



PODER EJECUTIVO DEL ESTADO DE
QUERÉTARO

UTP
COORDINACIÓN GENERAL DE UNIVERSIDADES
TECNOLÓGICAS Y POLITÉCNICAS

UTP
de Corregidora
Universidad Tecnológica



MEMORIAS

Número de Registro:
03-2022-111715334000-01

TEMAS



Alimentos



Salud



Agropecuario



Ambiental



Cartel

ÍNDICE

	pg.
PREFACIO	1
COMITÉ ORGANIZADOR	2
RESUMEN DE PONETES INVITADOS.	
Estudio del proteoma de bacteroides inducido por <i>Rhizobium leguminosarum</i> en nódulos de leguminosas. <i>Ramírez Anabel Marina et al.</i>	8
Ensayos empleados para la caracterización de microorganismos de biocontrol de <i>Botrytis cinerea</i> <i>Pacheco Aguilar Ramiro et al.</i>	10
TRABAJOS DE MODALIDA PLENARIA	
ÁREA TEMÁTICA: SALUD	
Extracción de Sulforafano a partir de la <i>Brassica Oleracea Var. Italica</i> <i>Pérez Hernández Sandra Jazmín</i>	14
Amplificación isotérmica para detección de <i>Escherichia coli</i> y genes codificantes de <i>Betalactamasas</i> de Espectro Extendido <i>Jaimes Caro Elkin Johan</i>	22
ÁREA TEMÁTICA: AMBIENTAL	
Comparativo entre métodos de extracción de polihidroxicarbohidratos de origen bacteriano <i>Flores Juárez Cyntia Rocío</i>	30
ÁREA TEMÁTICA: ALIMENTOS	
<i>Bacillus spp.</i> productor de compuestos volátiles inhibidores del crecimiento de hongos causantes de pudrición de frutos. <i>Alonso Solórzano Olga Mariana</i>	39

Evaluación de la inmovilización de *Lipasa Cândida* antártica B en membrana PGV.

Díaz Barbosa Arturo Alejandro 45

TRABAJOS DE MODALIDA CARTEL

ÁREA TEMÁTICA: AGROPECUARIO

Determinación cualitativa de actividad quitinolítica en hongos filamentosos para su uso como efecto fertilizante.

Rodríguez Ruíz Jenifer Marissa.....52

ÁREA TEMÁTICA: AMBIENTAL

Modelamiento de la biosorción de contaminantes en el agua con *Spirulina máxima* comercial

Hernández Leos Johana Elizabeth 58

Determinación de actividad Lacasa en hongos filamentosos para su uso como degradadores de clorofenoles.

Sánchez Tejeda Gabriela 62

Determinación de enzimas hidrolíticas en hongos filamentosos aislados de cáscara de camarón y aguacate.

Rodríguez Ruíz Jenifer Marissa 70

ÁREA TEMÁTICA: ALIMENTOS

Uso de dendrogramas para el análisis cuantitativo de diferentes tipos de tequila mediante espectroscopia Raman.

Ramírez Galindo Mayra Elizabeth 79

PREFACIO

Del 2 al 5 de agosto del 2021 la Universidad Tecnológica de Corregidora realizó el Segundo Congreso Internacional de Biotecnología Aplicada CIBTA 2021, en modalidad virtual, derivado de la contingencia sanitaria por la pandemia del COVID-19. La distancia no demeritó el impacto y calidad de las conferencias y trabajos presentados en este espacio. Las áreas temáticas del evento abarcaron: salud, alimentos, agropecuaria y ambiental; contando con una participación total de cinco conferencias magistrales, ocho ponencias plenarias y la presentación de 23 trabajos en modalidad cartel. Los países que nos acompañaron de manera remota se encuentran España, Colombia, Italia y los Estados Unidos. A través de la página oficial del congreso, se realizó la transmisión y publicación de todos los trabajos y ponencias; lo que permitió un alcance promedio de 300 visitas diarias entre estudiantes e invitados de otras instituciones. El objetivo de esta segunda edición de CIBTA fue favorecer el intercambio de conocimiento entre estudiantes, investigadores y académicos, mediante el análisis y la discusión de trabajos de investigación sobre biotecnología; mismo que sin duda alguna pudo ser cumplido a través de todas la ponencias y respuestas a las preguntas de la audiencia durante los 4 días de trabajo.

A continuación, se presenta la compilación de algunos de los resúmenes de ponentes invitados y trabajos de modalidad plenaria y de modalidad cartel seleccionados por el comité. Agradecemos todo el apoyo y trabajo para la realización de este evento, tanto a los colegas y participantes de este, como a todo el equipo del comité organizador.

M. en C. Carla Cristina Camacho Gallegos

COMITÉ ORGANIZADOR

M.C. Carla Cristina Camacho Gallegos

M.C. Erika Noemí García Sánchez

Dra. Virginia Mandujano González

Dra. Diana Alonso Segura

Dr. Víctor Manuel Hernández Pimentel

2do. Congreso Internacional de



RESUMEN

DE PONENTES INVITADOS



ESTUDIO DEL PROTEOMA DE BACTEROIDES INDUCIDO POR RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM EN NÓDULOS DE LEGUMINOSAS.

A.I. Marina,¹ C. García¹, M. Albareda², T. Ruíz-Argüeso², D. Durán² and J.M. Palacios².

¹Servicio de Proteómica, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO), CSIC Campus Cantoblanco, c/ Nicolás Cabrera 1, 28049 Madrid, Spain

²Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (C.B.G.P.) UPM-INIA, Campus de Montegancedo, 28223 Pozuelo de Alarcón, and Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, Spain.

*amarina@cbm.csic.es

Resumen



La simbiosis Rizobio-Leguminosa es una interacción beneficiosa en la que la bacteria convierte el nitrógeno atmosférico en amoníaco y lo entrega a la planta a cambio de compuestos de carbono (1). Esta

simbiosis implica la adaptación de las bacterias para vivir dentro de las células de la planta huésped.

