”. En el área de investigación médica se han realizado estudios con ratones para tratar padecimientos relacionados con la ansiedad, donde se corroboró que las propiedades del yerbanis sirven como ansiolítico y sedante-hipnótico (El Universal, 2021).

Mentha piperitaFig 4. *Mentha piperita*

TAXONOMÍA:

Reino: **Plantae**Subreino: **Viridiplantae**División: **Tracheophyta**Clase: **Magnoliopsida**Orden: **Lamiales**Familia: **Lamiaceae**Género: ***Mentha***Especie: ***Mentha piperita***

Mentha piperita, también conocida como menta negra, es una especie híbrida estéril obtenida de la cruce de *Mentha aquatica* (menta acuática) y *Mentha spicata* (hierbabuena). Esta cruce crece esporádicamente en zonas templadas de Europa, donde se cultiva artificialmente desde el siglo XVII en Inglaterra. Gracias a su esterilidad prácticamente se propaga a partir de rizomas subterráneos, volviéndose una planta invasiva en ambos hemisferios (ECOSOSTENIBLE, 2022).

La menta negra es una hierba permanente aromática que siempre se encuentra de color verde característico. Llega a medir de 40 a 80 cm de altura de forma erecta y lisa, sus tallos cuadrangulares son generalmente de un tono rojizo y velludos, con hojas opuestas de borde aserrado de 4.5 a 8.5 cm de largo y de 0.8 a 2 cm de ancho. Las flores de la *Mentha piperita* son de un tono entre rosado y violeta o púrpura de 4 a 5 cm de altura dispuestas en espigas terminales. El fruto está compuesto de 2 a 4 aquenios ovoides lisos y oscuros de aproximadamente 0.8 mm de largo (A. Vogel, 2021).

Se han detectado diferentes usos medicinales para la menta, entre todas sus propiedades tenemos su actividad antiinflamatoria, analgésica y antibacteriana. La infusión de las hojas secas se ha utilizado a lo largo de los siglos para aliviar cólicos, hinchazón abdominal, estreñimiento, bronquitis, asma, hemorroides, descongestionante nasal, dolores musculares y combatir las bacterias que generan el mal aliento (Ángulo, A.C., 2022). Actualmente podemos encontrar la menta en productos de higiene bucal, como ingrediente en recetas de comida, y en productos farmacéuticos (Herro, E., & Jacob, S. E., 2010).

Especies Microbianas Multi Farmacorresistentes

Staphylococcus aureus

TAXONOMÍA:

Dominio: **Bacteria**

Filo: **Firmicutes**

Clase: **Bacilli**

Orden: **Bacillales**

Familia: **Staphylococcaceae**

Género: **Staphylococcus**

Especie: **Staphylococcus aureus**

S. aureus es una bacteria Gram positiva que vista desde el microscopio tiene forma de coco (redonda) con un tamaño de entre 0.8 a 1.5 μ , la cual, no contiene flagelos, volviéndose un microorganismo inmóvil. La podemos encontrar en el microscopio en parejas, cadenas o racimos. Una de sus características principales es su capacidad de formar una envoltura capsulada de tipo mucoide, la cual le permite generar procesos óptimos de infección. Su temperatura ideal de crecimiento son los 35°C. Como método de transmisión principal se tiene la ingesta de alimentos contaminados con la bacteria o sus toxinas, seguido por el contacto con personas, animales o elementos contaminados por medio de contacto con heridas o mucosas (INSST, 2021).

Staphylococcus pertenece a la familia Staphylococcaceae, la cual aglomera 5 géneros y 75 especies (Castellanos, A., 2022). Específicamente, la especie *S. aureus* llega a presentar un alto porcentaje de las infecciones intrahospitalarias, siendo la más ampliamente estudiada.

Aunque *S. aureus* es considerado un patógeno oportunista, pertenece a la lista de los patógenos prioritarios que lanzó la OMS (2020). La cepa BAA-44 está clasificada como resistente a la meticilina (MRSA), siendo a su vez resistente a los β -lactámicos, la penicilina, los macrólidos, lincosamidas, y resistencia a la vancomicina, esta última adquirida por transferencia horizontal del gen *vanA* de *Enterococcus faecalis* (Feng et al, 2008).

Enterococcus faecalis

TAXONOMÍA:

Dominio: **Bacteria**

Filo: **Firmicutes**

Clase: **Bacilli**

Orden: **Lactobacillales**

Familia: **Enterococcaceae**

Género: **Enterococcus**

Especie: **Enterococcus faecalis**

E. faecalis es una bacteria Gram positiva con morfología de coco (redonda) que habita en el tracto digestivo de los humanos y otros mamíferos. Es considerada una bacteria inmóvil (ya que no contiene flagelo), anaerobia facultativa y fermentadora de glucosa sin producir gas. Una de sus características principales es su habilidad de vivir en ambientes extremos de pH (9,6) y de concentraciones elevadas de sal, así como, también, sobrevive a cambios abruptos de temperatura y estados de deshidratación (Torres, C., 2021).

En la primera década de los 2000, aproximadamente un 5% de los aislamientos que se obtuvieron de *Enterococcus faecalis* mostraban resistencia a vancomicina (Luna, 2019). Esta resistencia se debe a la presencia de los fenotipos VanA y VanB, los cuales vienen siendo genes de resistencia conjunta de la vancomicina y la teicoplanina (Moosavian, M., Ghadri, H., & Samli, Z., 2018).

Escherichia coli

TAXONOMÍA:

Dominio: **Bacteria**

Filo: **Proteobacteria**
Clase: **Gammaproteobacteria**
Orden: **Enterobacterales**
Familia: **Enterobacteriaceae**
Género: **Escherichia**
Especie: **Escherichia coli**

E. coli son bacilos Gram negativos no esporulados, anaerobios facultativos. Siendo la bacteria que más abundante que tenemos en nuestro tracto gastrointestinal, generando a pocas horas después del nacimiento y considerada parte de la flora normal, también, existen 6 cepas descritas de *E. coli* como productoras de diarreas como lo son las enterotoxigénicas (ETEC), enterohemorrágicas (EHEC), enteroinvasivas (EIEC), enteropatógenas (EPEC), enteroagregativas (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC). *Escherichia coli* también es protagonista de infecciones en el tracto urinario, siendo asociadas a catéteres (Villarreal et al., 2002).

En la cepa 25922, se ha encontrado la presencia de los genes de resistencia *murA* y *uhpT*, los cuales brindan resistencia a la fosfomicina, amoxicilina y cefalosporinas de segunda y tercera generación (Takahata, S. et al., 2010).

Pseudomonas aeruginosa

TAXONOMÍA:
Dominio: **Bacteria**
Filo: **Proteobacteria**
Clase: **Gammaproteobacteria**
Orden: **Pseudomonadales**
Familia: **Pseudomonadaceae**
Género: **Pseudomonas**
Especie: **Pseudomonas aeruginosa**

P. aeruginosa es un patógeno ubicuo, oportunista, gram negativo, con motilidad unipolar. Su morfología consta de una forma similar a la de un bastón, tiene un tamaño de entre 1.5 a 5 μ de largo y 0.5 a 1 μ de diámetro, cuenta con un flagelo que le permite movilidad. Su temperatura óptima de crecimiento varía desde los 20°C a los 40°C, siendo capaz de tolerar los cambios abruptos de extremos de temperatura a diferencia de otras especies de *Pseudomonas*. Otra característica que define a esta especie es su capacidad por producir una variedad de pigmentos, como lo son la piocianina (de color azul verdoso), la pioverdina (pigmento fluorescente de color verde amarillento) y la piorrubina (de color rojo). Como método de transmisión tenemos el contacto con piel lesionada o reblandecida, así como las mucosas al contacto con el agua u otros objetos contaminados. Otro mecanismo de transmisión es la inhalación de bioaerosoles o fluidos contaminados (INSST, 2022). La cepa 27853 contiene mutaciones en los genes cromosomales. Estas mutaciones le ayudan al patógeno a obtener resistencia a penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos, y a su vez, a los carbapenémicos gracias a la formación de biopelículas y producción de pili tipo IV o también conocido como T4P (Ochoa et al., 2013).

Acinetobacter baumannii

TAXONOMÍA:
Dominio: **Bacteria**
Filo: **Pseudomonadota**
Clase: **Gammaproteobacteria**
Orden: **Pseudomonadales**
Familia: **Moraxellaceae**
Género: **Acinetobacter**
Especie: **Acinetobacter baumannii**

A. baumannii son bacilos o cocobacilos gramnegativos mayormente encontrados en parejas, son no fermentadores, no esporulados, y aerobios estrictos. Mantienen una temperatura óptima entre 33°C a 35°C. Su papel predominante es como agente causal de la neumonía, volviéndose la causa más común de morbilidad infecciosa y mortalidad, afectando a pacientes en Unidades de Cuidados Intensivos. La OMS (2021) la tiene catalogada en prioridad 1 (crítica) en la lista de los patógenos prioritarios, ya que presenta una resistencia a carbapenémicos. Siendo clasificada como uno de los seis más importantes microorganismos Gram negativos multirresistentes a nivel mundial, debido a que compromete los pulmones, sangre e infecciones posquirúrgicas, y tienen tendencia a causar brotes hospitalarios.

En la cepa 15308 se ha encontrado resistencia a penicilinas, cefalosporinas de primera a cuarta generación, aztreonam, carbapenémicos aminoglucosidos y fluoroquinolonas; se tiene contemplado como posible origen a esta resistencia las alteraciones de proteínas ligadoras de penicilinas, así como, la disminución de la permeabilidad de la membrana externa, mutaciones en los sitios blanco y la inactivación por enzimas modificantes (Diomedi, 2005).

Klebsiella pneumoniae

TAXONOMÍA:

Dominio: **Bacteria**

Filo: **Proteobacteria**

Clase: **Gammaproteobacteria**

Orden: **Enterobacterales**

Familia: **Enterobacteriaceae**

Género: ***Klebsiella***

Especie: ***Klebsiella pneumoniae***

K. pneumoniae es una bacteria Gram negativa, encapsulada, no móvil, fermentadora de lactosa, anaerobio facultativo; está presente en nuestra flora normal de la piel, la boca y los intestinos. Esta especie de *Klebsiella* desempeña un importante papel como causa de las enfermedades infecciosas oportunistas, debido a su capacidad de causar infecciones severas y potencialmente mortales en pacientes sanos e inmunocomprometidos, asociándose a neumonías, infecciones en el tracto urinario, bacteriemias, abscesos hepáticos, y endoftalmitis. Se le atribuye al éxito patogénico la presencia de factores de virulencia como sistemas de captación de hierro, vías del metabolismo de la alantoína, porinas, sistemas de expulsión, fimbrias kpc, producción de polisacárido capsular y lipopolisacárido, y a su vez la presencia de genes de resistencia (Yinec, Y. et al., 2019).

Otros estudios dirigidos a la cepa 700603, reportaron resistencia a penicilina, oxacilina, ampicilina, ticarcilina, mezlocilina, cefalotina, cefazolina, aztreonam, lincomicina, bacitracina, kanamicina y la vancomicina (Reimer et al, 2021).

PARTE EXPERIMENTAL

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS METANÓLICOS

Del material vegetal se trituran las hojas con ayuda de un mortero para dejarlo macerar en metanol de 7 a 14 d. Una vez transcurrido este tiempo, se eliminará el solvente por medio del método de rotaevaporación a una temperatura de 35°C, y posteriormente, se utilizará una estufa de secado a 40°C para eliminar completamente el solvente.

Una vez seco, se tomarán 100 mg del extracto y se colocarán en un vial con capacidad mínima de 1 ml. Se adicionará un 1 ml de la solución 30% de metanol y 70% de agua para solubilizar, procedimiento que se llevará a cabo en el sonicador o en el vórtex.

TAMIZAJE FITOQUÍMICO PARA IDENTIFICAR GRUPOS FUNCIONALES DE LOS EXTRACTOS MEDIANTE PRUEBAS COLORIDAS

Alcaloides

- Prueba de Dragendorff.

Se prepararán 2 soluciones A y B, donde se disolverán 0.85g de nitrato de bismuto en una mezcla de 10 ml de ácido acético glacial y 40 ml de agua. Reactivo preparado a base de una mezcla de 5 ml de la solución A y 4 ml de la solución B con 100 ml de agua. La prueba es considerada positiva al observar una coloración roja o naranja persistente por un periodo de 24 h.

Flavonoides

- Prueba del H₂SO₄.

Se disolvieron unos cuantos miligramos del extracto en H₂SO₄. Dependiendo de la coloración que se obtuvo se definió el contenido, amarillo para flavones, naranjagüinda para flavonas, rojo-azuloso para chalconas y rojo-púrpura para quinonas.

- Prueba de Shinoda.

El extracto se disolvió en etanol y se puso en contacto con limaduras de Mg, se aplicó calor a la flama y posteriormente se agregaron unas gotas de HCl, esta prueba es considerada positiva si presenta coloraciones naranja, rojo, rosa, azul y violeta.

Sesquiterpenlactonas

- Prueba de Baljet.

A 2 o 3 mg de la muestra se agregaron 3 a 4 gotas de la solución mezcla la cual consistió en una solución A que contenía ácido pícrico al 1 % en etanol y una 21 solución B de NaOH al 10 %, se aceptó como un resultado positivo si se tornara de color naranja a roja oscura.

Carbohidratos

- Prueba de Molish.

A 1 o 2 mg del extracto se agregará gota a gota el reactivo de Molish (alfa-naftol al 1 % en etanol), posteriormente se agregó 1 ml de ácido sulfúrico por las paredes, esta prueba será aceptada como positiva si se observaba un anillo púrpura en la interfase.

- Prueba de las cumarinas.

Se disolvieron 1 o 2 mg del extracto en NaOH al 10 %, se aceptó como resultado positivo si aparece una coloración amarilla y desaparece al acidular la prueba.

Esteroles y triterpenos

- Prueba de Liebermann-Buchard

Se mezcló gota a gota 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de cloroformo, posteriormente se enfrió a 0°C y se añadió una gota de ácido sulfúrico. Se aceptó como una prueba positiva si presentaba colores azul, verde, rojo, anaranjado.

- Prueba de Salkowski.

Se pondrá 1 a 2 mg en contacto con 1 ml de ácido sulfúrico, aceptándose como positiva si presentara colores amarillo o rojo para esteroides y metilesteroides.

Oxhidrilos fenólicos (taninos vegetales)

- Prueba del FeCl₃.

Se disolvieron 1 a 2 mg del extracto en 1 ml de agua o etanol y se añadieron unas gotas de cloruro de hierro al 12.5 % en agua, se aceptó como un resultado positivo si presenta un precipitado rojo, azul-violeta o verde.

Insaturaciones

- Prueba del KMnO₄.

Se disolvieron 1 a 2 mg de la muestra en 1 ml de agua destilada, acetona o metanol y se añadió gota a gota una solución de KMnO₄ al 2 % en agua, se aceptó como positiva si se observó decoloración o formación de precipitado café.

ACTIVACIÓN DE CEPAS

Se tomarán cepas a evaluar del cepario de Química Analítica que están conservadas en arena y se colocan en cajas Petri con medio de cultivo se incubaran por 24 h a 36°C, se realizará un pase por medio de un asa bacteriológica a tubos inclinados; los cuales nos servirán como cepario principal.

Para la estandarización de las bacterias, es necesario que se realice un pase previo en caldo nutritivo. Por lo tanto, se prepararán varios tubos de cristal con un volumen de 4 ml de Caldo Müller Hinton en la campana de flujo laminar; estos se tendrán 24 h en la incubadora como prueba de esterilidad. Pasado el tiempo se realizará un pase de cada una de las bacterias en la campana de flujo laminar, con el flujo encendido, para los cuales se realizará la metodología siguiente: Esterilizar el asa bacteriológica en el mechero, tomar una asada del vial en conservación (tubo inclinado) y se inocula un tubo de cristal previamente preparado; este proceso se repetirá para cada una de las cepas de bacterias a evaluar. Los tubos inoculados se incubarán por un periodo de 24 h a 36°C.

ESCALAMIENTO MCFARLAND

Pasadas las 24 h de incubación de los tubos activados, se tomará una lectura a 600 nm para obtener la absorbancia inicial. Partiendo de la absorbancia inicial, dentro de la campana de flujo previamente esterilizada, se tomará un tubo de cristal con caldo nutritivo Müller Hinton, se agregarán 100 μ inicialmente del tubo activado hasta que se obtenga una lectura de 0.100 a 0.110 (Escala de McFarland a 1×10^6 UFC).

ANTIBIOGRAMA

Del tubo estandarizado en una escala de 0.5 de McFarland, se sembrará en una placa de agar Müller Hinton 100 μ L mediante un extendido en placa con un asa Digrafsky. Posteriormente, se utilizará una pipeta Pasteur para generar los pocillos correspondientes para cada extracto. Con una micropipeta se agregará en cada pocillo 25 μ L de extracto previamente liofilizado, colocando el control en medio de la placa. Después, las placas se llevarán a incubación por 24 h a 36°C. Finalmente se medirán los halos de inhibición con una regla.

DIFUSIÓN EN PLACA POR POCILLO

Para realizar la inoculación de las cajas Petri, se realizará un extendido en placa mediante la toma de 100 μ L de las cepas estandarizadas al tubo 0.5 de la escala de McFarland y se extendió con un asa digrafsky, posterior a eso, se realizaron 5 pocillos en el agar uno al centro, que será el control negativo que contendrá agua destilada estéril y los otros 4 alrededor con las diluciones de los extractos, de cada uno de estos se agregaron 25 μ L en cada pocillo. Para concluir se llevaron a incubar a 36°C por 24 h para poder realizar el análisis de los resultados (Barry et al., 1999).

RESULTADOS

Se comprobó la actividad antimicrobiana de *Senna alexandrina* (Sen), *Valeriana officinalis* (Valeriana), *Tagete lucida* (Yerbaniz) y *Mentha piperita* (Menta) en las cepas *Acinetobacter baumannii* 15308, *Staphylococcus aureus* BAA-44, *Klebsiella pneumoniae* 700603, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 y *Escherichia coli* 25922, cepas que presentan actividad farmacorresistente. El método que se utilizó fue difusión de placa por pocillos, donde se midieron los halos de inhibición de cada extracto en cada cepa; procedimiento realizado por medio de duplicado.

La actividad de extractos en *E. coli* 25922 dio halos de inhibición en los extractos de *T. lucida* (3 mm) y *S. alexandrina* (1 mm). En *A. baumannii* 15308 se observan halos de inhibición en los extractos *T. lucida* (4 mm), *Mentha piperita* (2 mm) y *S. alexandrina* (3 mm). Por otro lado, en *K. pneumoniae* 700603 solo se observa un halo de inhibición del extracto *T. lucida* (2 mm). Finalmente, por el lado de *P. aeruginosa* 27853 mostró halos de inhibición en *T. lucida* (2 mm) y *S. alexandrina* (1 mm).

CONCLUSIONES

En el presente estudio se evaluó la actividad de los extractos matanólicos de *S. alexandrina* (Sen), *V. officinalis* (Valeriana), *T. lucida* (Yerbaniz) y *M. piperita* (Menta) sobre las cepas Gram negativas (*A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *E. coli*) y Gram positiva (*E. faecalis*). El extracto que mostro mayor actividad fue el de *T. lucida* (Yerbaniz) contra las bacterias *A. baumannii*, *E. faecalis*,

P. aeruginosa y *E. coli*, los metabolitos encontrados en esta planta fueron: esteroides, cumarinas, taninos y flavonoides.

BIBLIOGRAFÍA

1. Akbar, S. (2020). *Senna alexandrina* Mill. (Fabaceae/Leguminosae). In Handbook of 200 Medicinal Plants (pp. 1629-1637). Springer, Cham.
2. Alshehri, M. M., Quispe, C., Herrera-Bravo, J., Sharifi-Rad, J., Tutuncu, S., Aydar, E. F., et al. (2022). A review of recent studies on the antioxidant and anti-infectious properties of *Senna* plants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022.
3. AlZain, M. N., Alatar, A. A., Kumar, A., Mothana, R. A., Noman, O. M., Herqash, R. N., Al-Sheddi, E. S., Farshori, N. N., & Alam, P. (2020). The Influence of Mycorrhizal Fungi on the Accumulation of Sennosides A and B in *Senna alexandrina* and *Senna italica*. *Separations*, 7(4), 65. <https://doi.org/10.3390/separations7040065>
4. Angulo, A. C. (2022, 23 octubre). Menta: Propiedades, Beneficios Y Para Qué Sirve Esta Planta. *Farmacia Angulo*. Recuperado 16 de enero de 2023, de <https://nutricionyfarmacia.com/blog/salud/bienestar/menta-propiedades-beneficios/>
5. Babiker, A. O., Abdelwakeel, A. A., Ahmed, I. F., & Elshikh, A. (2019). Identification and Authentication of Microbes Causing Urinary Tract Infection and Detection of Antibacterial Activity for Methanolic Extract of *Senna alexandrina* against these Pathogenic Bacteria in Khartoum State, Sudan. *Current Perspectives on Medicinal and Aromatic Plants (CUPMAP)*, 2(2), 93-99.
6. Calderón de Rzedowski, G., & Jerzy Rzedowski (2010). Flora fanerogámica del Valle de México. Pátzcuaro: Instituto de Ecología/CONABIO. p. 923. ISBN 978-607-7607-36-6.
7. Capunzo, M., Brunetti, L., Cavallo, P., Boccia, G., De Caro, F., & Ieluzzi, M. (2003). Antimicrobial activity of dry extracts of *Tagetes lucida* from Guatemala. *Journal of preventive medicine and hygiene*, 44, 85-97.
8. CDC. (2020). Preguntas y respuestas sobre el uso de antibióticos | Prescripción y uso de antibióticos | CDC. Recuperado 22 de enero de 2023, de <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/sp/should-know.html>
9. Choi, S. A., & Lee, H. S. (2019). Acaricidal and antibacterial toxicities of *Valeriana officinalis* oils obtained by steam distillation extraction. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 62(1), 19-23.
10. Desam, N. R., Al-Rajab, A. J., Sharma, M. M., Al-Rajab, A. J., Gowkanapalli, R. R., & Bratty, M. A. (2017). Chemical constituents, in vitro antibacterial and antifungal activity of *Mentha×Piperita* L. (peppermint) essential oils. *Journal of King Saud University - Science*, 31(4), 528-533. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.07.013>
11. ECOSOSTENIBLE. (2022, 26 octubre). *Mentha piperita*. Un Mundo Ecosostenible. Recuperado 16 de enero de 2023, de <https://antropocene.it/es/2022/10/26/mentha-piperita-es/>
12. Eftekhari, Z. (2020). Antimicrobial properties of medicinal plants; The new therapeutic aspect of *Valeriana officinalis*. *Plant Biotechnology Persa*, 2(1), 59-60.
13. El Universal. (2021, 16 junio). ¿Qué es el yerbaniz y cuáles son sus beneficios?: Una planta con múltiples beneficios. *El universal*. Recuperado 16 de enero de 2023, de <https://eldiariodecoahuila.com.mx/2021/06/17/que-es-el-yerbaniz-y-cuales-son-sus-beneficios/>
14. Farook, M. A., Mubarak Ali, A. & Madhan Kumar, R. (2019). Phytochemical screening and anti-bacterial activity of *Senna alexandrina* and *Coccinia grandis* leaf extracts. *International Journal of Science and Humanities*, 5(1), 23-37. <http://www.islamiahcollege.edu.in/images/downloads/6278IJHS%20V5%20N1.pdf#page=31>
15. Fletes Hernández, N. A. (2016). Síntesis verde de nanopartículas de plata usando extracto de las plantas *Valeriana officinalis* y *Passiflora incarnata* y su evaluación como agentes antibacteriales.

16. Hattesoehl, M., Feistel, B., Sievers, H., Lehnfeld, R., Hegger, M. & Winterhoff, H. (2008). Extracts of *Valeriana officinalis* L. s.l. show anxiolytic and antidepressant effects but neither sedative nor myorelaxant properties. *Phytomedicine*, 15(1-2), 2-15. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.11.027>
17. Hernández, A. (2022, 21 agosto). *Valeriana (Valeriana officinalis)*. *Naturalista Mexico*. Recuperado 16 de enero de 2023, de <https://www.naturalista.mx/taxa/56160-Valeriana-officinalis>
18. Herro, E., & Jacob, S. E. (2010). *Mentha piperita* (peppermint). *Dermatitis : contact, atopic, occupational, drug*, 21(6), 327–329.
19. INAH. (2019). Pericón. MEDiateca. Recuperado 16 de enero de 2023, de https://lugares.inah.gob.mx/en/museos-inah/museo/museo-piezas/12917-12917-peric%C3%B3n.html?lugar_id=389
20. Kalia, M., Singh, D., Sharma, D., Narvi, S. S., & Agarwal, V. (2020). *Senna alexandriana* mill as a potential inhibitor for quorum sensing-controlled virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Pharmacognosy Magazine*, 16(72), 797.
21. Moosavian, M., Ghadri, H., & Samli, Z. (2018). Molecular detection of *vanA* and *vanB* genes among vancomycin-resistant enterococci in ICU-hospitalized patients in Ahvaz in southwest of Iran. *Infection and Drug Resistance*, Volume 11, 2269-2275. <https://doi.org/10.2147/idr.s177886>
22. Mungali, M., Tripathi, A., & Singhal, S. (2021). *Valeriana officinalis* (valerian). In *Naturally Occurring Chemicals Against Alzheimer's Disease* (pp. 283-291). Academic Press.
23. NatGeo. (2021, 20 agosto). La medicina en Egipto, así curaban enfermedades en el Antiguo Egipto. [historia.nationalgeographic.com.es. https://historia.nationalgeographic.com.es/a/medicina-egipto-asi-curaban-enfermedades-antiguo-egipto_6289](https://historia.nationalgeographic.com.es/historia.nationalgeographic.com.es/a/medicina-egipto-asi-curaban-enfermedades-antiguo-egipto_6289)
24. OMS. (2019, 29 abril). Un nuevo informe insta a actuar con urgencia para prevenir una crisis causada por la resistencia a los antimicrobianos. Organización Mundial de la Salud. Recuperado 22 de enero de 2023, de <https://www.who.int/es/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>
25. OMS. (2021, 17 noviembre). Resistencia a los antimicrobianos. Organización Mundial de la Salud. Recuperado 22 de enero de 2023, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
26. Reddy, S. H., Al-Kalbani, A. S., & Al-Rawahi, A. S. (2018). Studies on phytochemical screening-GC-MS characterization, antimicrobial and antioxidant assay of black Cumin seeds (*Nigella sativa*) and *Senna alexandria* (*Cassia angustifolia*) solvent extracts. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(2), 490-497.
27. Takahata, S., Ida, T., Hiraishi, T., Sakakibara, S., Maebashi, K., Terada, S., Muratani, T., Matsumoto, T., Nakahama, C., & Tomono, K. (2010). Molecular mechanisms of fosfomycin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(4), 333-337. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.11.011>
28. Torres, C. (2021, 10 marzo). Estudio sobre la adaptación de la bacteria «*E. faecalis*». Recuperado 18 de enero de 2023, de <https://www.unirioja.es/apnoticias/servlet/Noticias?codnot=6959&accion=detnot>
29. Torres-Martínez, R., Moreno-León, A., García-Rodríguez, Y. M., Hernández-Delgado, T., Delgado-Lamas, G., & Espinosa-García, F. J. (2022). *Tagetes lucida* Cav. essential oil and the mixture of its main compounds are antibacterial and modulate antibiotic resistance in multi-resistant pathogenic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*.
30. Villa-Silva, P. Y., Iliná, A., Ascacio-Valdés, J. A., Esparza-González, S. C., Cobos-Puc, L. E., Rodríguez-Herrera, R., & Silva-Belmares, S. Y. (2020). Phenolic compounds of *Tagetes lucida* Cav. with antibacterial effect due to membrane damage. *Boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 19(6).
31. Viswanathan, S., & Nallamuthu, T. (2012). Phytochemical screening and antimicrobial activity of leaf extracts of *Senna alexandrina* Mill. against human pathogens. *International Journal of Current Science*, 2, 51-56.

32. Vogel. (2020). Enciclopedia de Plantas *Valeriana officinalis* L. (Valeriana). Mundo A. Vogel. Recuperado 16 de enero de 2023, de <https://www.avogel.es/enciclopedia-de-plantas/valeriana-officinalis.php>
33. Vogel. (2021). Enciclopedia de Plantas *Mentha x piperita* L. (Menta). Mundo A. Vogel. Recuperado 16 de enero de 2023, de <https://www.avogel.es/enciclopedia-de-plantas/mentha-x-piperita.php>
34. Wang, J., Zhao, J., Liu, H., Zhou, L., Liu, Z., Wang, J., et al. (2010). Chemical analysis and biological activity of the essential oils of two valerianaceous species from China: *Nardostachys chinensis* and *Valeriana officinalis*. *Molecules*, 15(9), 6411-6422.

ESTUDIO DE LA DINÁMICA DE LA LIBERACIÓN ESPONTÁNEA DE ACETILCOLINA EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR EN RATAS WISTAR CON Y SIN DIABETES EXPERIMENTAL

Lina Sarahí de la Madrid-Trevizo¹, Miguel Huerta-Viera¹, Julio Alcaraz-Siqueiros², Xóchitl Trujillo¹,
Mónica Ríos-Silva¹⁻² and Yolitzzy Cárdenas¹

¹Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Colima, Av. 25 de julio # 965, Col. Villas San Sebastián, Colima 28045, Colima, México, ²Facultad de Medicina, Av. Universidad # 333, Col. Las Víboras, Colima, 28040 Colima, México.
lina.trevi@gmail.com

RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) lleva al daño de nervios periféricos (Muramatsu, 2020). Una complicación de la diabetes es la polineuropatía diabética, las cual se han relacionado con cambios en la estructura de la unión neuromuscular (UNM) y en las vesículas de acetilcolina (ACh), aunado a lo anterior se ha reportado que los potenciales miniatura de placa terminal (PMPM) en un estado de hiperglucemia crónica incrementa la frecuencia de aparición de los PMPM como mecanismo compensatorio para la transmisión sináptica de la UNM, aunque los mecanismos que subyacen a dichas alteraciones no son del todo conocidos. El objetivo del estudio fue analizar la dinámica de liberación de ACh mediante los PMPM en la UNM de ratas con diabetes inducida durante 4 semanas. Se realizó un estudio de tipo experimental con 12 Ratas Wistar macho (peso 250±50 g). Las ratas fueron inducidas a diabetes con dosis única de 45mg/kg de estreptozotocina. Las ratas inducidas a DM tuvieron una glucosa en ayuno al inicio del protocolo de 332±26 mg/dL, y las sanas con una glucosa de 108±4.85mg/dL ($p<0.001$), posterior a las 4 semanas, en las diabéticas obtuvieron una glucosa de 445±20mg/dL vs las sanas con 97±3 mg/dl ($p<0.001$). En lo que respecta a la liberación espontánea de ACh en la UNM se realizó mediante el registro electrofisiológico de los PMPM, se comparó frecuencia y amplitud, las cuales hacen referencia al estado presináptico y postsináptico de la UNM. Las frecuencias de los PMPM en ratas sanas tuvieron una mediana de 256 con RIC 271, mientras que las diabéticas tuvieron una mediana de 122 con RIC 102, arrojando una mayor frecuencia en las sanas vs diabéticas ($p=0.031$). En lo referente a amplitud, la mediana fue 0.32 RIC 0.12 mV en sanas, mientras que en diabéticas reflejó una mediana de 0.31 RIC 0.14 mV observándose mayor amplitud en las sanas en referencia a las ratas con diabetes ($p=0.01$). Con base en los resultados podemos decir que la liberación espontánea de acetilcolina en la unión neuromuscular en ratas Wistar medida a través de la frecuencia y amplitud de los PMPM es menor en ratas con diabetes en comparación con ratas sanas.

INTRODUCCIÓN

Unión neuromuscular

La unión neuromuscular es el sitio en donde se une la terminal de una motoneurona con la célula muscular, en este sitio se lleva a cabo la transmisión sináptica del potencial de acción mediante la liberación del neurotransmisor acetilcolina desde el botón presináptico hacia el espacio sináptico (Muramatsu, 2020) (Figura 1). La estructura de la UNM la componen la terminal nerviosa (presináptica), la llama terminal motora postsináptica y el área entre la terminal nerviosa y la hendidura sináptica (Pedro M. Rodríguez Cruz, 2020).

La neurona motora al llegar al músculo pierde la vaina de mielina para ramificarse en un complejo de 100 a 200 terminaciones llamadas terminales nerviosas o botones sinápticos. Cada botón sináptico contiene 300,000 vesículas de ACh y cada una de estas almacena 10,000 moléculas de ACh (Omar Abdillahi, 2023). La ACh se libera mediante una serie de sucesos desencadenados con un impulso nervioso que produce la apertura de canales de sodio (Na^+) dependientes de voltaje lo que causa la despolarización de la célula y por ende se abren los canales de calcio (Ca^{2+}) voltaje dependientes lo que aumenta la concentración de Ca^{2+} intracelular, en donde fosforila la proteína sinapsina lo que libera la vesícula de ACh en el citosol (Hall, 2016) (Figura 2).

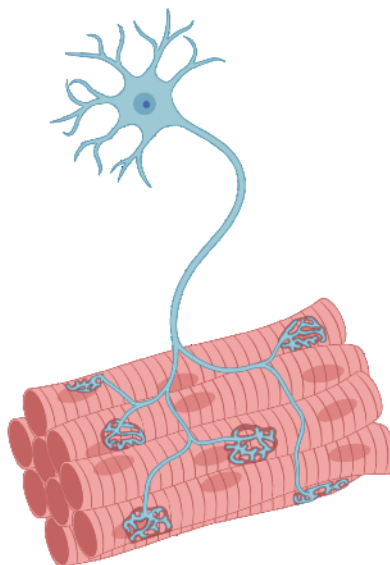


Figura 1. Unión neuromuscular

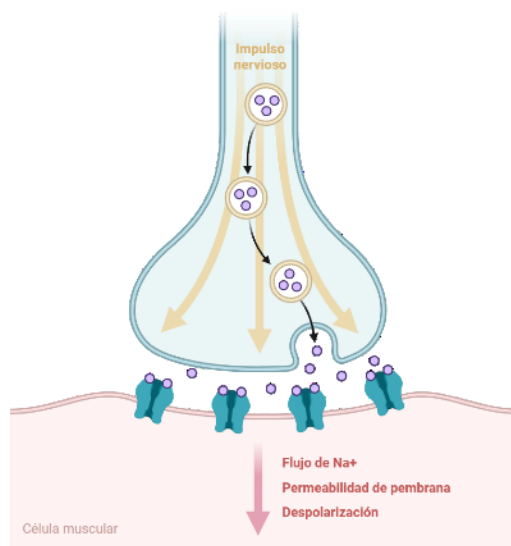


Figura 2. Liberación de acetilcolina

Un potencial de acción es un impulso eléctrico transitorio, rápido y regenerativo en el cual el potencial de membrana pasa de un estado negativo, es decir, con mayor cantidad de aniones en su interior, hacia un estado positivo, debido a la concentración de cationes dentro de la célula.

El potencial de acción tiene 4 fases; 1º el estado de reposo, en donde se tiene un voltaje de -65 mV en una célula muscular en el humano, sin embargo en la rata hablamos de -80 mV debido a que los canales de Na^+ y potasio (K^+) se encuentran cerrados; 2º la despolarización de la célula ocurre siguiendo una ley de “todo o nada”, al entrar Na^+ a la célula con la apertura de los canales de Na^+ , se incrementa la permeabilidad de membrana y si se sobrepasa el umbral de reposo, da lugar a la despolarización; 3º la repolarización se debe al cierre de los canales de Na^+ como mecanismo para frenar la excitación celular y simultáneamente la salida de K^+ de la célula; 4º finalmente al perder cationes la célula vuelve a tener una carga negativa, activándose así la bomba Na^+/K^+ ATPasa (Hall, 2016). Sin embargo, la liberación de ACh no siempre está ligada a un potencial de acción presináptico, una o unas vesículas sinápticas liberan su contenido en ausencia de potenciales de acción presinápticos, es decir de manera espontánea, generando pequeños picos de voltaje en la membrana postsináptica llamados potenciales miniatura de placa motora (PMPM); para el caso de

la unión neuromuscular de rata, estas son pequeñas despolarizaciones de alrededor de 0.4 mV y duran entre 3 y 5 ms (Katz p. F., 1952). Desde su descubrimiento por Fatt y Katz en 1952, los PMPM han demostrado la naturaleza cuantificada de la transmisión neuronal en las sinapsis químicas (Kuffler, 1975) (Del Castillo, 1954) (Katz B. &, 1972).

Además, pueden mostrar el efecto de la activación de un solo tipo de receptor (lo que no siempre es posible cuando se analizan los potenciales de acción completos). Por lo tanto, esclarecer el cómo se produce un PMPM brinda una visión profunda del mecanismo de la señalización eléctrica en el sistema nervioso, es decir, la estructura de la actividad espontánea presináptica en la unión neuromuscular (Bartol TM Jr, 1991). A pesar de que se han trabajado durante muchos años, algunos aspectos de los mecanismos de generación aún no se conocen por completo.

Diabetes y unión neuromuscular

Se ha reportado que la secreción de ACh puede alterarse ante la presencia de algunas situaciones como la DM y el envejecimiento. En la DM se cursa con un estado de hiperglucemia crónica, que lleva a la alteración morfofisiológica de la motoneurona, tales como pérdida de las uniones axogliales, desmielinización, disminución de las vesículas de ACh y de los receptores nicotínicos, denervación, degeneración mitocondrial en los botones sinápticos y del soma, así como re-inervación, mismos cambios que se han observado en el envejecimiento, además de 3 posibles mecanismos; acumulación de especies reactivas de oxígeno, que causan citotoxicidad, debido al aumento de Ca^{+} en la mitocondria debido al aumento en la demanda de ATP y por consiguiente lleva a la denervación y por lo tanto atrofia. Lo anterior lleva a la disminución de la velocidad de conducción nerviosa (Muramatsu, 2020) (Pedro M. Rodríguez Cruz, 2020).

Complicaciones de la diabetes respecto a la unión neuromuscular.

Kabitz, H. et al. en 2008 llevaron a cabo un estudio con pacientes enfermos con DM que tenían dificultad respiratoria (DR) pero no enfermedad pulmonar subyacente y al excluir posibles causas de la DR, la única comorbilidad asociada era la DM. Mediante pruebas electrofisiológicas se llegó a la conclusión de que había una disminución en el grosor del diafragma, que lleva a la debilidad, así mismo a la disminución en la amplitud del nervio frénico y aumento en su latencia, en la histología observaron degeneración axonal, desmielinización y denervación muscular. En ratas además de esto o erraron disminución del diámetro axonal, que se traduce en la disminución de la velocidad de conducción.

De igual forma Wilson & Wright en 2014 reportan que modelos animales han sido utilizados para esclarecer componentes relacionados con la disfunción motora. Uno de estos estudios reporta posterior a las 8 semanas de inducción con estreptozotocina (STZ) en ratas se observó degeneración mitocondrial en la UNM, diferente estricta de las vesículas, además de daño en la membrana sináptica.

Dentro de los antecedentes inmediatos de nuestra línea de investigación, hemos reportado que un modelo de ratas con diabetes inducida por STZ observamos un incremento en la frecuencia y amplitud de potenciales miniatura en comparación con las ratas sanas. (Martínez-Sánchez, y otros, 2024) Sin embargo, consideramos importante revisar a diferentes tiempos de cronicidad de la diabetes si estos cambios se agudizan o mantienen en dependencia del tiempo, por lo anterior se propone analizar la frecuencia de liberación espontánea de ACh medida a través de los PMPM en un modelo de ratas con diabetes.

PARTE EXPERIMENTAL

Animales de experimentación.

Se utilizaron ratas macho Wistar que fueron obtenidas y alojadas en el I bioterio del Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Colima bajo las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio que se indican en la NOM-062-ZOO-1999 y el CIGUAL del CUIB.