En este trabajo aplicamos técnicas RP-LC-MS / MS e iTRAQ para estudiar el perfil proteómico de células endosimbióticas (bacteroides) inducidas por *Rhizobium leguminosarum* bv viciae cepa UPM791 en nódulos de leguminosas (2).

Las subunidades de la nitrogenasa, las enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico y las proteínas de respuesta al estrés, se encuentran entre las más abundantes de entre más de mil proteínas rizobianas identificadas en los bacteroides del guisante (*Pisum sativum*) (3). El análisis comparativo de los bacteroides inducidos en nódulos de guisantes y lentejas (*Lens culinaris*) reveló la existencia de una respuesta diferencial significativa específica

del huésped que afecta a docenas de proteínas bacterianas, incluidas proteínas relacionadas con el estrés, reguladores de la transcripción y proteínas involucradas en el metabolismo del carbono y el nitrógeno (4). Un mutante afectado en una de estas proteínas, homólogo a un tipo GntR regulador transcripcional, mostró un rendimiento simbiótico significativamente alterado en simbiosis con guisantes, pero no con plantas de lentejas. Análisis de los proteomas de bacteroides aislados de ambos hospedadores también reveló la presencia de diferentes conjuntos de péptidos ricos en cisteína (NCR) específicos de nódulos derivados de plantas, lo que indica que las bacterias endosimbióticas encuentran un cóctel de estresores químicos específicos del huésped dentro del nódulo (5).

Al estudiar las variaciones de la respuesta bacteriana a diferentes entornos de células vegetales, seremos capaces de identificar las limitaciones específicas impuestas por el huésped que podrían darnos pistas para la mejora del rendimiento de los rizobios.

Palabras clave: Rizobio, leguminosa, proteómica, péptidos NCR.

1. Poole, P., Ramachandran, V., and Terpolilli, J. (2018) Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. *Nat Rev Microbiol* 16, 291-303
2. Kocher, T., Pichler, P., Schutzbier, M., Stingl, C., Kaul, A., Teucher, N., Hasenfuss, G., Penninger, J. M., and Mechtler, K. (2009) High precision quantitative proteomics using iTRAQ on an LTQ Orbitrap: a new mass spectrometric method combining the benefits of all. *J Proteome Res* 8, 4743-4752
3. Delmotte, N., Ahrens, C. H., Knief, C., Qeli, E., Koch, M., Fischer, H. M., Vorholt, J. A., Hennecke, H., and Pessi, G. (2010) An integrated proteomics and transcriptomics reference data set provides new insights into the *Bradyrhizobium japonicum* bacteroid metabolism in soybean root nodules. *Proteomics* 10, 1391-1400
4. Brito, B., Toffanin, A., Prieto, R. I., Imperial, J., Ruiz-Argueso, T., and Palacios, J. M. (2008) Host-dependent expression of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* hydrogenase is controlled at transcriptional and post-transcriptional levels in legume nodules. *Mol Plant Microbe Interact* 21, 597-604
5. Montiel, J., Downie, J. A., Farkas, A., Bihari, P., Herczeg, R., Balint, B., Mergaert, P., Kereszt, A., and Kondorosi, E. (2017) Morphotype of bacteroids in different legumes correlates with the number and type of symbiotic NCR peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 5041-5046.



ENSAYOS EMPLEADOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS DE BIOCONTROL DE *BOTRYTIS CINEREA*

J. R. Pacheco Aguilar^{1*}, Y. S. Juárez Campusano¹, M. G. Mendoza Cervantes¹, R. C. López González¹, B. Carrillo Carrilo²

¹Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Cerro de las Campanas S/N Col. Las Campanas. Querétaro Qro.

²Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. Av. De las Ciencias S/N. Juriquilla, Querétaro, Qro.

*juanramiro29@yahoo.com.mx

Resumen



Botrytis cinerea es un hongo fitopatógeno que genera pudriciones de los frutos de la uva tanto en precosecha como en poscosecha. Para su control en campo, se han empleado diversos fungicidas que han originado cepas resistentes. Por lo que la búsqueda de métodos alternos es necesaria, uno de ellos es el empleo de agentes de biocontrol. En el presente trabajo, se evaluó por ensayo dual, la capacidad de las levaduras NB9 y FLL17 (aisladas de frutos de uva y de flor manzana) y de la bacteria FR4B12 (proveniente de frutos de manzano) para inhibir el crecimiento de la cepa de *Botrytis* 137, encontrando en las placas petri, una reducción del crecimiento micelial del 61, 49 y 32 % por FR4B12, FLL17 y NB9, respectivamente. En un siguiente ensayo, frutos de uva cv Merlot fueron sujetos a infección por *Botrytis* (50 esporas/fruto), coinoculando los agentes de biocontrol (8x10⁴ -1x10⁵ células/fruto), con la finalidad de reducir la incidencia de la pudrición, los resultados

mostraron que NB9 fue la única cepa que tuvo un efecto benéfico, reduciendo la incidencia en un 89 %, mientras FR4B12 (6 %) y FLL17 (0 %) mostraron una mínima y nula reducción, respectivamente. Para el ensayo final, plantas de los cultivares Cabernet sauvignon y Syrah fueron inoculadas con NB9 y FR4B12 (4X10⁸ células/planta), seguido por *Botrytis* (4X10⁵ esporas/planta), los resultados mostraron que solo FR4B12 redujo en un 63 % el área de necrosis provocada por *Botrytis*. La identificación genética por secuenciación permitió caracterizarlas como *Metschnikowia pulcherrima* (NB9), *Bacillus methylotrophicus* (FR4B12) y *Naganishia diffluens* (FLL17). En conclusión, los resultados indican que la bacteria FR4B12 pudiera emplearse para el control de *Botrytis* en planta, mientras que la levadura NB9 pudiera ser un candidato para el control de la pudrición del fruto.

Palabras clave: Cultivares, esporas, ensayo dual, coinoculación.

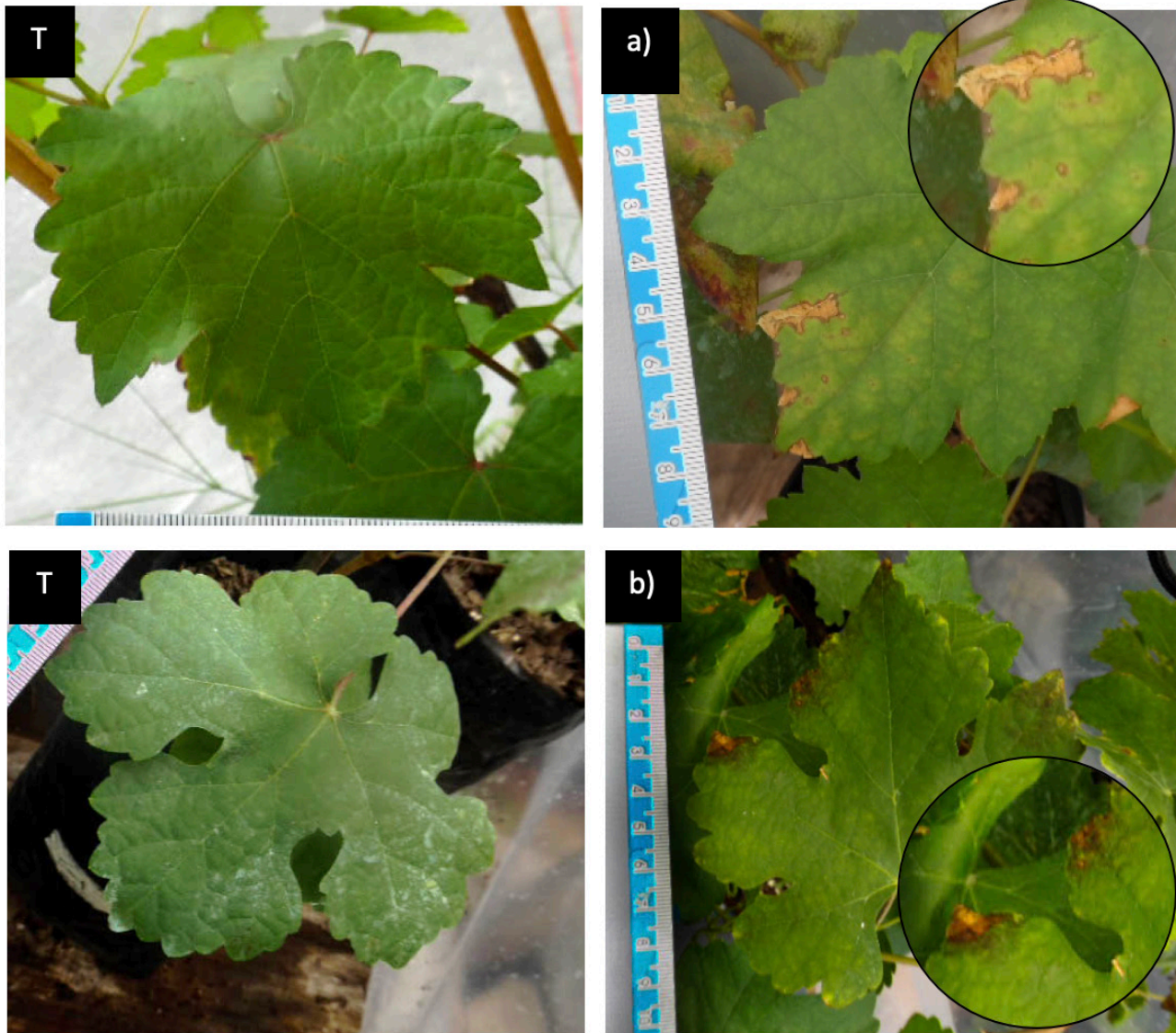


Fig. 1. Infección de plantas de vid, cv. Syrah (a) y cv. Cabernet sauvignon (b) por *Botrytis cinerea*. (T= testigo sin inocular).

Referencia

Juárez C.Y.S., O.M.D.S., López G.R.C., Pacheco A.J.R. 2020. Dinámica de agentes de biocontrol contra *Botrytis cinerea* en hojas de vid. Mexican journal of Biotechnology. 5(2):70-85.





TRABAJOS DE

MODALIDAD PLENARIA



EXTRACCIÓN DE SULFORAFANO A PARTIR DE LA BRASSICA OLERACEA VAR. ITÁLICA

Sandra Jazmín Pérez Hernández^{1*}, M. en C. Ángel Eduardo Márquez Ortega¹, I.Q. Nadia Jazmín González González¹

¹ Tecnológico de Estudios Superiores de Chimalhuacán. TESCHI, Calle Primavera S/N, Sta Maria Nativitas, 56330 Chimalhuacán, Méx

[*ethelmiranamali@gmail.com](mailto:ethelmiranamali@gmail.com)

Resumen



La *Brassica Oleracea Var. Itálica* posee un compuesto bioactivo denominado Sulforafano, el cual proviene de los glucosinatos al ser hidrolizados por la enzima mirosinasa al momento de ser dañados mecánicamente, se logran obtener compuestos biológicamente activos entre los que se destacan los isotiocianatos (Sulforafano), a su vez tienen una actividad ante la gastritis, úlcera gástrica y cáncer de estómago. Este compuesto reduce el tamaño del tumor al actuar como activador del factor de transcripción Nrf2. El Sulforafano no presenta efectos adversos; sin embargo, es necesario

llevar a cabo un estudio extenso para conocer las dosis máximas para su administración. Es primordial desarrollar métodos para la obtención eficientes de extracción para el aprovechamiento de esta valiosa propiedad mencionada anteriormente. Esta investigación postula al Sulforafano como un posible candidato en el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos que hagan frente a la infección por *Helicobacter pylori* y empleo en otras líneas de investigación.