Las ratas se mantuvieron con un ciclo circadiano de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad programadas, contaban con ventilación para flujo y salida de aire favoreciendo la circulación del aire,

así como temperatura controlada $23 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad relativa de 40%. Las cajas en donde se alojaron los animales son de piso y paredes sólidas con material de policarbonato y tapa tipo rejilla de aluminio, lo que permite una buena visibilidad de los animales en el interior de las camas. Las cajas fueron limpiadas diariamente asegurando un ambiente óptimo para la rata, el piso de la caja fue cubierto con una capa de 3-5 cm de espesor de viruta de madera previamente esterilizada.

El alimento y el agua fueron administrados a libre demanda. El alimento que se les proporcionó era marca nutricubos de Purina®, el contenido nutrimental cumple con los requerimientos mínimos fijados por la NOM-062-ZOO-1999 para la alimentación de la rata. El agua potable se colocaba en bebederos con chupón para evitar goteo y se hacía cambio de agua y lavado del recipiente de manera diaria.

Inducción a diabetes

Para la inducción a DM las ratas se dejaron en ayuno nocturno para la aplicación de STZ con dosis única de 45 mg/kg de peso vía intraperitoneal (VIP). La STZ se disuelve en buffer de fosfato a pH de 4.5.

Posterior a la inducción con STZ esperamos 7 días para medir la glucosa en ayuno de 8 horas, si la glucosa igual o mayor a 200 mg/dl se consideró como rata diabética. Mientras que las ratas inducidas con STZ que no cumplieron con los parámetros establecidos de glucosa, fueron sacrificadas mediante una sobredosis de pentobarbital. Las ratas sanas control fueron inyectadas sólo con el vehículo (Buffer) y su glucosa en ayuno no debía sobrepasar los 120 mg/dl. (Figura 3)

Glucosa en ayuno

Para la medición de glucosa se optó por una técnica no invasiva que nos permitiera la repetición de la medición sin ocasionar daño grave al animal. Para llevarlo a cabo se tomaba la sangre del extremo distal de la cola de la rata con previa antisepsia con una torunda (algodón con alcohol etílico al 70%), posteriormente se realiza un pequeño corte con tijeras quirúrgicas con previa antisepsia, una vez que se hizo el corte se masajea la cola de proximal a distal para obtener una gota de sangre que es desechada y se repite el masaje para obtener una segunda gota que se deposita por capilaridad en la tira *Accucheck*® que sirve para medir la glucosa en un glucómetro de la misma marca. Cuando se finalizó la toma de muestra, se limpió la sangre con una gasa y se aplicó *Microdacyn*® en el sitio en donde se hizo el corte para prevenir infección del sitio.

Monitoreo de parámetros metabólicos (agua, alimento, orina)

Para recabar datos de parámetros fisiológicos, tales como consumo de alimento, de agua y la diuresis, se metieron las ratas en jaula metabólica, lo que nos permitió medir estos en un recuento de 24 horas en 2 ocasiones; en el primer día y 2 días previos al sacrificio, para comparar los efectos del tratamiento al inicio y el final de este. (Figura 3)

Registros electrofisiológicos.

Una vez transcurridas 4 semanas del tratamiento posterior a la inducción con STZ para el grupo diabético y del vehículo para el grupo control, las ratas se sacrificaron mediante dislocación cervical, método físico elegido debido a que se realizaron registro de PMPM y los derivados barbitúricos pueden alterar la frecuencia del registro. Los residuos biológicos infecciosos fueron desechados de acuerdo con lo establecido en la NOM-087-ECOL-1995.

Una vez sacrificada la rata, se realizó la disección del diafragma de acuerdo con el método reportado por Martínez-Sánchez, y otros, 2024.

Una vez montado el diafragma sobre la caja Petri, se procedió a realizar el registro electrofisiológico con un microelectrodo de vidrio (A-M Systems, USA) con KCl 3M con una resistencia de 10 MΩ. El microelectrodo es conectado a un amplificador AxoClamp serie 2AA, el cual amplifica y registra el potencial de membrana una vez insertado en la UNM, el potencial en reposo debía de ser de -80 mV.

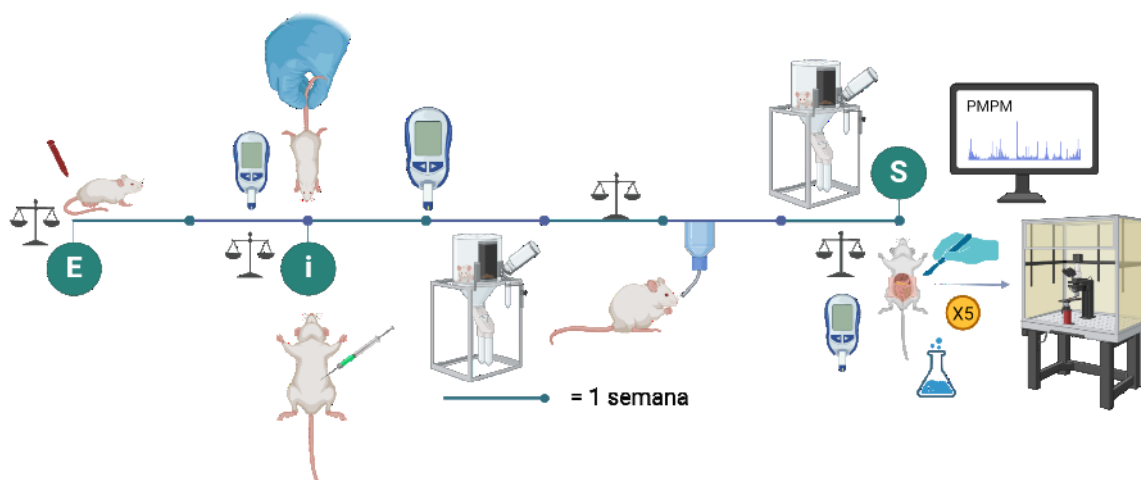


Figura 3. Diagrama de la metodología. El experimento inicia con la entrega de animales, una vez que consiguen el peso requerido (300 ± 50 g), se inducen y a la semana se hace PTGO para revisar el estado de la rata y al día siguiente se mete a caja metabólica. Previo al sacrificio se realiza PTGO, así como se mete a caja metabólica. Al cumplirse 4 semanas las ratas se sacrifican, se extrae el diafragma y se toman los registros electrofisiológicos. E= entrega de animales. I= inducción. S= sacrificio.

- Tamaño de muestra

El cálculo del tamaño de muestra se calculó considerando el diseño del estudio utilizando la ecuación de recursos y la fórmula de Aifirin para incidencias. (Zahiruddin, 2017)

Se consideran 6 ratas por grupo, con un total de 12 ratas Wistar macho para el desarrollo del experimento.

Análisis estadístico

Para las variables cuantitativas se analizó la distribución por grupo con la prueba de Shapiro Wilks, posteriormente se resumieron las variables con estadística descriptiva utilizando la media $\pm$ error estándar o mediana con rango intercuartílico de acuerdo con la distribución de las variables ya sea paramétrica o no paramétrica respectivamente.

Para la estadística inferencial se realizaron comparaciones entre grupos utilizando la t de Student para muestras independientes o la U de Mann Whitney, mientras que para las comparaciones intragrupal se utilizó la t de Student para muestras emparejadas o Wilcoxon de acuerdo con la distribución de las variables. Se considero significativo un valor de $p < 0.05$ con un poder estadístico del 80%.

RESULTADOS

Después de 4 semanas se midieron los registros electrofisiológicos y se cuantificaron los parámetros de glucosa y área bajo la curva al inicio y al final de dicho periodo.

Para corroborar el modelo de diabetes mellitus tipo 2 y además confirmar que no hubo una reversión del mismo, tomamos mediciones de glucosa en ayuno postinducción donde se obtuvo una diferencia entre sanas y diabéticas ($p < 0.001$), la cual se mantuvo al final del experimento. Además, se realizó la comparación intragrupal donde se observó una disminución de la glucosa en el grupo sano al final del experimento ($p = 0.025$) y un incremento en el grupo con diabetes ($p = 0.002$). (Tabla 1)

Se realizó la prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTGO) donde se calculó el área bajo la curva (AUC) obteniendo una diferencia entre sanas y diabéticas, donde el área fue mayor en las ratas con diabetes ($p = 0.005$), esta diferencia también se observó al final del experimento, por lo que en las ratas con diabetes disminuye su capacidad de tolerancia a la glucosa, un mecanismo fisiológico propio de la diabetes.

Tabla 1. Glucosa y Área Bajo la Curva (AUC) inicial y final de ratas sanas y con diabetes.

	Inicial		Final		Valor de p		
					Intragrupal		Intergruparal final
	Sanas	DM	Sanas	DM	Sanas	DM	
Glucosa (mg/dl)	108.3 ± 4.85	332.8 ± 26.48	97.5 ± 3.6	445.0 ± 20.43	0.025	0.002	<0.001
AUC (mg/dl/120 min)*	55508 (55511)	160178 (130774)	48563 (45143)	132750 (151995)	0.02	0.06	0.005

Los datos de la glucosa se representan con la media y el error estándar y para el AUC, es la mediana con rango intercuartílico (RIC). Los valores de p intragrupal fueron con t de Student para muestras relacionadas o Wilcoxon; para las comparaciones intergrupales se utilizó t de Student para muestras independientes o U de Mann Withney. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.
 Nota: AUC: área bajo la curva

Los parámetros electrofisiológicos tomados en cuenta fueron la frecuencia y amplitud de los PMPM.

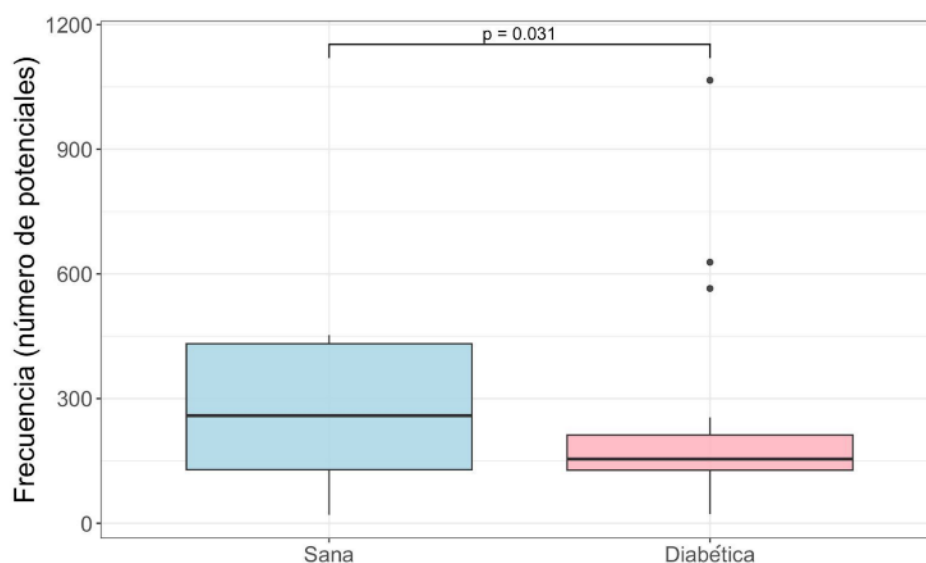


Figura 4. Boxplot de la frecuencia de los PMPM entre ratas sanas y con diabetes. Se considera significativa una $p < 0.05$, test U de Mann Whitney, $n = 6$ por grupo.

En la gráfica 1 se puede observar que la frecuencia de PMPM en ratas diabéticas es significativamente menor ($p < 0.05$) en comparación con las ratas sanas. En cuanto a la amplitud de los PMPM en la gráfica 2 se observa que ésta fue mayor en ratas diabéticas con respecto a las sanas, lo cual apoya nuestra hipótesis de que al existir una diferencia en la dinámica de liberación de ACh entre ratas sanas y con diabetes también habrá diferencias en las frecuencias y amplitudes de los PMPM.

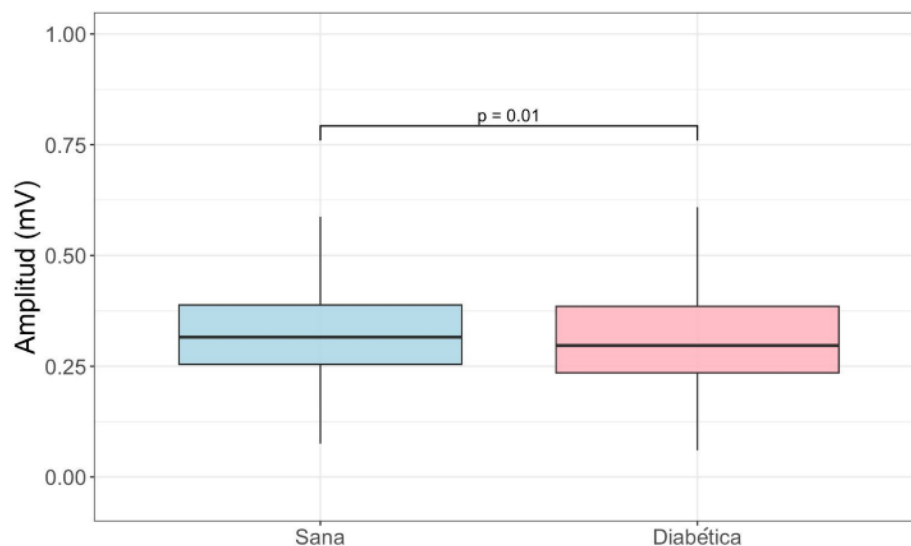


Figura 5. Boxplot de la amplitud de los PMPM entre ratas sanas y con diabetes. Se considera significativa una $p < 0.05$, test U de Mann Whitney, $n = 6$ por grupo.

CONCLUSIONES

En las ratas con diabetes se observa una menor frecuencia de PMPM con respecto a las ratas sanas y una mayor amplitud de PMPM en las ratas con diabetes. Por lo que la dinámica de la liberación espontánea de acetilcolina en la unión neuromuscular es diferente debido a la diabetes.

BIBLIOGRAFÍA

- Bartol TM Jr, L. B. (1991). Monte Carlo simulation of miniature endplate current generation in the vertebrate neuromuscular junction. *Biophys J.*, 1290-1307.
- Del Castillo, J. &. (1954). Quantal components of The end-plate potentia. *The Journal of physiology*, 560-573.
- Giulia Zanetti, S. N. (2018). Electrophysiological Recordings of Evoked End-Plate Potential on. *Bio-protocol*, 8(8).
- Hall, J. E. (2016). *Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica*. España: ELSEVIER.
- Kabitz, H. J. (2008). Diabetic Polyneuropathy si associated with respiratory muscle impairment in type 2 diabetes. *Diabetology*, 191-197.
- Katz, B. &. (1972). The statistical nature of acetylcholine potential and ITS molecular components. *The Journal of physiology*, 665-699.
- Katz, p. F. (1952). Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *Journal of physiology*, 109-128.
- Kuffler, S. W. (1975). The number of transmitter molecules in a quantum: an estimate from iontophoretic application of acetylcholine at the neuromuscular synapse. *The Journal of physiology*, 465.482.
- Martínez-Sánchez, J., Cárdenas, Y., Trujillo, X., Ríos-Silva, M., Díaz-Reval, M., Bricio-Barrios, J., . . . Huerta, M. (2024). Increased Frequency of Giant Miniature End-Plate Potentials at the Neuromuscular Junction in Diabetic Rats. *Blomedicines*, 12,68.
- Medina, M. e. (2008). Histology and Histopathology Ultraestructural study of neuromuscular junction in rectus femoris muscle of streptozotocin-diabetic rats. *Histology and Hitopathology*, 607-610.
- Muramatsu, K. (2020). Diabetes mellitus-related dysfunction of the motor system. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 7485.
- Omar Abdillahi, M. K. (1 de Mayo de 2023). *Physiology, Neuromuscular Junction*. Obtenido de StatPearls: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470413/>

Pedro M. Rodríguez Cruz, J. C. (2020). The Neuromuscular Junction in Health and Disease: Molecular Mechanisms Governing Synaptic Formation and Homeostasis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13:610964.

Sergio Méndez, M. P. (8 de Diciembre de 2011). *Gobierno de México*. Obtenido de Gobierno de México: <https://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/441GER.pdf>

Zahiruddin, W. A. (2017). Sample size calculation in animal studies using resource equation approach. *The Malaysian journal of medical sciences*, 101-105.

CARACTERIZACION DE LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA A PARTIR DE MÉTODOS BIOGÉNICOS EXTRACELULARES CON EL HONGO RHIZOPUS STOLONIFER PARA SU APLICACIÓN EN DESINFECCION

Natyeli Alejandra Ortiz Tirado¹, Alexa Contreras Bañuelos², Luis Alberto Aranda Aguilar², Israel Rodríguez Barrón³, Oscar Manuel Rodríguez¹, Alain Salvador Conejo Davila⁴

¹CIATEC León, ²IBERO León, ³TecNM Tepic, ⁴CIMA Chihuahua.
nortiz.picyt@ciatec.mx

RESUMEN

Los procesos de síntesis convencionales (i.e., químicos y físicos) utilizan productos tóxicos que pueden llegar a general subproductos peligrosos al medio ambiente y metodologías con altos gastos de energía que finalmente los vuelve procesos poco fiables y costosos¹. A partir de ello, se han desarrollado de métodos sustentables entre los cuales han resaltado los métodos de síntesis biogénica, los cuales se basan en utilizar productos naturales (e.g., hongos), que sustituyan a los productos químicos². De los diversos métodos el uso de extractos de hongos ha resaltado debido a que tienen una gran tolerancia a los metales y la capacidad de segregar grandes cantidades de biomoléculas y/o metabolitos extracelulares que reducen las sales metálicas a nanopartículas³, volviéndolo un proceso biocompatible (i.e., no tóxicos). Por ello, se utilizó el hongo *Rhizopus stolonifer* para generar extractos libres de biomasa. Se prepararon soluciones saturadas con el hongo y se dejaron en agitación por 2 a 96h. Posteriormente, se filtró el extracto con bomba de vacío y filtro de membrana con un tamaño de poro de 45 µm. El sobrenadante recolectado se almaceno y se realizó la cuantificación de proteínas y polifenoles. A los extractos producidos, se les añadió una concentración de 1 mM de nitrato de plata y se dejó en incubación a temperatura ambiente de 24 a 48h. Finalmente, las soluciones se analizaron por espectrofotómetro UV-VIS para buscar bandas correspondientes a la formación de nanopartículas de plata. A partir de los experimentos se determinó que, los extractos presentaron rangos de 0.02 a 0.25 mg/mL y 0.51 a 1.60 mg/mL de polifenoles y proteínas, respectivamente, las cuales no fueron dependiente del tiempo. Para la reacción de reducción de plata se confirmo con el cambio de color de la solución y la presencia de una banda ancha alrededor de los 420 nm característica de nanopartículas de plata. Tomando en cuenta ello se concluye que a pesar de que se han utilizado las mismas condiciones para generar los extractos, cada uno reacciona diferente por lo que las concentraciones de polifenoles y proteínas varías y la relación de estas biomoléculas esta relacionada con la producción o no de nanopartículas de plata.

INTRODUCCIÓN

Una alternativa viable para la desinfección ha sido el uso de nanopartículas metálicas, en especial las nanopartículas de plata, oro, cobre, zinc y hierro, ya que con sus propiedades químicas y físicas pueden aplicarse como agentes antimicrobianos³. Además, debido a su mecanismo de inactivación de microorganismos se ha mostrado como una forma viable de evitar subproductos, porque puede actuar por la interacción directa con las células microbianas y generar alteraciones físicas a la membrana celular o productos como especies de oxígeno reactivas o iones metálicos disueltos, que causan daño celular⁴. Sin embargo, los métodos de síntesis de dichas partículas representan un problema ambiental porque, se utilizan productos químicos tóxicos (e.g., hidróxido de sodio, 1-octadeceno, yoduro de germanio (II y IV) y metanol)⁵⁻⁷. Por lo tanto, el desarrollo de métodos biocompatibles como lo es la síntesis biogénica de nanopartículas metálicas (e.g., plata) han resaltado porque eliminan dichas desventajas^{8,9}.

La síntesis biogénica se basa en el uso de agentes biológicos para sintetizar nanopartículas a las cuales se le añaden propiedades como biocompatibilidad, baja toxicidad, aumento de la actividad antibacteriana, antifúngica y de inclusión; así como se ha reportado que se produce una relación entre agentes biológicos de carácter medicinal que aportan las mismas propiedades a las nanopartículas sintetizadas con ellos⁸. Estos procesos pueden desarrollarse a partir de dos

mecanismos; 1) síntesis intracelular, en el cual el precursor del metal se agrega al cultivo micelial y se interna en la biomasa lo que la hace requerir la extracción de las nanopartículas mediante tratamientos químicos, centrifugación y filtración para romper la biomasa y 2) síntesis extracelular, donde el precursor del metal se añade al filtrado acuoso de biomoléculas fúngicas, lo que resulta en la formación de nanopartículas libres en la dispersión^{9,13-17}.

De las diferentes síntesis, la basada en hongos ha sido la más reportada debida a que se dice que es una opción viable en comparación con otros microorganismos como bacterias (e.g., *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus amylophilus*, *Salmonella*)^{10,11}, debido a que los hongos tienen una gran tolerancia a los metales, son fáciles de manipular y cultivar⁸, y tienen la capacidad de segregar grandes cantidades de enzimas extracelulares que reducen las sales metálicas a nanopartículas¹². Por lo que, con el objetivo de caracterizar y analizar el método de síntesis biogénica extracelular, en el presente trabajo se analizara la posible relación entre las biomoléculas o metabolitos segregados por el hongo *R. stolonifer* y la formación de nanopartículas de plata, cuantificando proteínas y polifenoles y caracterizando por diferentes métodos las AgNPs. Posteriormente, se utilizarán las AgNPs para la desinfección de microorganismos.

TEORÍA

Síntesis biogénica de nanopartículas metálicas

La síntesis de nanopartículas mediante métodos biogénicos utilizando materiales biológicos derivados de agentes biológicos (por ejemplo, bacterias, hongos, levaduras, algas o extracto de plantas)^{1, 18-20} que tienen un factor importante en la vía de síntesis, propiedades y aplicaciones de estos nanometales. Los procesos de síntesis biogénica se basan en utilizar productos naturales como polifenoles, vitaminas, aminoácidos, carbohidratos, biopolímeros y tensoactivos naturales de plantas, bacterias, algas, hongos o levaduras¹, que genera nanopartículas cubiertas con biomoléculas derivadas del organismo utilizado y puede llegar a mejorar la estabilidad⁸. Los métodos biogénicos son procesos extra o intra celular²¹. Además, las síntesis biogénicas evitan el uso de productos químicos tóxicos²². Todo ello generando que se muestren como métodos bastante estables²³, con mayor producción y menores costos¹⁸.

Síntesis biogénica a partir de hongos

Los hongos siendo organismos eucariotas que se nutren de materiales orgánicos (heterótrofos), digieren los alimentos externamente y absorben los nutrientes a través de sus paredes celulares. Por ello, los hongos se han reportado como material biológico en la síntesis biogénica de nanopartículas, lo cual ha producido una nueva línea de investigación denominada miconanotecnología²⁴.

La miconanotecnología es la fusión de la micología y la nanotecnología, ya que los hongos resultan mejor agente para la síntesis biogénica que otros microorganismos como bacterias (e.g., *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus amylophilus*, *Salmonella*)⁹, ya que los hongos tienen una gran tolerancia a los metales⁸, son fáciles de manipular y cultivar⁷, y tienen la capacidad de segregar grandes cantidades de enzimas extracelulares que reducen las sales metálicas a nanopartículas²⁴. Además, la síntesis biogénica a partir de hongos puede desarrollarse a partir de dos mecanismos, el intracelular en el cual el precursor del metal se agrega al cultivo micelial y se interna en la biomasa lo que la hace requerir la extracción de las nanopartículas mediante tratamientos químicos, centrifugación y filtración para romper la biomasa. Mientras que en el mecanismo extracelular el precursor del metal se añade al filtro acuoso que contiene solo las biomoléculas fúngicas, lo que resulta en la formación de nanopartículas libres en la dispersión⁸.

Procesos de desinfección utilizando nanopartículas metálicas

Considerando las deficiencias y problemas reportados por los tratamientos de desinfección convencionales, en la última década la búsqueda de nuevas técnicas y tecnologías para la desinfección ha sido de gran interés^{26,1,27}. Investigadores han prestado atención a las nanopartículas metálicas, en especial las nanopartículas de plata, oro, cobre, zinc y hierro, ya que con sus propiedades químicas y físicas pueden aplicarse como agentes antimicrobianos³. Además, debido a su mecanismo de reacción para la inactivación de microorganismos se ha mostrado como una forma

viable de evitar subproductos, esto debido a que puede actuar por interacción directa con las células microbianas y generar alteraciones físicas de la membrana celular o productos como especies de oxígeno reactivas o iones metálicos disueltos, que causan daño celular⁴.

En el caso específico de las nanopartículas de plata sus acciones inhibitorias, se originan debido a que interactúan con proteínas ricas en azufre o fósforo (e.g., membrana celular de bacterianas), inactivando al microorganismo²². Además, el ion de plata interactúa con el fósforo en el ADN y proteínas que contienen azufre, lo que resulta en la inhibición de las actividades de las enzimas²⁷.

PARTE EXPERIMENTAL

Aislamiento y purificación del hongo *R. Stolonifer*

Se aisló el hongo a partir de un fruto enfermo de yaca (*Artocarpus heterophyllus*) en agar papa-dextrosa (PDA) con antibiótico (amperamida) para evitar la contaminación por bacterias y se incubó a temperatura ambiente ($28 \pm 1^\circ \text{C}$). Para su purificación se hizo un seguimiento con microscopio Labomed Lx-400 y se realizaron resiembras cada tercer día hasta observar una cepa pura cada. El hongo aislado se almacena a -40°C con glicerol al 10% para mantener la pureza.

Extracto extracelular del hongo *R. Stolonifer*

Se prepararon los extractos en tubos con tapa Falcon de 50 mL estériles con 45 mL de agua destilada estéril y se saturarán con el hongo *R. Stolonifer* (biomasa), para ello se raspa la superficie del agar sin romper el mismo para lograr extraer la máxima cantidad de biomasa pura y se dejó en agitación por 2, 24, 48, 72 y 96 h. Por último, se filtrarán con milipore de $0.45 \mu\text{m}$ conservando el sobrenadante y se almacena a 4°C . La biomasa recolectada durante la filtración se dejó para peso seco. El filtrado resultante se almacena a 4°C . Los experimentos se hicieron por cuadruplicado.

Síntesis de nanopartículas de plata

Al extracto de hongo (sobrenadante) se le añadió nitrato de plata (AgNO_3) para una concentración final de 1 mM y se dejó en agitación a 120 rpm y temperatura ambiente ($28 \pm 1^\circ \text{C}$) un máximo 72 h, o hasta que se presentó un cambio de color visible. Una vez terminada la síntesis se almacena la muestra en líquido a 4°C . Los experimentos se hicieron por cuadruplicado.

Caracterización

Los extractos fueron caracterizados mediante espectroscopia de infrarroja codificado por transformada de Fourier (FT-IR) Thermo Scientific, NICOLET IS10. Los espectros fueron adquiridos empleando la técnica de atenuación total de reflexión (ATR) con 16 barridos y una resolución de 2 cm^{-1} . Se identificaron y cuantificaron los ácidos carboxílicos por eclosión iónica, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con un equipo Agilent Technologies Serie 1200 acoplado a una columna de análisis de ácidos orgánicos HPLC de Bio-Rad, columna de exclusión iónica Aminex HPX-87H, $300 \text{ mm} \times 7.8 \text{ mm}$ y detector UV a $\lambda=210 \text{ nm}$. La fase móvil fue 4 mM de H_2SO_4 , con un flujo de 0.6 mL min^{-1} . Por último, se determinaron los polifenoles totales y proteínas mediante el método de Folin-Ciocalteu utilizando un espectro de microplacas Thermo Scientific Multiskan SkyHigh a una longitud de onda de 765 nm y el método de Bradford a una longitud de onda de 595 nm respectivamente.

Se le dio seguimiento a la producción de AgNPs mediante un barrido de absorción (200 a 700 nm) utilizando un espectrofotómetro ultravioleta-visible (Thermo scientific, evolution 300 UV-vis). Además, se analizaron las AgNPs sintetizadas por Raman para buscar señales correspondientes a plata mediante Laser-Micro-Raman en un equipo Horiba Jobin Yvon LabRam HR800 con un detector de carga acoplada y un espectrómetro de fibra óptica de red "grating" de 1200 líneas mm^{-1} . En el rango de 100 a 2000 cm^{-1} bajo un objetivo de 100x, con una fuente de excitación de 633 y 785 nm, a una potencia laser de 6mW y un tiempo de exposición de 10 s.

La morfología y composición elemental de las AgNPs se determinó mediante microscopía electrónica JEOL para microanálisis JSM-7610F operando con un voltaje de 2kV y un espectro de energía

dispersiva de rayos X (EDS) acoplado. Y mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) con electrones retrodispersados a bajo vacío con diferentes aumentos.

Cinética de crecimiento y producción de biomasa.

Se realizó la curva de cinética de crecimiento y producción de biomasa del hongo *Rhizopus Stolonifer* para reportar el aumento de la biomasa respecto al tiempo. La cinética de crecimiento se reportó mediante el aumento de diámetro cada 24 h. Para la producción de biomasa se utilizó la técnica de peso seco, donde se recolectó una muestra de hongo en papel filtro en diferentes días de crecimiento y se dejaron secar a 100°C por 24 h. Los experimentos se hicieron por cuadruplicado.

RESULTADOS

Aislamiento y purificación de hongos *R. Stolonifer*

A partir del fruto infectado (figure 1a) se buscó aislar y purificar el hongo *R. Stolonifer*; donde en el primer aislamiento se identificaron dos morfologías (figure 1b); 1) Morfología característica del hongo *R. Stolonifer*, 2) morfología característica del hongo *Aspergillus spp.* Por ello, se procedió a realizar nuevamente el aislamiento hasta obtener una cepa pura (figure 1c-d).

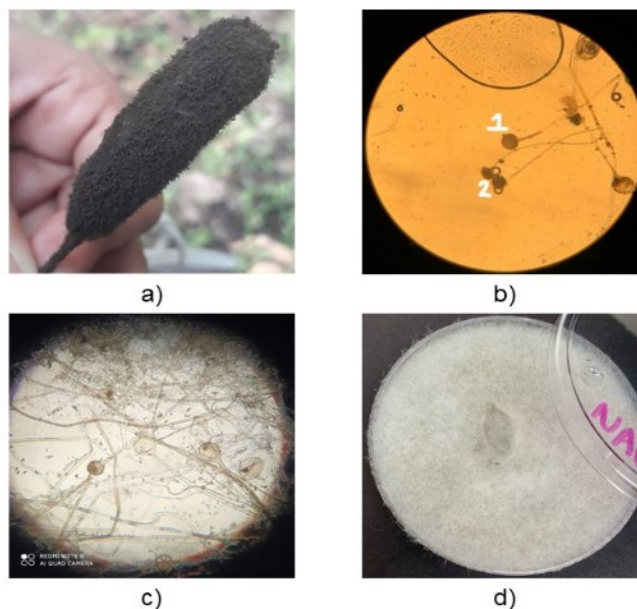


Figura 1. Aislamiento y purificación del hongo *R. Stolonifer*.; a) Fruto de Jaca infectada por hongos, b) Imagen microscópica del primer aislado, c) Imagen microscópica del hongo *R. Stolonifer* puro y d) Placa con *R. Stolonifer* puro

Cinética de crecimiento y masa

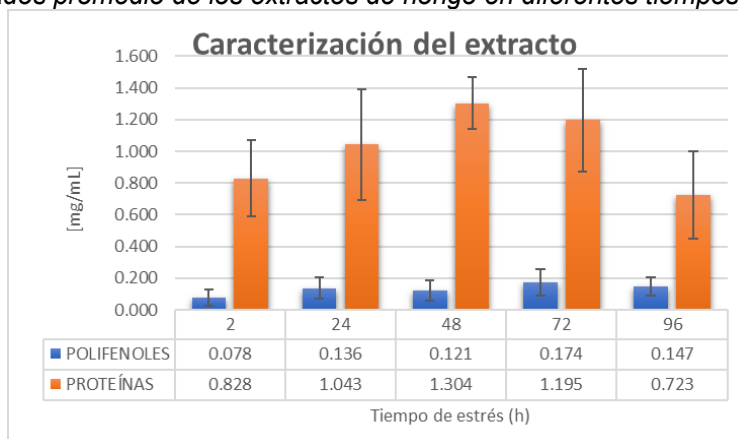
Se midió la cinética de crecimiento del hongo mostrando que alcanza el máximo del diámetro en dos días, por otro lado, la cinética de masa que se realizó a partir del día tres mostró un comportamiento no lineal con respecto del tiempo, reflejando que el hongo tiene una tendencia no lineal. Se reporta un valor inicial como el máximo peso con 0.1805 g en el día tres, el valor decae hasta llegar a un valor mínimo en el día 8 con 0.1210 g, y posteriormente, aumenta en el día 10 con 0.1591 g. Por lo tanto, los extractos realizados se utilizó un hongo con 3 días de crecimiento que es donde se reportó el máximo de biomasa y el crecimiento total del hongo.

Caracterización del extracto

En la gráfica 1 se muestra la cuantificación realizada a los diferentes tiempos justo con sus réplicas de la concentración de polifenoles y proteínas desde las 2 h de agitación hasta las 96 h. La cuantificación mostró diferentes valores entre las réplicas de cada tiempo lo que demuestra la falta de uniformidad pese a que las condiciones fueron las mismas, reflejando una falta de tendencia de

producción de estos dos metabolitos con respecto al tiempo. Esto se puede deber a que cada hongo se comportó como individuo y reaccionó diferente a la agitación por lo que segregó en diferentes concentraciones estos dos metabolitos. Por lo tanto, podemos concluir que las condiciones y el tiempo de agitación en agua destilada estéril no está relacionada con la producción de metabolitos en especial la concentración de polifenoles y proteínas. Por lo tanto, la segregación se relaciona más a la respuesta del hongo hacia la agitación que las condiciones y el tiempo de agitación, con ello podemos observar la complejidad de estandarizar este tipo de proceso.

Grafica 1. Resultados promedio de los extractos de hongo en diferentes tiempos de estrés



Síntesis biogénica de nanopartículas de plata.

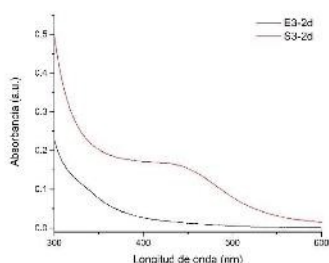
Se añadió AgNO_3 a 5 mL de extracto para una concentración final de 1 mM, y se dejó en agitación a 120 rpm y a temperatura ambiente, transcurridas 24 h se observó un cambio visual de color en algunas muestras como se denota en color verde en la Tabla 2. Por otro lado, se calculó la relación entre las proteínas y los polifenoles, una vez hecha la relación se tomó como base para reordenar las muestras iniciando con el valor más grande hasta el valor más pequeño. Como se observa en la Tabla 2, todos los experimentos que lograron un cambio de color visible tienen una relación (Proteínas/Polifenoles) entre a 8 y 33 presentando una mayor concentración de proteínas con respecto a los polifenoles, el cambio de color revela un rango de relación óptimo para la síntesis de AgNPs. Por lo que la concentración adecuada de proteínas parece mejorar la reacción y podría aumentar la estabilidad de las AgNPs formadas.

Tabla 2. Concentración de polifenoles y proteínas y su relación para la formación de AgNPs.

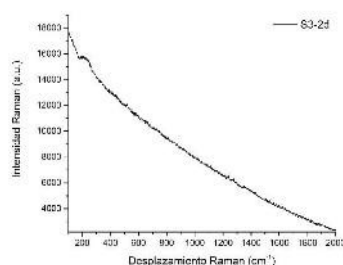
Extracto	[mg/mL]	[mg/mL]	Pro/Pol
	Polifenoles	Proteínas	Relación
S3-2d	0.024	0.788	32.695
S3-48a	0.065	1.476	22.661
S3-2c	0.046	0.943	20.407
S3-48d	0.070	1.271	18.031
S3-24d	0.074	0.863	11.620
S3-72b	0.117	1.270	10.815
S3-2b	0.109	1.069	9.791
S3-72a	0.087	0.856	9.789
S3-24c	0.096	0.879	9.170
S3-96d	0.065	0.580	8.976

Para confirmar la presencia de AgNPs se le hizo un barrido de absorción a todas las muestras utilizando un espectrofotómetro UV-vis. La caracterización por espectroscopia UV-vis es una de las técnicas fundamentales para observar la formación de nanopartículas, esto se debe a que cuando

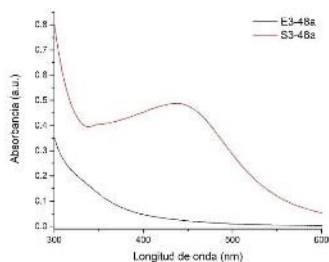
la Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) está presente y a una determinada longitud de onda, alrededor de 400 nm para AgNPs^{17,28}, permite confirmar la presencia de nanopartículas metálicas. En la Figura 2, se reportan los espectros de UV-vis y Raman de 8 experimentos que están dentro el aparente rango viable, los experimentos d-1) S3-48a, f-1) S3-72b y h-1) S3-72a tuvieron un máximo de adsorción alrededor de 450 nm con un área bajo la curva de 6.6078, 0.2601 y 1.8684 respectivamente. El espectro con mayor área bajo la curva fue la muestra c-1) S3-2c con 14.8593 y reporta un máximo de absorción en 434 nm. Se dice que existe una dependencia entre la intensidad de la señales y la morfología y tamaño de la nanopartícula metálica, Sin embargo, en el caso de las sintetizadas con microorganismos se han hecho algunas otras suposiciones: El máximo de absorción depende de la especie estudiada y de las proteínas o metabolitos presentes³. Esto puede dificultar llegar la predicción del tamaño y forma utilizando los espectro UV-vis por la interferencia de los compuestos orgánicos presentes en las nanopartículas sintetizadas con microorganismos ya que mayormente se reporta un máximo de absorción alrededor de los 420 nm, pero las morfologías y tamaños son diferentes^{15,29,30}, lo que aumenta la complejidad de estandarizar la biosíntesis y la necesidad de hacer caracterizaciones específicas para evaluar el tamaño, la morfología y la dispersión de las nanopartículas sintetizadas biogenicamente.



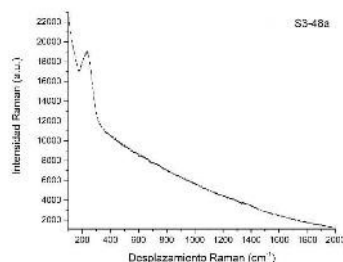
a-1)



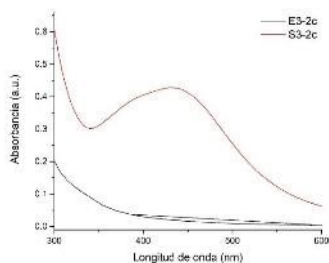
a-2)



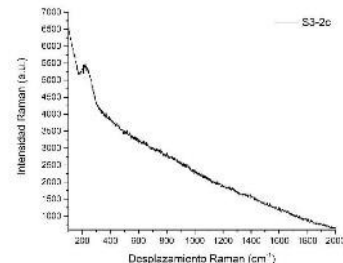
b-1)



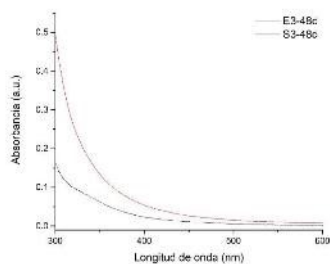
b-2)



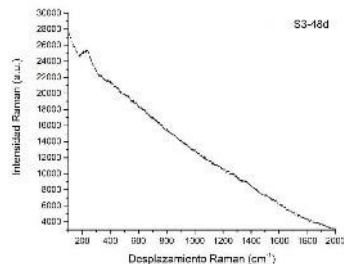
c-1)



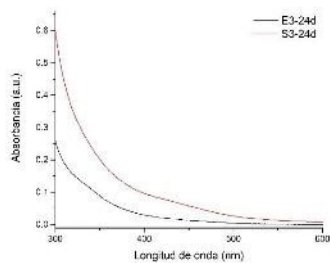
c-2)



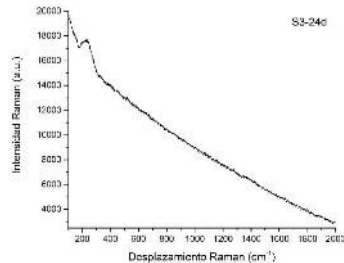
d-1)



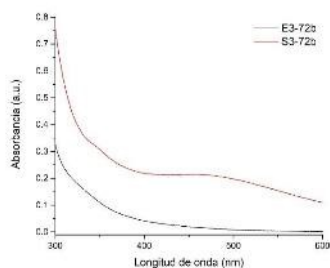
d-2)



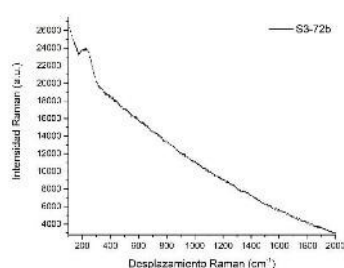
e-1)



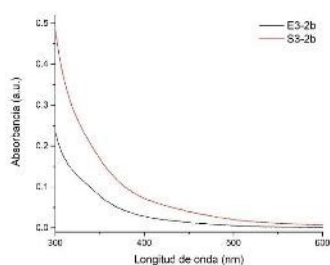
e-2)



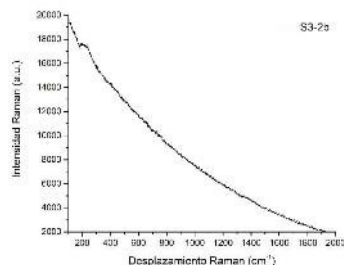
f-1)



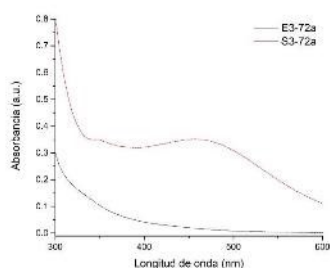
f-2)



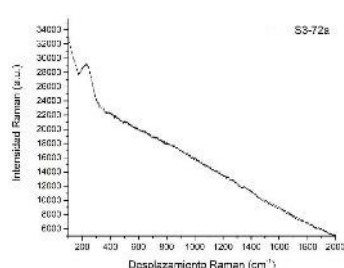
g-1)



g-2)



h-1)



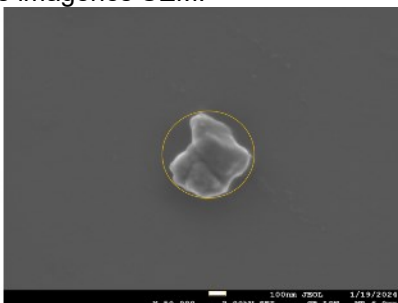
h-2)

Figura 2. Espectros de UV- vis y Raman de la síntesis biogénica de nanopartículas de plata.

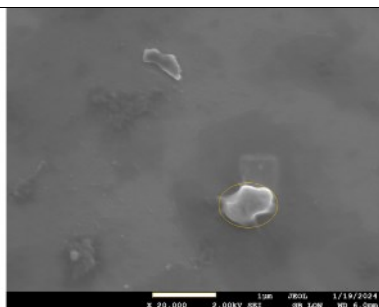
Otros experimentos como d-1) S3-48d, e-1) S3-24d, g-1) S3-2b pese a estar dentro del rango, solo la muestra S3-24d mostro un cambio de color visible sin embargo ninguno de los tres experimentos presento señales en los espectros UV-vis lo que indica falta de presencia de AgNps. Sin embargo, en la Figura 2 también se presentan los 8 espectros de Raman realizados a las muestras dentro de rango, donde todos los experimentos muestran una señal alrededor de 230 cm^{-1} relacionada a la presencia de Ag-O (óxidos de plata)³¹, que se atribuye a la formación de nanopartículas ayudando a confirmar lo observado en los espectros UV-vis, a excepción del experimento S3-24d que pese a presentar el cambio de color, no presenta ninguna señal que indiquen la formación de AgNPs, pero si presenta una señal en 228 cm^{-1} relacionada a la formación de AgNPs, confirmando que existe una interferencia por la materia orgánica derivada del *R. Stolonifer* que impide visualizar una señal clara en los espectros de UV-vis sin interferir en los espectros de Raman para la confirmación de la formación de AgNPs.

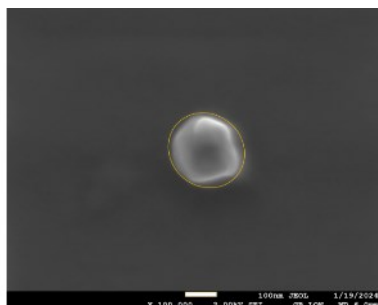
En la figura 3 se muestran las imágenes SEM realizadas a algunas muestras, la imágenes muestran tamaños promedio de 522, 807 y 234 nm de las muestras a) S3-48a, b) S3-48d y c) S3-24d respectivamente. El tamaño más grande reportado de partícula de plata fue de 807 nm corresponde al experimento S3-48d que no presento señal de absorción en el espectro UV-vis (Fig. 2, d-1) S3-48d) pero si una señal en Raman en 235 cm^{-1} , indicando que, si se sintetizaron partículas de plata, pero no a escala nano por lo que no se observa señal en el espectro UV-vis. Así mismo la muestra S3-24d que si presento cambio de color muestra un tamaño de 234 nm, y una señal en Raman de 228 cm^{-1} , sin presentar señales en el espectro UV-vis (Fig. 2, e-1) S3-24d) en cambio el experimento S3-48a que tiene un tamaño promedio de 522 nm, si presento un máximo de absorción en 452 nm en el espectro UV-vis (Fig. 2, b-1) S3-48a), con todo ello podemos concluir que no todas las reacciones se logró la escala nano por lo observado en los espectros UV-vis de la Figura 2 produciendo partículas más grandes que pueden ser igualmente detectadas por el cambio visual de color, el espectro de Raman y las imágenes SEM.

a) E3-48a



b) S3-48d

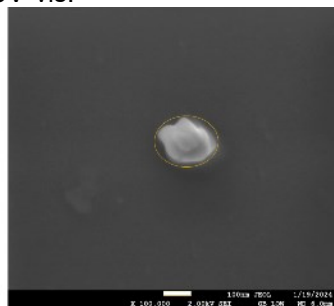




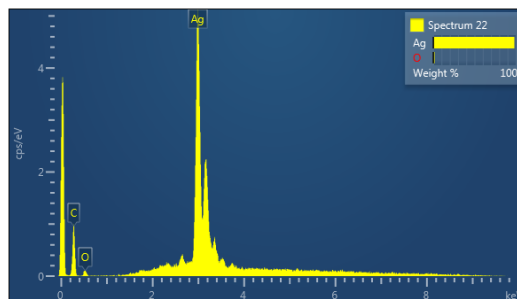
c) S3-24d

Figura 3. Imágenes SEM de la síntesis biogénica de nanopartículas de plata.

La última caracterización realizada fue el EDS, como se muestra en la Figura 4, donde podemos observar porcentajes de 3.97, 94.52 y 1.52 de C, Ag y O respectivamente de la muestra S3-72a, lo que confirma la presencia de materia orgánica por el carbón presente y la presencia de Ag-O por la formación de nanopartículas de plata. Además, presento un máximo de adsorción del espectro UV-vis en 453 nm, una señal de Raman en 233 cm^{-1} (Fig. 2, h-1) y h-2) respectivamente), que confirman una vez más la formación de AgNPs, sin embargo, el tamaño promedio fue de 191 nm sugiriendo una vez más la interferencia de la materia orgánica en la variación del tamaño de partícula impidiendo hacer un correcto seguimiento por UV-vis.



a) Imagen SEM



b) EDS

 Figura 4. a) Imagen SEM y b) Resultados de EDS de la muestra S3-72^a

CONCLUSIONES

Se determinó que, los extractos preparados con el hongo *R. stolonifer* presentan rangos de 0.02 a 0.25 mg mL^{-1} de polifenoles y rangos de 0.51 a 1.60 mg mL^{-1} de proteínas que no fueron dependiente del tiempo, a su vez la formación de nanopartículas de plata se confirmó con el cambio de color de la solución, la presencia en algunos experimentos de una banda ancha alrededor de los 450 nm en los espectros de UV-vis característico de nanopartículas de plata y la presencia de una señal de Raman alrededor de los 230 cm^{-1} . Además, los tamaños observados en las imágenes SEM son entre 800 y 900 nm y se observa la presencia de carbón y oxígeno en la muestra analizada por EDS que sugiere la presencia de materia orgánica adherida a las nanopartículas de plata, modificando su tamaño, morfología y su absorción. Dicho esto, se llegó a la conclusión que para

futuros experimentos y para la estandarización del método se debe tener en cuenta el rango de relación observado (de 8 a 33 veces más concentración de proteínas con respecto a los polifenoles) por lo que es necesario modificar la metodología enfocada en el rastreo de polifenoles y proteínas o cualquier otro metabolito cuantificable y evaluando las relaciones de estos para asegurar la formación de AgNPs. Además, se realizarán los experimentos de sensibilidad contra *E. coli* principalmente para evaluar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata biogenicamente sintetizadas utilizando el hongo *R. stolonifer*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bandala, E. R., Stanisić, D., & Tasić, L. (2020). Biogenic nanomaterials for photocatalytic degradation and water disinfection: a review. *Environmental Science*, 6(12), 3195-3213. <https://doi.org/10.1039/d0ew00705f>
2. Naganthran, A., Verasoundarapandian, G., Khalid, F. E., Masarudin, M. J., Zulkharnain, A., Nawawi, N. M., Karim, M., Abdullah, C. A. C., & Ahmad, S. A. (2022). Synthesis, Characterization and Biomedical Application of Silver Nanoparticles. *Materials*, 15(2), 427. <https://doi.org/10.3390/ma15020427>
3. Cunha, F. A., Da C S o Cunha, M., Da Frota, S. M., Mallmann, E. J. J., Freire, T. M., Da Costa, L. S., Paula, A. J., Menezes, E. A., & Fachine, P. B. A. (2018). Biogenic synthesis of multifunctional silver nanoparticles from *Rhodotorula glutinis* and *Rhodotorula mucilaginosa*: antifungal, catalytic and cytotoxicity activities. *World Journal Of Microbiology & Biotechnology*, 34(9). <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2514-8>
4. Al-Issai, L.; Elshorbagy, W.; Maraqa, M. A.; Hamouda, M.; Soliman, A. M. Use of Nanoparticles for the Disinfection of Desalinatedwater. *Water (Switzerland)* 2019, 11 (3). <https://doi.org/10.3390/w11030559>.
5. Lanje, A. S.; Sharma, S. J.; Pode, R. B. Sythesis of Silver Nanoparticles: A Safer Alterative to Conventional Antimicrobial and Antibacterial Agents. 2010, No. January.
6. Muthuswamy, E.; Iskandar, A. S.; Amador, M. M.; Kauzlarich, S. M. Facile Synthesis of Germanium Nanoparticles with Size Control: Microwave versus Conventional Heating. *Chemistry of Materials* 2013, 25 (8), 1416–1422. <https://doi.org/10.1021/cm302229b>.
7. Adeeyo, A. O.; Odiyo, J. O. Biogenic Synthesis of Silver Nanoparticle from Mushroom Exopolysaccharides and Its Potentials in Water Purification. *Open Chemistry Journal* 2018, 5 (1), 64–75. <https://doi.org/10.2174/1874842201805010064>.
8. Guilger-Casagrande, M.; Lima, R. de. Synthesis of Silver Nanoparticles Mediated by Fungi: A Review. *Front Bioeng Biotechnol* 2019, 7 (October), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00287>.
9. Dhami, N. K.; Reddy, M. S.; Mukherjee, A. Bacillus Megaterium Mediated Mineralization of Calcium Carbonate as Biogenic Surface Treatment of Green Building Materials. *World J Microbiol Biotechnol* 2013, 29 (12), 2397–2406. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1408-z>.
10. Menon, S.; S., R.; S., V. K. A Review on Biogenic Synthesis of Gold Nanoparticles, Characterization, and Its Applications. *Resource-Efficient Technologies* 2017, 3 (4), 516–527. <https://doi.org/10.1016/j.reffit.2017.08.002>.
11. Joshi, C. G.; Danagoudar, A.; Poyya, J.; Kudva, A. K.; BL, D. Biogenic Synthesis of Gold Nanoparticles by Marine Endophytic Fungus-Cladosporium Cladosporioides Isolated from Seaweed and Evaluation of Their Antioxidant and Antimicrobial Properties. *Process Biochemistry* 2017, 63, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.09.008>.
12. Mughal, B.; Zaidi, S. Z. J.; Zhang, X.; Hassan, S. U. Biogenic Nanoparticles: Synthesis, Characterisation and Applications. *Applied Sciences (Switzerland)* 2021, 11 (6). <https://doi.org/10.3390/app11062598>.
13. K. AbdelRahim, S.Y. Mahmoud, A.M. Ali, K.S. Almaary, A.E.Z.M.A. Mustafa, S.M. Husseiny, Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Rhizopus stolonifer*, *Saudi J Biol Sci* 24 (2017) 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.025>.
14. M.S. Tufail, I. Liaqat, S. Andleeb, S. Naseem, U. Zafar, A. Sadiqa, I. Liaqat, N.M. Ali, A. Bibi, N. Arshad, G. Saleem, Biogenic Synthesis, Characterization and Antibacterial Properties of Silver Nanoparticles against Human Pathogens, *J Oleo Sci* 71 (2022) 257–265. <https://doi.org/10.5650/jos.ess21291>.

15. A.M. Al-Dbass, S. Al Daihan, A.A. Al-Nasser, L.S. Al-Suhaibani, J. Almusallam, B.I. Alnwisser, S. Saloum, R.S. Alotaibi, L.A. Alessa, R.S. Bhat, Biogenic Silver Nanoparticles from Two Varieties of *Agaricus bisporus* and Their Antibacterial Activity, *Molecules* 27 (2022). <https://doi.org/10.3390/molecules27217656>.
16. S.H. El-Moslami, Bioprocessing strategies for cost-effective large-scale biogenic synthesis of nano-MgO from endophytic *Streptomyces coelicolor* strain E72 as an anti-multidrug-resistant pathogens agent, *Sci Rep* 8 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22134-x>.
17. Bai, R. G., Muthoosamy, K., Shipton, F. N., Pandikumar, A., Rameshkumar, P., Huang, N. M., & Manickam, S. (2016). The biogenic synthesis of a reduced graphene oxide–silver (RGO–Ag) nanocomposite and its dual applications as an antibacterial agent and cancer biomarker sensor. *RSC Advances*, 6(43), 36576–36587. <https://doi.org/10.1039/c6ra02928k>
18. Durán, N., Marcato, P. D., Durán, M., Yadav, A., Gade, A., & Rai, M. (2011). Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(5), 1609–1624. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3249-8>
19. Irfan, M., Moniruzzaman, M., Ahmad, T., Mandal, P. C., Bhattacharjee, S., & Abdullah, B. (2017). Ionic liquid based extraction of flavonoids from *Elaeis guineensis* leaves and their applications for gold nanoparticles synthesis. *Journal of Molecular Liquids*, 241, 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.05.151>
20. Joshi, N. C., & Prakash, Y. (2019). LEAVES EXTRACT-BASED BIOGENIC SYNTHESIS OF CUPRIC OXIDE NANOPARTICLES, CHARACTERIZATIONS, AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY. 12. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2019.v12i8.34182>
21. Batool, S., Hussain, Z., Niazi, M. B. K., Liaqat, U., & Afzal, M. (2019). Biogenic synthesis of silver nanoparticles and evaluation of physical and antimicrobial properties of Ag/PVA/starch nanocomposites hydrogel membranes for wound dressing application. *Journal Of Drug Delivery Science And Technology*, 52, 403–414. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.05.016>
22. Brahmachari, G., Sarkar, S., Ghosh, R., Barman, S., Mandal, N. C., Jash, S. K., Banerjee, B., & Roy, R. (2014). Sunlight-induced rapid and efficient biogenic synthesis of silver nanoparticles using aqueous leaf extract of *Ocimum sanctum* Linn. with enhanced antibacterial activity. *Organic and Medicinal Chemistry Letters*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s13588-014-0018-6>
23. Harshiny, M., Iswarya, C. N., & Matheswaran, M. (2015). Biogenic synthesis of iron nanoparticles using *Amaranthus dubius* leaf extract as a reducing agent. *Powder Technology*, 286, 744–749. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.09.021>
24. Joshi, C. G., Danagoudar, A., Poyya, J., Kudva, A. K., & BL, D. (2017). Biogenic synthesis of gold nanoparticles by marine endophytic fungus-*Cladosporium cladosporioides* isolated from seaweed and evaluation of their antioxidant and antimicrobial properties. *Process Biochemistry*, 63, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.09.008>
25. Dhami, N. K., Reddy, M. S., & Mukherjee, A. (2013). *Bacillus megaterium* mediated mineralization of calcium carbonate as biogenic surface treatment of green building materials. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(12), 2397–2406. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1408-z>
26. Abdel-raouf, M. E., Maysour, N. E., & Farag, R. K. (2019). *International Journal of Environment & Agricultural Science Wastewater Treatment Methodologies*, Review Article. 3(1), 1–25.
27. Deshmukh, S. P., Patil, S. M., Mullani, S. B., & Delekar, S. D. (2019). Silver nanoparticles as an effective disinfectant: A review. *Materials Science and Engineering C*, 97(December), 954–965. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.102>
28. Eze, F. N., & Nwabor, O. F. (2020b). Valorization of *Pichia* spent medium via one-pot synthesis of biocompatible silver nanoparticles with potent antioxidant, antimicrobial, tyrosinase inhibitory and reusable catalytic activities. *Materials Science & Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors And Systems*, 115, 111104. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111104>
29. Wypij, M., Czarnecka, J., Świecimska, M., Dahm, H., Rai, M., & Golińska, P. (2018c). Synthesis, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of biogenic silver nanoparticles synthesized from *Streptomyces xinghaiensis* OF1 strain. *World Journal*

- Of Microbiology & Biotechnology Incorporating The MIRCEN Journal Of Applied Microbiology And Biotechnology/World Journal Of Microbiology & Biotechnology, 34(2). <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2406-3>
30. Salem, S. S., Ali, O. M., Reyad, A. M., Abd-Elsalam, K. A., & Hashem, A. H. (2022). Pseudomonas indica-Mediated Silver Nanoparticles: Antifungal and Antioxidant Biogenic Tool for Suppressing Mucormycosis Fungi. Journal Of Fungi, 8(2), 126. <https://doi.org/10.3390/jof8020126>
31. Joshi, N., Jain, N., Pathak, A., Singh, J., Prasad, R., & Upadhyaya, C. P. (2018). Biosynthesis of silver nanoparticles using Carissa carandas berries and its potential antibacterial activities. Journal Of Sol-gel Science And Technology, 86(3), 682-689. <https://doi.org/10.1007/s10971-018-4666-2>

ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD MOLECULAR PARA EL ÁCIDO PIRÚVICO POR EXPOSICIÓN A RADIACIÓN IONIZANTE CON RELEVANCIA EN EVOLUCIÓN QUÍMICA

Mariana Orduña Martínez¹; Luisa Ramírez Vázquez ²; Alicia Negrón Mendoza ²; Carlos Ríos Martínez¹; Consuelo Letechipía de León¹

¹Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Estudio Nucleares, Calle Antigua Carretera A La Bufa No. Sn, Colonia Fracc. Lomas Del Patrocinio, CP 98066, Zacatecas, Zacatecas.

²Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito exterior S/N, Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México.

ordunamartinez1996@gmail.com

RESUMEN

Lo que se ha establecido como "Evolución química", va desde el periodo posterior de formación de la Tierra hasta el surgimiento de las primeras sustancias químicas de diferentes grados de complejidad sobre la superficie terrestre, que aún no se podían denominar seres vivos (Calvin). En la Tierra primitiva, algunos de los compuestos orgánicos, como el ácido pirúvico, fueron generados en la atmósfera, océanos y la superficie terrestre, probablemente como resultado de reacciones químicas en un ambiente de exposición a diferentes energías. Esta molécula perteneciente al grupo de los cetoácidos, ha desempeñado un papel significativo en el desarrollo y evolución de la vida. Por lo anterior, su presencia pudo haber proporcionado un punto de partida para la formación de moléculas más complejas, incluidos los aminoácidos, los bloques de construcción de las proteínas, y otros compuestos orgánicos considerados para el origen de la vida. En el presente trabajo, se evaluó la estabilidad del ácido pirúvico expuesto a radiación gamma. La molécula de ácido pirúvico en medio acuoso a una concentración de 0.1 mol L⁻¹ se expuso a radiación gamma mediante una fuente de ⁶⁰Co en un gamma beam PT651 ubicado en el Instituto de Ciencias Nucleares (UNAM). Las dosis de exposición fueron 10,30, 36.5, 60, 73 y 146 kGy. Después, fue evaluado el porcentaje de estabilidad de la molécula mediante la técnica HPLC-UV. Como resultado, la molécula de estudio demostró ser inestable al ser expuesta a radiación en una dosis de 73kGy al descomponerse en un 50%. Estos datos representan información significativa sobre los cetoácidos; en la literatura no ha sido reportada la presencia de ácido pirúvico posterior a ser expuesta a ese tipo de fuentes de energía.

INTRODUCCIÓN

La relevancia del ácido pirúvico para este periodo radica en ser una molécula abundante en el registro geológico de meteoritos como lo es en ALH83102, Murchinson, Murray (Cooper et al.; Pizzarello); además, es bien conocida por su participación en la respiración celular, principalmente como producto de la glucólisis, así como en la etapa anterior al Ciclo de Krebs (Zimmerman et al.); finalmente, los ácidos carboxílicos son trazadores moleculares de la astroquímica del medio interestelar, y bio-marcadores e intermediarios entre los aminoácidos y las proteínas (Saladino et al.; Schildlowski).

Las reacciones de compuestos más complejos pudieron haberse dado por diferentes fuentes de energía. Una de las energías utilizadas, posiblemente fue la radiación ionizante, principalmente es considerada, por el tiempo de vida media de los núclidos ⁴⁰K, ²³⁸U y ²³²Th, esta energía pudo haber sido un recurso abundante para la Tierra primitiva. Por lo que la exposición de moléculas de interés prebiótico frente a energía ionizante, ofrece un panorama acerca de uno de los objetivos de la Evolución química, particularmente, de la Química prebiótica, como lo es la estabilidad de compuestos, pues nos permite conocer si son moléculas resistentes en las condiciones propuestas para este periodo, y los posibles productos obtenidos con base en sus reacciones y su implicación en los orígenes de la vida.

TEORÍA

Evolución Química

En la escala de tiempo, como se puede observar en la adaptación de la Figura 1, porque las reacciones de interés en Química prebiótica y la predeterminación de condiciones experimentales, son alusivos a un periodo que abarca entre los 4.2 mil millones de años a ~4 mil millones de años (Becerra et al.; Cohen, K.M., Finney, S.C., Gibbard, P.L. & Fan, J.-X.). Así, determinar a detalle cómo ocurrieron las reacciones de interés en química prebiótica, ha sido complicado. Por lo anterior, se han propuesto cuatro variables que pueden ser importantes para el estudio de la Tierra primitiva: La primera, la atmósfera; segunda, disponibilidad de masas aéreas; tercera, propiedades de masas de agua primitiva que podrían afectar la química acuosa; cuarta, temperaturas (Cleaves); quinta, las fuentes de energía (Negrón-Mendoza et al.).

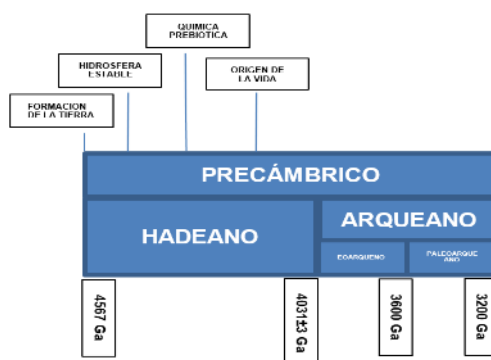


Figura 1. Adaptación de Becerra *et al*, 2007; y de la Tabla cronostratigráfica internacional, Cohen et al, 2023.

Fuentes de energía

Sumado a lo anterior, una parte fundamental acerca de las fuentes de energía como recurso en la formación de la Tierra, se ha establecido que la presencia de los radionúclidos primarios (^{238}U , ^{235}U , ^{232}Th y ^{40}K), se distribuyeron de manera no uniforme en su interior donde se concentraron principalmente en la corteza terrestre. Además la presencia de estos elementos tuvo un impacto significativo, como la generación de calor interno a través de la desintegración radiactiva (Garzón y Garzón).

Ambientes de agua

Se sabe que los ambientes ideales fueron diversos sistemas acuáticos, ya que, estos albergan entornos físicos, químicos y geológicos donde la síntesis abiótica posiblemente tuvo lugar (Colín-García., et al; Zaikowski et al.). El agua fue de importancia en la síntesis de moléculas orgánicas. Los océanos posiblemente protegieron a las moléculas orgánicas de la radiación ultravioleta masiva (Cleaves y Miller).

Experimentalmente, la radiólisis del agua fundamenta el principio para entender la formación de moléculas orgánicas a partir de inorgánicas; porque al formarse radicales, estos sufrieron una sucesión de reacciones en cadena y reacciones de terminación al recombinarse; todo esto, por la liberación de la energía como consecuencia de la desintegración de los radioisótopos (Ershov).

Acido pirúvico

Por otra parte, el ácido pirúvico, es una molécula altamente distribuida como un metabolito intermediario en la naturaleza, puesto que es una unidad de construcción para muchos compuestos de origen biológico. Además, en el registro geológico, se ha reportado su presencia en meteoritos como el ALH83102, Murchinson y Murray (Cooper et al.). Es importante reiterar que al ser un ácido carboxílico se caracteriza por ser trazador molecular con aplicación de la astroquímica del medio interestelar, y biomarcador e intermediario entre los aminoácidos y las proteínas (Pizzarello; Schildowski)

PARTE EXPERIMENTAL

Se prepararon tres disoluciones a 0.1 M con un pH natural de ~6.63, en tubos de cultivo se agregaron alícuotas de 7mL, antes de irradiar. Estas, libres de oxígeno sustituido con argón para simular una atmósfera anóxica, por 5 minutos cada muestra. Las muestras se expusieron a radiación gamma en una fuente de ^{60}Co (Gamma beam PT651, Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM), a 10 kGy, 30 kGy, 36.5 kGy, 60 kGy, 73 kGy y 146 kGy. Figura 2.

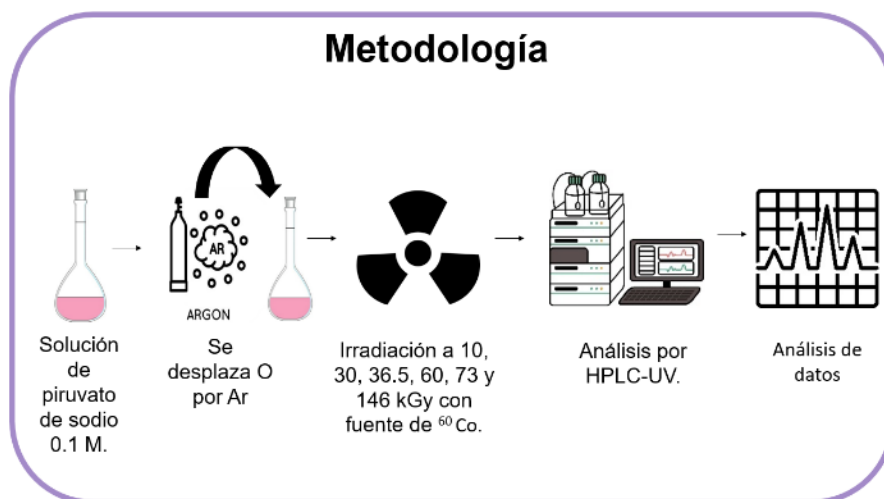


Figura 2. Desarrollo experimental

RESULTADOS

En la Figura 3, se observa que conforme aumenta las dosis de radiación se ve comprometida la estabilidad de la molécula, pero en un porcentaje mínimo. A dosis de radiación de 10 kGy es estable un 80%, la dosis más alta de irradiación en este experimento (146 kGy), se destruye completamente. Lo que indica que es una molécula bastante estable a dosis relativamente altas de radiación.

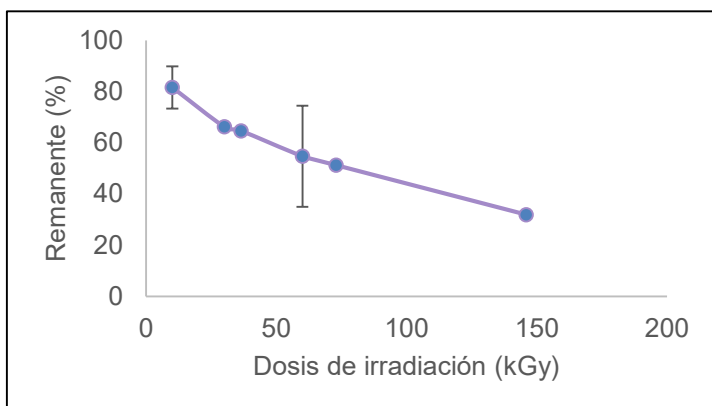


Figura 3. Porcentaje de recuperación de ácido pirúvico en diferentes dosis de radiación.

La Figura 4 muestra una deformación del pico a los 73 kGy respecto a la dosis inicial de 10 kGy y la dosis final, 146 kGy. Lo que se puede observar es una notoria formación de compuestos nuevos a medida que aumenta la dosis de radiación.

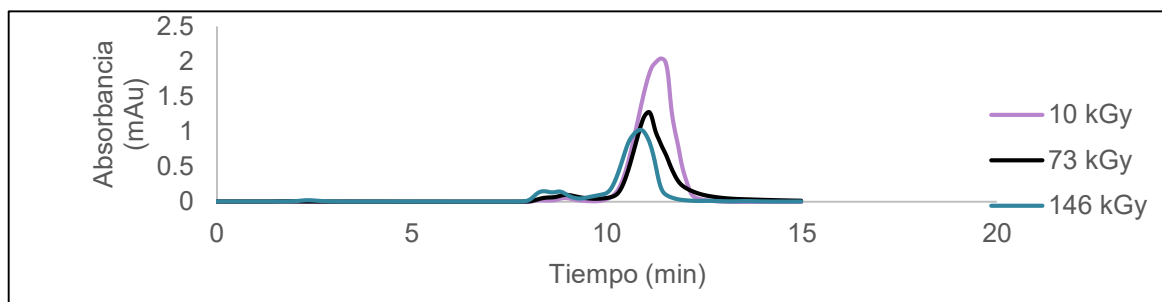


Figura 4. Cromatograma de ácido pirúvico a 10,73 y 146 kGy analizado por HPLC-UV.

Como fuente de energía en la Tierra primitiva, se consideran los radioisótopos ^{238}U , ^{232}Th y ^{40}K , ya que tienen un tiempo de vida media largo (10^9 años). Como se observa en la Figura 3, la intensidad de dosis del agua oceánica, hace ~ 3.8 Ga publicada es de 2.5×10^{-4} Gy/a (^{40}K), 1.42×10^{-6} Gy/a (^{238}U), y 1.98×10^{-9} Gy/a (^{232}Th), (Mosqueira et al.).

Material	^{40}K	^{238}U	^{232}Th
Roca ígnea			
Ultrabásica	2.7×10^{-5}	4.73×10^{-7}	3.95×10^{-7}
Basáltica	5.7×10^{-3}	4.73×10^{-4}	3.95×10^{-4}
Granítica			
Alto con en Ca	1.73×10^{-2}	1.42×10^{-3}	8.4×10^{-4}
Pobre en Ca	2.89×10^{-2}	1.42×10^{-3}	1.68×10^{-3}
Sientia	3.30×10^{-2}	1.42×10^{-3}	1.28×10^{-3}
Roca sedimentaria			
Lutita	1.83×10^{-2}	1.75×10^{-3}	1.18×10^{-3}
Arenisca	7.3×10^{-3}	2.13×10^{-4}	1.68×10^{-4}
Caliza	1.8×10^{-3}	1.04×10^{-3}	1.68×10^{-4}
Sedimentos de océanos profundo			
Caliza	2.0×10^{-3}		
Arcillas	1.75×10^{-2}	6.1×10^{-4}	6.9×10^{-4}
Aguas oceánicas	2.5×10^{-4}	1.42×10^{-6}	1.98×10^{-9}

Figura 3. Adaptación de Mosqueira *et al*, 1996. Dosis estimada anual en (Gy/a) hace 3.8×10^9 años de la corteza terrestre.

Consideradas las dosis de irradiación a las que se expuso el ácido pirúvico en el sistema, se puede estimar en tiempo la permanencia del compuesto (Ec. 2), en la Figura 5, se expone la coincidencia con el tiempo desde los inicios de la Tierra primitiva (4.5 Ga), así como puntualmente, el periodo de Química prebiótica (~4.2-3.8 Ga), (Becerra et al.). Según la ley de decaimiento radiactivo (Ec.1). Donde D_0 es el la dosis de irradiación, t es el tiempo transcurrido, y λ es la constante de decaimiento del elemento, o bien, el $\ln 2$ sobre el $t_{1/2}$ del radioisótopo.

$$(Ec.1) \quad D = D_0 \cdot e^{-\lambda t}$$

Despejando t (Ec.2)

$$t = \frac{\left(\ln \frac{D}{D_0} \right) t_2^1}{\ln 2}$$

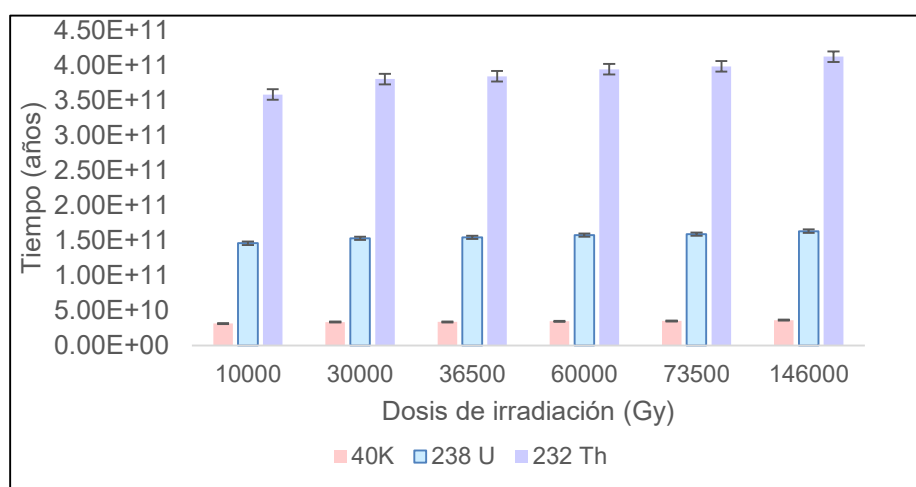


Figura 5. Comparación de tiempo en la Tierra a distintas dosis de irradiación del ácido pirúvico por núclidos ²³⁸U, ²³²Th y ⁴⁰K.

CONCLUSIONES

La propuesta hecha para cada radioisótopo a las dosis de radiación propuesta en el proyecto demuestra que el ácido pirúvico es una molécula muy estable a dosis de irradiación altas, lo que indicaría que es una molécula, que en un ambiente probable de la Tierra primitiva, estuviera presente un largo tiempo en altos campos de radiación.

BIBLIOGRAFÍA

- Becerra, Arturo, et al. «The Very Early Stages of Biological Evolution and the Nature of the Last Common Ancestor of the Three Major Cell Domains». *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, vol. 38, n.º 1, diciembre de 2007, pp. 361-79. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095825>.
- Calvin. *Chemical evolution and the origin of life*. n.º 3, 1956, pp. 248-63, <http://www.jstor.org/stable/27826801>.
- Cleaves, H. James, y Stanley L. Miller. «Oceanic Protection of Prebiotic Organic Compounds from UV Radiation». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 95, n.º 13, junio de 1998, pp. 7260-63. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1073/pnas.95.13.7260>.

- Cleaves, Henderson. «Prebiotic Chemistry: Geochemical Context and Reaction Screening». *Life*, vol. 3, n.º 2, abril de 2013, pp. 331-45. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.3390/life3020331>.
- Cohen, K.M., Finney, S.C., Gibbard, P.L. & Fan, J.-X. «International Chronostratigraphic Chart». *The ICS International Chronostratigraphic Chart. Episodes* 36: 199-204., 2023, <https://stratigraphy.org/ICSchart/ChronostratChart2023-09.pdf>.
- Colín-García., et al. «Hydrothermal vents and prebiotic chemistry: a review.» *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, vol. 68, n.º 3, 2016, pp. 599-620, http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-33222016000300599&lng=es&tlng=en.
- Cooper, George, et al. «Detection and Formation Scenario of Citric Acid, Pyruvic Acid, and Other Possible Metabolism Precursors in Carbonaceous Meteorites». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, n.º 34, agosto de 2011, pp. 14015-20. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1073/pnas.1105715108>.
- Ershov, Boris. «Natural Radioactivity and Chemical Evolution on the Early Earth: Prebiotic Chemistry and Oxygenation». *Molecules*, vol. 27, n.º 23, diciembre de 2022, p. 8584. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.3390/molecules27238584>.
- Garzón, León, y M. Luisa Garzón. «Radioactivity as a Significant Energy Source in Prebiotic Synthesis». *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, vol. 31, n.º 1/2, 2001, pp. 3-13. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1023/A:1006664230212>.
- Mosqueira, F. G., et al. «A Review of Conditions Affecting the Radiolysis Due to 40K on Nucleic Acid Bases and Their Derivatives Adsorbed on Clay Minerals: Implications in Prebiotic Chemistry». *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, vol. 26, n.º 1, febrero de 1996, pp. 75-94. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1007/BF01808161>.
- Negrón-Mendoza, A., et al. «Applications of Radio and Radiation Chemistry to Chemical Evolution Studies». *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry Articles*, vol. 124, n.º 2, octubre de 1988, pp. 281-88. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1007/BF02041321>.
- Pizzarello, Sandra. «Question 2: Why Astrobiology?» *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, vol. 37, n.º 4-5, octubre de 2007, pp. 341-44. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1007/s11084-007-9076-3>.
- Saladino, Raffaele, et al. «Meteorites as Catalysts for Prebiotic Chemistry». *Chemistry – A European Journal*, vol. 19, n.º 50, diciembre de 2013, pp. 16916-22. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1002/chem.201303690>.
- Schildowski. «THE BEGINNINGS OF LIFE ON EARTH: EVIDENCE FROM THE GEOLOGICAL RECORD». *The Chemistry of Life's Origins*, vol. 146, 1993, file:///C:/Users/Mariana%20Ordu%C3%B1a%20Mtz/Downloads/978-94-011-1936-8.pdf.
- Zaikowski, Lori, et al., editores. *Chemical Evolution II: From the Origins of Life to Modern Society*. American Chemical Society, 2010. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1021/bk-2009-1025>.
- Zimmerman, Jerry J., et al. «Cellular Respiration». *Pediatric Critical Care*, Elsevier, 2011, pp. 1058-72. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-07307-3.10074-6>.

SINTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS CARBONILADOS DE RE(I) CON LIGANTES FLUORESCENTES NITROGENADOS

María Obdulia Sánchez Guadarrama¹, Juan Saúl Victoriano Figueroa¹, José Luis Gárate Morales¹, Armando Cortés-Lozada¹ y Noé Zúñiga Villarreal²

¹Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, ² Universidad Nacional Autónoma de México
obdulia.sanchez@correo.buap.mx

RESUMEN

Los carbonilos metálicos son compuestos muy importantes en la química organometálica; existe gran variedad de compuestos estables tanto mononucleares como dinucleares. Una característica en cuanto a la reactividad de estos compuestos son las reacciones de sustitución de ligantes carbonilos que pueden experimentar, dependiendo de las características y efectos de la propia molécula (por ejemplo, los efectos *cis* y *trans*). Las moléculas con átomos que tienen pares de electrones disponibles pueden actuar como ligantes, entre ellos las aminas, las cuales son ligantes comunes. Los complejos de Re(I) que contienen tres ligantes carbonilo en la disposición facial han tomado relevancia gracias a sus propiedades luminiscentes para ser empleados como marcadores celulares, pero también se ha estudiado su comportamiento como anticancerígenos, antibacteriales e inclusive como catalizadores.[1,2] En este trabajo se presenta la síntesis de dos ligantes de tipo amina derivados del antraceno y de picolilamina, así como sus respectivos compuestos organometálicos con renio.