Palabras clave: Sulforafano, Isotiocianatos, Brassica, Glucosinatos, Nrf2

Introducción

La *Brassica Oleracea var. Itálica* originaria de Europa y hoy en día cultivada en todo el mundo usada como una hortaliza para hacer ensalada, se ha descubierto que posee un fuerte compuesto biológicamente activo y beneficioso para la salud, denominado Sulforafano, más allá de la nutrición básica y esencial del brócoli, actúa como un tratamiento de gastritis y úlcera gástrica, debido a su propiedad anticancerígena y bacteriológica que contiene esta verdura. Brassica Oleracea var. Itálica también conocida como brócoli. Este vegetal ofrece diversos tipos de beneficios, benefactores para

la salud al contener compuestos antioxidantes, vitaminas, minerales, selenio y glucosinatos (Andrea Mahn, 2012). Los glucosinatos, son los precursores de los isotiocianatos, de los cuales el Sulforafano es el más relevante, porque posee propiedades antimicrobianas, antioxidantes y anti carcinogénicas comprobadas in vitro e in vivo (Monia Lenzi, 2007). Sulforafano es conocido como un fitoquímico, una sustancia dentro del grupo isotiocianato de compuestos organosulfurados, que se encuentra en los vegetales crucíferos, como el brócoli, la col, la coliflor y las coles de Bruselas. Actualmente el brócoli es consumido como un

alimento procesado, la mayoría de las veces afecta el contenido de compuestos bioactivos. Algunos procesos, tales como el escaldado, la cocción, la congelación y la deshidratación, afectan el contenido de glucosinolatos y Sulforafano. Se ha reportado una pérdida de un 30% de los glucosinolatos totales al escaldar brócoli fresco, y una pérdida de 72.4% de los glucosinolatos totales al cocer brócoli fresco (Cieslik Leszczyńska et al., 2007). Con el aumento de la esperanza de vida de la población aparece un incremento de las enfermedades cancerígenas. En la alimentación juega un papel importante en la prevención de dichas enfermedades gracias a sus propiedades activan a las células anticancerígenas, se ha demostrado que elimina las células cancerosas y reduce el tamaño del tumor. Esta crucífera también puede estar asociada tener una menor probabilidad de padecer cáncer.

La terapia de erradicación, basada en la utilización de antibióticos disminuya la secreción gástrica, ha sido recomendada por más de una década como una buena opción para el tratamiento de la *H. pylori*. Sin embargo, el desarrollo de resistencia bacteriana junto con la falta de nuevas opciones de tratamiento compromete negativamente la erradicación de la infección y se prevé que esto pueda conducir a graves problemas para el tratamiento de los trastornos asociados a la infección por este patógeno en un futuro cercano. La presente investigación se basa en la explicación del análisis de la *Brassica Oleracea* Var. *Itálica* (brócoli). Este vegetal de la familia crucífera con un alto potencial medicinal se trabajará para la salud y bienestar en adolescentes, jóvenes y adultos que son más propensos a padecer dicha enfermedad provocada por la *Helicobacter Pylori*; su objetivo principal es evitar y erradica las complicaciones internas que son: la gastritis, úlceras y cáncer de estómago, incluso donde la enfermedad sea más aguda. Se propone el uso de un régimen con aplicación natural evitando el uso elevado de químicos durante su desarrollo, empleando los métodos de deshidratación y extracción

Soxhlet que harán más económico su proceso de extracción y posteriormente nos llevará a idear una formulación de administración médica, siendo así una forma más factible de aprovechar el componente bioactivo del brócoli que es el Sulforafano, gracias a su propiedad anticancerígena será de gran utilidad en el laboratorio para llevar a cabo las investigaciones pertinentes que ayudará al bienestar y salud de las personas. De igual manera nos permitirá otorgar grandes beneficios para que el Sulforafano sea factible para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos que hagan frente a la infección de *Helicobacter Pylori*, dentro de las líneas de investigación química, microbiológica y farmacéutica, permitiendo abrir un campo de investigación amplio para otras vertientes científicas.

ANTECEDENTES

El término glucosinolatos hace referencia a la fracción de glucosilo "gluco", la presencia de un grupo sulfato (ate), y la propiedad de ser un precursor de un aceite de mostaza (sinol). Las principales fuentes de los glucosinolatos son el producto de metabolitos secundarios de las plantas de las familias de las crucíferas entre las que se destacan y que tiene interés comercial, col de bruselas, brócoli, coliflor y repollo, de acuerdo con la cantidad de glucosinolatos varía de una especie a otra e influye de manera directa el tipo de tejido de la planta. Los glucosinolatos son hidrolizados por la enzima mirosinasa, fruto de esta fase se obtienen compuestos biológicamente activos entre los que se destacan isotiocianatos sulfuranos, nitrilos y tiocianatos, estos procesos dependen de las condiciones de reacción y la presencia de proteínas asociadas (Najera 2004).

Las verduras crucíferas contienen variedad de glucosinolatos, cada uno forma un isotiocianato diferente cuando se hidroliza. Masticar a fondo las verduras crucíferas aumenta el contacto de los glucosinolatos con la mirosinasa (enzima

que los degrada) lo que aumenta la cantidad de isotiocianatos absorbidos. Esta absorción es menor cuando las verduras están cocidas. Los isotiocianatos poseen actividad antiinflamatoria y actividad antibacterial para *Helicobacter pylori*. El Sulforafano es un producto químico de las plantas encontrado en vegetales crucíferos, incluyendo el brócoli. Fue descubierto hace más de una década, es un potente inductor de enzimas que proveen defensa contra el cáncer. El Sulforafano tiene un efecto de antibiosis selectiva hacia la *H. pylori*. Se ha demostrado de manera in vitro que el Sulforafano es capaz de matar cepas de *H. pylori* naturales y cepas resistentes a uno e incluso dos antibióticos. A pesar de que el mecanismo por el cual logra eliminar la bacteria no está claro, se sabe que el Sulforafano contribuye a anular la ureasa (Rocha 2012). Un estudio de 2009 de Johns Hopkins sobre ratones descubrió que los brotes de brócoli son especialmente buenos para ayudar de esta manera. Los ratones que fueron alimentados con brotes de brócoli diariamente durante dos meses redujeron los niveles de *H. pylori* en sus heces en más del 40 por ciento.

El Dr. X. Haristoy, de la Universidad francesa de Nancy, en 2003, publicó un trabajo en el que se comprueba que el Sulforafano tiene un efecto antibiótico, llegando a eliminar la bacteria *Helicobacter pylori*, que previamente se había infectado en ratones. No obstante, se requiere más investigación para determinar si el Sulforafano

es un buen candidato que logre ayudar en el tratamiento de *Helicobacter pylori* (Akinori Yanaka 1 2009).

METODOLOGÍA

Materiales

Se utilizaron los materiales siguientes que fueron, *Brassica Oleracea*, frasco de vidrio hermético, caja pretri, manta de cielo, recipiente colocar la muestra a deshidratar. de reactivos se usarón ácido cítrico, para evitar la oxidación de la muestra, hexano para extraer los aceites y dicloromentano.

Deshidratación

Esta primera parte de este proceso de Investigación y Desarrollo, (Obtención del Principio activo), para la formulación de un medicamento para erradicar la *H. Pylori*, se llevó a cabo lo siguiente.

Se trituró la *Brassica Oleracea*, durante este proceso los glucosinolatos ya fueron hidrolizados al momento de ser dañados mecánicamente en este caso al ser triturada dicha cruifera, la enzima mirosinasa empieza a tener contacto con el sustrato, es donde se empieza a libera moléculas de glucosa, hay un reacomodo intramolecular dando lugar a isotiocianatos, nitrilos, metil isotiocianatos, y metilnitrilos, que formaran el Sulforafano es el principal compuesto que ocasiona el aroma y olor típico desagradable.

Hidrólisis de los glucosinolatos al sufrir un daño mecánico (cortan o mastican)

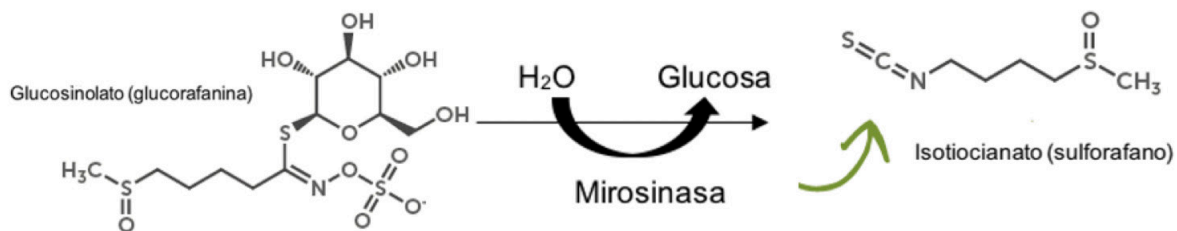


Figura 1 Hidrólisis de los glucosinolatos que muestra el camino que conduce al isotiocianato sulforafano, un potente anticancerígeno

Después se deshidrata ya la muestra triturada al sol por 3 días, para evitar su descomposición y oxidación de la muestra se añade ácido cítrico y se cubre con manta de cielo, durante los días que se cumple el secado la muestra se monitorea con la finalidad de que esta muestre la textura adecuada que se necesita. Posteriormente se llevará a cabo la extracción del principio activo por medio de la técnica Soxhlet para extracción de los aceites contenidos con Hexano, empleando el rotavapor y diclorometano, este presenta ser un solvente útil para extraer el Sulforafano. Este proceso de extracción se aplica tanto a la parte de Inflorescencia como del tronco, las dos partes muestran tener propiedades muy significativas se

pueden aprovechar y obtener más cantidad del compuesto bioactivo.

Resultados y discusión

Secado del Tronco e Inflorescencia

Se logró obtener un proceso de secado eficiente tanto de la inflorescencia como del tronco, mediante una deshidratación solar de 3 días la muestra se ha cubierto con manta de cielo para evitar la contaminación de esta y un daño por los rayos elevados del sol, antes de llevar a cabo el proceso de deshidratación se añadió una solución de ácido cítrico para evitar la oxidación de la muestra. durante el proceso de deshidratado la muestra presento una textura apropiada para hacer la obtención del compuesto bioactivo.



Figura 2 Proceso de Deshidratado de inflorescencia.

Primero se obtuvo por medio de deshidratación solar la muestra de la inflorescencia de la Brassica Oleracea Var. Itálica. Para después hacer el deshidratado del tronco.



Figura 3 *Proceso de Deshidratado del tronco*

Al ser una propuesta de extracción (postproceso) se consideran 3 alternativas que son:

- Principio Bioactivo
- Extracto
- Modo Vegetal

Se obtendrá el producto deshidratado o pulverizado. Por lo tanto, se manejaron 3 etapas se mencionaron anteriormente, para el proceso de obtención del compuesto bioactivo que son:

- Prueba de deshidratado
- Obtención del extracto
- Cuantificación del extracto

	Peso Fresco	Sulforafano	Peso Seco	Sulforafano
Inflorescencia	338 g	1.279 g	300g	0.513 g
Troco	348 g	1.316 g	302g	0.516 g

Figura 4 *Tabla de datos teóricos de cantidad contenida de Sulforafano en la Inflorescencia y el tronco.*

RESULTADOS DE LA ENCUESTA REALIZADA

Se tomó en consideración una encuesta el cual se muestran los siguientes datos estadísticos de los cuestionamientos más importantes obtenidos esto con la finalidad de conocer dentro de la población en un rango de 16 a 54 años de edad (aplicada en el Estado de México, Puebla y Ciudad de México), cual es el porcentaje promedio que parece enfermedades de gastritis, que tanto conocen

sobre los beneficios de la *Brassica Oleracea*, saber cómo lo consume la mayoría de las persona, base las referencias consultadas este al sufrir un proceso de cocción pierde por completo sus propiedades, esto se debe a que el Sulforafano es una molécula no muy soluble en agua, termosensible se destruye a temperaturas mayores de 40°C y muy reactiva.