Los resultados obtenidos hasta la fecha en la que se escribe este trabajo incluyen la obtención de los dos ligantes en su estado puro; confirmado mediante estudios de espectroscopía de RMN, así como la caracterización por pruebas fisicoquímicas (punto de fusión, solubilidad). Los ligantes obtenidos son moléculas orgánicas que contienen al policiclo antraceno en su estructura y dos o tres átomos de nitrógeno, denominados L1 y L2, respectivamente; capaces de donar sus electrones para unirse a un centro metálico.

Para ambos ligantes se han obtenido los respectivos compuestos organometálicos utilizando técnicas de síntesis en condiciones de atmósfera inerte; obteniendo en ambos casos el producto en forma sólida. El estudio mediante RMN de ¹H permite la discusión acerca de la nuclearidad de los compuestos mientras que la técnica de IR proporciona información sobre la disposición que adopta el ligante al unirse al centro metálico. Además, uno de los ligantes ha mostrado características de luminiscencia al ser irradiado con una longitud de onda de 254 nm, tanto en estado sólido como en disolución. La conclusión general es la obtención de dos compuestos organometálicos estables en condiciones normales de presión y temperatura haciendo uso de dos ligantes polidentados, tales compuestos se caracterizaron mediante espectroscopías de IR y RMN.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos de coordinación y organometálicos tienen aplicaciones muy variadas, por ejemplo, un metalofármaco empleado en el tratamiento del cáncer es la solución inyectable de cisplatino o carboplatino (compuestos de coordinación), se trata de compuestos que actúan mediante su unión con el ADN para causar la muerte programada de las células. No solamente los compuestos de coordinación han mostrado efectividad en el tratamiento de este padecimiento: variedad de complejos organometálicos han sido estudiados como candidatos al tratamiento de diferentes tipos de cáncer. En este mismo tema los compuestos carbonilados de renio han ganado interés en años recientes debido a su estabilidad, diversidad estructural y propiedades espectroscópicas. [2,3] Recientemente en el año 2019, C. Konkankit y colaboradores publicaron un estudio *in vivo* de un complejo tricarbonilado de renio(I) como agente anticancerígeno. También han sido estudiados los complejos de renio (I) como posibles fotosensibilizadores en los tratamientos de terapia fotodinámica contra el cáncer; un tratamiento en el cual la luz visible activa a una molécula (fotosensibilizador)

para generar especies reactivas, como aquellas de oxígeno (ROS), para causar daño celular a las células con cáncer. [3] Se han descrito gran variedad de compuestos que contienen el fragmento $\text{fac- [Re(CO)}_3\text{]}^+$ con ligantes que contienen átomos de fósforo, oxígeno, nitrógeno y otros.[4] Los ligantes

bidentados del tipo N,N han tomado relevancia en la comunidad científica, principalmente los sistemas de tipo bipyridina y fenantrolina, se han explorado gran variedad de complejos de este tipo.[3, 5, 6]. No solamente los ligantes con átomos de nitrógeno en heterociclos han sido investigados sino también nitrógenos formando parte de iminas y aminas.[7] Ejemplos de los complejos mencionados anteriormente se ilustran en la Figura 1.

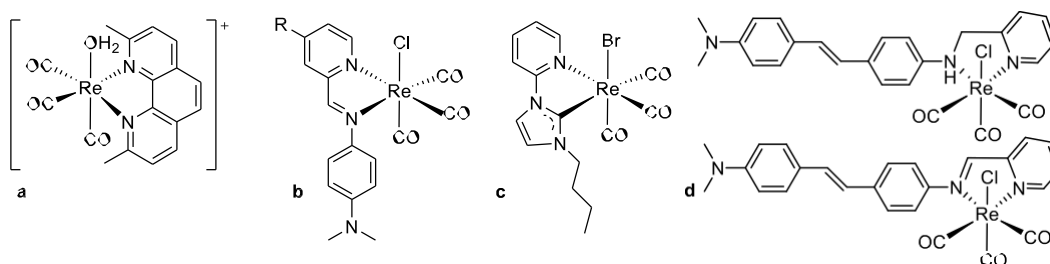


Figura 1. Ejemplos de complejos con actividad anticancerígena (a, b, c) y de complejos que emplean ligantes tipo imina y amina (d)

No solamente existen reportes de complejos mononucleares, un ejemplo de compuestos dinucleares con el fragmento Re(CO)_3^+ en disposición *fac* son los estudiados por Wang y colaboradores en el año 2019 quienes demostraron con estudios *in vivo* que compuestos con la estructura general mostrada en la **Figura 2** presentan actividad citotóxica contra células con cáncer, actuando principalmente mediante una vía de estrés oxidativo y ocasionando la muerte celular.[8]

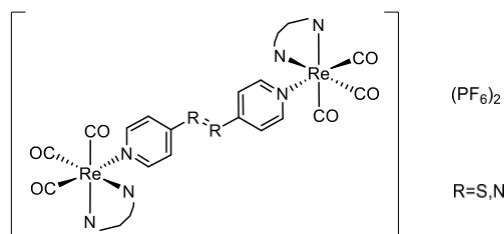
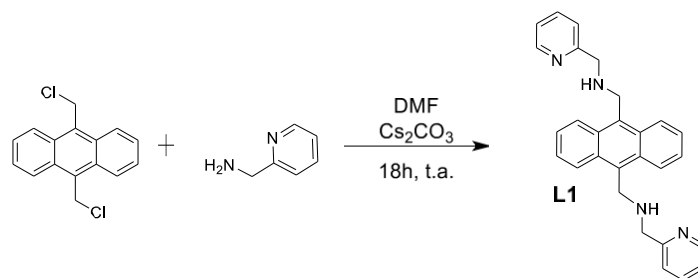


Figura 2. Ejemplo de un compuesto dinuclear con actividad anticancerígena

Por lo que se ha mencionado anteriormente, la búsqueda de nuevos compuestos de renio(I) que puedan llegar a presentar aplicaciones interesantes como posibles metalofármacos; agentes de diagnóstico e inclusive en otras áreas de la ciencia aprovechando las posibles propiedades luminiscentes se presenta como un área de oportunidad para el diseño de ligantes, el establecimiento de métodos de síntesis y purificación, así como la caracterización de diferentes compuestos organometálicos de este tipo. En el presente trabajo se muestra la síntesis de dos ligantes y sus respectivos compuestos organometálicos de la forma $[\text{Re}_2(\text{CO})_6\text{LCl}]$ en donde L es un ligante polidentado capaz de coordinarse al renio en dos sitios equivalentes de la molécula y empleando dos átomos de nitrógeno como átomos donadores, la caracterización principal se ha realizado mediante resonancia magnética nuclear de ¹H y espectroscopía de infrarrojo.

PARTE EXPERIMENTAL

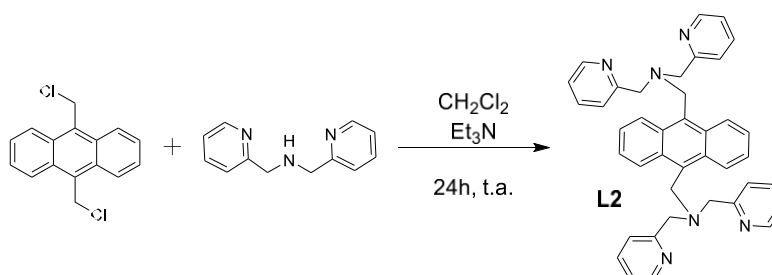
Obtención de L1



El ligante denominado **L1** fue obtenido colocando 300mg (1.1 mmol) de 9,10-bis(clorometil)antraceno y 0.71g (2.18 mmol) de Cs_2CO_3 en un matraz de 25mL, a continuación, se agregaron 8mL de dimetilformamida y se mantuvo en agitación durante 30 minutos, a esta mezcla fue agregada gota a gota 0.449mL (4.35 mmol) de picolilamina. La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 18 horas, tiempo en el cual se observó el consumo de la materia prima derivada del antraceno. La reacción se filtró utilizando un embudo con disco de vidrio sinterizado y una capa de celita, la celita se lavó dos veces con 15mL de acetato de etilo y se juntaron las disoluciones.

En un embudo de separación se realizaron múltiples lavados de la fase orgánica con agua destilada para retirar la dimetilformamida de la reacción, a la fase acuosa se le realizaron dos extracciones con 15mL de acetato de etilo y finalmente se juntaron las fases orgánicas, a la fase orgánica total se le retiró el residuo de agua lavándola con 2 x 10mL de solución saturada de NaCl, posteriormente la fase orgánica se secó empleando Na_2SO_4 , fue filtrada y concentrada en el rotavapor. El resultado es un semisólido color naranja, el cual fue lavado con varias porciones de acetato de etilo frío para dar un sólido color amarillo brillante. El sólido amarillo se analizó por espectroscopía de RMN de ^1H y ^{13}C , confirmando la presencia del producto deseado: p.f = 109-111°C.

Obtención del L2



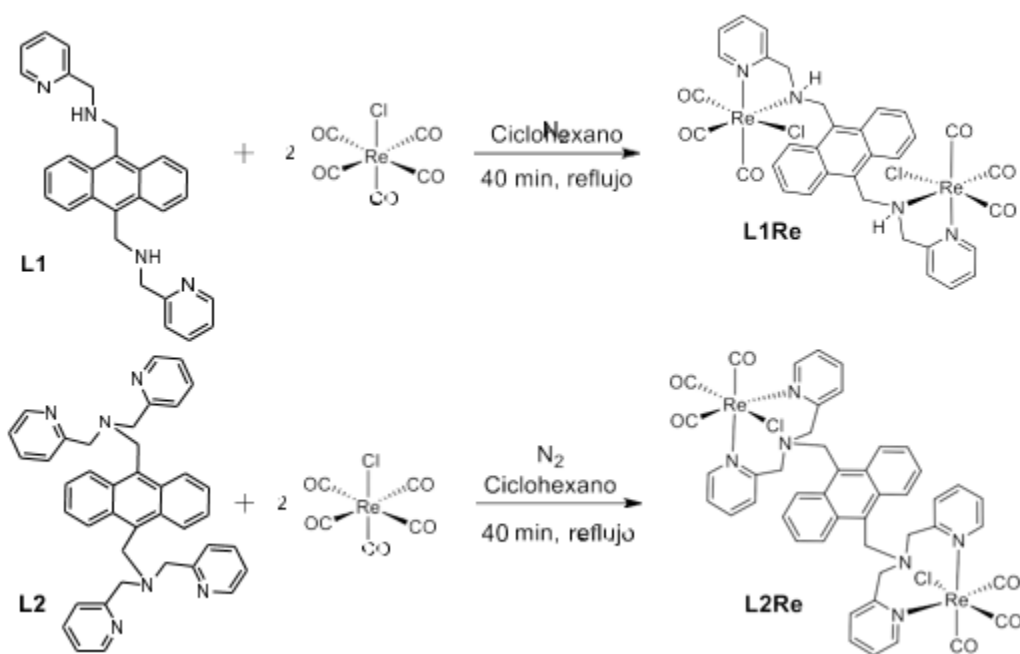
La síntesis de **L2** se llevó a cabo colocando 200mg (0.726 mmol) de 9,10-bis(clorometil)antraceno en un matraz de 50mL, se añadieron 20mL de diclorometano y se mantuvo en agitación unos minutos. Al matraz que contenía al compuesto solubilizado parcialmente se agregaron 0.2mL (1.45 mmol) de trietilamina y se conservó la agitación durante treinta minutos.

Transcurrido el tiempo, fueron añadidos gota a gota 0.261mL (1.45 mmol) de Di-(2-picolil)amina, la mezcla se mantuvo en agitación toda la noche hasta el siguiente día cuando se observó el consumo total del reactivo limitante. La mezcla de reacción fue filtrada con algodón y se agregaron 10mL de diclorometano. La disolución fue colocada en un embudo de separación y lavada 2 veces

con 15mL de agua destilada con el objetivo de retirar sales y la trietilamina residual, la fase acuosa fue desechada. Posteriormente, se retiró el residuo de agua lavando la fase orgánica con 2 x 10mL de solución saturada de NaCl, se secó empleando, fue filtrada y se permitió la evaporación lenta del disolvente. Al evaporarse completamente el disolvente se observó la formación de cristales color ámbar, los cuales fueron recolectados y lavados con la mínima cantidad de CHCl_3 frío.

La purificación se llevó a cabo mediante recrystalización empleando la mezcla de disolventes $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{C}_6\text{H}_{14}$; en un matraz Erlenmeyer se colocaron los cristales y se empleó la mínima cantidad de CH_2Cl_2 para disolverlos, la disolución se llevó a ebullición. En ebullición, se agregó suficiente hexano para formar una disolución con turbidez e inmediatamente se añadió una cantidad mínima de diclorometano para volver traslúcida de disolución; se esperó a que el sistema alcanzara su punto de ebullición, momento en el cual se pasó el matraz a un baño de hielo, los cristales color amarillo resultantes fueron filtrados y lavados con hexano frío. El análisis por espectroscopía de RMN de ^1H y ^{13}C de los cristales confirmó la obtención del producto deseado: p.f = 193-195°C.

Obtención de los complejos organometálicos



Las reacciones para la obtención de los complejos organometálicos se realizaron en un matraz con salida lateral de 100mL, en el que se añadieron 30 mg (0.083 mmol) de $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}]$ y la cantidad equivalente del ligante (14.5mg (0.037 mmol) para L1) y (24.9mg (0.041 mmol) para L2) el matraz con las materias primas sólidas se conectó a un tubo refrigerante y el sistema fue purgado mediante tres ciclos de vacío/nitrógeno durante 1 minuto cada uno haciendo uso de la línea de Schlenk. Manteniendo las condiciones de atmósfera inerte se agregaron 30mL de hexano seco para llevar la mezcla a reflujo.

El seguimiento de la reacción se realizó mediante cromatografía en capa fina, los tiempos de reacción se determinaron de acuerdo con el tiempo en que se consumió el reactivo limitante. Una vez concluido el tiempo de reacción, se detuvo la agitación y calentamiento y se permitió la

precipitación del producto. Empleando la técnica de canulación se retiró la fase líquida del matraz la cual se colocó en un matraz Schlenk previamente purgado. El sólido resultante se analizó por espectroscopía de RMN de ^1H para obtener el respectivo espectro del crudo de reacción; a partir del cual se confirmó la presencia de los productos.

RESULTADOS

El análisis de los compuestos mediante espectroscopia de RMN fue de gran importancia para la elucidación de las estructuras de las moléculas, los espectros de ^1H y ^{13}C de los ligantes se presentan y discuten a continuación. Asimismo, el análisis mediante esta espectroscopía, específicamente RMN de ^1H , permitió proponer una estructura posible para los complejos organometálicos, lo cual se discute en este mismo apartado. Todos los espectros se presentan con la señal residual del disolvente referenciada en 7.260ppm para RMN- ^1H y 77.16 ppm para RMN- ^{13}C .

Ligante 1

El espectro de RMN de ^1H para L1 se ilustra en la **Figura 3**. Debido a la simetría de la molécula, el análisis y asignación de las señales se ha realizado solamente para la mitad de los protones totales y la integración se ha dejado de tal forma que se obtenga el número total correspondiente. En el espectro se observan un total de ocho señales asignables a cada uno de los hidrógenos de la molécula. En la zona de frecuencias más altas, se observan dos señales simples correspondientes a hidrógenos unidos a carbonos con hibridación sp^3 y cercanos a un átomo electronegativo; la primera señal aparece en 4.17ppm y se ha asignado a H_4 , la segunda señal se observa en 4.753 ppm y corresponde a H_3 , la asignación de las señales se ha confirmado con lo reportado en la bibliografía.^[15]

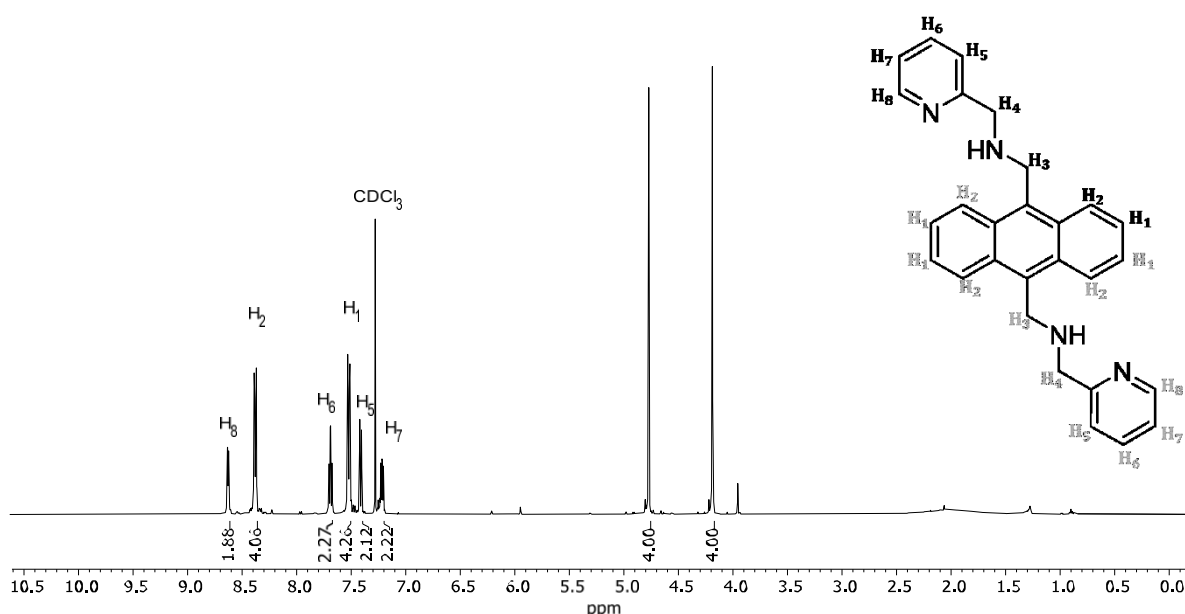


Figura 3. Espectro RMN de ^1H , 500 MHz del ligante L1.

En la zona de hidrógenos aromáticos, en el intervalo de 7.0 a 8.8ppm se presenta un conjunto de seis señales: dos de ellas corresponden a los hidrógenos del anillo de antraceno y las otras cuatro al anillo de piridina. La expansión de las señales en esta zona se muestra en la **Figura 4**. La primera señal aromática se encuentra en 7.197ppm y tiene una multiplicidad de doble de dobles (dd), la integración es para dos hidrógenos que corresponden a los dos H_7 de la molécula. El valor de las

constantes de acoplamiento son 4.8 Hz para $^3J_{H7-H8}$ y 7.4 Hz para $^3J_{H7-H6}$ ambos valores están en conformidad con los respectivos acoplamientos en las posiciones *o*- de un anillo de piridina.^[17]

La siguiente señal aromática es una señal doble (*d*) con un desplazamiento químico de 7.393 ppm, la integración es para dos hidrógenos y se ha asignado a H₅, la respectiva constante de acoplamiento es $^3J_{H7-H8} = 7.9\text{Hz}$. A continuación, se observa una señal con multiplicidad doble de dobles (*dd*) en 7.502ppm, el valor de la integral es para 4 hidrógenos por lo que deberá corresponder a hidrógenos unidos al sistema de anillos de antraceno, específicamente a H₁. El valor de las dos constantes de acoplamiento para esta señal son $^3J_{H1-H2}$ (*orto*) = 6.85Hz y $^4J_{H1-H2}$ (*meta*) = 3.2Hz. La señal ubicada en 7.670ppm tiene una multiplicidad triple de dobles (*td*) y se ha asignado a H₆, la multiplicidad de esta señal se explica debido al valor similar que presentan las constantes de acoplamiento $^3J_{H6-H7}$ y $^3J_{H6-H5}$, es decir; la multiplicidad esperada (doble de doble de dobles) tiene dos valores muy similares en las constantes de acoplamiento para los hidrógenos en las posiciones *orto*, el valor de la constante más pequeña es, por lo tanto, la correspondiente a un acoplamiento con un hidrógeno en posición *meta* respecto a H₆, los valores de las constantes de acoplamiento son: $^3J_{H6-H7} \approx ^3J_{H6-H5} = 7.6\text{ Hz}$ y $^4J_{H6-H8} = 1.8\text{ Hz}$.

La señal ubicada en 8.360 ppm es muy similar a la ubicada en 7.502 ppm y corresponde por lo tanto a H₂, la relación entre estas dos señales se observa perfectamente con el valor de sus constantes de acoplamiento, el valor aproximado de la constante mayor y la coincidencia numérica de la constante menor nos indican el acoplamiento entre los núcleos de H₁ y H₂; $^3J_{H2-H1}$ (*orto*) = 6.9 Hz y $^4J_{H2-H1}$ (*meta*) = 3.2 Hz. La señal con el valor más grande de desplazamiento químico es una señal con multiplicidad doble (*d*) ubicada en 8.610 ppm, la integración nos da un valor aproximado a dos hidrógenos y se asignó al hidrogeno más cercano al átomo de nitrógeno del heterociclo (H₈), la constante tiene un valor de $^3J_{H8-H7} = 4.85$, valor comparable con el de la señal *dd* ubicada en 7.197 ppm y que deja en evidencia la relación entre estas señales y su correcta asignación.

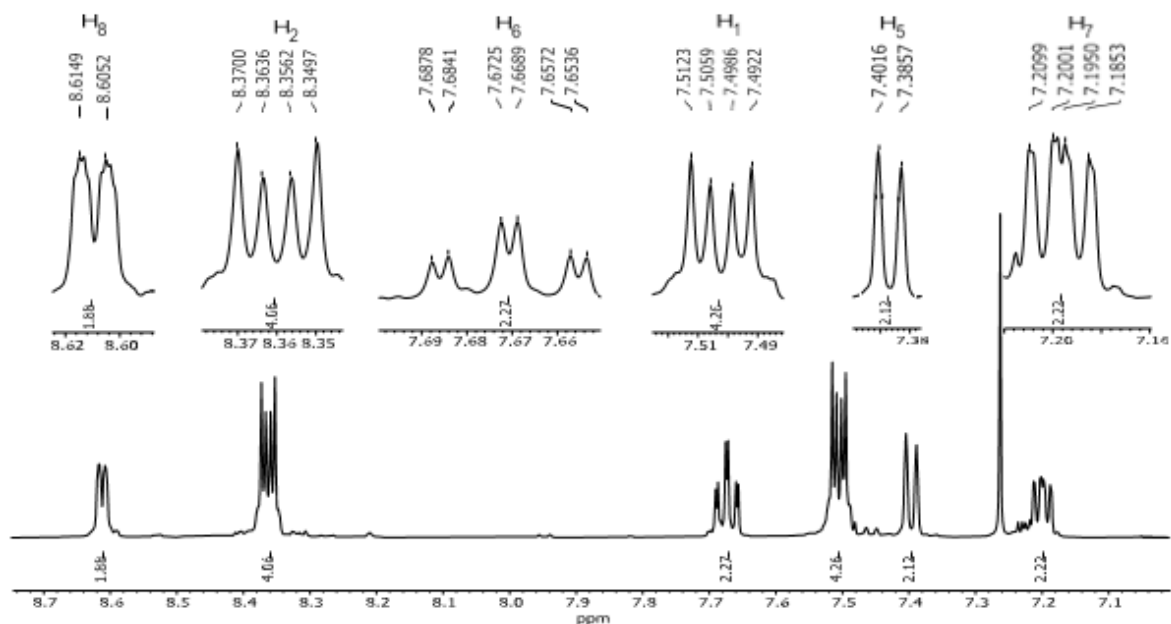


Figura 4. Expansión de la zona de señales aromáticas del espectro RMN de ^1H , de L1.

En la **Figura 5** se presenta el espectro de RMN- ^{13}C desacoplado de protón para L1, el número de señales observadas corresponde al número de carbonos con diferente ambiente químico en la molécula. Las dos señales ubicadas en 45.55 y 55.64ppm cada una corresponde a los carbonos C₆ y C₅ respectivamente, la elección de asignación está en concordancia con el orden de asignación en el espectro de ^1H . Es importante mencionar que la asignación de señales aromáticas fue

realizada gracias a un experimento de RMN bidimensional (HSQC), el cual no se aborda en el presente trabajo. El experimento HSQC permitió correlacionar los hidrógenos asignados en el espectro de la **Figura 3** con las señales correspondientes de carbono en la **Figura 5**.

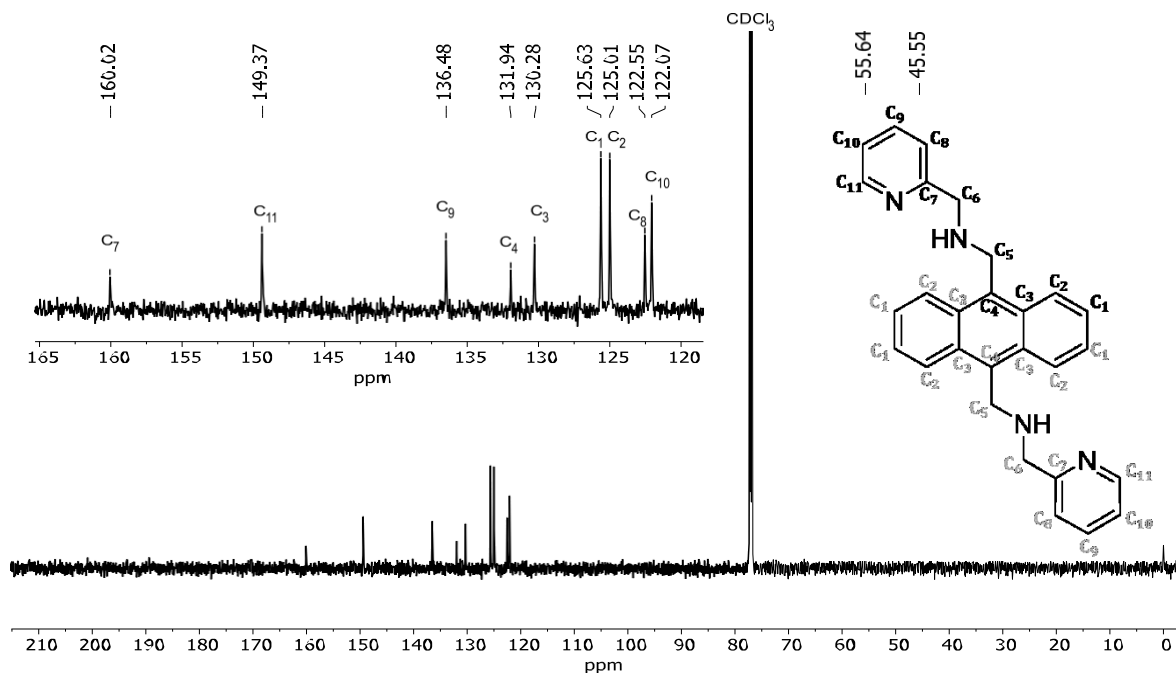


Figura 5. Espectro RMN de ^{13}C , 500MHz del ligante L1

Ligante 2

El espectro de RMN de ^1H para L2 se ilustra en la **Figura 6**. El espectro para este ligante es muy similar al descrito para L1 debido a la similitud de las dos moléculas; el número de señales, así como el orden en el que aparecen e incluso la multiplicidad es muy parecida, sin embargo, los desplazamientos químicos, la integración y los valores de las constantes de acoplamiento son diferentes. Al igual que con L1, debido a la simetría, el análisis y asignación de las señales se ha realizado solamente para una porción de la molécula y la integración se ha dejado de tal forma que se obtenga el número total correspondiente, el análisis de esta molécula es muy similar al de L1 y se presenta a continuación.

En la zona de frecuencias más altas, por debajo de 3.5 ppm se observan las dos señales simples correspondientes a los grupos metileno de la molécula; la primera señal aparece en 3.87 ppm (H_4) y la segunda 4.64 ppm (H_3) la asignación de las señales se realizó de acuerdo con el valor de la integral (ocho y cuatro, respectivamente).

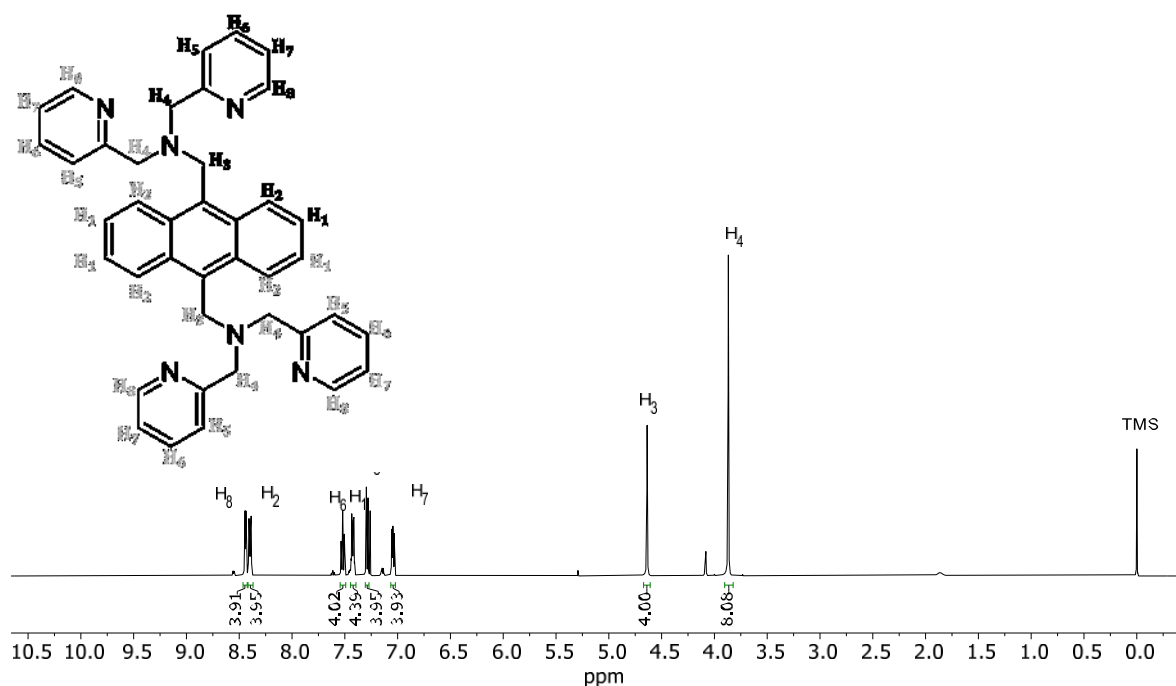


Figura 6. Espectro RMN de ^1H , 500 MHz del ligante L2.

La ampliación de las señales aromáticas se muestra en la **Figura 7** y se puede apreciar el mismo patrón de señales que para L1, se tiene entonces; la primera señal (*dd*) se observa en 7.044ppm y el valor de la integral es para cuatro hidrógenos que corresponden a H_7 ($^3J_{\text{H7-H8}} = 4.9\text{Hz}$ y $^3J_{\text{H7-H6}} = 7.3\text{Hz}$). Justo a un lado de la señal residual de disolvente, exactamente en 7.288ppm se encuentra la señal doble que se ha asignado a H_5 , con una integración para cuatro hidrógenos y con una constante de acoplamiento igual a 7.8Hz para $^3J_{\text{H5-H6}}$.

Las señales características del sistema policíclico antraceno están presentes en 7.424ppm (H_1) y 8.397ppm (H_2), ambas presentan multiplicidad doble de dobles con constantes de acoplamiento que coinciden entre sí numéricamente ($^3J_{\text{H1-H2}}(\text{ortho}) = 6.9\text{Hz}$ y $^4J_{\text{H1-H2}}(\text{meta}) = 3.3\text{Hz}$) y ($^3J_{\text{H2-H1}}(\text{ortho}) =$

6.9Hz y $^4J_{\text{H2-H1}}(\text{meta}) = 3.3\text{Hz}$). Al igual que en el espectro de L1, se encuentra una señal triple de dobles, en este caso con un valor de la integral para cuatro hidrógenos y que corresponde al hidrógeno H_6 , el valor de las constantes de acoplamiento es: $^3J_{\text{H6-H7}} \approx ^3J_{\text{H6-H5}} = 7.65\text{Hz}$ y $^4J_{\text{H6-H8}} =$

1.8Hz . Por último, la señal del hidrogeno más desprotegido es una señal doble ubicada en 8.441 ppm y se asignó a H_8 .

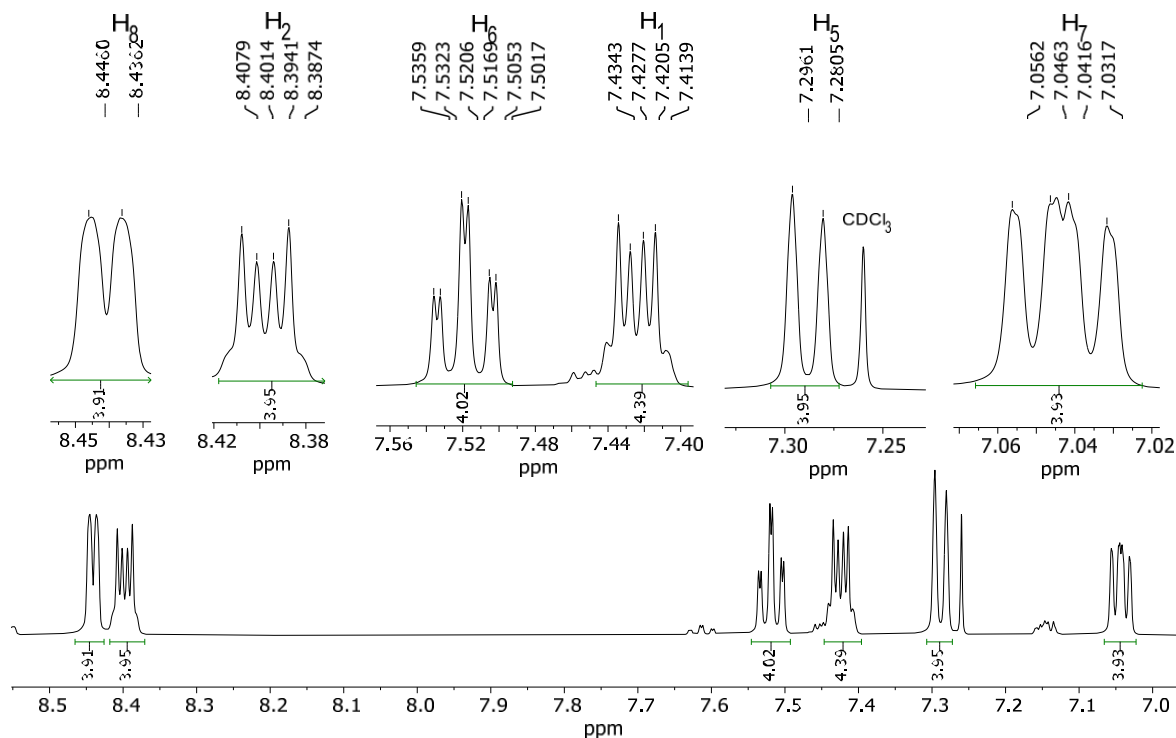


Figura 7. Expansión de la zona de señales aromáticas del espectro RMN de ^1H , de L2.

Con respecto a la técnica de RMN- ^{13}C , la **Figura 8** muestra el espectro obtenido para esta molécula, al igual que con L1, la asignación de señales aromáticas fue realizada gracias a un experimento de RMN bidimensional (HSQC).

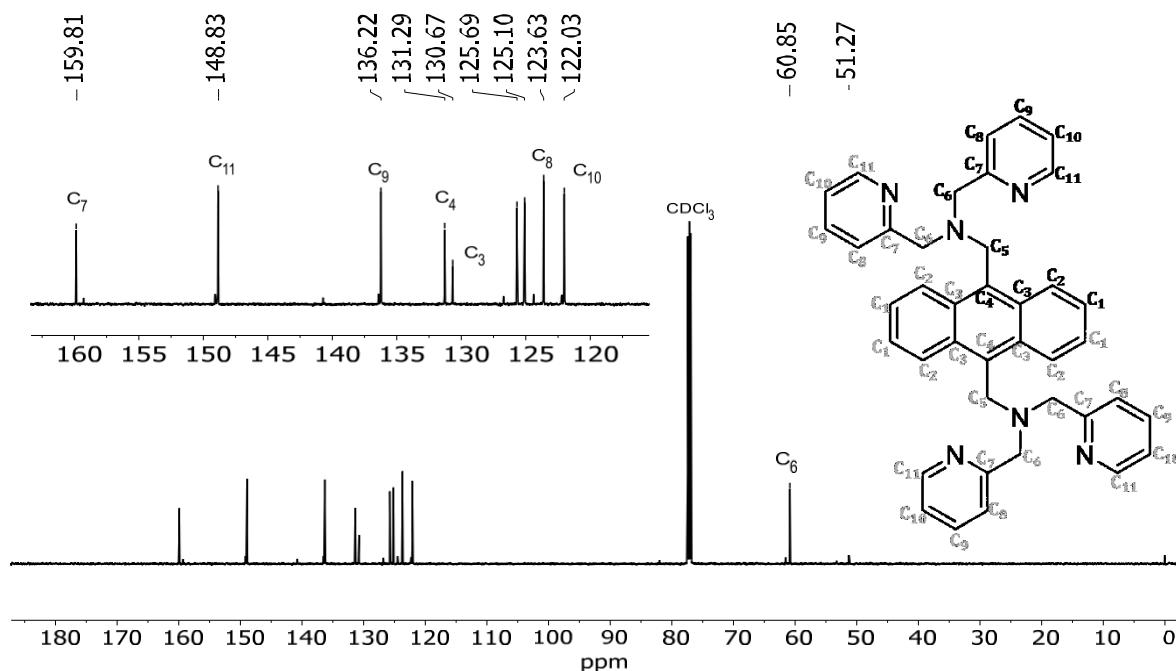


Figura 8. Espectro RMN de ^{13}C , 500 MHz del ligante L2

Complejo L1Re

El espectro mostrado en la **Figura 9** es un espectro obtenido a partir del crudo de reacción (producto sin purificar), por lo que las señales apreciadas en el espectro completo exceden las señales asignables al compuesto, sin embargo, la asignación de señales se basó, principalmente, en su posición en el espectro, así como en el valor de la integral ya que las señales asignadas coinciden en pertenecer a un mismo sistema, el espectro se muestra en la **Figura 9** junto con la propuesta de la estructura del compuesto.