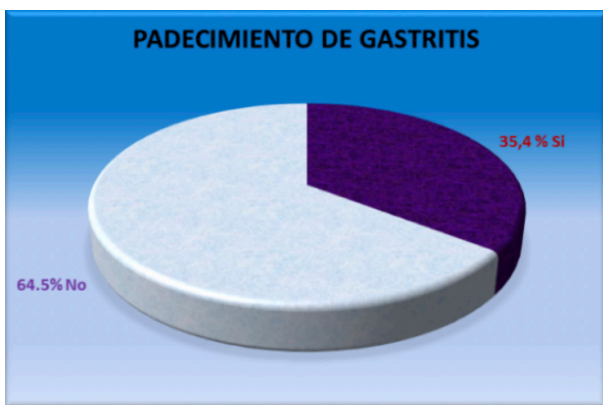


Figura 5 Padecimiento de Gastritis

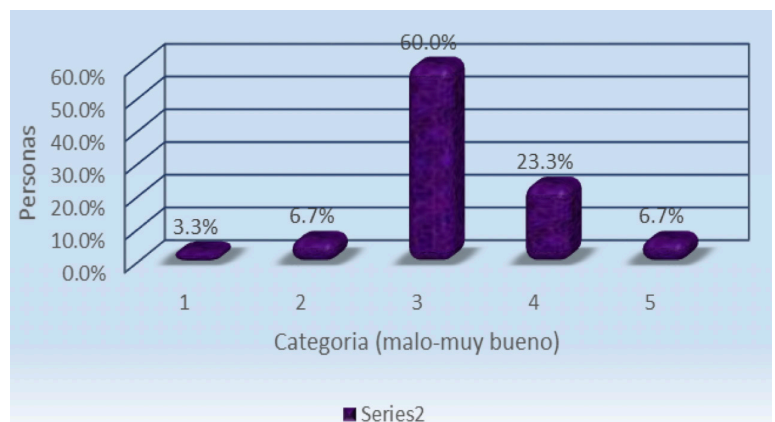


Figura 7 Eficiencia de los medicamentos convencionales empleados para la erradicación de la H. Pylori

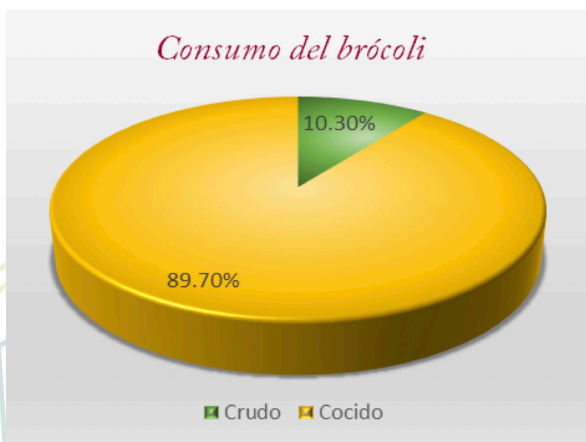


Figura 8 Formas en las que comúnmente la gente consume el brócoli

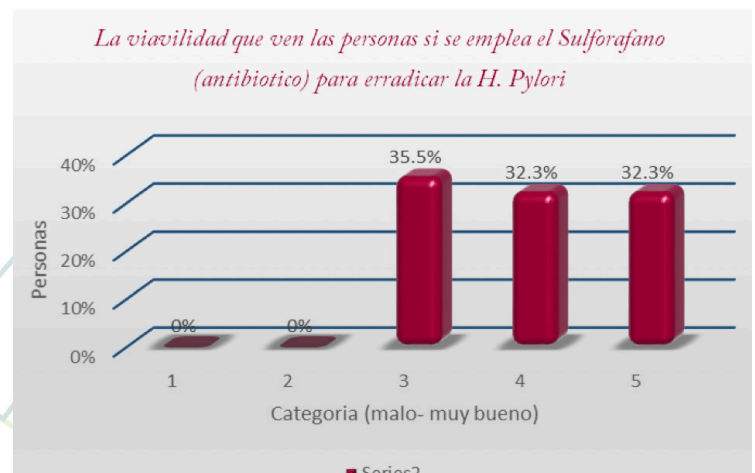


Figura 9 Viabilidad del Sulforafano como un antibiótico para la erradicación de la H. Pylori

Conclusiones

Los resultados presentados muestran de manera teórica el contenido de sulforafano en los vegetales de la familia de las crucíferas, como lo es el brócoli. Las inflorescencias son la principal fuente de sulforafano en brócoli, así como el tronco que presenta niveles significativos de sulforafano, es importante considerar que este vegetal generalmente se consume sin cocción con la principal finalidad de aprovechar las propiedades químio protectoras del fitoquímico sulforafano.

Durante el desarrollo de esta investigación importante destacar estos puntos como recomendaciones importantes que son:

- Factibilidad de darle utilidad al desecho del brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) este caso el tronco.

- Diseñar una metodología para la extracción de sulforafano procedente de la *Brassica oleracea* var. *Italica*

En cuanto al proceso de extracción del compuesto bioactivo será viable y económico, se ha empezado a desarrollar una metodología para llevar a cabo dicho proceso y este no logren invertir mucho sobre la parte de la maquinaria, un ejemplo de ello fue sustituir el liofilizado por el secado solar debido al alto costo que podría llegar a generar al tener en cuenta es un proyecto apenas va iniciando, es obtener un costo menos elevado en cuanto a uso de materiales y reactivos, ayudara mucho poder desarrollar otras metodologías que sean factibles y útiles para llevar a cabo la extracción.

Referencias

- Andrea Mahn, A. R. (2012). Una descripción general de los compuestos del brócoli que promueven la salud (*Brassica oleracea* var. *Italica*) y el efecto del procesamiento. *Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 503-514.
- Akinori Yanaka 1, J. W. (2009). Los brotes de brócoli ricos en sulforafano en la dieta reducen la colonización y atenúan la gastritis en ratones y humanos infectados con *Helicobacter Pylori*. *Cáncer Prev Res*.
- Brécol: la verdura anticancerígena por excelencia. (2008). *Discovery DSalud*. <https://www.dsalud.com/reportaje/brecol-la-verdura-anticancerigena-por-excelencia/>
- Camba, C. D. (2006). Desarrollo de un prototipo de ensalada lista para consumir de brotes de brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). Honduras: ZAMORANO CARRERA DE AGROINDUSTRIA.
- Cieslik, E., Leszczyńska, T., Filipiak-Florkiewicz, A., Sikora (2007). Efectos de algunos procesos tecnológicos sobre el contenido de glucosinolatos en hortalizas crucíferas. *Química de Alimentos*, 976-981.

- Cousin, N. (2012). Brocoli et autres Crucifères. Paris: Grupe Eyrolles.
- Cumberland. (2017). Organización Mundial de la Salud: Un informe de la OMS confirma que el mundo se está quedando sin antibióticos. Obtenido de Ginebra.: Cumberland OMS Publishing: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/running-out-antibiotics/es/>
- El Gran Libro de la Salud. (2000). Reader´s Digest Association.
- Lewis, B., & C., A. L. (2016). Delicias Criollas “Recetas para la Salud y la vitalidad”. Florida: PsyPress.
- López Cervantes, J. (2013). Método de Extracción de Sulforafano mediante un tratamiento de Fermentación Láctica en Plantas Crucíferas. Cajeme, Sonora.
- Monia Lenzi, C. F. (2007). El sulforafano como molécula prometedor para combatir el cáncer. National Library of Medicine, 90-104.
- Nájera, N. (2004). • “CUANTIFICACIÓN DE SULFORAFANO PROCEDENTE DE GLUCORAFANINA EN RETOÑOS DE Brassica oleracea var. itálica por Cromatografía Líquida de Alta Resolución. <http://biblioteca.usac.edu.gt/> Universidad de San Carlos Guatemala
- Martínez, D. M. (2018). “EL BRÓCOLI: SU IMPORTANCIA, PROPIEDADES FUNCIONALES Y BIODISPONIBILIDAD”. FRONTERA BIOTECNOLÓGICA-IPN, 4-9.
- Rocha. (2012). Calaméo. Obtenido de Sulforafano: https://www.calameo.com/books/0017522028258_9c12c4f0
- Rodríguez, M. y. (2014). Biosíntesis del Sulforafano. Obtenido de Enciclopedia de Nutraceuticos Monterrey, N.L.: <http://nutraceuticose53.wixsite.com/enciclopedia-e5/biosntesis-sulforafano>
- Yanaka, A., & W., J. (2010). Los brotes de brócoli ricos en Sulforafano. Japón.

AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA PARA DETECCIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* Y GENES CODIFICANTES DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO

E.J. Jaimes Caro^{1,2}, L.M. Sosa Ávila^{3,4}, M.A. Machuca^{1,2*}

¹ Escuela de Microbiología, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

² Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular, Universidad Industrial de Santander

³ Departamento de Pediatría, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

⁴ Grupo PAIDOS, Universidad Industrial de Santander

*Correspondencia: maymaper@uis.edu.co

Resumen



Las infecciones del tracto urinario (ITU) son las segundas más frecuentes en pacientes pediátricos y derivan en cuadros de salud severos y enfermedades crónicas cuando no se aplica el tratamiento oportuno.

Para el diagnóstico microbiológico se realiza la identificación del agente etiológico que debe ser inicialmente cultivado y aislado a partir de la orina y luego se realizan pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos con el fin de determinar el tratamiento apropiado, lo que generalmente toma de 48 a 72 horas. En las ITU, el germen más frecuentemente aislado es el bacilo Gram negativo

Escherichia coli, seguido de otras enterobacterias. En este trabajo se diseñaron, utilizando herramientas bioinformáticas, iniciadores para amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP) que detectan el gen ARN ribosomal 23S de *E. coli*, y los genes de resistencia blaCTX-M, blaTEM, blaSHV, codificantes para Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE). Los ensayos de LAMP fueron estandarizados utilizando cepas de referencias obteniéndose amplificación de los genes blanco luego de 30 minutos de incubación en un bloque seco a 65°C. Los resultados obtenidos demuestran que los iniciadores son específicos y tienen potencial para incluirse en nuevas técnicas diagnósticas.

Palabras clave: BLEE, ITU, amplificación isotérmica mediada por bucles, LAMP, *Escherichia coli*

Introducción

La infección del tracto urinario (ITU) es una de las infecciones bacterianas más frecuentes que afecta a pacientes hospitalizados como ambulatorios a nivel mundial y, en pacientes menores de siete años es una de las infecciones más prevalentes (1,2). Las manifestaciones clínicas de la ITU pueden ser inespecíficas en lactantes, en niños mayores son representativos los síntomas como fiebre, dolor en el flanco, disuria, tenesmo e incontinencia (3). Adicionalmente, se pueden desarrollar complicaciones como malformaciones en riñones y vías urinarias, por lo cual, un diagnóstico preciso, rápido y eficiente que identifique al agente infeccioso y determine su perfil de resistencia, es indispensable para el inicio de un tratamiento oportuno que disminuya el riesgo de daño renal (2,4-6).