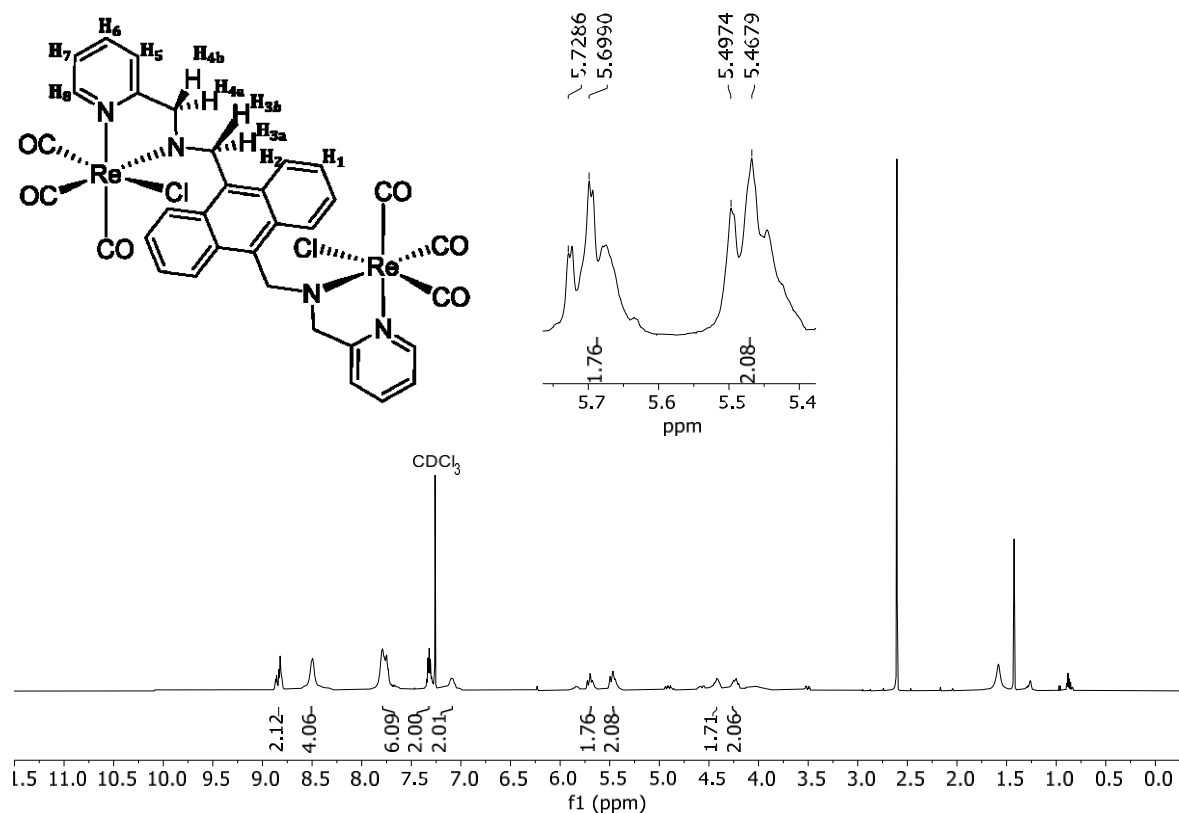


Figura 9. Espectro RMN de ^1H , 500 MHz del crudo de reacción para L1Re.

Una de las características más importantes para tener en cuenta es el cambio en desplazamiento y multiplicidad de las señales alifáticas (con respecto al ligante L1), las cuales han cambiado completamente para dar un conjunto de cuatro señales, cada una con un valor de la integral de dos hidrógenos. Las señales están en concordancia con una forma de coordinación al centro metálico en la que se forma un quelato de cinco miembros y las señales correspondientes a hidrógenos unidos a los carbonos sp^3 adquieren una propiedad de proquiralidad, es decir, el ambiente químico ya no es el mismo debido a la restricción de la rotación de los enlaces sencillos debido a que ahora pertenecen a un quelato (uno de los hidrógenos está en la misma dirección que el átomo de Cl y el otro en la dirección de un grupo $-\text{CO}$) como lo muestra la proyección de líneas y cuñas en la **Figura 9**. Las señales aparecen en 4.239, 4.207, 5.482 y 5.742 ppm y cada una tiene una integración para dos hidrógenos que se han asignado a H_{3a} , H_{3b} , H_{4a} , H_{4b} , respectivamente. Lo anterior deja en evidencia la coordinación de los nitrógenos con el átomo de renio, además, lo anterior está sustentado debido al valor de la constante de acoplamiento para H_{4a} y H_{4b} que tiene un valor de $^2J_{\text{H}_{4a}-\text{H}_{4b}} = 14.8\text{Hz}$, valor que corresponde a dos hidrógenos con un acoplamiento geminal. En el caso de las señales en 4.239 y 4.207 ppm no es posible calcular la constante de acoplamiento debido a la anchura de la señal; es decir, no parece concordar con alguna multiplicidad específica, sin embargo, el valor de la integral coincide con la propuesta.

El conjunto de señales aromáticas corresponde al número de señales y al valor de la integral para la estructura mostrada en la **Figura 9**. La multiplicidad de las señales no se logra apreciar correctamente y esto puede deberse a diferentes factores, uno de ellos es, probablemente, la solubilidad del complejo en el disolvente empleado (CDCl_3).

Complejo L2Re

El complejo L2Re presenta una forma de coordinación al átomo de renio de tal forma que participan solamente los átomos de nitrógeno pertenecientes al anillo de piridina, esta afirmación se hace con base en el análisis del espectro de RMN- ^1H (**Figura 11**), el cual se describe a continuación.

En primera instancia se ha observado un cambio en las señales que corresponden a hidrógenos pertenecientes a grupos metileno, por el valor de la integral se han seleccionado tres señales que parecen formar parte de una misma estructura; la primera señal aparece en 4.870ppm es una señal doble con una constante de acoplamiento $^2J_{\text{H}4\text{a}-\text{H}4\text{b}} = 16.25\text{Hz}$, la segunda se encuentra en 5.216ppm y está relacionada con la primera mediante el valor de la constante de acoplamiento que tiene un valor de $^2J_{\text{H}4\text{b}-\text{H}4\text{a}} = 16.35\text{Hz}$, la tercera señal es una señal simple ubicada en 6.204ppm que se ha asignado a los hidrógenos H_3 , la ampliación de las señales descritas se muestra en la **Figura 10**.

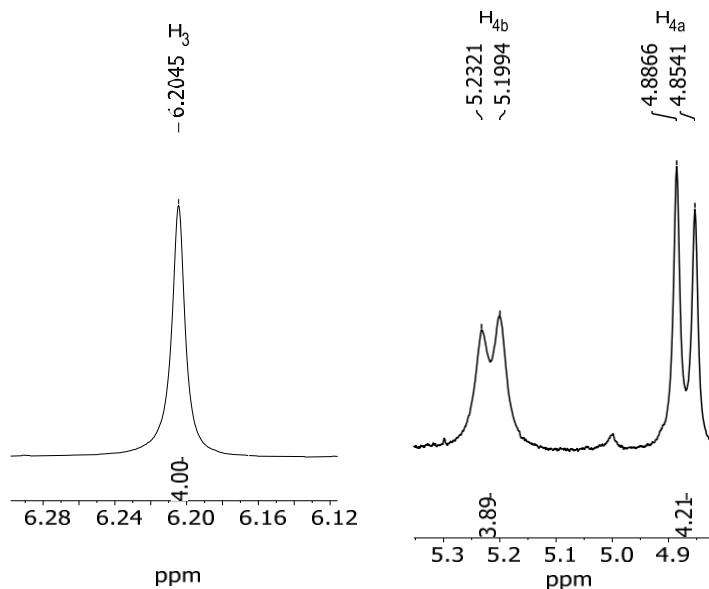


Figura 10. Ampliación de las señales alifáticas del espectro RMN de ^1H para el crudo de reacción de L2Re

El conjunto de señales aromáticas, mostradas en la **Figura 11** integran cada una para cuatro hidrógenos, la primera de ellas se encuentra en 7.234ppm, es una señal con multiplicidad triple con una constante de acoplamiento igual a 6.6Hz ($^3J_{\text{H}7-\text{H}8}$), se ha asignado a H_7 . En 7.782ppm se ubica la señal doble de dobles característica del antraceno que se asignó a H_1 , las constantes de acoplamiento son $^3J_{\text{H}1-\text{H}2}(\text{orto}) = 6.9\text{Hz}$ y $^4J_{\text{H}1-\text{H}2}(\text{meta}) = 3\text{Hz}$. Junto a la señal de H_1 se encuentra una señal triple ligeramente traslapada, esta señal se ha designado para el hidrogeno H_6 del anillo de piridina, la constante de acoplamiento correspondiente tiene un valor $^3J_{\text{H}6-\text{H}5} = 7.8\text{Hz}$. En 7.946ppm se ubica una señal doble, perteneciente al hidrogeno H_5 , para esta señal se ha calculado una constante con un valor de 7.9Hz ($^3J_{\text{H}6-\text{H}5}$), lo anterior apoya el orden de asignación de H_6 y H_7 ya que ambos hidrógenos producen señales muy similares.

La señal de H_2 se encuentra en 8.540 ppm, es una señal doble de dobles con las siguientes constantes; $^3J_{\text{H}2-\text{H}1}(\text{orto}) = 6.9\text{Hz}$ y $^4J_{\text{H}2-\text{H}1}(\text{meta}) = 3.25\text{Hz}$, lo cual era esperado para el sistema de señales de antraceno. La señal más desprotegida es la señal doble ubicada en 8.691ppm, la respectiva constante de acoplamiento tiene un valor de $^3J_{\text{H}8-\text{H}7} = 5.5\text{Hz}$, el cual se ha propuesto

para el acoplamiento entre H₈ y H₇. Por el análisis del espectro, que se ha descrito anteriormente se propuso la estructura mostrada en la **Figura 11** para el complejo L2Re.

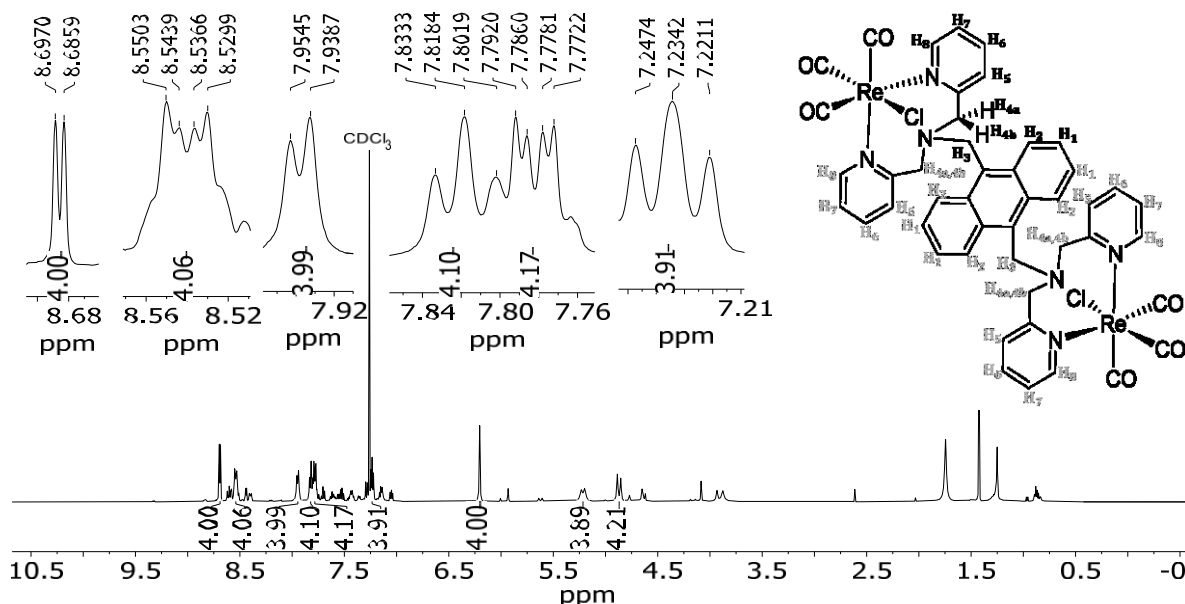


Figura 11. Espectro RMN de ¹H, 500 MHz del crudo de reacción para L2Re.

Espectroscopia IR

En la **Figura 12** se muestra la comparación de espectros de infrarrojo entre ambos complejos organometálicos y el [Re(CO)₅Cl], los espectros fueron obtenidos en pastilla de KBr. En los espectros de ambos productos se puede notar la ausencia de materia prima y un cambio notable en las bandas de absorción de carbonilos (1700 a 2100 cm⁻¹ en la **Figura 12**). Las bandas de absorción de carbonilos unidos a un metal son diferentes en el precursor metálico y en los productos, en el caso de los productos parece existir un ambiente electrónico similar, pues aparecen en valor similares de número de onda. En el caso del producto se observa probablemente el solapamiento de dos bandas de absorción, cuyo desdoblamiento en más bandas está en función de los modos de vibración de los grupos CO presentes en el complejo.

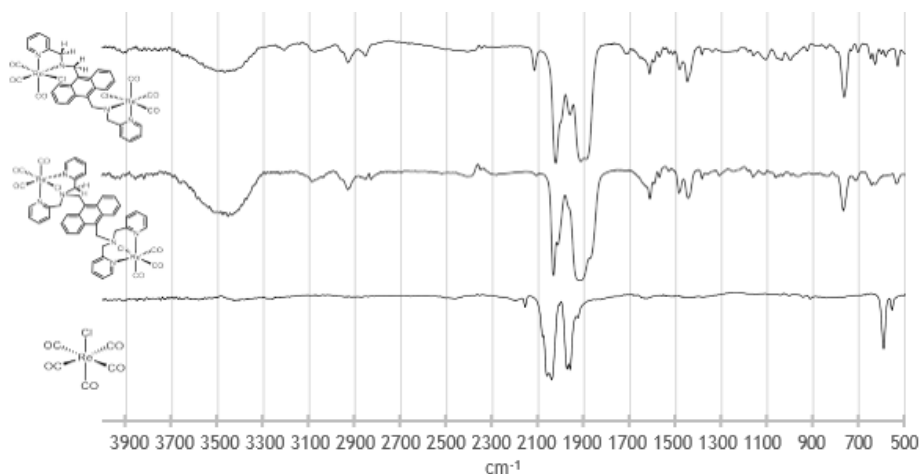


Figura 12. Comparación de los espectros de infrarrojo (obtenidos en pastilla de KBr) para los dos complejos L1Re y L2Re con respecto al precursor metálico [Re(CO)₅Cl]

CONCLUSIONES

Se han obtenido dos ligantes derivados de antraceno y picolilamina. El análisis de RMN de ^1H ha demostrado la obtención de las moléculas, dentro de este mismo estudio el análisis de las constantes de acoplamiento permitió la asignación de las señales correspondientes, los espectros de RMN de ^{13}C también se han obtenido y asignado.

Se probó la reactividad de ambos ligantes frente a $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}]$ y se obtuvieron dos productos que se caracterizaron mediante RMN- ^1H y espectroscopia de infrarrojo. El análisis de resonancia magnética nuclear permitió realizar una propuesta estructural de ambos productos, el análisis de IR nos da indicios de la coordinación de los ligantes con el metal debido al desplazamiento de las bandas de carbonilos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Anthony, E. J.; Bolitho, E. M.; Bridgewater, H. E.; Carter, O. W. L.; Donnelly, J. M.; Imberti, C.; Lant, E. C.; Lermite, F.; Needham, R. J.; Palau, M.; Sadler, P. J.; Shi, H.; Wang, F.-X.; Zhang, W.-Y.; Zhang, Z. Metallodrugs Are Unique: Opportunities and Challenges of Discovery and Development. *Chem. Sci.* 2020, 11, 12888.
2. Liew, H. S.; Mai, C.-W.; Zulkefeli, M.; Madheswaran, T.; Kiew, L. V.; Delsuc, N.; Low, M. L. Recent Emergence of Rhenium(I) Tricarbonyl Complexes as Photosensitisers for Cancer Therapy. *Molecules.* 2020, 25, 4176.
3. Konkankit, C. C.; King, A. P.; Knopf, K. M.; Southard, T. L.; Wilson, J. J. In Vivo Anticancer Activity of a Rhenium(I) Tricarbonyl Complex. *ACS Med. Chem. Lett.* 2019, 10, 822.
4. Schindler, K.; Zobi, F. Anticancer and Antibiotic Rhenium Tri- and Dicarbonyl Complexes: Current Research and Future Perspectives. *Molecules.* 2022, 27, 539.
5. Konkankit, C. C.; Vaughn, B. A.; MacMillan, S. N.; Boros, E.; Wilson, J. J. Combinatorial Synthesis to Identify a Potent, Necrosis-Inducing Rhenium Anticancer Agent. *Inorg. Chem.* 2019, 58, 3895.
6. Simpson, P. V.; Casari, I.; Paternoster, S.; Skelton, B. W.; Falasca, M.; Massi, M. Defining the Anti-cancer Activity of Tricarbonyl Rhenium Complexes: Induction of G2/M Cell Cycle Arrest and Blockade of Aurora-A Kinase Phosphorylation. *Chemistry.* 2017, 23, 6518.
7. Pino-Cuevas, A.; Carballo, R.; Muñoz, L.; Vázquez-López, E. M. Rhenium Complexes of Ligands Based on Stilbene – Synthesis, Characterization, Reactivity, and Conformational Analysis. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2015, 2015, 4402.
8. Wang, F.-X.; Liang, J.-H.; Zhang, H.; Wang, Z.-H.; Wan, Q.; Tan, C.-P.; Ji, L.-N.; Mao, Z.-W. Mitochondria-Accumulating Rhenium(I) Tricarbonyl Complexes Induce Cell Death via Irreversible Oxidative Stress and Glutathione Metabolism Disturbance. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2019, 11, 13123.
9. Chin, H. F. *Organometallic Compounds: Preparation, Structure & Properties*; Nova Science, 2010.
10. Crabtree, R. H. *The Organometallic Chemistry of the Transition Metals*, 7a ed.; John Wiley & Sons, 2019.
11. Bochmann, M. *Organometallics and Catalysis: An Introduction*; Oxford University Press, 2014.

12. Spessard, G. O.; Miessler, G. L. *Organometallic Chemistry*, 2a ed.; Oxford University Press, 2009.
13. Huheey, J. E.; Keiter, E. A.; Keiter, R. L. *Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity*, 4a ed.; HarperCollins College, 1993.
14. Gupta, B. D.; Elias, A. J. *Basic organometallic chemistry: Concepts, syntheses, and applications of transition metals*; CRC Press, 2010.
15. Amendola, V.; Fabbrizzi, L.; Pallavicini, P.; Parodi, L.; Perotti, A. A ditopic tetradentate pyridyl amine ligand containing an anthracene fragment: fluorescence intensity and 'closed' vs. 'open' species formation in the presence of Cu²⁺, as a function of pH. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1998, 12, 2053.
16. Sharma A. S.; Vaibhavi N.; Kar B.; Das U.; Paira P. Target-specific mononuclear and binuclear rhenium(I) tricarbonyl complexes as upcoming anticancer drugs. *RSC Adv.* 2022, 12, 20264.
17. Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. A. *Introduction to Spectroscopy*, 5a ed.; Cengage Learning, 2015.

ANÁLISIS DE LA VOLTAMETRÍA CÍCLICA GENERADA POR *GEOBACTER SULFURREDUCTENS* EN UNA CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANO CON SUERO DE QUESO COMO SUSTRATO

Juana Elizabeth Alba Cuevas; Frida Ortega Franco; Virginia Villa-Cruz; Isaac Zarazúa Macías

Doctorado en Ciencia y Tecnología. Departamento de Ciencias de la Tierra y de la Vida, Centro Universitario de los Lagos, Universidad de Guadalajara. Lagos de Moreno, Jalisco, México.
juana.alba9250@alumnos.udg.mx

RESUMEN

Las celdas electroquímicas son pequeños dispositivos en los cuales se obtiene energía eléctrica a partir de energía química, pueden clasificarse de acuerdo al proceso que se lleve a cabo en su interior como electrolíticas o galvánicas y de estas últimas se han hecho adaptaciones a un subtipo de celda conocida como Celda de Combustible Microbiano o CCM. Las CCM son bioreactores de una o dos cámaras cuyas reacciones químicas son catalizadas por microorganismos (bacterias con metabolismo electrogénico) que utilizan los nutrientes contenidos en su medio de crecimiento (sustrato) para oxidar la materia orgánica y como producto de su metabolismo transferir sus electrones de manera directa (a través de sus apéndices) o mediada (a través de sustancias aplicadas externas) a un aceptor final de electrones (electrodo). Las reacciones bioeléctricas que se generan en una CCM pueden ser medibles con un potenciómetro; una de estas mediciones es la voltametría cíclica que relaciona el potencial y la corriente eléctrica, esto nos permite obtener la capacitancia que es la relación entre los componentes de la celda con respecto al tiempo de operación. En este trabajo se utilizó una CCM de doble cámara, con electrodos de carbono; para las reacciones bioeléctricas se empleó *Geobacter sulfurreducens* como inóculo (bacteria electrogénica) y suero de queso como sustrato, proveniente de cremas locales de Lagos de Moreno. La CCM conteniendo suero de queso, previamente esterilizado, fue inoculada con *G. sulfurreducens* y se mantuvo en incubación durante 16 días (384 h) a 36°C. Cada tres días, se hicieron mediciones eléctricas con un potenciómetro con electrodo de Calomel como referencia. El análisis de los picos de oxidación-reducción de las gráficas de voltametría cíclica, nos generó una curva que mostró un incremento en la capacitancia de 8×10^{-3} a 18×10^{-3} mF. A nivel biológico, el incremento en la capacitancia en la respuesta bacteriana predice un comportamiento capacitivo, es decir, una acumulación intracelular de los electrones generados por la bacteria. Este comportamiento refleja un sistema dieléctrico donde no hay flujo de carga. Con base en lo anterior podemos concluir que los minerales presentes en el suero de queso ayudan al metabolismo redox de la bacteria; además, que el sistema CCM-bacteria-sustrato al tener un comportamiento dieléctrico requiere de un hilo conductor que permita el flujo de electrones.

INTRODUCCIÓN

Las celdas electroquímicas son pequeños dispositivos en los cuales se obtiene energía eléctrica a partir de energía química, pueden clasificarse de acuerdo al proceso que se lleve a cabo en su interior como electrolíticas o galvánicas y de estas últimas se han hecho adaptaciones a un subtipo de celda conocida como Celda de Combustible Microbiano o CCM. Las CCM son bioreactores de una o dos cámaras cuyas reacciones químicas son catalizadas por microorganismos (bacterias) que utilizan los nutrientes contenidos en su medio de crecimiento (sustrato) para oxidar la materia orgánica y, producto de su metabolismo transferir sus electrones de manera directa (a través de sus apéndices) o mediada (a través de sustancias aplicadas externas) a un aceptor final de electrones (electrodo). Los electrodos que se utilizan para este fin pueden ser de cualquier material conductor, aunque en los últimos años se ha optado por materiales derivados del carbono debido a su porosidad y alta conducción. Dentro de las CCM se ha experimentado con diferentes inóculos, resaltando entre ellos *G. sulfurreducens* que es una bacteria anaerobia facultativa (resiste una cierta cantidad de oxígeno) catalogada como bioelectrogénica ya que transfiere electrones de manera directa a un electrodo sin necesidad de agregar mediadores ni ningún agente externo más que un medio rico en nutrientes para su metabolismo. Dentro de los sustratos utilizados se encuentran desde medios químicos controlados, lodos, aguas residuales y muy recientemente residuos derivados de procesos

lácteos por el gran aporte de azúcares y nutrientes benéficos para el crecimiento de *G. sulfurreducens*. Esta bacteria además, tiene la característica de al ir duplicando su población, formar “biopelículas” o “biofilm” que son agrupaciones de bacterias que se van entrelazando una a una a través de sus pili y, aprovechándose de los mismos, transfieren electrones de una bacteria a otra utilizando los pili como “nanocables” o “nanowires” de manera que aunque haya bacterias que se encuentren alejadas del aceptor terminal de electrones, pueden llevar a cabo su transferencia gracias a estas comunidades bacterianas. Como se mencionó anteriormente, existen diversos factores que son claves para el adecuado funcionamiento y desempeño de una CCM, tales como: la configuración de los electrodos, el medio de cultivo, el crecimiento óptimo de la especie bacteriana y el desarrollo de su biopelícula, por lo que en este trabajo se pretende analizar estos factores utilizando electrodos a base de carbono en diferentes presentaciones e innovar al usar suero de queso descremado como sustrato inoculado con *G. sulfurreducens*, midiendo su eficiencia, crecimiento bacteriano, desarrollo de biopelícula y parámetros electroquímicos que nos permita un panorama más amplio sobre el uso de bacterias electroquímicas, celdas de combustible y reutilización de productos de desecho para un beneficio energético.

TEORÍA

Las celdas electroquímicas, son dispositivos en los cuales se obtiene energía eléctrica a partir de reacciones químicas o bien se producen reacciones químicas catalizadas por energía eléctrica, gracias a electrodos conductores o semiconductores que permiten la transferencia de electrones. Existen diferentes tipos de celdas electroquímicas cada una de ellas con sus propias características y aplicaciones, pero las principales son: celda electroquímica o electrolítica y celda galvánica o voltaica. La diferencia entre ambas celdas es la reacción espontánea o no espontánea que se lleva a cabo para la conversión de energía química en energía eléctrica.

Dentro de las celdas galvánicas, se encuentran las celdas de combustible microbiano (CCM). Este tipo de celdas se basan en la actividad metabólica de microorganismos para generar energía eléctrica. Estos microorganismos, generalmente bacterias, son llamados como electro-activos, electro-génicos o bacterias de respiración anódica (Kondaveeti 2020, Jing 2019). Por lo que una CCM es un reactor biológico que se usa para la obtención de energía eléctrica por medio de la oxidación de la materia orgánica realizada por microorganismos.

La arquitectura de una CCM consta de dos cámaras (anódica y catódica), separadas por una membrana semipermeable. La cámara anódica, funciona en condiciones de anaerobiosis, es el lugar donde las reacciones de óxido-reducción son llevadas por el microorganismo al degradar el sustrato (materia orgánica, aguas residuales, entre otros), además contiene el ánodo (electrodo negativo), que es la estructura de adhesión de los microorganismos y funciona como el aceptor de electrones, producto de la actividad metabólica de los mismos. Sumado a la producción de electrones, producto de oxidación de la materia orgánica, también se pueden obtener protones y dióxido de carbono. En la cámara catódica, se reciben los protones que fueron generados en la cámara anódica y estos pasan a través de una membrana semipermeable. Estos protones junto con los electrones, que han viajado a través de un circuito externo y llegado a la cámara catódica, se combinan con un aceptor final de electrones, el oxígeno y forman agua. En la siguiente figura (figura 1) se muestra un esquema típico de una CCM:

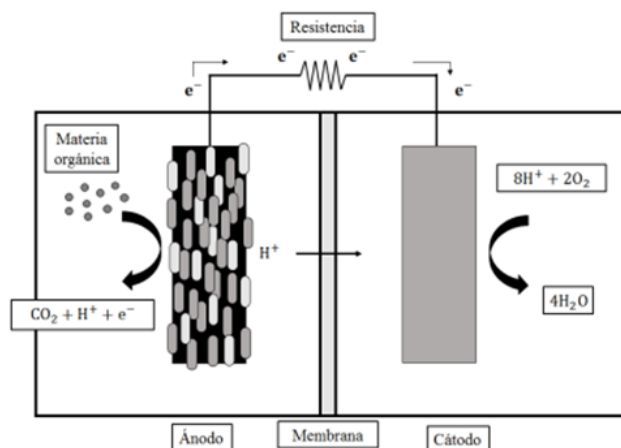


Figura 2.1: Esquema de una MFC.

Figura 1: Esquema de una CCM

En una CCM, el tipo de microorganismo y sustrato son piezas claves para el funcionamiento del reactor biológico.

Geobacter es un género de bacterias que tienen la capacidad de transferir electrones directamente a los materiales conductores, como los electrodos que tienen las cámaras anódicas de una CCM, sin necesidad de un mediador (Du, Li, y Gu, 2007, Bond y Lovley, 2003). *Geobacter* pertenecen a la familia Geobacteraceae, que se encuentra dentro del dominio Bacteria, phylum Proteobacteria, clase Deltaproteobacteria, y orden Desulfuromonadales, son bacilos Gram-negativas, quimioorganótrofo anaerobio (Romero Mejía et al., 2012). Dentro de ese género se destaca *Geobacter sulfurreducens*, que puede reducir Mn (IV), U (VI), azufre elemental, además de Fe (III) y fumaratos en presencia de acetato como donador de electrones. Se ha demostrado que el acetato se oxida a CO₂ por Fe (III) gracias al ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y a proteínas con actividades fumarato-reductasa que actúan también como succinato-deshidrogenasa. Esta capacidad confiere a *Geobacter sulfurreducens* una característica biorremediadora importante ya que el acetato es el intermedio en la degradación anaerobia de materia orgánica en ambientes sedimentarios (Butler et.al., 2006; Lovley et.al., 2011; Lovley y Chapelle, 1995; Caccavo et.al., 1994). Además, se ha demostrado que *G. sulfurreducens* tiene la capacidad de respirar uranio, nocivo para el ambiente y convertirlo en un elemento neutro (Lovley, 1991). La ventaja de utilizar *G. sulfurreducens* dentro de una CCM es que puede oxidar por completo a los donantes de electrones usando solo un electrodo como aceptor de electrones, puede transferir casi cuantitativamente electrones a electrodos en ausencia de mediadores de electrones (conociendo la reacción redox y algunos otros parámetros se puede obtener la cantidad aproximada de electrones) y esta transferencia de electrones se debe a una población de células que se unen al electrodo y son capaces de velocidades de transporte de electrones a electrodos que son similares a las observadas para el transporte de electrones al citrato de Fe (III) (Bond y Lovley, 2003).

Con respecto al sustrato, se han utilizado diferentes composiciones de sustrato, desde medios artificiales controlados hasta lodos, aguas residuales y más recientemente suero de queso. El suero de queso, es un subproducto resultante en la elaboración de queso. Es un líquido amarillento y ligeramente ácido que se separa del cuajo durante el proceso de coagulación de la leche mediante la acción enzimática del cuajo que rompen el sistema coloidal de leche en dos fracciones: una sólida (contiene principalmente proteínas insolubles y lípidos, que precipitan llevándose algunos constituyentes hidrosolubles) y una líquida correspondiente al suero donde se encuentran suspendidos todos los componentes nutricionales que no se utilizaron durante la coagulación de la caseína. En investigación bacteriológica han utilizado el suero de queso como medio de cultivo, encontrándose ideal para muchas bacterias, por su contenido de nutrientes (lactosa, aminoácidos, vitaminas y minerales) esenciales para el crecimiento y reproducción bacteriana. Al ser rico en

lactosa, lo convierte en un medio ideal para las bacterias que pueden fermentar este carbohidrato. Su uso también tiene beneficios ambientales al reciclar un subproducto de la industria que de otra manera se desecha (Guerra-Rodríguez et.al., 2015).

La voltamperometría cíclica es una técnica electroquímica utilizada para estudiar la oxidación y reducción de especies químicas en una solución. Es una técnica útil en la caracterización de compuestos orgánicos e inorgánicos, así como en la identificación de procesos redox y reacciones químicas en solución. Se basa en la aplicación de un potencial eléctrico variable a través de una solución, mientras se mide la corriente que fluye a través de la misma. Durante el proceso, la solución se somete a ciclos de oxidación y reducción, lo que permite la observación de los cambios en la corriente en función del potencial aplicado (Bard, 2001).

PARTE EXPERIMENTAL

Se determinó la composición de suero de queso local (grasa, proteína, lactosa, etc) mediante un analizador milkoscan y se procedió a prepararlo para su uso como sustrato: esterilizando a 121°C durante 20 minutos y ajustando pH a 6 (que es el propio para la bacteria). Antes del ensamblado de la CCM se activó la membrana de Nafion No. 117. Para esto se recortó la membrana a manera de un círculo de 1.5cm de radio, después siguiendo la metodología de Taeger *et. al.*, (2003) se sumergió en una solución de HCl 1N durante 48 horas, después se lavó con agua desionizada para eliminar el exceso de ácido y posteriormente se sumergió en 25 mL de una solución que contenía NaCl 2M durante 72 horas (para sustituir los H⁺ por Na⁺ en la membrana), pasado ese tiempo se lavó nuevamente con agua desionizada. Una vez activada la membrana Nafion No. 117, se procedió al ensamblaje de la CCM (marca "Adams & Chittenden"), se colocó la membrana en la unión entre las dos cámaras y se selló de manera hermética con un seguro incluido en la celda.

En una cámara de anaerobiosis previamente preparada, a la cámara anódica se vaciaron 100 mL del medio de cultivo (suero de queso) y en la cámara catódica 100 mL de una solución de tris-HCl 30 mM, apoyándose en la metodología de Lovely & Phillips, 1998, Esteve-Nuñez y col 2005, Jain y col 2011. Para los electrodos se utilizó grafito plano de 10 cm de largo por 1.5 cm de ancho (superficie total: 15 cm²) con conductividad eléctrica, asegurando que el área sumergida dentro de la CCM tanto para el ánodo como para el cátodo fuera la misma (6cm de largo y 1.5 cm de ancho, área: 9cm²), este ensayo se utilizó como el blanco. Después de 120h de uso, se desmontó y se realizaron los mismos pasos, pero ahora agregando a la cámara anódica una concentración de 2×10^5 células de la cepa de *Geobacter sulfurreducens* ATCC51573, esta vez durante 384 horas. Se realizaron mediciones de voltamperometría cíclica con un potenciostato marca Gamry reference 600, cada 24 horas a 4 velocidades de barrido (5, 10, 50 y 100mV/s) en un rango de -1 a 1V. Y con los datos obtenidos de estas mediciones se realizó un análisis y reporte gráfico de cada una de ellas mediante un software especializado. Las voltamperometrías se graficaron de acuerdo a lo arrojado directamente por el equipo mientras que derivadas de las mismas se pueden obtener tanto datos de capacitancia como de separación de altura de picos para analizar la reversibilidad de las reacciones. Para el análisis de la capacitancia se tomaron datos de la corriente a partir de un voltaje fijo, en donde no hubiera picos de redox, posteriormente se realizó un análisis matemático de acuerdo a Scholz, 2011, y se graficaron los resultados en una gráfica de capacitancia vs tiempo. Por otro lado, a partir de las gráficas de voltamperometría, se tomaron los datos de la altura de cada pico redox (corriente tanto de oxidación como de reducción), se realizó un delta de la separación entre picos y estos datos se graficaron contra la velocidad de barrido.

RESULTADOS

En los gráficos de las voltamperometrías cíclicas (figura 2) se pueden ver 3 picos de oxidación ubicados a -0.31008, 0.2109, y 0.91492 volts vs SCE, y dos picos de reducción a -0.54313 y 0.038871 volts vs SCE indicando la presencia de dos reacciones RedOx reversibles y una irreversible.

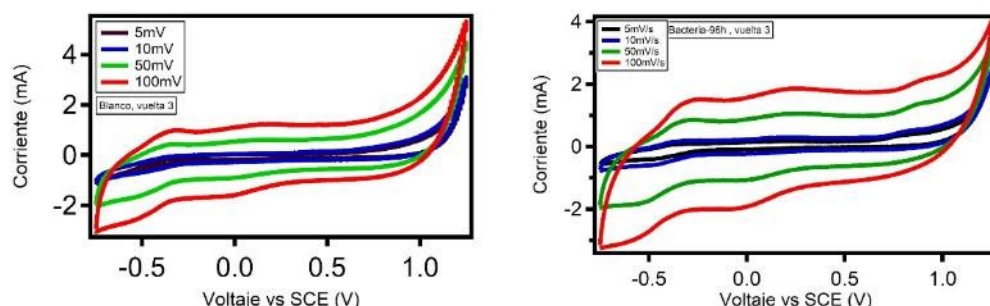


Figura 2: Voltamperometría en CCM sin bacteria (blanco). Voltamperometría en CCM con bacteria. Ambas con electrodo de grafito.

A partir de los datos de las voltamperometrías cíclicas se procedió a calcular la separación pico de oxidación a pico de reducción (ΔE_p) en función de la velocidad de barrido para determinar la reversibilidad de las reacciones (ver figura 3). De acuerdo a la escala y el comportamiento de las curvas en ΔE_p el sistema muestra la transición de la cinética de transferencia de carga altamente reversible, limitada solo por los procesos de difusión, que quiere decir que hay un movimiento espontáneo debido a un gradiente de concentración; la materia fluye de la parte más concentrada a otra de menor concentración para llegar a un estado homogéneo. (Sholz, 2010).

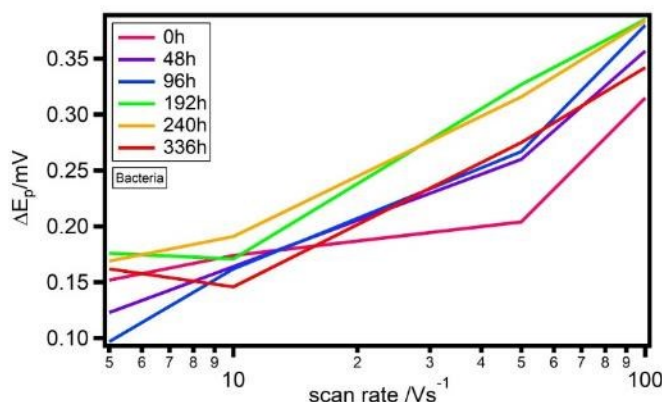


Figura 3: Gráfico de la separación pico a pico, ΔE en función de la velocidad de barrido en la CCM con *G. sulfurreducens*.

Adicionalmente, en la figura 2 se observó que al incrementar la velocidad de barrido (v) las curvas se ensanchan considerablemente, indicando un comportamiento pseudo capacitivo de almacenamiento de carga (comportamiento de capacitor) por parte de las muestras. Para tener un mayor entendimiento de este fenómeno, se realizó el cálculo de la capacitancia a partir de la corriente base de las curvas (i) usando la siguiente ecuación

$$C = i/v \quad (1),$$

Y se estudió su comportamiento como función del envejecimiento durante 120 h, tanto para el blanco (sin bacteria, únicamente el suero y el electrodo) como para las muestras después de inocular con *Geobacter sulfurreducens* y dejarla aproximadamente 384 horas (16 días) como se observa en la figura 4, aquí se puede observar que la capacitancia va en aumento conforme pasan los días con unas ligeras variaciones a partir del día 10, tomando en cuenta que anteriormente se mencionó que la celda se comporta como un capacitor, en la relación electrodo-bacteria-electrolito, alguno de estos componentes se esté comportando como un material dieléctrico. Un dieléctrico se utiliza en la fabricación de capacitores para que las cargas reaccionen, provoca también un aumento en el voltaje que el capacitor es capaz de soportar pero la característica más importante es que provoca un

aumento en la capacitancia del condensador proporcional a su constante dieléctrica. Sin embargo, si se compara con el blanco en la misma figura (4) la capacitancia en el blanco tiene una escala mayor que al agregar la bacteria, lo que puede resultar en que el inóculo cataliza las reacciones mejorando la difusión de electrones entre el suero y el electrodo y reduciendo la capacitancia del sistema. (Prescott,1999; Park, 2008)

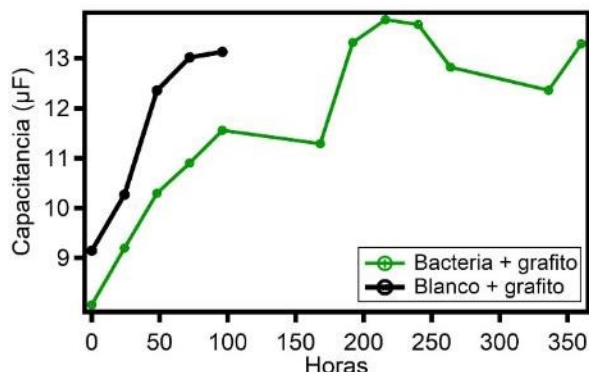


Figura 4: Capacitancia en CCM para el blanco (sin bacteria) y con *G. sulfurreducens* con electrodo de grafito.

CONCLUSIONES

El suero de queso es un sustrato viable para el crecimiento y el comportamiento electrónico característico de *Geobacter sulfurreducens*, la misma, tiene la capacidad de crecer en electrodos (soportes) de carbono dentro de una CCM y desarrollar su actividad electroquímica fue monitoreada y cuantificada, encontrando que la celda tiene un fuerte comportamiento capacitivo el cual se reduce al introducir a las bacterias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bard, AJ y Faulkner, LR (2001). Métodos electroquímicos: Fundamentos y aplicaciones, 2da edición. Wiley.
2. Bond, D.R., Lovley, D.R. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1548-55 (2003)
3. Butler, J.E., Glaven, R.H., Esteve-Nunez, A., Nunez, C., Shelobolina, E.S., Bond, D.R. and Lovley, D.R. (2006). Genetic characterization of a single bifunctional enzyme for fumarate reduction and succinate oxidation in *Geobacter sulfurreducens* and engineering of fumarate reduction in *Geobacter metallireducens*. *J. Bacteriol.* 188, 450–455.
4. Caccavo, F., Jr., Lonergan, D.J., Lovley, D.R., Davis, M., Stolz, J.F. and Mcinerney, M.J. (1994). *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate- oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3752–3759.
5. Du, Z., Li, H., & Gu, T. (2007). A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Journal of Biotechnology Advances*, 25(5), 424 - 482. doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.05.004
6. Esteve-Nunez, A., Rothermich, M., Sharma, M. and Lovley, D. (2005). Growth of *Geobacter sulfurreducens* under nutrient-limiting conditions in continuous culture. *Environ. Microbiol.* 7, 641–648.
7. Guerra-Rodríguez, E. et.al. (2015). Producción de bacteriocinas por bacterias ácido lácticas utilizando suero de leche como medio de cultivo. *Control de Alimentos*, 47, 444-450.
8. Jain, A., Gazzola, G., Panzera, A., Zannoni, M. and Marsili, E. (2011). Visible spectroelectrochemical characterization of *Geobacter sulfurreducens* biofilms on optically transparent indium tin oxide electrode. *Electrochim.* doi: 10.1016/j.electacta.2011.02.073

9. Jing, X., Liu, X., Deng, C., Chen, S., & Zhou, S. (2019). Chemical signals stimulate *Geobacter soli* biofilm formation and electroactivity. *Biosensors & Bioelectronics*, 127, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.11.051>
10. Kondaveeti, S., Lee, S.-H., Park, H.-D., & Min, B. (2020). Specific enrichment of different *Geobacter* sp. in anode biofilm by varying interspatial distance of electrodes in air-cathode microbial fuel cell (MFC). *Electrochimica Acta*, 331(135388), 135388. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2019.135388>
11. Lovley, D.R. and Phillips, E.J. (1998). Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1472–1480.
12. Lovley, D.R. and Phillips, E.J.P. (1998b). Manganese inhibition of microbial iron reduction in anaerobic sediments. *Geomicrobiol. J.* 6, 145–155.
13. Lovley D.R., Toshiyuki Ueki, Tian Zhang, Nikhil S. Malvankar, Pravin M. Shrestha, Kelly A. Flanagan, Muktak Aklujkar, Jessica E. Butler, Ludovic Giloteaux, Amelia-Elena Rotaru, Dawn E. Holmes, Ashley E. Franks, Roberto Orellana, Carla Risso and Kelly P. Nevin. (2011). *Geobacter: The Microbe Electric's Physiology, Ecology, and Practical Applications*. *Advances In Microbial Physiology*, 59, 1-100.
14. Lovley, D.R., and Chapelle, F.H. (1995) Deep subsurface microbial processes. *Rev Geophys* 33: 365–381.
15. Lloyd, J.R., Leang, C., Hodges Myerson, A.L., Coppi, M.V., Cuifo, S., Methe, B., *et al.* (2003) Biochemical and genetic characterization of PpcA, a periplasmic c-type cytochrome in *Geobacter sulfurreducens*. *Biochem J* 369: 153–161
16. Park, I. and Kim, B.C. (2011). Homologous overexpression of omcZ, a gene for an outer surface c-type cytochrome of *Geobacter sulfurreducens* by single-step gene replacement. *Biotechnol. Lett.* 33, 2043–2048
17. Prescott, LM, Harley, JP y Klein, DN (1999) *Microbiología*. Cuarta edición, The McGraw-Hill Companies, Inc., Nueva York, 685.
18. Romero Mejía, A. A., Vásquez, J. A., & Lugo González, A. (2012). Bacterias, fuente de energía para el futuro. *Revista Tecnura*, 16(32), 117.
19. Scholz, F. (2010). *Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications*. <https://ci.nii.ac.jp/ncid/BA56835189>
20. Taeger, A. (2003). Ion exchange membranes derived from sulfonated polyaramides. *Reactive and Functional Polymers*, (57), 77-92,
21. Wan, Lean Zhou, Shu Wang, Chengmei Liao, Nan Li, Weitao Liu y Xin Wang. (2018). El crecimiento sintrófico de *Geobacter sulfurreducens* acelera la desnitrificación anaeróbica. *Fronteras en microbiología*, 1–8.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS DE *PLEUROCHAETE LUTEOLA* (MUSGO) SOBRE PATÓGENOS GASTROINTESTINALES

Erick Mauricio Velázquez-Castillo*, Catalina Rivas-Morales, Ethel Daniela Cabello-Ruiz, Catalina Leos-Rivas, Jorge Luis Hernández-Piñero y José Ezequiel Viveros-Valdez

Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León

*Autor de correspondencia: erickvelazquezcastillo@gmail.com

RESUMEN

En México las enfermedades gastrointestinales son una causa común de consulta médica y en algunos casos han ocasionado la muerte, anualmente se presentan más de 4,500 decesos por causa de una enfermedad gastrointestinal, siendo algunos causantes de estas: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, entre otros^[1]. Los microorganismos han desarrollado farmacoresistencia a los tratamientos convencionales que se han utilizados para controlar las enfermedades que provocan^[2]. Por tal motivo se ha incrementado la búsqueda de alternativas para combatir estas enfermedades. Las plantas medicinales contienen metabolitos secundarios que han demostrado actividad biológica, estos pueden ser utilizados en el tratamiento y/o como coadyuvante para combatir algunas enfermedades gastrointestinales^[3]. El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antimicrobiana de extractos de *P. luteola*. La planta se colectó en el Monumento Natural Cerro de la Silla Nuevo León, México. Esta se limpió, se secó, se trituro y se realizaron extracciones en un equipo Soxhlet con solventes de diferente polaridad (hexano y metanol), se eliminó el solvente en un rotavapor a baja presión y se determinó su rendimiento. A los extractos obtenidos se les realizó un perfil fitoquímico por pruebas colorimétricas. Posteriormente se realizó la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos por el método de difusión de pozo^[4], sobre las cepas farmacoresistentes: *E. coli* 25922, *S. aureus* BAA44, *E. faecalis* 29212. El porcentaje de rendimiento fue de 2.64% y 3.08% para el extracto hexánico y metanólico respectivamente. En el perfil fitoquímico dieron positivas las pruebas de triterpenos, alcaloides, carbohidratos, cumarinas y sesquiterpenlactonas para el extracto metanólico y la presencia de cumarinas y sesquiterpenlactonas en el extracto hexánico. Se encontró actividad antimicrobiana para el extracto metanólico con un halo de inhibición de 4.7 ± 0.3 mm sobre *E. faecalis* 29212, el extracto hexánico no presentó actividad biológica.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias han evolucionado de tal manera que desarrollando resistencia a los tratamientos convencionales dificultando su tratamiento, dentro los últimos 3 años en México se han reportado más de 20,000 casos anuales de intoxicación alimentaria bacteriana y 3.2 millones de infecciones intestinales indefinidas^[5], se ha visto un incremento de incidentes de intoxicación alimentaria bacteriana, tan solo en el año 2023 se encontró un aumento del 10% con respecto al año 2022 y un aumento del 42% con respecto al 2020^[6]. Estas enfermedades pueden complicarse y causar la muerte, presentando en promedio 4,500 decesos anuales, algunas bacterias causantes de estos malestares son: *E. coli*, *E. faecalis* y *S. aureus*^[1]; los cuales suelen entrar al organismo por consumir alimentos en mal estado, como lo son la baja higiene de manejo de los alimentos o presentarse en estado de descomposición^[7]; En el país se tiene registro del uso de plantas medicinales como remedio de distintas enfermedades que datan de las épocas coloniales hasta la actualidad^[2]; También se sabe que el país cuenta con una basta diversidad de estas plantas medicinales, de la cual se estima que existen unas 4,500 especies y se menciona que el 90% de la población mexicana ha recurrido alguna vez a la herbolaria medicinal^[8]; A pesar de que estos remedios como las infusiones de té, los parches, ungüentos, pastas, etc. son ampliamente utilizados tanto por la población en general como médicos^[9]; Realmente son escasos estudios que confirmen sus cualidades medicinales y además nos informen sobre una dosis segura de aplicación para evitar la intoxicación con las mismas ^[3].

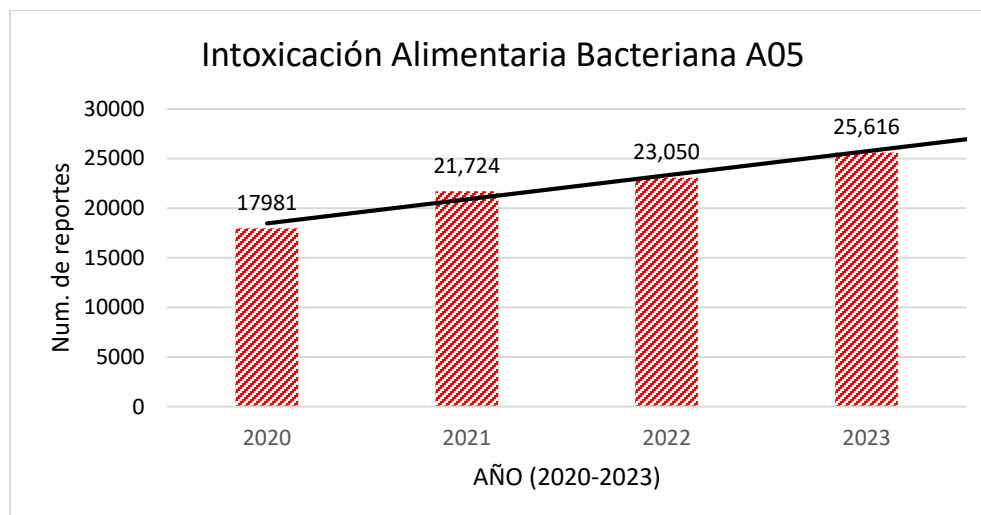


Figura 4 Casos de intoxicación alimentaria bacteriana en los años del 2020 al 2023 [6].

TEORÍA

Pleurochaete luteola (B.) es un musgo de la familia Pottiaceae el cual puede presentar un color verde claro o de tonos amarillentos, suelen medir 4 cm de alto tienen hábito de cojín. Se encuentra en los estados de Chiapas, Coahuila, Guerrero, Hidalgo, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas y Veracruz. ^[10]

Tabla 1 Taxonomía de *Pleurochaete luteola* (Besch.)

Taxonomía	Reino	Plantae.
	División	Bryophyta.
	Clase	Bryopsida.
	Orden	Pottiales.
	Familia	Pottiaceae.
	Genero	<i>Pleurochaete</i> .
	Especie	<i>P. luteola</i> (B.)

Basile y aliados en 1998 en Italia se utilizó a *Pleurochaete squarrosa* donde se le realizó una extracción acetónica y se estudió su actividad biológica donde se encontró actividad contra *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 10875), *S. aureus* (ATCC 13709), *E. coli* (ATCC 11229), *Enterobacter cloacae* (ATCC 10699), *Bacillus subtilis* (ATCC 10774), *Proteus mirabilis* (ATCC 12454) y *Citrobacter diversus* (ATCC 25408), también se realizaron una prueba de toxicidad con ratones donde no se encontraron signos de dolor o cambios de comportamiento ^[11]. Gonca y colaboradores en 2014 publicaron un estudio sobre la composición química y la actividad biológica del aceite esencial de ejemplares *P. squarrosa* colectados de Turquía, encontraron en el extracto: Aldehídos, monoterpenos e hidrocarburos y obtuvieron respuesta antibacteriana contra *S. aureus* (ATCC 25923), *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 607), *Candida albicans* (ATCC 60193) y *Saccharomyces cerevisiae* (RSKK 251) ^[12]. Por otro lado en Oaxaca México se utiliza al género *Pleurochaete* como remedio tradicional para limpiar/desinfectar heridas o como alivio para el dolor estomacal siendo administrado como té de infusión ^[13].

PARTE EXPERIMENTAL

Preparación del material vegetal: El material fue colectado en el Monumento Natural Cerro de la Silla (MNCS), NL, México; Se limpio, se secó en oscuridad a temperatura ambiente y se trituró. **Obtención de extractos:** Se realizaron dos extracciones en equipo por Soxhlet, primero con hexano y después con metanol durante 5 h por 5 d, se concentró el extracto a presión reducida con ayuda de un rotavapor, finalmente se llevó a sequedad y se determinó su rendimiento. **Prueba de actividad antimicrobiana:** Se realizó la **prueba de difusión en pozo** sobre las cepas *E. coli* 25922, *E. faecalis* 29212 y *S. aureus* BAA44, del Lab. Química Analítica, FCB, UANL. Se colocaron 100 µL de la solución de bacterias a una concentración de 0.5% de la escala de McFarland (1×10^8 UFC/mL) y sobre placas con agar Mueller-Hinton, después se realizaron 5 pocillos con una pipeta Pasteur, se agregaron 25 µL de extracto a una concentración de 4,000 ppm, en un pocillo se agregó 25 µL de Metanol-Agua 70: 30 como control negativo y se incubaron a 36 °C por 24 h y se miden los halos de inhibición, las pruebas se realizaron por triplicado. Por último, se realizó el tamizaje fitoquímico por pruebas colorimétricas ^[14].

RESULTADOS

Tabla 2.- Rendimiento de las extracciones de *P. luteola* por el método soxhlet.

Extracto	Rendimiento %
Hexánico	2.6
Metanolico	3.0

Tabla 3 Perfil fitoquímico de los extractos de *P. luteola*.

Prueba química	Extracto Metanólico	Extracto Hexánico
Liebermann-Burchard	+	-
Curmarinas	+	+
Baljet	+	+
Quinonas	-	-
Saponinas	-	-
Shinoda	-	-
Taninos	-	-
Antrona	+	-
Dragendorf	+	-

Presencia del metabolito: (+); Ausencia del metabolito: (-).

Tabla 4.- Actividad antimicrobiana por difusión en pozo de los extractos de *P. luteola*.

Cepa	Halo de Inhibición (mm)	
	Extracto Hexánico	Extracto Metanolico
<i>E. coli</i> 25922	-	-
<i>S. aureus</i> BAA44	-	-
<i>E. faecalis</i> 29212	-	4.7 ± 0.3

CONCLUSIONES

- El mayor rendimiento de *P. luteola* fue para el extracto metanólico de 3%, sugiriendo una mayor cantidad de compuestos polares en el material vegetal.
- La actividad biológica de *P. luteola* solo se presentó en el extracto metanólico contra *E. faecalis* 29212 con halos de inhibición de 4.7 ± 0.3 mm.
- En el perfil fitoquímico de los extractos de *P. luteola* para el hexánico dio positivos para: alcaloides, carbohidratos, cumarinas y sesquiterpenlactonas y el metanólico dio positivo para: cumarinas, triterpenos y sesquiterpenlactonas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hernández-Cortez, C., Aguilera-Arreola, M., Castro-Escarpulli, G. (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. ENF INF MICROBIOL 2011 31 (4): 137-151.
2. Boire, N., Riedel, S., Parrish, N. (2013). Essential Oils and Future Antibiotics: New Weapons against Emerging 'Superbugs'? Journal of Infectious Diseases & Preventive Medicine. J Anc Dis Prev Rem 1: 105. DOI: 10.4172/2329-8731.1000105.
3. Moreno-Pérez, G., Narváez-González, H., González-Trujano, M. (2020). Plantas medicinales para el alivio del dolor. Disponible en: https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/images/revista/71_2/PDF/10_71_2_1231_PlantasMedicinales-L.pdf. Consultado el 07 de marzo del 2024.
4. García, D. (2016). Actividad biológica, separación, aislamiento e identificación de metabolitos activos de plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana. Tesis doctoral Universidad Autónoma de Nuevo León.
5. Secretaría de salud. (2022). Distribución de casos nuevos de enfermedad por fuente de notificación, Estados Unidos Mexicanos 2022, Población General. Añadir un poco de texto.
6. Secretaría de salud. (2024). Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información. <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico>
7. Polanco-Allué, I. (2015). Microbiota y enfermedades gastrointestinales. Anales de Pediatría. An Pediatr (Barc). 2015;83(6):443.e1-443.e5.
8. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2021). Plantas medicinales de México. Disponible en: <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/plantas-medicinales-de-mexico?idiom=es>. Consultado el 15 de mayo del 2024.
9. Taddei, G., Santillana, M., Romero, J., Romero, M. (1999), "Aceptación y uso de herbolaria en medicina familiar", Salud Pública de México, 41:216-220.
10. Sharp, A., Crum, H. y P. M. Eckel, P. 1994. The Moss Flora of México. Memoirs of The New York Botanical Garden, 69:1-1113.
11. Basile, A., Sorbo, S., Giordano, S., Lavitola, A., Castaldo-Cobianchi, R. (1998). Antibacterial activity in *Pleurochaete squarrosa* extract (Bryophyta). International Journal of Antimicrobial Agents. ISSN: 09248579. DOI: 10.1016/s0924-8579(98)00028-4.
12. Gonca, T., Büsra, Y., Turan, Ö., Nevzat, B., Nurettin, Y., Sengül-Alpay, K. (2014). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from *Tortella inclinata* var. *Densa*, *T. tortusa* and *Pleurochaete squarrosa*. Asian Journal of Chemistry. ISSN: 09707077. DOI: 10.14233/ajchem.2014.15618.
13. López-Santiago, J. (2015). Plantas útiles del municipio de San Pablo Macuiltianguis, Oaxaca. Tesis de licenciatura. Universidad de la Sierra Juárez. Oaxaca. México.
14. Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M., Verde-Star, M. (2016). Investigación en plantas de importancia médica 1ra. Edición (436 páginas). ISBN: 978-84-944673-7-0, DOI: <http://dx.doi.org/10.3926/oms.313>. OmniaScience (Omnia Publisher SL) 2016 ISBN:9788494467370.

DESARROLLO DE UN CANDIDATO A MATERIAL DE REFERENCIA DE OLEORRESINA DE CEMPASÚCHIL (*TAGETES ERECTA* L.) ENCAPSULADA CON ACEITE DE GIRASOL

Heidi Segundo Malagón¹, Carlos Alberto Carrillo Hernández¹, Diego Vázquez Bustamante¹, Alejandro Nuñez Vilchis¹, Areli Ontiveros Rodríguez¹, Eloy Rodríguez de León²

¹Laboratorio de Instrumentación Analítica, Parque Biotecnológico UAQ, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas S/N Querétaro, Qro. C. P. 76010

² Posgrado en Ciencias Químico Biológicas, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas S/N Querétaro, Qro. C. P. 76010.

hsegundo26@alumnos.uaq.mx

RESUMEN

La oleorresina de *Tagetes erecta* L. se utiliza ampliamente como colorante en la alimentación de animales y en la industria alimentaria por su elevado contenido de luteína¹. Este carotenoide es sensible a la temperatura, la luz y el pH², por lo que su concentración en la oleorresina disminuye rápidamente, así como su capacidad colorante y otras de sus propiedades funcionales. Debido a la baja estabilidad, no existe un material de referencia certificado (MRC) de oleorresina de cempasúchil que permita validar la exactitud de los métodos analíticos en esta matriz. Se ha encontrado que encapsular la oleorresina con aceites naturales protege a la luteína de los factores mencionados manteniendo su concentración inalterada en comparación con muestras sin encapsular³. Considerando esto, se elaboró un candidato a MR de oleorresina encapsulada con aceite de girasol usando ultrasonido y se evaluó su homogeneidad y su estabilidad. La estabilidad se estudió midiendo la concentración inicial de luteína en la oleorresina encapsulada y muestras almacenadas por cuatro semanas a temperatura controlada (25 °C) en recipientes transparentes y ámbar para comparar el efecto de la irradiación. La homogeneidad se evaluó por medio de un muestreo por capas para identificar una posible sedimentación. La concentración de luteína se midió usando espectrofotometría UV-Vis. La prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) indicó una diferencia estadística significativa en las muestras expuestas a la luz respecto a la concentración inicial y a las almacenadas en frasco ámbar. Por otro lado, una ANOVA de un factor precisó que las muestras fueron homogéneas ($p=0.416$) entre las capas de los lotes estudiados. El candidato a MR desarrollado con exposición a la luz disminuyó la concentración de luteína en $\approx 25\%$ en comparación a la concentración inicial, indicando baja estabilidad en esta condición, aunque se obtuvo un 4.28% de variación en las muestras almacenadas en recipientes ámbar. Por lo que puede llegar a ser estable en algunas condiciones, mientras que resultó ser homogéneo en su composición. Este trabajo presenta resultados preliminares importantes para estudios interdisciplinarios metrológicos y fitoquímicos en el análisis de luteína y otros carotenoides susceptibles a la degradación fotoquímica.

INTRODUCCIÓN

Las flores de cempasúchil secas y molidas son una fuente importante de luteína ya que se encuentra en su oleorresina apolar en forma de ésteres. Este compuesto es capaz de proporcionar diferentes tonalidades desde el amarillo al rojo, lo suficiente concentradas como para permitir su uso comercial a gran escala⁴. Por esta razón, la oleorresina de cempasúchil se ha utilizado como aditivo en la alimentación de aves de corral para mejorar la pigmentación de la grasa, la piel y la yema de huevo del ave⁵. Asimismo, al ser una fuente rica en ésteres de luteína, su purificación y saponificación conduce al aislamiento de luteína libre⁶; un pigmento vegetal de color amarillo que pertenece a la familia de los carotenoides con importantes aplicaciones en la industria como aditivo nutracéutico, suplemento alimenticio e ingrediente farmacéutico y cosmético¹.

La protección de oleorresina rica en luteína no está muy documentada. No obstante, el tratamiento con ultrasonido de muestras que contenían luteína incorporadas a aceites de girasol presenta una buena estabilidad en comparación a muestras control³, por lo que se propuso un método verde que consistió en la encapsulación asistida por ultrasonido de oleorresina de cempasúchil (*Tagetes erecta*

L.) con aceite de girasol para evitar la degradación de luteína, lo que a su vez permitió obtener un material de referencia homogéneo y estable.

Aunque desde los años 1990 se han utilizado indiscriminadamente colorantes naturales y sintéticos para colorear alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos, actualmente en el sector industrial existe una tendencia a sustituir los colorantes sintéticos por compuestos naturales, porque los consumidores los consideran más saludables y de mayor valor y calidad. Estudios recientes han demostrado una relación entre el consumo prolongado de productos que contienen colorantes alimentarios sintéticos y varios problemas de salud como alergias, hiperactividad infantil, reacciones asmáticas e incluso cáncer. Por tanto, entre las diversas fuentes de pigmentos naturales destacan las oleorresinas obtenidas a partir de materias primas responsables del color del extracto final¹.

Es entonces que, a partir de las flores secas y molidas de flor de cempasúchil (*Tagetes erecta* L.), se obtiene una oleorresina no polar con una intensa coloración amarilla que se debe principalmente a la luteína y, en menor medida, a la zeaxantina⁷. Dosis bajas de esta oleorresina son suficientes para conseguir el color deseado en una gran cantidad de productos, por esta razón ha tomado mayor relevancia en las últimas décadas, pues según estimaciones reales de los principales fabricantes, al año se procesan hasta 420 toneladas de xantofilas totales de origen natural⁸.

Aunado a esto, la oleorresina de *Tagetes erecta* L., al ser una fuente rica en luteína, no se utiliza únicamente como colorante en la alimentación de animales y en la industria alimentaria. Importantes investigaciones han estudiado sus efectos beneficiosos, los cuales están relacionados principalmente con su actividad antioxidante, ya que protege a la retina y en general al cuerpo humano de los radicales libres. Asimismo, disminuye la incidencia de muchas enfermedades crónicas, como enfermedades cardíacas, cáncer y enfermedades oculares relacionadas con la edad⁴. En otro estudio, se demostró que la administración de dosis de luteína en la piel de ratones desnudos inhibe la proliferación de las células epidérmicas y el eritema inducido por la luz UV-B hasta en un 50%¹.

La luteína es sensible a la temperatura, la luz y el pH². Su oxidación puede disminuir tanto la capacidad colorante como también las propiedades funcionales de la oleorresina. De igual modo, la oxidación de la luteína puede generar un conjunto de sustancias que aportan un sabor y aroma con repercusiones generalmente negativas sobre la calidad del producto final. Y, junto a la pérdida de calidad, se producen problemas de seguridad debido a la toxicidad de los subproductos formados a partir de hidroperóxidos lipídicos⁴.

Este problema es una limitante muy grande para aplicaciones posteriores de la oleorresina. Por lo tanto, es necesario encontrar un vehículo adecuado que pueda proteger a la luteína de diversos factores físicos y químicos². Aunado a la búsqueda de este objetivo, la protección de la luteína mejora la estabilidad y homogeneidad de la oleorresina, permitiendo el desarrollo a un candidato de material de referencia la matriz de interés ya mencionada.

Es así como se encontró una investigación reciente donde se informó que la tasa de retención de la luteína, así como su estabilidad, fue mayor cuando se trató en una relación 6:4 con aceite². En otra investigación, el tratamiento de luteína con aceite de girasol a una intensidad ultrasónica de 70 W/m² y un tiempo de 12.5 min permitió darle mayor estabilidad. Por último, es necesario resaltar la inocuidad del proceso, al ser totalmente respetuoso con el medio ambiente, y su impacto económico, pues se utilizan reactivos de fácil acceso y deshecho³.

Hasta la fecha no se cuenta con un material de referencia de oleorresina de cempasúchil (*Tagetes erecta* L.) que permita conocer con certeza su concentración de luteína. Aún menos, un MR de oleorresina encapsulada con aceites naturales. Por lo que, para lograr el desarrollo de un candidato a MR de nuestra matriz de interés encapsulado con aceite de girasol, la Guía ISO 35 requiere explícitamente la inclusión de evaluaciones de homogeneidad y estabilidad en la matriz.

PARTE EXPERIMENTAL

1. Cuantificación de la concentración inicial de luteína

Para la construcción de la curva de calibración se disolvieron 12.5 mg de estándar de luteína en acetona-metanol (5 mL, 1:1 v/v). A partir de esta disolución, se preparó una curva de calibración de 500, 1000, 1500, 2000 y 2500 ug/L con la misma mezcla de disolventes. Se midió la absorbancia de cada disolución estándar a 400 nm por triplicado.

Posteriormente, se pesaron 6 g de oleorresina de cempasúchil, para encapsularse en las siguientes condiciones: intensidad ultrasónica de 70 W/m², tiempo de 12.5 min en 4 mL de aceite de girasol adquirido en una tienda local. Se disolvieron 20 mg de oleorresina de cempasúchil encapsulada en acetona-metanol (5 mL, 1:1 v/v). A partir de la solución resultante, se preparó una solución de 4,000 ug/L, cuya absorbancia se midió inmediatamente a 400 nm, calibrando el equipo con acetona-metanol. Este proceso se realizó por triplicado. Y, por último, se determinó la concentración de luteína presente en las muestras con ayuda de la curva de calibración. Luego de la experimentación, de los datos obtenidos se obtuvo la media y la desviación estándar.

2. Análisis de estabilidad

Se encapsularon 36 g de oleorresina de cempasúchil con 24 mL de aceite de girasol en las condiciones descritas previamente. Los 60 g de oleorresina de cempasúchil encapsulada se fraccionaron en 6 frascos, cada uno de ellos contenía 10 mL de la muestra. Posteriormente, 3 frascos de vidrio transparente y 3 frascos de vidrio ámbar se almacenaron por 4 semanas a 25 °C en una incubadora. Transcurrido el respectivo tiempo de almacenamiento, el contenido de cada frasco se fraccionó en tres viales.

De cada vial se tomaron 20 mg de oleorresina encapsulada de cempasúchil en acetona-metanol (5 mL, 1:1 v/v). Cada muestra se preparó para su análisis como lo descrito en la sección anterior. Se hizo un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías y una prueba Tukey sobre los datos de concentración de cada muestra.

3. Análisis de homogeneidad

Para el análisis de homogeneidad, 60 g de oleorresina de cempasúchil se encapsularon como lo antes descrito; 100 mL de oleorresina encapsulada se fraccionaron en 8 partes iguales y de cada fracción se tomaron tres alícuotas las cuáles se prepararon y analizaron a través de su absorbancia a 400 nm para obtener la concentración de luteína.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

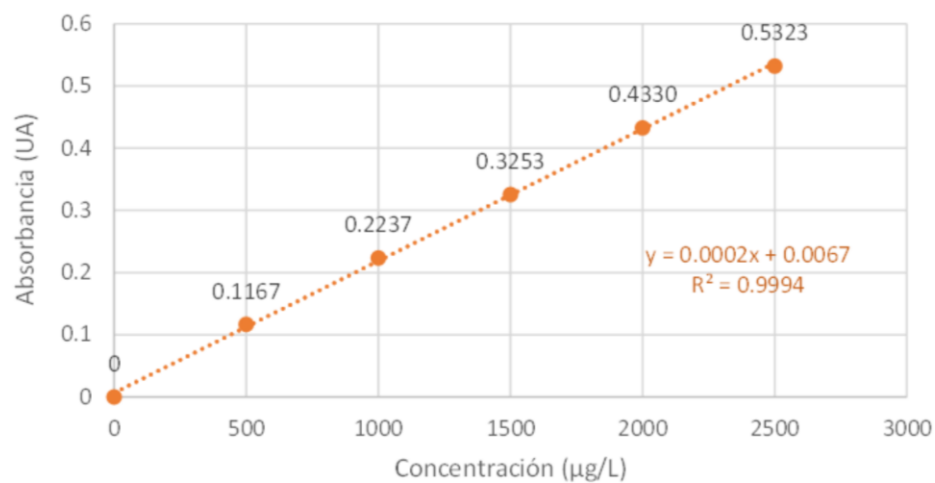


Figura 1. Curva de calibración de luteína
Análisis de estabilidad

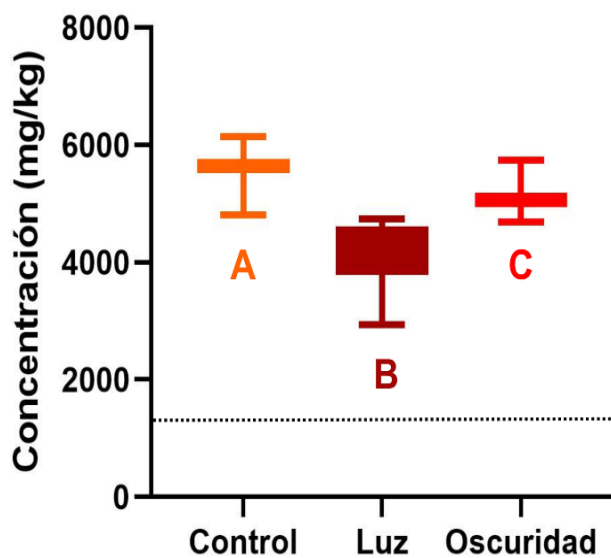


Figura 2. Diagrama de caja del análisis de estabilidad,
(- - -) Concentración calculada sin encapsular

Análisis de homogeneidad

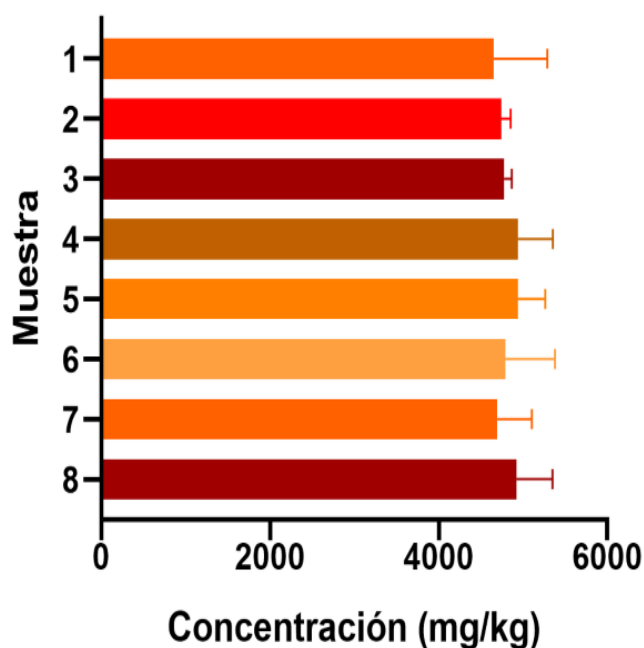


Figura 4. Gráfico de barras del análisis de homogeneidad.

El CENAM define a la estabilidad como una propiedad útil para definir las condiciones específicas para determinar el tiempo de vida útil del material de referencia. Por lo que materiales volátiles, sensibles a la luz, temperatura, humedad, oxígeno o actividad microbiológica, no son buenos candidatos. Es entonces que, para hacerle frente a esta problemática, se propuso la encapsulación de la oleoresina de cempasúchil con aceite de girasol para retrasar la degradación de la luteína. Pues, el aceite de girasol forma una capa lipídica sobre la luteína, impidiendo la entrada de oxígeno y luz³.

Adicionalmente, las condiciones experimentales para el análisis de estabilidad fueron seleccionadas sabiendo que la luteína no presenta degradación de 20 a 40°C, ni en sitios oscuros sin corrientes de aire³. De esta manera, se obtuvo un mayor control de las variables que podían interferir en la estabilidad y discutir que el candidato desarrollado sí es estable cuando se encuentra almacenado en frascos de vidrio ámbar debido a que éstos, junto al aceite de girasol, retardan la fotodegradación de la luteína.

Por otro lado, el análisis de homogeneidad permite identificar una posible sedimentación; un factor de riesgo en la producción de materiales de referencia. Al observar el porcentaje de variación entre las concentraciones de luteína de las distintas capas del análisis de homogeneidad llevado a cabo se puede argumentar que el candidato a material de referencia sí es homogéneo, debido a que encapsulamiento con ultrasonido permitió homogeneizar la concentración de luteína en la oleoresina.

CONCLUSIONES

El candidato a material de referencia presentó una mayor estabilidad con respecto a la concentración de luteína cuando se almacenó en recipientes ámbar debido a que obtuvo 4.28% de variación en comparación a las muestras control. Mientras tanto en ambas condiciones resultó ser homogéneo. Este trabajo presenta resultados preliminares importantes para estudios interdisciplinarios metrológicos y fitoquímicos en el análisis de luteína y otros carotenoides susceptibles a la degradación fotoquímica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rodríguez-de León E, Jiménez-Halla, J. Ó. C., Báez, J. E., & Bah, M. (2019). A simple and efficient method for the partial synthesis of pure (3R,3'S)-Astaxanthin from (3R,3'R,6'R)-Lutein and lutein esters via (3R,3'S)-Zeaxanthin And theoretical study of their formation mechanisms. *Molecules*, 24(7), 1386. <https://doi.org/10.3390/molecules24071386>
2. Wang Y, Zhang X, Yan M, Zhao Q. (2023). Enhancing the stability of lutein emulsions with a water-soluble antioxidant and a oil-soluble antioxidant. *Heliyon*, 9(4), e15459. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15459>
3. Manzoor S, Rashid R, Panda BP, Sharma V, Azhar MA. Green extraction of lutein from marigold flower petals, process optimization and its potential to improve the oxidative stability of sunflower oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, 85, 105994. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.105994>
4. Ríos JJ, Fernández-García E, Mínguez-Mosquera MI, Pérez-Gálvez A. Description of volatile compounds generated by the degradation of carotenoids in paprika, tomato and marigold oleoresins. *Food Chemistry*, 106(3), 1145-1153. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.045>
5. Siriamornpun S, Kaisoon O, Meeso N. (2012). Changes in colour, antioxidant activities and carotenoids (lycopene, B-carotene, lutein) of marigold flower (*Tagetes erecta* L.) resulting from different drying processes. *Journal of Functional Foods*, 4(4), 757-766. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.05.002>
6. Sivel M, Kráčmar S, Fišera M, Klejdus B, Kubáň V. (2014). Lutein content in marigold flower (*Tagetes erecta* L.) concentrates used for production of food supplements. *Czech Journal of Food Sciences*, 32(6), 521-525. <https://doi.org/10.17221/104/2014-cjfs>
7. Forigua-Ahumada DA, Soto-Morales LL, Morales-Erazo LV, Abella- Gamba JP..Desarrollo de un material de referencia certificado para análisis elemental de agua potable. (2019). *Revista Colombiana de Química*. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v48n3.78660>
8. Zorn H, Breithaupt DE, Takenberg M, Schwack W, Berger RG. (2003). Enzymatic hydrolysis of carotenoid esters of marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and red paprika (*Capsicum annum* L.) by commercial lipases and *Pleurotus sapidus* extracellular lipase. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(5), 623-628. [https://doi.org/10.1016/s0141-0229\(03\)00020-6](https://doi.org/10.1016/s0141-0229(03)00020-6)

COLUMNAS DE ADSORCIÓN DE LECHO FIJO EMPACADAS CON CARBÓN ACTIVADO PRODUCIDO A PARTIR DE RESIDUOS AGRÍCOLAS PARA LA REMOCIÓN DE CONTAMINANTES AGROINDUSTRIALES PRESENTES EN AGUA

Guillermo Andrade Espinosa, Jonatan Sahian Ponce Ávila, Heidi Kimberly Osorio García, Verónica Janette Cedeño Garcidueñas, Omar Augusto Sánchez Ortiz y Claudia Palomares Rodríguez

Tecnológico Nacional de México / Instituto Tecnológico del Valle de Morelia
guillermo.ae@vmorelia.tecnm.mx

RESUMEN

En Michoacán, la contaminación por plaguicidas, fertilizantes y metales presentes simultáneamente en agua causa serios daños a la salud y medio ambiente. Además, la disposición de residuos agrícolas, como lo es el residuo del espárrago, es un grave problema emergente ya que solo el 13.33% de la planta es lo que se consume, desechando el resto. Esta investigación propone el tratamiento terciario de agua usando carbón activado (CA) producido con el residuo del espárrago. La máxima capacidad de adsorción (q_{max}) en competencia de 2-4 DCP (2-4 Diclorofenol), PO_4 , NH_4 y Cd^{2+} fue evaluada estudiando los efectos de pH, Temperatura y MO en el CA. Además, se realizaron pruebas de cinética determinando el decaimiento de la concentración de los contaminantes con respecto del tiempo y se obtuvieron las curvas de rompimiento mediante una columna de lecho empacado con el CA. Los resultados, sin MO, muestran una q_{max} para 2-4 DCP, PO_4 , NH_4 y Cd^{2+} de 123.70, 113.74, 26.66 y 432.577 mg/g a pH de 7 para el CA. Por otro lado, se encontró que la q_{max} es altamente dependiente de la temperatura, al aumentarla de 25 a 40° C la q_{max} aumentó para los cuatro contaminantes. Asimismo, con MO aumentó q_{max} de PO_4 y NH_4 a pH 7 y de Cd^{2+} a pH 5. Finalmente, las pruebas de cinética mostraron una disminución en la concentración de 2,4-DCP, PO_4 , Cd^{2+} y NH_4 de 20%, 80%, 70% y 80%, respectivamente, en las primeras 40 horas, y el rompimiento, al operar la columna, se observó a las 22 y 1.5 h para 2, 4-DCP y PO_4 , respectivamente. Estos resultados indican que el CA, producido a partir de los desechos de espárrago, es un gran candidato para ser utilizado en procesos terciarios de plantas de tratamiento de agua residual para la eliminación de contaminantes agroindustriales disueltos.

INTRODUCCIÓN

La contaminación del agua hace referencia a la presencia de materias extrañas como microorganismos, productos químicos, metales pesados, materia orgánica, entre otros, los cuales deterioran la calidad del agua (Celaya, 2018). Algunos contaminantes se encuentran presentes en las aguas de manera natural y en bajas concentraciones, sin embargo, en la actualidad debido a la acción antropogénica y al crecimiento industrial, la concentración de sustancias indeseables se ha ido intensificando en los cuerpos de agua. Industrias como la agroquímica y la agroalimentaria son responsables de liberar contaminantes como amonio (NH_4^+), fosforo (PO_4^-) y 2,4- diclorofenol (2,4-DCP) en los ecosistemas; así mismo, la presencia de metales pesados como el cadmio (Cd^{2+}) en cuerpos de agua puede adjudicarse al trabajo de la industria automotriz, tabacalera, minera, el acabado de metales y la industria de la pintura, principalmente (Khairia et al., 2016). El 2,4-diclorofenol es un derivado clorado del fenol utilizado principalmente en la preparación de plaguicidas y en fábricas de papel. Esta sustancia puede ser absorbida por los tejidos biológicos por exposición en agua o a través de la ingesta de alimentos contaminados. Dosis tóxicas de clorofenoles producen convulsiones, jadeo, coma y finalmente la muerte (Lemus, 2018; Mahugo, 2004). Por su parte, el su uso excesivo de fertilizantes fosfatados y nitrogenados en la agricultura moderna implica una amenaza para el medio ambiente, ocasionando nitrificación, eutrofización de las aguas superficiales y un crecimiento desmedido de algas que al morir, provocan un aumento en la demanda química de oxígeno (DQO) (Lavie et al., 2010). Asimismo, la presencia de metales pesados como el cadmio (Cd^{2+}) en cuerpos de agua se debe principalmente a efluentes de las industrias de procesamiento, textil, uso de pigmentos de pintura, el acabado de metales y las baterías de acumuladores eléctricos. El Cd^{2+} representa una amenaza a la salud debido a que tiene la capacidad de acumularse en órganos vitales alcanzando un tiempo de vida media de hasta 30 años ocasionando daños irreversibles (Celaya, 2018; Reyes et al., 2016). Michoacán ocupa el primer lugar a nivel nacional en

valor de producción agrícola, lo que se traduce en una gran demanda de productos químicos como fertilizantes, herbicidas y plaguicidas; cuya descarga a cuerpos de agua ha tenido repercusiones a corto y largo plazo en el ambiente y en la salud de la población. Este problema de contaminación en los cuerpos de agua se ha ido intensificando en los últimos años, lo cual representa un problema grave, ya que sustancias como estas pueden causar diversos efectos en la salud, tales como toxicidad crónica, disrupción endocrina y bioacumulación, además de que representan una amenaza para la conservación de los ecosistemas y los seres vivos que los habitan (Virkutyte et al., 2010). Bajo este contexto es necesario buscar la manera de desarrollar métodos eficientes, económicos y sustentables para poder eliminar las sustancias contaminantes presentes en los cuerpos de agua y reducir su efecto en el medio ambiente. Es por eso que, tecnologías como la precipitación química, el intercambio iónico, la adsorción en carbón activado y los procesos de separación de membrana se han implementado en la eliminación o degradación de contaminantes de las aguas naturales contaminadas. Actualmente, el método más utilizado para la remoción de contaminantes es la adsorción sobre materiales inorgánicos, debido a su eficiencia y a sus ventajas económicas y operativas (Lemus, 2018). Durante el proceso de adsorción, las especies disueltas se transportan al adsorbente sólido poroso por difusión y se acumulan en una fase sólida del material adsorbente. Uno de los materiales que se presenta como la mejor tecnología disponible para tratar soluciones acuosas que contienen compuestos orgánicos es el carbón activado (CA) (Hernández et al., 2003). En los últimos años, se ha estudiado una amplia gama de materiales para producir carbón activado, entre estos se encuentra el hueso de aceituna, aguacate, cereza, ciruela, dátil, cáscara de pistacho, coco, avellana, fibras coco, palma, plátano, madera y el residuo del espárrago. Este último se caracteriza por su alto contenido en lignina, celulosa y hemicelulosa, así como por su gran disponibilidad y precio. El espárrago pertenece a la familia de las Liliáceas y contiene muchos compuestos bioactivos valiosos, como saponinas, flavonoides, fructanos y aminoácidos que lo hacen un material potencial para la síntesis del CA. Con base en lo descrito anteriormente, la finalidad de este trabajo fue probar la capacidad del CA producido a partir residuo agrícola del espárrago, para la remoción simultánea de los iones contaminantes NH_4^+ , PO_4^- , 2,4-DCP y Cd^{2+} , presentes en cuerpos de agua. En reactores en lote fueron obtenidos los datos experimentales de las isotermas de adsorción de dichos iones, evaluando el efecto de pH, temperatura y la presencia de materia orgánica. Posteriormente se estudió la cinética de adsorción de dichos contaminantes y se obtuvieron las curvas de rompimiento de los mismos mediante una columna de lecho empacado con el CA.

PARTE EXPERIMENTAL

Producción de Carbón Activado

Pretratamiento

El residuo del espárrago (RE) fue cortado en fracciones de aproximadamente 3 cm, posteriormente se introdujo en una estufa a 60°C por 3 días. Finalmente, el material fue retirado de la estufa y dispuesto para la activación.

Activación Química

El RE seco, se activó con ZnCl_2 a una concentración de 2.5 M. Se usó una relación de activación de 2.5:1, es decir, 2.5 gramos de material por gramo de agente activante usado. Se pesaron 8 g de agente activante. El agente activante utilizado se disolvió en 100 ml de agua destilada en dos matraces Erlenmeyer de 250 ml y se añadieron 20 g de RE seco a cada matraz. Seguido de esto, los matraces se sellaron con una película auto-sellante y se introdujeron a la estufa a 80 °C durante 24 horas. Posteriormente, se decantó el líquido remanente y nuevamente se secó el material de cada matraz a 80°C durante 24 horas.

Carbonización

Una vez seco el material, este se carbonizó a 500°C durante 44 minutos en una mufla. Las muestras carbonizadas se enjuagaron con abundante agua destilada para eliminar residuos del agente activante y nuevamente se secaron a 80 °C durante 24 horas.

Efecto del pH en el CA para Remoción de Iones contaminantes NH_4^+ , PO_4^- , 2,4-DCP y Cd^{2+}

Para esto se prepararon seis tubos de polipropileno con carbón activado teniendo masas de 10, 30, 70, 120, 160, y 200 g. Posteriormente, se vertieron 40 ml de una solución de 1.3404 mmol equivalentes de NH_4^+ , PO_4^- , 2,4-DCP y Cd^{2+} , en cada tubo. Dichos experimentos se mantuvieron en agitación constante por tres días, durante los cuales se ajustaron los valores de pH a 3, 5, 7 y 9 empleando para esto soluciones de NaOH 0.1 N o ácido clorhídrico 0.1 N según el caso. Al finalizar, se obtuvieron las capacidades de remoción en el carbón activado para la eliminación de los iones NH_4^+ , PO_4^- , 2,4-DCP y Cd^{2+} , presentes en solución, obteniendo las concentraciones finales de cada contaminante.

Efecto de Temperatura

Para esto, se preparó una solución de 1.3404 mmol equivalentes de NH_4^+ , PO_4^- , 2,4-DCP y Cd^{2+} que se vertió en tubos de polipropileno, siguiendo la metodología descrita en la evaluación del efecto del pH. Para cuatro grupos de seis tubos de polipropileno, bajo condiciones de pH 5 y 7 se mantuvieron a temperaturas de 10 y 40 °C, respectivamente. Finalmente, se midió la concentración final de cada ion contaminante y se obtuvieron las capacidades de remoción mediante un balance de masas.

Efecto de Materia Orgánica Natural (NOM)

El efecto de la materia orgánica natural se estudió usando agua de pozo con 157.35 mgDQO/L a pH 7 usando CA. Para este experimento, se extrajo una muestra compuesta de agua de pozo con base en el método descrito en la norma NMX-AA-003-1980 y posteriormente se determinó el contenido de materia orgánica. Con el agua muestreada, se preparó un litro de una solución con NH_4^+ , PO_4^- , 2,4-DCP y Cd^{2+} a una concentración equimolar 1.8404 mmol. La obtención de los puntos de isoterma, se realizó como se describe en la sección de evaluación de pH. Finalmente se obtuvo la concentración final de cada ion contaminante y las capacidades de remoción para el carbón, así como la cantidad de DQO presente en solución antes y después del proceso de adsorción.

Obtención de la cinética de adsorción para carbón activado utilizando un reactor en lote a condiciones de pH neutro y temperatura ambiente, en presencia de MO

Para esto se colocaron 0.8 g de CA 2.5 M en un reactor por lote, que contenía dos litros de una solución de 1.3404 mmol equivalentes de NH_4^+ , PO_4^- , 2,4-DCP y Cd^{2+} , bajo condiciones de pH 7, temperatura de 25 °C, y agitación constante a 300 rpm, durante todo el periodo de operación. Asimismo, se tomaron muestras de 40 ml de forma periódica durante cada 5 min (durante los primeros 15 min), posteriormente cada hora (durante dos horas), y por último cada dos horas hasta llegar al punto de equilibrio, en un tiempo de operación de 45 horas. Dichas muestras fueron vertidas en tubos de polipropileno y posteriormente fueron analizadas para presencia de los iones contaminantes.

Obtención de las Curvas de Rompimiento

Para la obtención de las condiciones de operación de la columna de adsorción se usó un tiempo de saturación (t_{ex}) de 45 horas, una concentración del influente (C_{inf}) de 300 mg/L, una capacidad de adsorción (q) de 123 mg/g y una masa de CA (M_{GAC}) de 5.31g. Para determinar la dosis de CA (D_{GAC}) se usó la Ecuación 1.

$$(D_{\text{GAC}}) = \frac{C_{\text{inf}}}{q} \quad \text{Ec. 1}$$

Donde:

D_{GAC} = dosis de carbón activado, g/L

q = máxima capacidad de adsorción mg/g

C_{inf} = concentración de adsorbente en el influente mg/L

Para determinar el caudal (Q) se usó la Ecuación 2.

$$Q = \frac{M_{\text{GAC}}}{t_{\text{ex}} \cdot D_{\text{GAC}}} \quad \text{Ec. 2}$$

Donde:

Q = Caudal, ml/min

t_{ex} = Tiempo de saturación, minutos
 M_{GAC} = Masa de carbón activado, g
 D_{GAC} = Dosis de CA, g/L

Se hizo pasar un flujo ascendente equivalente a 0.8 ml/min de una solución equimolar de 1.8404 mmol de NH_4^+ , PO_4^- , 2,4-DCP y Cd^{2+} , utilizando una bomba peristáltica. Se tomaron muestras cada media hora durante dos horas y cada hora durante 45 horas hasta encontrar las curvas de rompimiento.

RESULTADOS

Efecto del pH en el CA para Remoción de Iones contaminantes NH_4^+ , PO_4^- , 2,4-DCP y Cd^{2+}

La Tabla 1 muestra las q_{max} obtenidas para los iones estudiados a pH 3, 5, 7 y 9.

Tabla 5. Máximas capacidades de adsorción utilizando el CA a diferentes pH's.

		q_{max} (mg/g)			
pH	°C	2,4-DCP	PO_4	NH_4	Cd^{2+}
3	25	922.28	175.25	26.152	11.8
5		558.97	84.89	39.02	220.22
7		465.93	49.36	22.82	794.25
9		964.13	3.65	22.82	826.63

La evaluación del efecto del pH muestra que las mejores q_{max} de PO_4 y NH_4 ocurren a un pH menor, esto debido a que a valores de pH menores la carga superficial de las especies en solución de cada uno de los iones favorece la adsorción del mismo al material. A medida que el pH aumenta, se favorece la adsorción de 2,4-DCP, y Cd^{2+} , debido a que la remoción de estos contaminantes es más eficiente a condiciones de pH básicas. Además, de que el Cd^{2+} precipita a valores de pH superiores a siete.

Los resultados muestran que capacidades de adsorción de 2,4-DCP, PO_4 y NH_4 aumentan a pH 3, mientras que a pH 7 existe mayor adsorción de Cd^{2+} . Esto debido a que a pH 3, las especies en solución de cada uno de los iones favorece la adsorción del mismo al material. Para el caso del 2,4-DCP, la isoterma describe que el incremento en la capacidad de adsorción se debe a la gran afinidad que tiene el ion por sí mismo. Por otro lado, se observa que a pH 7, tanto la carga superficial del material como la especie en solución de Cd^{2+} , favorecen la adsorción de ion.

Por otro lado, la tabla muestra como las mejores capacidades de adsorción para los contaminantes 2-4 DCP, Cd^{2+} , se dan bajo condiciones de pH 9, alcanzando valores de 964.13 mg/g y 826.63 mg/g, respectivamente. Sucede de manera distinta para el amonio y el fosforo, ya que la adsorción disminuye a pH de 5, alcanzando valores de 84.89 mg/g y 39.02 mg/g, respectivamente.

Los resultados para 2-4 DCP, Cd^{2+} pueden deberse a que la remoción de estos contaminantes es más eficiente a condiciones de pH básicas, que a condiciones acidas. Además, de que se sabe que el Cd^{2+} precipita a valores de pH superiores a siete, lo cual favorece la remoción de este contaminante sin necesidad de llevar a cabo un proceso de adsorción. Por otro lado, se observa que los contaminantes NH_4^+ y PO_4^- son adsorbidos de manera más eficiente bajo condiciones de pH cercanas a valores ácidos, un comportamiento que probablemente esté relacionado con sus diagramas de especiación. Además de que el CA 2.5 M cuenta con una mayor cantidad de grupos funcionales basicos, lo cual teóricamente lo haría más eficiente a valores de pH ácidos.

Efecto de Temperatura

La Tabla 2 muestra las máximas capacidades de adsorción de los diferentes iones tóxicos a temperaturas de 10, 25 y 40 °C. En cuanto al efecto de temperatura, para el caso de NH_4 y Cd^{2+} a

pH 7 el aumento en la temperatura favorece la adsorción. Ocurre lo mismo en el caso del 2,4-DCP y el PO₄ bajo condiciones pH 5. Esto nos confirma que el efecto de temperatura influye de manera positiva en la capacidad del CA 2.5 M, para llevar a cabo el proceso de adsorción.

Tabla 6. Máximas capacidades de adsorción utilizando el CA a diferentes Temperaturas

$q_{\max}$ (mg/g)					
pH	°C	2,4-DCP	PO ₄	NH ₄	Cd ²⁺
5	10	92.58	84.63	13.26	348.85
	25	558.97	84.89	39.02	220.22
	40	442.62	291.80	71.99	816.47
7	10	88.347	314.593	63.847	794.517
	25	465.93	49.359	22.825	794.257
	40	442.629	291.805	71.990	816.478

pH 5

Se observan capacidades de adsorción mayores para cada ion, expuesto a condiciones de temperatura de 40 °C, mostrando capacidades de adsorción de 442.62 mg/g, 816.47 mg/g, 71.99 mg/g y 291.8 mg/g para 2-4 DCP, Cd²⁺, NH₄⁺ y PO₄⁻, respectivamente. Tales resultados superan la capacidad de adsorción obtenida a temperatura de 25 °C, exceptuando el caso del 2,4-DCP, que obtuvo una capacidad de 558.97 mg/g. Además, se observan capacidades de adsorción menores para condiciones de temperatura 10 °C, mostrando valores de 92.58 mg/g, 348.85 mg/g, 13.26 mg/g y 84.63 mg/g, para 2-4 DCP, Cd²⁺, NH₄⁺ y PO₄⁻, respectivamente. Esto nos confirma que el efecto de temperatura influye de manera positiva en la capacidad del CA 2.5 M, para llevar a cabo el proceso de adsorción. Presentando mayores capacidades de adsorción a temperaturas de 40 °C, que a 10 y 25 °C; esto debido a que probablemente el proceso de adsorción química que se lleva a cabo en el CA es un proceso endotérmico, es decir, cualquier reacción química que requiere energía, normalmente en forma de calor (Gómez, 2007). Lo cual implicaría que este proceso de adsorción necesita de energía para llevarse a cabo, es así que, al aumentar la temperatura en el medio, la adsorción se lleva a cabo de manera más eficiente, ya que el calor suministrado acelera la reacción en el material.

pH 7

Por otro lado, los resultados muestran que para el caso del 2,4-DCP, la máxima capacidad de adsorción se alcanzó a 25°C con un valor de 465.93 mg/g, luego de lo obtenido a 40 y 10 °C, respectivamente. Para el grupo fosfato, la máxima capacidad de adsorción se obtuvo a 10°C con un valor de 314.59 mg/g seguido de 291.80 y 49.35 mg/g a 40 y 25 °C, respectivamente. Por su parte, los iones de amonio y cadmio se adsorben en mayor proporción a 40°C con valores de 71.99 y 816.478 mg/g, respectivamente. El efecto de la temperatura sobre la adsorción cambia en relación a las condiciones de operación, las propiedades del material adsorbente y del soluto, por lo que, su influencia será distinta para cada uno de los iones en solución. Para el caso de NH₄ y Cd²⁺ un aumento en la temperatura influye de manera positiva en la adsorción de los mismos; esto indica que el proceso es de naturaleza endotérmica, es decir, necesita energía para llevarse a cabo de manera más eficiente. La capacidad de adsorción para el caso de NH₄, aumenta un 11% y 68 %, mientras que para Cd²⁺ un 2.68 y 2.72 % a 40 °C respecto a lo obtenido a 10 y 25 °C, para cada ion. Por otro lado, el incremento en la adsorción del grupo fosfato a 10 y 40 °C indica que bajo estas condiciones existe mayor afinidad por la especie de PO₄ en relación a los otros iones en solución posiblemente debido a que a bajas temperaturas la difusión tarda más tiempo en ocurrir por lo que las especies contaminantes., mientras que, a 40 °C, la adsorción favorece a las especies de NH₄ y Cd²⁺.

Efecto de Materia Orgánica Natural (NOM)

La Tabla 3 muestra las máximas capacidades de adsorción del CA a diferentes pH's y con la presencia de materia orgánica. La presencia de NOM muestra una disminución de la capacidad de

adsorción en los iones contaminantes; esto debido a que estos compuestos pueden bloquear la entrada de los poros del material por lo que reducen la capacidad de adsorción del mismo.

Tabla 3. Máximas capacidades de adsorción utilizando el CA en presencia de NOM

$q_{\max}$ (mg/g)					
pH		2,4-DCP	PO ₄	NH ₄	Cd ²⁺
5	MO	363.02	0	21.46	432.87
	S/MO	558.97	84.89	39.02	220.22
7	MO	123.70	113.74	26.66	432.57
	S/MO	465.93	49.36	22.82	794.25

pH 5

Se observan capacidades de adsorción mayores en presencia de materia orgánica para el Cd²⁺, mostrando un valor de 432.87 mg/g, en comparación con los 220.22 mg/g obtenidos en la adsorción en ausencia de materia orgánica. Por otro lado, los resultados para los otros iones resultan ser mejores en ausencia de MO, alcanzando valores de 558.97 mg/g, 39.02 mg/g y 84.89 mg/g para 2,4 DCP, NH₄⁺ y PO₄⁻, respectivamente. Además, se obtuvo un porcentaje de remoción de DQO del 30.06%, mostrando que el CA 2.5 M también tiene la capacidad de remover MO de cuerpos de agua. Esto muestra que la presencia de MO disuelta en solución afecta negativamente las capacidades de remoción del CA 2.5 M, probablemente debido a que esta ocupa los poros del material adsorbente, evitando la formación de monocapas alrededor del material y no permitiendo que los contaminantes sean adsorbidos en su totalidad; sin embargo, a pesar de esto, las capacidades de adsorción son favorables y alcanzan valores de remoción significativos.

pH 7

Los resultados muestran que existe mayor capacidad de adsorción de 2,4-DCP y Cd²⁺ en ausencia de NOM con valores de 465.83 y 794.257 mg/g, respectivamente. No obstante, para el caso de PO₄ y NH₄, existe mayor adsorción en presencia de materia orgánica natural. El decremento de la capacidad de adsorción del material en presencia de NOM para los iones de 2,4-DCP y Cd²⁺, describe que el sistema de adsorción se ve afectado de manera negativa con la presencia de compuestos con alto peso molecular como lo es la materia orgánica natural. Esto, debido a que estos compuestos pueden bloquear la entrada de los poros del material por lo que reducen la capacidad de adsorción del mismo (Crittenden et al., 2012). Por otro lado, el incremento en la adsorción del grupo fosfato y el ion amonio en un sistema en presencia de materia orgánica, se debe a que, naturalmente, los cuerpos de agua contienen NOM la cual está conformada por una gran variedad de constituyentes entre los que se encuentran el ion amonio y el grupo fosfato (Fuentes et al., 2015), por lo que al agregar mayor concentración de estos iones a un sistema en competencia a concentraciones equimolares, favorece la adsorción de los mismos.

Obtención de la cinética de adsorción para carbón activado utilizando un reactor en lote a condiciones de pH neutro y temperatura ambiente, en presencia de MO

La Figura 1 muestra los datos obtenidos en el experimento de cinética, es decir, el decaimiento de la concentración con respecto al tiempo, para la adsorción de Cd²⁺, tanto en presencia de materia orgánica como en ausencia de la misma, en CA 2.5 M. las condiciones de operación fueron 25 °C, pH 7 y presencia de MO.

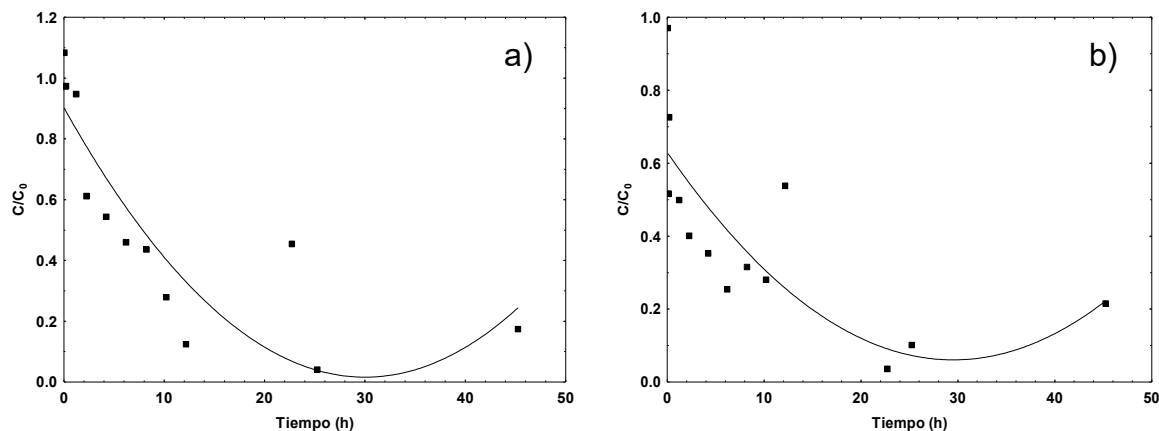


Figura 1. Cinéticas de adsorción en CA 2.5 M, a pH 7 y temperatura de 25 °C, para: a) Cd^{2+} en ausencia de MO y b) Cd^{2+} en presencia de MO.

Las cinéticas describen la velocidad de adsorción del adsorbato en el adsorbente y determina el tiempo en que se alcanza el equilibrio (Murillo et al., 2011). Durante el proceso de adsorción del cadmio se presentan tres fases, la primera de ellas consiste en el transporte de las especies disueltas desde el seno de la solución hacia la superficie del material, posteriormente estas especies son transportadas por difusión a los poros y finalmente hacia los sitios activos del CA. En las gráficas anteriores se puede observar que la primera fase ocurre en las primeras 30 horas, y logra llegar al equilibrio en menos de 50 horas para ambos casos. Se observa entonces que la remoción es significativa en las 30 primeras horas, lo cual se debe, posiblemente a la disponibilidad de SBT, que favorecen la adsorción en el CA 2.5 M; hasta llegar a condiciones de equilibrio.

A continuación, se presentan los datos obtenidos en el experimento de cinética, para la adsorción de NH_4^+ , tanto en presencia de materia orgánica como en ausencia de la misma, en CA 2.5 M

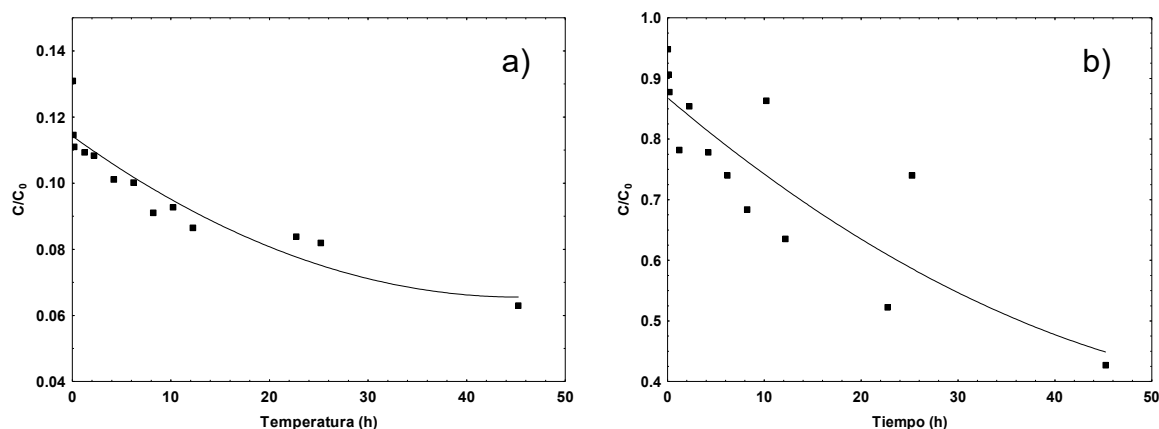


Figura 2. Cinéticas de adsorción en CA 2.5 M, a pH 7 y temperatura de 25 °C, para: a) NH_4^+ en ausencia de MO y b) NH_4^+ en presencia de MO

De igual manera, las cinéticas presentadas describen la velocidad con la que se adsorbe el amonio en el CA 2.5 M, determinando el tiempo en que se alcanza el equilibrio (Murillo et al., 2011). En las cinéticas obtenidas para el NH_4^+ , se puede observar que la primera fase, en la cual se da el transporte de las especies disueltas desde el seno de la solución hacia la superficie del material, ocurre en las primeras 25 horas, y logra llegar al equilibrio aproximadamente a las 45 horas para el caso sin materia orgánica, y no logra alcanzar el equilibrio para el caso que presenta MO. Se observa entonces que la remoción es significativa en las primeras 25 horas, lo cual probablemente se deba a la disponibilidad de SBT presentes en el material adsorbente.

El decaimiento de la concentración respecto al tiempo de los iones de 2,4-DCP y PO₄ se obtuvo siguiendo método descrito anteriormente a condiciones de pH neutro, temperatura ambiente y agitación de 250 rpm. A continuación, se presentan las cinéticas de adsorción obtenidas para 2,4-DCP en presencia y ausencia de materia orgánica natural (Figura 3).

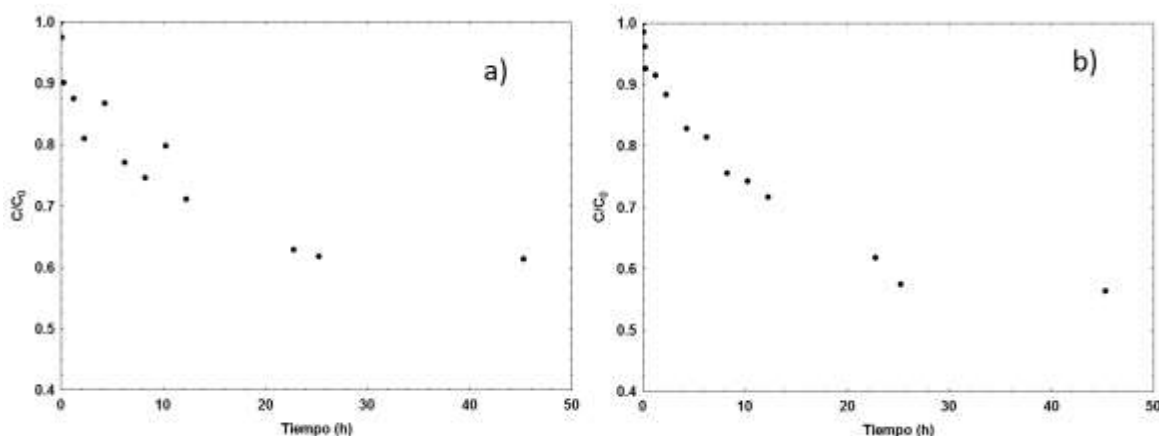


Figura 3. Decaimiento de la concentración de 2,4-DCP con respecto al tiempo a pH 7, 25 °C, 250 rpm; a) Sistema en ausencia de NOM y b) Sistema en presencia de NOM.

Las curvas obtenidas en ambos sistemas, muestran una tendencia descendente desde los primeros minutos del experimento en los cuales C/C_0 disminuye conforme avanza el tiempo. Finalmente, se observa un comportamiento asintótico a partir de las 25 horas en ambos experimentos. Los modelos cinéticos de adsorción permiten conocer el tiempo, la velocidad en que se realiza el proceso de adsorción y las etapas de transporte del adsorbato desde el seno de la solución hasta el sitio activo de la superficie adsorbente (Murillo et al., 2011; Rodríguez et al., 2014). Las primeras dos etapas de la cinética de adsorción, ocurren en los primeros segundos a partir de que el material se encuentra en contacto con la fase líquida y el ion contaminante se desplaza desde la fase líquida hacia la interface que rodea al CA-2. Durante las primeras dos horas, la concentración inicial del 2,4-DCP disminuye en un 20% lo que se expresa en la inclinación prolongada de la curva, esto es atribuido a que el sistema ya se encuentra en las etapas tres y cuatro en donde el ion contaminante difunde al interior del adsorbente y finalmente ocurre la adsorción en los sitios activos disponibles (García, 2014). Por otra parte, el comportamiento asintótico que se muestra a partir de las 25 horas indica que hay una disminución en la adsorción por los procesos de difusión en donde la concentración del 2,4-DCP en la solución ya no es suficiente para generar una fuerza impulsora que favorezca la difusión de los iones hasta los sitios activos, asimismo, es posible que los sitios activos disponibles ya hayan sido ocupados por este u otros iones en solución. Finalmente, ambos sistemas, logran llegar al equilibrio en 45 horas en los cuales hay una remoción de 2,4-DCP del 41.8 y 43.62%, respectivamente.

A continuación, se presenta la cinética de adsorción correspondiente al PO₄ en un sistema en competencia en presencia y ausencia de NOM (Figura 4).

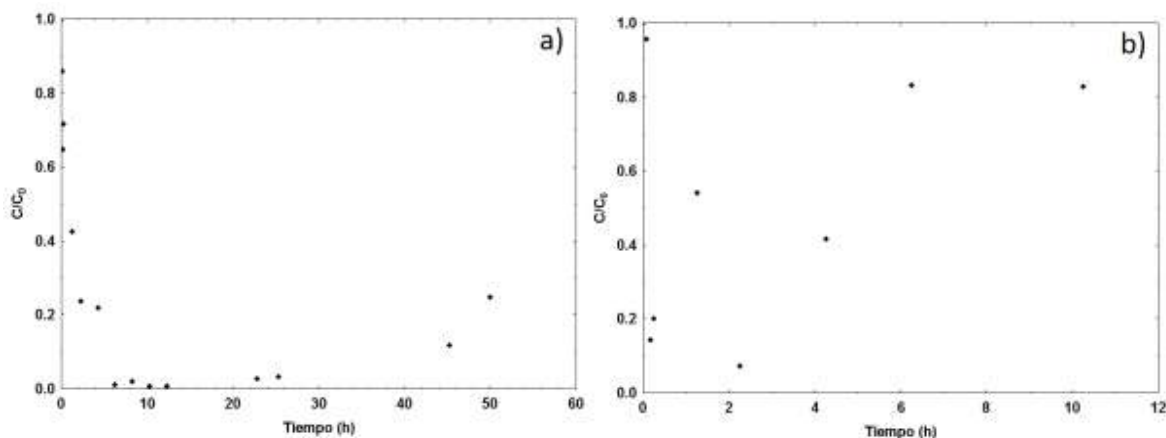


Figura 4. Decaimiento de la concentración de PO_4 con respecto al tiempo a pH 7, 25 °C, 250 rpm; a) Sistema en ausencia de NOM y b) Sistema en presencia de NOM.

La curva obtenida para el grupo fosfato en un sistema libre NOM, muestra una tendencia descendente desde los primeros minutos donde C/C_0 , disminuye conforme avanza el tiempo hasta las 10 horas, seguido de esto, se observa un comportamiento asintótico hasta las 45 horas y finalmente un incremento en la concentración del mismo. En cambio, la Figura b) no muestra una tendencia definida, no obstante, se observa que la concentración de PO_4 disminuye considerablemente durante las primeras 3 horas, sin embargo, a medida que el tiempo avanza, la concentración del mismo aumenta nuevamente.

Similar a lo obtenido para ion de 2,4-DCP, la cinética de adsorción de PO_4 muestra que las primeras dos etapas ocurren en los primeros segundos. Para el sistema libre de NOM, se observa que, la concentración inicial del grupo fosfato disminuye en un 80% durante las primeras cuatro horas, posteriormente, se observa un comportamiento asintótico hasta las 45 horas. Por otro lado, pese a que la Figura 31-b no muestra una tendencia definida, se observa que, durante las primeras dos horas, el material remueve cerca del 95% de PO_4 en solución, no obstante, a medida que avanza el tiempo, nuevamente hay presencia de PO_4 en el medio.

Obtención de las Curvas de Rompimiento

Obtención de las curvas de rompimiento de contaminantes en competencia Cd^{2+} y NH_4^+ , en carbón 2.5 M, utilizando una columna empacada, bajo condiciones de pH = 7 y temperatura ambiente, en presencia de MO

Se realizaron los experimentos de las curvas de rompimiento para determinar el punto de saturación de la columna de adsorción en el momento en que la concentración del efluente alcance un valor dado, denominado “concentración de rompimiento” (Yesid, 2011).

La Figura 5 muestra la curva de rompimiento experimental obtenida para el Cd^{2+} y el NH_4^+ , utilizando el CA 2.5 M, empacado en una microcolumna, con parámetros de operación de 25 °C, pH 7 y presencia de MO.

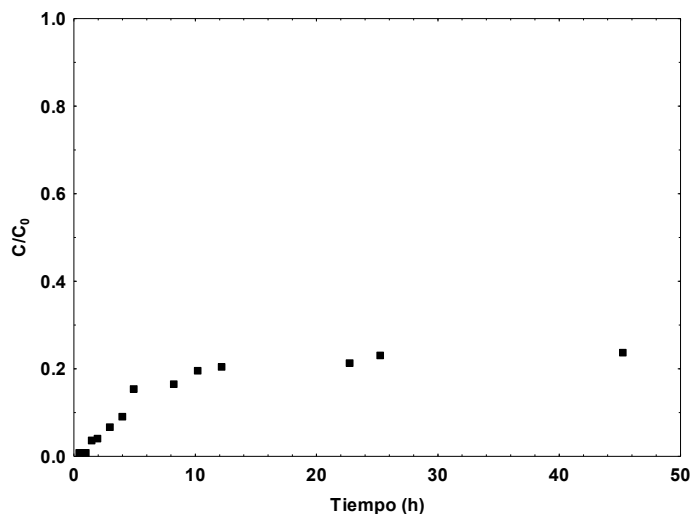


Figura 5. Curva de rompimiento del CA 2.5 M, a condiciones de pH 7, temperatura 25 °C y presencia de materia orgánica, para Cd^{2+} .

La curva de rompimiento muestra un perfil de concentración ascendente en las primeras 30 h de operación, presentando un comportamiento asintótico a partir de un tiempo de operación de 35 horas. Se observa, además, que no se alcanzó el rompimiento, que fue previamente establecido a 35 %, llegando a un valor de 20 %, para la adsorción de Cd^{2+} en la columna empacada.

La Figura 6 muestra la curva de rompimiento experimental obtenida para el NH_4^+ , utilizando el CA 2.5 M, empacado en una micro columna, con parámetros de operación de 25 °C, pH 7 y presencia de MO.

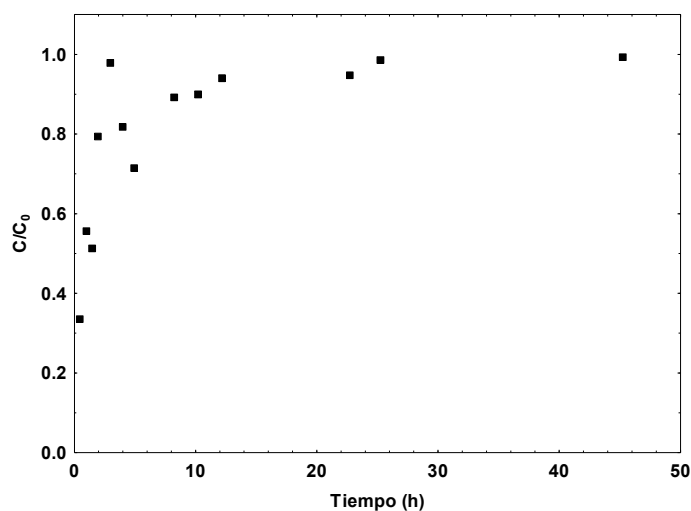


Figura 6. Curva de rompimiento del CA 2.5 M, a condiciones de pH 7, temperatura 25 °C y presencia de materia orgánica, para NH_4^+ .

La curva de rompimiento muestra un perfil de concentración ascendente en la primera hora de operación, alcanzando una saturación del 100 % al pasar las primeras dos horas; y posteriormente presentando un descenso en la concentración después de un tiempo de operación de 35 horas. Se observa, además, que se alcanzó el rompimiento previamente establecido a 35 %, en las primeras horas de operación.

Lo anterior está relacionado a las fuerzas impulsoras en el proceso de adsorción y consecuentemente por estas se determina el comportamiento del adsorbente en un modo de operación continuo. Es sabido que el gradiente de concentración afecta las tasas de adsorción y el fenómeno de transferencia de masa y determina el tiempo de contacto entre el adsorbente y la solución contaminante.

Finalmente, se obtuvieron las curvas de rompimiento de los iones de 2,4-DCP y PO_4 en competencia con NH_4 y Cd^{2+} . Se utilizó CA empacado en una micro columna con parámetros de operación a 25 °C, pH 7, presión atmosférica, con una solución equimolar de 0.3 mmol de 2-4 DCP, PO_4 , utilizando una bomba peristáltica a un flujo de 0.8 ml/min. La Figura 7 muestra la curva de rompimiento obtenida para el 2,4-DCP usando CA- 2 a pH 7, 25 °C en competencia con PO_4 , NH_4 y Cd^{2+}

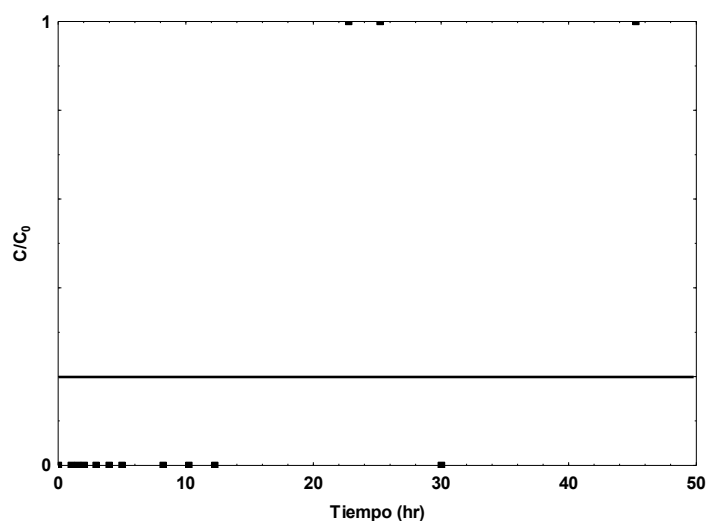


Figura 7. Curva de Rompimiento de 2,4-DCP a pH 7; 25°C

La curva muestra un perfil de concentración lineal durante las primeras 10 horas de operación del experimento, posteriormente, a las 22 horas se observa el rompimiento del material. Los sistemas de flujo continuo, tienen la finalidad de reducir la concentración en el efluente para que no exceda un valor predeterminado de ruptura (Báez, 2005). Este valor también es conocido como el límite máximo permisible de adsorbato en el efluente de la columna de adsorción. En este experimento, el valor establecido para el rompimiento fue del 20% de la concentración inicial. Con base en esto, se observa que el sistema tiene una eficiencia del 100% hasta que alcanza el rompimiento a las 22.75 horas.

Por otro lado, en la Figura 8 se muestra la curva de rompimiento obtenida para el grupo fosfato en competencia con 2,4-DCP, NH_4 , y Cd^{2+} . La curva de rompimiento de PO_4 muestra un perfil de concentración ascendente a partir de la primera hora de operación, alcanzando una saturación del 100% en las primeras 1.5 horas, no obstante, posteriormente se observa un descenso en la concentración hasta las 30 horas.

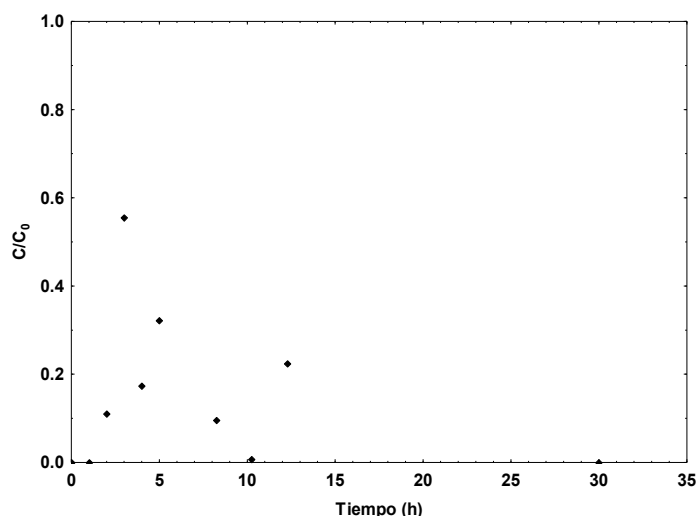


Figura 8.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha estudiado el potencial del carbón activado producido a partir del residuo del espárrago para remover plaguicidas, fertilizantes y metales pesados de cuerpos de agua. Los resultados mostraron que el residuo de espárrago presenta gran potencial para ser usado como precursor para la producción de carbón activado granular debido a que posterior al proceso de activación, aún conserva las características mecánicas y estructurales del material sin modificar gracias a que está constituida en mayor proporción por compuestos lignocelulósicos. Por otro lado, se comprueba que la concentración de agente activante es un factor determinante que brinda características específicas al material según la concentración del mismo. La evaluación de la capacidad de adsorción del carbón producido a partir de una activación química usando ZnCl_2 como agente activante, mostró que existe mayor afinidad por el 2,4-DCP en ambos pH estudiados (pH 4 y 6) usando CA. Contrario a lo predicho, la evaluación del efecto del pH sobre la adsorción de 2,4-DCP, PO_4 , NH_4 y Cd^{2+} en un sistema en competencia usando, mostró que existe mayor adsorción de los iones de 2,4-DCP, PO_4 , y NH_4 a pH menor, mientras que para el ion de Cd^{2+} a pH 7. Por otro lado, el efecto en la temperatura mostró que el proceso de adsorción es de naturaleza endotérmica el cual se ve favorecido a partir de temperaturas mayores de 25°C para los iones de 2,4-DCP, NH_4 y Cd^{2+} , no obstante, se sugiere estudiar a profundidad el calor de adsorción de las entalpías de adsorción para saber con exactitud qué ocurre en el sistema. La evaluación de la presencia de materia orgánica en un medio de adsorción por competencia influye de manera negativa para la adsorción de los iones de naturaleza inorgánica 2,4-DCP y Cd^{2+} , mientras que la adsorción de los iones de PO_4 y NH_4 se ve favorecida en presencia de la misma. Los estudios de cinética de adsorción mostraron que una remoción del 20% de la concentración inicial de 2,4-DCP, se alcanza durante las primeras dos horas de operación y logra una remoción del 40% constante a partir de las 25 horas durante las 45 horas de operación; mientras que la remoción del 80% de NH_4 se obtiene a partir de las primeras 4.25 horas de operación. Por otro lado, la obtención de las curvas de rompimiento en lechos empacados a flujo constante mostró que para el caso de 2,4-DCP el rompimiento ocurre después de las 22 horas garantizando una eficiencia del 100% durante el periodo mencionado; por otro lado, mientras que para el PO_4 . Finalmente, se comprobó que las interacciones electrostáticas entre los iones y el material adsorbente en un sistema de multicomponentes en competencia, favorecen la capacidad de adsorción del material al formar nuevos grupos funcionales que atraerán más iones a la superficie del adsorbente formando multicapas, no obstante, no es posible decir con exactitud cuál ion favorece la adsorción de los demás debido a que la química superficial de los materiales es muy compleja. Finalmente, al comparar los resultados de las capacidades de adsorción obtenidas y compararlas con los datos reportados en los antecedentes, se concluye que el carbón activado presenta capacidades de adsorción que son capaces de superar a las de los materiales adsorbentes convencionales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Celaya, B. (2018). Residuo de esparrago como biosorbente para la remoción dinámica de azul de metileno y cadmio presentes en solución acuosa: Estudios de equilibrio, cinéticos y de columna. Tesis de Grado. Instituto Tecnológico del Valle de Morelia. Morelia, México.
2. Lavie, E., Morábito, J., Salatino, S., Bermejillo, A., y Filippin, M. F. (2010). Phosphate pollution in the oasis irrigated by the Mendoza River. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 42, 160–184.
3. Lemus, K. (2018). Producción de Carbón Activado a partir de desechos de esparrago (*Asparagus Officinalis*) con distintos agentes activantes para la remoción de contaminantes en solución acuosa. Tesis de Grado. Instituto Tecnológico del Valle de Morelia. Michoacán, México.
4. Reyes, Y., Vergara, I., Torres, O., Díaz, M., & González, E. (2016). Heavy metals contamination: implications for health and food safety. *Revista Ingeniería, Investigación y Desarrollo*, 16(2), 66–77.
5. Hernández, O., Mendoza, J., Guerrero, R., y Leyva, R. (2003). Adsorción de Pentacloroenol en solución acuosa sobre carbones activados comerciales. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 19(3), 137–144.
6. Crittenden, C., Rhodes, R., Hand, W., Howe, J., Tchobanoglous, G., (2012). *MWH's Water Treatment: Principles and Desing*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
7. Fuentes, J. (2009). Caracterización de componentes bioactivos del esparrago verde: obtención de ingredientes funcionales a partir de los subproductos generados durante su transformación industrial. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. Córdoba, España.
8. Murillo, Y., Giraldo, L. y Moreno, J. (2011). Determination of the 2-4-dinitrofenol adsorption kinetic on bovine bone char by UV-Vis spectrophotometry. *Revista Colombiana de Química*, 40(1), 91-104.
9. García, N. (2014). Una nueva generación de carbones activados de altas prestaciones para aplicaciones medio ambientales. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo. Asturias, España.
10. Yulieth C. Reyes, Inés Vergara, Omar E. Torres, Mercedes Díaz, Edgar E. González. (junio, 2016). Contaminación por metales pesados: implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Ingeniería, Investigación y Desarrollo*, 16, 12. 18/109/2019, De Dialnet Base de datos.
11. Báez, R. (2015). Recuperación de fenol de efluentes industriales mediante un proceso automatizado de adsorción en continuo. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León, México.
12. Xu, D., Tan, X., Chen, C. y Wang, X. (2008). Adsorption of Pb (II) from aqueous solution to MX-80 bentonite: Effect of pH, ionic strength, foreign ions and temperature. *Applied Clay Science*, 41(2008), 37-46.

EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE UN SHAMPOO ORGÁNICO CON QUITOSANO PARA EL TRATAMIENTO DE LA ALOPECIA, CASPA Y RESEQUEZ EN EL CUERO CABELLUDO

Naomi Yunuen Frias Aguilar¹, Aldo Darien Martínez Montiel², Joshua Samuel Frias Aguilar³, Juan Esteban Ramírez Gutiérrez⁴, María Teresa Fuentes Romero⁵ y Jesús Nicolás Bermúdez⁶

Universidad Tecnológica Fidel Velázquez
22313015@utfv.edu.mx

RESUMEN

Actualmente los mercados de productos orgánicos están en auge, esto debido al rechazo, sensibilidad y dermatitis que pueden causar productos con alto contenido de químicos sintéticos. Es por ello, que el objetivo de este trabajo fue desarrollar un shampoo orgánico con quitosano. La fórmula se hizo pensando en las principales problemáticas a tratar con productos del mismo tipo en el cual se incluyen la alopecia, caspa, sequedad y seborrea, utilizando como base extractos orgánicos, aceites minerales, algunas proteínas para nutrir el cabello y como parte del principio activo se añadió quitosano. Para el uso del producto se humedeció primero el cabello y el cuero cabelludo, posteriormente se colocó el producto según el largo del cabello, se esparció de manera uniforme con ambas manos y se frotó en espiral usando las yemas de los dedos, al final se dejó actuar el producto durante al menos 3 minutos y después se enjuagó hasta limpiar los restos del producto. El procedimiento se realizó en un periodo de 3 meses y el tamaño de muestra fue de 16 personas con al menos uno de los problemas a tratar.

Durante la primer semana se observaron en la mayoría de los casos algunas características como la sedosidad del cabello, en mujeres ya no se enredaba y en los pacientes con alopecia comentaban una picazón en las zonas con disminución de cabello; durante la segunda y tercer semana en los pacientes con caspa se observa una disminución significativa en la descamación, al igual que calma de la picazón provocada al salir durante días soleados, durante estas semanas las personas con alopecia continuaban con picazón constante, incluso 2 pacientes debido a la desesperación renunciaron al tratamiento; en la cuarta semana los pacientes con alopecia comenzaron a tener brote de algunos cabellos en las zonas principales del tratamiento, de igual manera las personas con sequedad en esta semana habían eliminado la descamación y los pacientes con caspa tenían una mínima evidencia de aún tener la afección; se observó el uso intermitente del producto en los pacientes restantes para ver el progreso.

Al concluir el tiempo acordado para el tratamiento en los pacientes se han determinado las principales características del producto, las cuales satisfacen las necesidades planteadas, de igual manera se observa que los efectos del producto dependen del tipo de piel que se tenga, la afección a tratar, el pH de la persona, el largo del cabello y la edad de las personas, por último y no menos importante se aclara que la picazón causada por el producto es por la activación de los folículos en las zonas con alopecia.

INTRODUCCIÓN

La salud y cuidado del cuero cabelludo son la constante preocupación de muchas personas y problemas como la caspa, alopecia y seborrea pueden causar incomodidad y afectar la autoestima. En la búsqueda por solucionar este problema se han creado distintos productos, sin embargo, en los productos con ya comerciales no se ha satisfecho esta necesidad debido a la cantidad de químicos sintéticos presentes en los mismos que causan distintas reacciones adversas en los pacientes que padecen de caspa, alopecia y sequedad en el cuero cabelludo, siendo así los productos de origen orgánico los que han mostrado mejor respuesta en el tratamiento de estas afecciones.

Entre los activos del shampoo se encuentra el quitosano, un polímero natural derivado de la quitina el cual cuenta con múltiples beneficios para el cuidado del cuero cabelludo y el cabello, su principal atractivo se encuentra sus propiedades antiinflamatorias y antimicrobianas las cuales ayudan a la

irritación y la inflamación del cuero cabelludo, además de brindar hidratación y protección formando una capa protectora que ayuda a reforzar la barrera cutánea del cuero cabelludo ayudando así a la estimulación del crecimiento capilar dando como resultado final salud, suavidad, brillo y manejabilidad del cabello.

Este trabajo tiene como objetivo evaluar la eficacia de dichas propiedades del quitosano en conjunto con algunos aceites minerales aplicadas en un shampoo en el tratamiento de estas afecciones capilares. Se reclutará a un grupo de participantes con al menos uno de los padecimientos a tratar y se evaluará la percepción de estos usuarios con la finalidad de obtener una visión general sobre su satisfacción y eficacia percibida del shampoo en su caso particular.

Los resultados de esta evaluación muestran este shampoo como una contribución al desarrollo de productos orgánicos para tratar problemas capilares comunes como lo son la caspa, alopecia y resequedad brindando así una opción más saludable y respetuosa con el medio ambiente y el usuario.

TEORÍA

Problemas como la caspa, la resequedad y la alopecia son problemas capilares comunes que afectan a gran parte de la población a diferentes edades por diversas razones como lo son la genética, el estrés experimentado por la gente, clima, productos capilares agresivos, lavado excesivo, los desequilibrios hormonales, etc. Estos problemas pueden tener un impacto negativo en la calidad de vida de las personas que tiene alguno de los padecimientos.

El tratamiento que se le suele dar a estas problemáticas involucran productos químicos sintéticos los cuales con los efectos secundarios indeseables que suelen tener están lejos de resolver el problema, además, sus efectos no suelen permanecer con el paso del tiempo. Es así como surge la necesidad de explorar alternativas naturales más sostenibles que puedan abordar de manera efectiva estas afecciones.

El quitosano, un derivado de la quitina, que posee propiedades atractivas para su implementación en un shampoo que ayude a dar solución a estas problemáticas, sus propiedades antiinflamatorias, humectantes y estimulantes del crecimiento capilar lo hacen el candidato ideal para esta aplicación. Las propiedades antiinflamatorias y antimicrobianas del quitosano ayudarán a reducir la inflamación y el crecimiento excesivo de hongos y bacterias asociados con la alopecia y la caspa. Sus propiedades humectantes que forman capas protectoras mejora la hidratación y barrera cutánea reduciendo así la resequedad.

Los aceites minerales que se utilizan para beneficiar y ayudar en esta problemática son los aceites de aloe vera, aceite de romero, y el aceite de menta, debido a que favorecen a la irritación que puede llegar a causar la resequedad en el cuero cabelludo, de igual manera ayudan y brindan una mejor estructura en el cabello.

PARTE EXPERIMENTAL

Se reclutó a una población de 16 personas para la valoración del uso de este shampoo para el cual se tomaron criterios de aceptación para el estudio, como el uso correcto del shampoo por un tiempo determinado, así como que fueran individuos que padecieran caspa, seborrea y/o alopecia. La población se dividió en 3 grupos de aproximadamente 5 integrantes cada uno los cuales se denominaron, grupo control, grupo intensivo y grupo bandera.

Para el grupo bandera se aplicó el shampoo “Eco Liss” usando en el baño de forma intermitente, es decir, un día sí y un día no en la cual cada individuo fue responsable de su tratamiento, durante un lapso de 3 meses.

El grupo intensivo fue tratado de igual manera con “Eco Liss” aplicando el shampoo mediante el apoyo de una estética en este lugar se les pidió que lavaran el cabello y posteriormente retiraran el producto dando un masaje estimulante, también durante un lapso de 3 meses.

Finalmente, el grupo control se trató durante el primer mes con “Eco Liss” de manera intermitente, es decir, un día sí y un día no, para este grupo cada individuo fue responsable de su tratamiento, posterior al primer mes, se les pidió que usaran el shampoo de su preferencia que ya se encontrara en el mercado utilizando el mismo método de lavado de manera intermitente, por último, el tercer mes se les pidió que regresaran al tratamiento de “Eco Liss” para la comparativa.

RESULTADOS



Fig 1. Paciente 1 con caspa antes de empezar el tratamiento con “Eco Liss”.

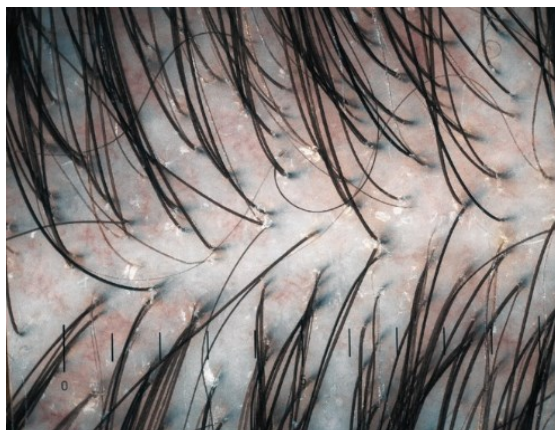


Fig 2. Resultado del paciente 1 después del tratamiento con “Eco Liss”.

Una vez se reclutó al grupo de personas y se les explicó el método de aplicación, el cual de manera detallada es el siguiente: se humedece primero el cabello y el cuero cabelludo, posteriormente se coloca el producto según el largo del cabello, para después esparcirlo de manera uniforme con ambas manos y se frota en espiral usando las yemas de los dedos dejando actuar el producto durante al menos 3 minutos para su posterior se enjuague hasta limpiar los restos del shampoo.

El procedimiento se realizó en un periodo de 3 meses y el tamaño de muestra fue de 16 personas con al menos uno de los problemas a tratar. Durante la primera semana se observaron en la mayoría de los casos algunas características como la sedosidad del cabello, en mujeres ya que no se enredaba, así mismo, en los pacientes con alopecia comentaban una picazón en las zonas con disminución de cabello; durante la segunda y tercera semana en los pacientes con caspa se observa una disminución significativa en la descamación, al igual que calma de la picazón provocada al salir durante días soleados. Durante estas semanas las personas con alopecia continuaban con picazón constante, provocando inclusive que 2 pacientes debido a la desesperación renunciaran al tratamiento; en la cuarta semana los pacientes con alopecia comenzaron a tener brote de algunos cabellos en las zonas principales del tratamiento, de igual manera las personas con resequead en esta semana habían eliminado la descamación y los pacientes con caspa tenían una mínima evidencia de aún tener la afección; se observó el uso intermitente del producto en los pacientes restantes para ver el progreso.

Al concluir el tiempo acordado para el tratamiento en los pacientes se han determinado las principales características del producto, las cuales satisfacen las necesidades planteadas, de igual manera se observa que los efectos del producto dependen del tipo de piel que se tenga, la afección a tratar, el pH de la persona, el largo del cabello y la edad de las personas, por último y no menos importante se aclara que la picazón causada por el producto es por la reactivación de los folículos en las zonas con alopecia.

CONCLUSIONES

Los resultados de la evaluación de la eficacia de aplicación de un shampoo orgánico con quitosano para el tratamiento de la alopecia, caspa y resequedad en el cuero cabelludo demostraron ser prometedoras como alternativa de los productos ya existentes.

El análisis de resultados de las personas encuestadas que decidieron seguir con el tratamiento mostró su eficacia primeramente en los pacientes con caspa quienes mencionaron la eliminación de la picazón y la descamación causada por la misma, los pacientes con alopecia reportaron una ligera picazón en el cuero cabelludo resultado de la generación de nuevo cabello, finalmente las personas tratadas por resequedad manifestaron la mejora en la hidratación pacientes mencionan tener mejor salud y aspecto estético, así como, manejabilidad de su cabello.

En conclusión y de manera general el shampoo orgánico con quitosano fue bien recibido por la mayoría los usuarios mostrando evidencia sobre los beneficios capilares evidenciándolo como una alternativa eficaz para la mejora de la salud y el aspecto del cabello y cuero cabelludo.

BIBLIOGRAFÍA

1. De Almeida Braga, NC, Moreno Pinho, AP y Lúcio Leócadio, Á. (2023). Slow Beauty: investigación sobre el consumo de alternativas sustentables de cosméticos. ECCOM: Educação, Cultura e Comunicação , 14 (28).
2. García Díaz, G. L., Tzián Toxcón, C. J., & Zamora Hernández, L. M. (2017). Elaboración de gel y shampoo para el control de las manifestaciones clínicas de la caspa (dermatitis seborreica) elaborado a partir de extracto de jengibre (*Zingiber officinale*): Estudio Piloto.
3. Tapia, A. G., González-Guerra, E., & José, M. (2017). Alopecia androgénica femenina. Nuevas herramientas terapéuticas frente a los factores fisiopatológicos implicados: hormonal, oxidativo e inflamatorio. Más dermatología, (27), 21-33.
4. Romero-Serrano, A., & Pereira, J. (2020). Estado del arte: Quitosano, un biomaterial versátil. Estado del Arte desde su obtención a sus múltiples aplicaciones. Revista INGENIERÍA UC, 27(2), 118-135.
5. Martino, A. D., Sittering, M., & Risbud, M. V. (2005). Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. Biomaterials, 26(30), 5983-5990.

RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE BACTERIAS AISLADAS DE AGUA PARA CONSUMO EN CUAUTEPEC (TLACUILOTEPEC, PUEBLA, MÉXICO)

Adriana Vargas-Rosas¹, María Teresa Núñez-Cardona^{1*}, Miriam Pulido Flores¹, Patricia Castilla Hernández².

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Departamento El Hombre y su Ambiente.
Laboratorio de Ecología Microbiana¹; Laboratorio de Biotecnología Ambiental²
mtnunez@correo.xoc.uam.mx*

RESUMEN

Las bacterias presentes en el agua para consumo humano pueden representar un riesgo para la salud de las poblaciones humanas, especialmente cuando estas han creado resistencia a los antibióticos, que son la principal herramienta terapéutica para atender infecciones. La resistencia creciente a estos fármacos es un reto para los servicios de salud. En los ambientes acuáticos las bacterias pueden incorporar genes de resistencia a los antibióticos a través de un mecanismo conocido como transferencia horizontal de genes, los cuales están presentes en los ambientes acuáticos. La detección de bacterias resistentes a los antibióticos en aguas para consumo humano es un indicador de contaminación antrópica^{1,2}. Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue aislar bacterias a partir de muestras de agua provenientes del pozo La Concha (Cuautepec, Tlacuiloatepec, Puebla) y determinar su respuesta a antibióticos de amplio uso en el sector salud. Se realizaron diluciones seriadas y con 0.1 ml de estas fueron inoculadas cajas Petri conteniendo agar nutritivo, después de 24-48 horas de incubación fueron aisladas colonias al azar para obtener cultivos puros y determinar su respuesta a antibióticos para bacterias Gram positivas que incluyeron a la Ampicilina (AM), Cefalotina (CF), Cefatoxina (CFX), Ciprofloxacino (CPF), Clindamicina (CLM), Dicloxacilina (DC), Eritromicina (E), Gentamicina (GE), Penicilina (PE), Tetraciclina (TE), Sulfametoxazol/Trimetoprim (STX) y Vancomicina (VA); así como para bacterias Gram negativas: Cefuroxima (CE/XM), Norfloxacina (NF/NOR), Aztreonam (AT), Cefotaxima (CX/CTX), Ceftriaxona (FR/CRO), Ácido nalidíxico (NA), Nitrofurantoina (FU/NI), Gentamicina (GM), Amikacina (AK), Ciprofloxacina (CI), Ofloxacina (OF), Ceftazidima (CZ/CAZ), Cefixima (FX/FIX), Cefdinir (CN/CD). Los sensibilizadores con estos antibióticos fueron colocados en agar Müller-Hinton, previamente estriado, con cultivos líquidos (en caldo nutritivo) de cada una de las cepas. Después de 18 horas de incubación a 28°C, se midieron los halos de inhibición (en mm). Se obtuvieron 21 cultivos puros y previa aplicación de pruebas bioquímicas, fueron seleccionados 14 de estos (diez Gram positivos y cuatro Gram negativos). Todos los cultivos Gram negativos (tres bacilos y un coco) fueron sensibles a los doce antibióticos ensayados, en tanto que los Gram positivos mostraron resistencia, principalmente a cefotaxima y tetramicina (ambas 60%); el 50% a Cefalotina, Dicloxacilina y Penicilina; un cultivo con forma de coco fue resistente a diez antibióticos (sensible a Ciprofloxacino y Clindamicina); dos cultivos con forma bacilar fueron resistentes a Ampicilina, Cefalotina, Cefotaxima, Clindamicina, Dicloxacilina, Tetramicina, Penicilina, solo dos cocos Gram positivos mostraron resistencia a Vancomicina. Las bacterias con resistencia múltiple a los antibióticos antes indicados son de preocupación, ya que el agua analizada es consumida por los pobladores sin tratamiento previo por lo que podrían representar un riesgo para la salud de los pobladores de Cuautepec.

INTRODUCCIÓN

En todo sistema acuático habitan una gran diversidad de microorganismos tanto autótrofos como heterótrofos, cuya permanencia depende de la calidad de este preciado líquido, sin embargo, debido a actividades humanas, incluyendo la agropecuaria, también pueden recibir microorganismos alóctonos como bacterias que incluye a enterobacterias, *Pseudomonas* spp. y estafilococos, entre otras.

Desde hace ya varias décadas, los estudios de la contaminación química y microbiana del agua van en aumento, debido a la emergencia de enfermedades como el cólera, diarrea, disentería, hepatitis, fiebre tifoidea y poliomielitis. De acuerdo con la OMS (2022) si no hay servicios de agua y

saneamiento, o si estos son insuficientes o inapropiadamente gestionados, las poblaciones humanas están expuestas a contraer enfermedades que pueden prevenirse³.

También hay preocupación por determinar, no sólo la contaminación del agua, sino cuánta está disponible para uso y consumo humano; para actividades agrícolas y productivas; así, la escasez de agua representa un problema grave a nivel mundial, especialmente, en las zonas rurales con asentamientos humanos donde los recursos hídricos no reciben tratamiento previo a su uso y consumo por lo que las bacterias presentes pueden representar un riesgo significativo para la salud, especialmente cuando han desarrollado resistencia a los antibióticos, que son la principal herramienta terapéutica para tratar infecciones diversas.

De manera general, la presencia de bacterias resistentes en aguas para consumo humano indica contaminación antrópica y puede representar un riesgo y problema significativos para la salud pública, afectando aspectos como son el aumento de enfermedades infecciosas que son causadas por microorganismos resistentes, que pueden ser más frecuentes y difíciles de tratar, así mismo estos pueden conducir a brotes y epidemias debido a que los tratamientos con antibióticos disponibles (convencionales) ya no son efectivos.

Por otro lado, las infecciones debidas a microorganismos resistentes a los antibióticos, podría conducir a una mayor tasa de mortalidad y morbilidad debido a tratamientos ineficaces, incompletos o prescripciones erróneas, así como a tratamientos prolongados que finalmente conducirían a la muerte^{4,5}.

La resistencia a los antibióticos es un fenómeno que compromete la eficacia de los tratamientos médicos, aumentando la morbilidad y mortalidad asociadas a infecciones bacterianas, por lo anterior, este trabajo tiene como objetivo aislar bacterias a partir de muestras de agua provenientes del pozo La Concha (Cuautepec, Tlacuilotepec, Puebla) y determinar su respuesta a antibióticos de amplio uso en el sector salud.

TEORÍA

En los ambientes acuáticos, las bacterias pueden incorporar genes de resistencia a los antibióticos a través de un mecanismo conocido como transferencia horizontal de genes (HGT), un proceso mediante el cual estos microorganismos pueden intercambiar material genético. Este mecanismo permite que genes de resistencia a los antibióticos se propaguen rápidamente entre diferentes especies bacterianas, incluyendo a las que son patógenas para los humanos⁶.

Se han encontrado genes de resistencia a varias familias de antimicrobianos, como las tetraciclinas y las Quinolonas. Estas últimas son análogos sintéticos del ácido nalidíxico (ácido nalidíxico, ácido oxolínico, cinoxacina, entre otros)⁴. Las bacterias desarrollan resistencia a las Quinolonas mediante mutaciones en genes que codifican las enzimas ADN girasa y topoisomerasa IV, que son los blancos de estos antibióticos. Además, la expresión de bombas de eflujo y alteraciones en la permeabilidad de la membrana bacteriana contribuyen a la resistencia a los antibióticos⁶.

Los antibióticos de la familia de las Quinolonas son utilizados principalmente para tratar infecciones del tracto urinario, prostatitis bacteriana crónica, infecciones de transmisión sexual e infecciones pélvicas. También se ha documentado su eficacia en el manejo de infecciones cutáneas, osteoarticulares y del tracto gastrointestinal, así como en la quimiopprofilaxis en pacientes neutropénicos, postquirúrgicos y cirróticos con riesgo de desarrollar peritonitis bacteriana. Además, se consideran una alternativa a los agentes de primera línea para el tratamiento de infecciones bacterianas del tracto respiratorio, como la sinusitis, la neumonía y la bronquitis crónica complicada en pacientes inmunocomprometidos⁶.

Los Beta-lactámicos son otra familia de antibióticos que incluyen cuatro clases: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos. Los componentes de esta familia se utilizan,

principalmente, para tratar infecciones de la piel y partes blandas, además de infecciones respiratorias, osteoarticulares y urinarias⁷.

Los antibióticos Beta-lactámicos tienen en común que en su estructura molecular hay un anillo β lactámico, el cual es responsable en gran parte de su acción antimicrobiana, las β -lactamasas son enzimas capaces de romper este anillo e inactivar al antibiótico, su presencia es ubicua en las bacterias Gram negativas y representan una forma importante de resistencia^{8,9}. En particular, las carbapenemasas como las KPC y las metalobetalactamasas son de especial preocupación debido a su capacidad para hidrolizar los antibióticos carbapenémicos⁸.

En la actualidad, se sabe que tanto las bacterias Gram negativas y positivas están creando resistencia múltiple a los antibióticos. Por mencionar algunos ejemplos se tiene a *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. La primera es una bacteria Gram positiva resistente a casi todos los antibióticos Beta-lactámicos debido a la alteración de las proteínas de unión a penicilinas (PBP); puede causar enfermedades, que van desde infecciones de la piel y tejidos blandos hasta muy graves (neumonía) que amenazan la vida⁶.

Listeria monocytogenes (común en alimentos, tierra y agua), es una bacteria Gram negativa que ha desarrollado resistencia significativa a los Beta-lactámicos, limitando las opciones de tratamiento disponibles, es el agente causal de la listeriosis, la cual se manifiesta de forma invasiva o no invasiva. La primera puede provocar mortinatos, abortos, partos prematuros, y en los recién nacidos e inmunodeprimidos puede conducir a septicemia, meningitis y encefalitis; en la forma no invasiva se producen síntomas como fiebre, dolor de cabeza y diarrea¹⁰.

Además de la producción de enzimas inactivadoras, las bacterias pueden desarrollar resistencia mediante mutaciones en las porinas de la pared celular, que reducen la entrada de los antibióticos; también por alteraciones en los sistemas de transporte que impiden que los antibióticos lleguen a sus sitios de acción o bien por la actividad de la bomba de eflujo por la cual son expulsados los antibióticos fuera de la célula bacteriana, reduciendo su concentración intracelular y consecuentemente su eficacia⁵.

PARTE EXPERIMENTAL

Cuautepec es una comunidad de Tlacuilotepec, enclavada en la Sierra Norte de Puebla, el clima es cálido con lluvias todo el año. El agua para uso humano proviene de diversos sitios uno de ellos el Pozo "La Concha" (Fig. 1). Se colectaron muestras de agua de este pozo con las que se realizaron diluciones seriadas y con 0.1 mL de estas fueron inoculadas cajas Petri conteniendo agar nutritivo, después de 24 horas de incubación, a temperatura ambiente, fueron aisladas colonias al azar para obtener cultivos puros y determinar su respuesta a antibióticos para bacterias Gram positivas, que incluyeron a la Ampicilina (AM), Cefalotina (CF), CFX Cefatoxina (CFX), Ciprofloxacino (CPF), Clindamicina (CLM), Dicloxacilina (DC), Eritromicina (E), GE Gentamicina (GE), Penicilina (PE), Tetramicina (TE), Sulfametoxazol/Trimetoprim (STX) y Vancomicina (VA); así como para bacterias Gram negativas: Cefuroxima (CE/XM), Norfloxacina (NF/NOR), Aztreonam (AT), Cefotaxima (CX/CTX), Ceftriaxona (FR/CRO), Ácido nalidíxico (NA), Nitrofurantoina (FU/NI), Gentamicina (GM), Amikacina (AK), Ciprofloxacina (CI), Ofloxacina (OF), Ceftazidima (CZ/CAZ), Cefixima (FX/FIX), Cefdinir (CN/CD). Los sensibilizadores con los antibióticos fueron colocados en agar Müller-Hinton, previo estriado de cada una de las cepas crecida previamente, en caldo nutritivo. Después de 18 horas de incubación a 28°C, se midieron los halos de inhibición (en mm). Para determinar la respuesta (resistencia) a los antibióticos se consideró las instrucciones del productor de los sensibilizadores.

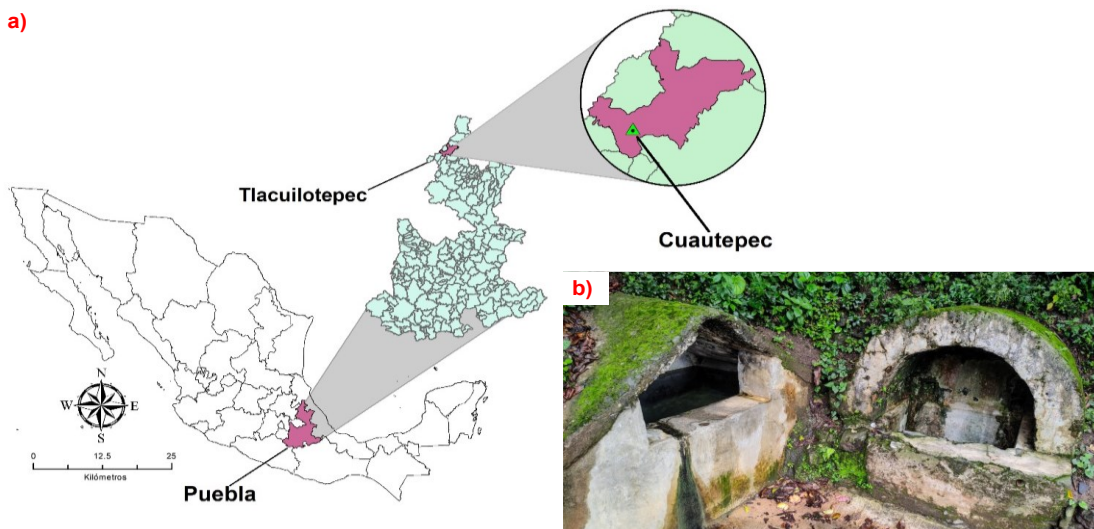


Figura 1. Área de estudio: Cuautepec es una de las localidades de Tlacuilotepec, ubicada al noroeste de Puebla (a). Pozo La Concha: fuente de abastecimiento hídrico en Cuautepec (b).

RESULTADOS

Se obtuvieron 21 cultivos bacterianos puros los cuales fueron caracterizados morfológicamente, para ello se aplicó la tinción de Gram. Previo al ensayo con los sensidiscos, se aplicaron pruebas bioquímicas para seleccionar a 14 de ellos: diez Gram positivos y cuatro Gram negativos.

Todos los cultivos con respuesta negativa a la tinción de Gram (tres bacilos y un coco) fueron sensibles a los 12 antibióticos ensayados (Cefuroxima, Norfloxacin, Aztreonam, Cefotaxima, Ceftriaxona, Ácido nalidíxico, Nitrofurantoina, Gentamicina, Amikacina, Ciprofloxacina, Ofloxacina, Ceftazidima, Cefixima, Cefdinir), en tanto que los cultivos Gram positivos mostraron resistencia, principalmente a Cefotaxina y Tetramicina (ambas 60%); el 50% a Cefalotina, Dicloxacilina y Penicilina; un cultivo con forma de coco fue resistente a diez antibióticos y sensible únicamente a Ciprofloxacino y Clindamicina; dos cultivos con forma bacilar fueron resistentes a Ampicilina, Cefalotina, Cefotaxima, Clindamicina, Dicloxacilina, Tetramicina, Penicilina en tanto que solo dos cultivos con forma de coco (Gram positivos) mostraron resistencia a Vancomicina (figura 2, tabla 1).

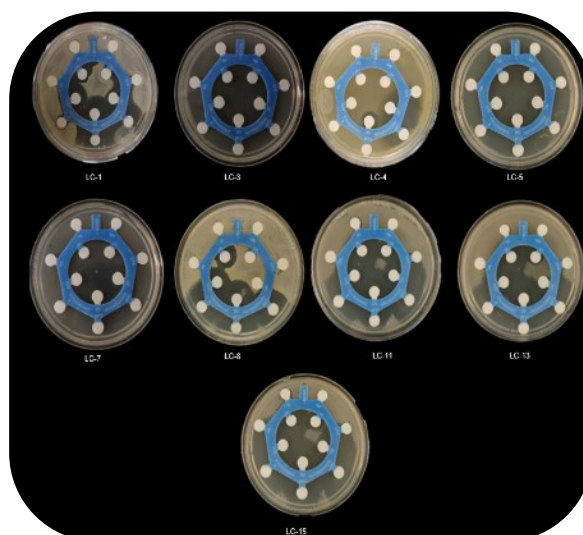


Figura 2. Respuesta a los antibióticos por cultivos bacterianos Gram positivos. Las áreas transparentes (halos de inhibición) indican la resistencia de los cultivos bacterianos a los antibióticos.

Tabla 1. Características morfológicas de las bacterias Gram positivas aisladas del pozo La Concha y su respuesta a antibióticos de amplio uso en el sector salud

Cultivo (clave)	Morfología celular	AM	CF	CFX	CPF	CLM	DC	E	GE	PE	TE	SXT	VA
LC-1	Cocos	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
LC-3	Cocos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LC-4	Cocos	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
LC-5	Cocos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LC-7	Cocos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LC-8	Cocos	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0
LC-11	Bacilos	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0
LC-13	Bacilos	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0
LC-15	Bacilos	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0
LC-21	Bacilos	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0
	Total	5	5	6	1	4	5	2	1	5	6	2	1

AM-Ampicilina, CF-Cefalotina, CFX-Cefatoxina, CPF-Ciprofloxacino, CLM-Clindamicina, DC-Dicloxacilina, E-Eritromicina, GE-Gentamicina, PE-Penicilina, TE-Tetramicina, SXT-Sulfametoxazol/Trimetoprim, VA-Vancomicina. 1-Resistente al antibiótico, 0-Sensible al antibiótico.

CONCLUSIONES

Los cuatro cultivos con respuesta negativa a la tinción de Gram (cocos y bacilos) fueron sensibles a los 12 antibióticos ensayados lo que indica que estas bacterias muy probablemente no han estado expuestas a estos fármacos o bien en la comunidad de Cuauhtepac no han sido utilizados.

Se aisló una bacteria con forma de coco (Gram positivo) que mostró resistencia a diez de los antibióticos ensayados. Los fármacos Ciprofloxacina, Vancomicina, Gentamicina y Eritromicina junto con sulfametoxazol/trimetoprim podrían ser opciones terapéuticas para el tratamiento de infecciones que pudieran presentarse en los habitantes de Cuauhtepac, ya que solo uno o dos cultivos bacterianos fueron resistentes a estos antibióticos.

AGRADECIMIENTOS

A la comunidad de Cuauhtepac, especialmente a la Sra. Justina Rosas Martín y el Sr. Erasto Vargas Santos, por las facilidades otorgadas para coleccionar y procesar las muestras de agua utilizadas para el presente estudio. A la Biól. Lucía Viridiana González López por la elaboración del mapa del área de estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. Martins, R. A. Silva, L. O. Ferreira, M. M. Licate, C. R. Delafiori, S. F. “Resistencia a antimicrobianos de enterobacterias aisladas de aguas destinadas al abastecimiento público en la región centro-oeste del estado de São Paulo”, Pan-Amazônica de Saúde., Vol. 10, 2019, pp. 1-8.
2. E. A. Rodríguez, J. N. Jiménez-Quiceno. “Resistencia bacteriana a antibióticos en ambientes acuáticos: origen e implicaciones para la salud pública”, Rev. Fac. Nac. Salud Pública., Vol. 41, 3, 2023, pp. 1-12.
3. OMS. 2022. Guidelines for drinking-water quality: small water supplies [Internet]. 2024 [Consultado el 7 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240088740>

4. R. Cantón, P. Ruiz-Garbajosa. "Infecciones causadas por bacterias Gram positivas multirresistentes (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* spp.)", *Enferm. Infecc. Microbiol. Clínica*, Vol. 31, 8, 2013, pp. 543-551.
5. R. G. Acosta, C.M. Vargas. "Mecanismos de resistencia bacteriana", *Diagnóstico*, Vol. 57,2, 2018, pp. 82-86.
6. D. A. Álvarez-Hernández, G. S. Garza-Mayén, R. Vázquez-López. "Quinolonas: Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia", *Rev. Chil. Infectol.*, Vol. 32, 5, 2015, pp. 499-504.
7. M. Marín, F. Gudíol. "Antibióticos betalactámicos", *Enferm. Infecc. Microbiol. Clínica*, Vol. 21,1, 2003, pp. 42-55.
8. J. D. Tafur, J. A. Torres, M. V. Villegas. "Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas", *Infectio.*, Vol. 12, 3, 2008, pp. 227-232.
9. D. P. López-Velandia, M. I. Torres-Caycedo, C. F. Prada-Quiroga. "Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud pública en Colombia", *Univ. Salud*, Vol. 18,1, 2016, pp. 190-202.
10. V. Z. Soto, L. L. Pérez, E. D. Alvarado. "Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia", *Rev. Salud Uninorte.*, Vol. 32, 1, 2016, pp 105-122.

EDITORAS

Cristina E. Solano Sosa
María Eugenia Sánchez Morales
Gloria Verónica Vázquez García
Amalia Martínez García
Alexandra Monsetrrat García



CONAHCYT
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



CENTRO DE INVESTIGACIONES
EN ÓPTICA, A.C.



ISBN TOMO I
BIOLOGÍA Y QUÍMICA



ISBN OBRA COMPLETA
AVANCES CIENTÍFICOS Y
TECNOLÓGICOS EN MÉXICO I