Este tipo de infecciones son principalmente causadas por enterobacterias provenientes del propio tracto gastrointestinal del paciente, siendo *Escherichia coli* el agente etiológico aislado en más del 90% de las ITU (7). A su vez, las enterobacterias se caracterizan por presentar diferentes mecanismos de resistencia a antibióticos lo que disminuye las opciones terapéuticas disponibles, y es habitual encontrar aislamientos portadores de genes de resistencia (8) como por ejemplo, portadores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), enzimas con capacidad hidrolítica de antibióticos betalactámicos (9,10).

El diagnóstico de la ITU incluye el uroanálisis (5), el aislamiento del agente etiológico a partir del urocultivo (11) y la realización de pruebas fenotípicas encaminadas hacia la determinación de su perfil de resistencia-susceptibilidad a antimicrobianos (12). Los resultados se obtienen de 24 a 72 horas dependiendo de la velocidad de crecimiento del microorganismo, y en algunos casos, se prolonga el tiempo de inicio del tratamiento específico para el aislamiento

bacteriano identificado, y por consiguiente, las probabilidades del surgimiento de complicaciones y secuelas incrementan (2,4,6,13)

El advenimiento de las técnicas moleculares ha brindado un gran número de herramientas diagnósticas que presentan una alta sensibilidad y especificidad, con la capacidad de disminuir el tiempo de procesamiento y obtención de resultados (14).

Sin embargo, los costos de implementación suelen ser elevados impidiendo su adquisición por laboratorios con recursos económicos limitados. Por lo anterior, se hace patente la necesidad de desarrollar un método diagnóstico molecular que permita la detección e identificación de los microorganismos asociados a ITU de forma rápida, sensible, específica y económica (14).

La técnica de amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP) es un método de amplificación de ácidos nucleicos realizado en condiciones isotérmicas, que, al emplear más de un par de iniciadores logra incrementar la sensibilidad y especificidad de la prueba (15). Además, la LAMP presenta un tiempo de procesamiento más corto que el empleado por otras técnicas moleculares, por lo que, sumado a lo descrito anteriormente, se ha sugerido como un método diagnóstico alternativo en algunas infecciones como la ITU (16-18). El uso de LAMP en ITU permitiría disminuir el tiempo acaecido entre el ingreso de un paciente y la administración del tratamiento adecuado, jugando un papel importante en la recuperación del paciente y disminución de la morbilidad. Por lo anterior, esta investigación desarrolló protocolos basados en la técnica LAMP para la detección del agente etiológico más frecuente en ITU y genes determinantes de resistencia que codifican para las BLEE más comunes.

METODOLOGÍA

El estudio tuvo como propósito la estandarización de la técnica LAMP como método alternativo para la identificación de *E.*

coli y la detección de los genes determinantes de resistencia bla_{CTX-M} , bla_{TEM} , bla_{SHV} .

Diseño de Iniciadores LAMP

Para la detección molecular de *E. coli* se diseñaron iniciadores LAMP específicos para la amplificación del gen ARN ribosomal 23s verificando que no hibridaran con genes de otros géneros de la familia *Enterobacteriaceae*. Igualmente, fueron diseñados los iniciadores para los genes determinantes de resistencia bla_{CTX-M} , bla_{TEM} , bla_{SHV} utilizando la información depositada en la base de datos Beta-lactamase Data Resource¹ del NCBI, a partir de la cual se generaron secuencias consenso para cada

gen de BLEE seleccionado. La secuencia del ARN ribosomal 23s y la consenso de cada BLEE fueron introducidas en la herramienta en línea NEB LAMP Primer Design Tool2 para generar los cuatro iniciadores LAMP básicos (FIP, BIP, FP y BP), según los parámetros basales mostrados en la Tabla 1. A partir de su secuencia, la especificidad de los iniciadores seleccionados y diseñados se evaluó usando herramientas bioinformáticas.

Tabla 1: Parámetros establecidos para la elaboración de los iniciadores LAMP

Iniciador	Tamaño (pb)	%CG
FIP/BIP (F1c/B1c)	20 – 22	40 – 65
FIP/BIP (F2/B2)	18 – 20	40 – 65
BP/FP	18 - 20	40 – 65
LFP/LBP	15 - 25	40 – 65

¹<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/beta-lactamase-data-resources/>

²<https://lamp.neb.com>

Cepas de referencia y extracción de ADN

La técnica LAMP se estandarizó utilizando como controles de amplificación las cepas *E. coli* C27, C2, C12, C13, C4, C5, C6, *Staphylococcus aureus* y *Proteus mirabilis* previamente caracterizadas en nuestro grupo de investigación, y las cepas de referencia *E. coli* ATCC25922 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC700503 y ATCC BAA1705. Las características de las cepas de referencia se describen en la Tabla 2. Las cepas fueron crioconservadas en caldo BHI (Infusión cerebro-corazón) con glicerol al 20% y almacenadas a -70°C .

El ADN total bacteriano fue extraído a partir de un cultivo crecido durante toda la noche en 3 ml de

BHI, que fue centrifugado 5.000 rpm para obtener un *pellet* bacteriano. El *pellet* fue suspendido en 10 mM Tris-HCl pH 8, y calentado a 100°C por 10 minutos, más 5 minutos de agitación vórtex. La precipitación de proteínas se realizó con 5 M NaCl y centrifugación a 14.000 rpm. El ADN fue recuperado por precipitación con isopropanol y centrifugado a 14.000 rpm. Finalmente, el ADN fue resuspendido en 100 μl de 10 mM Tris-HCl pH 8 y 1 mM EDTA pH 8. La concentración y pureza del ADN extraído fue determinada por espectrofotometría (260/280nm) y su concentración fue ajustada a 25 ng/ μl .

Protocolo de LAMP

En la estandarización de los cinco ensayos LAMP se utilizó el ADN extraído de las cepas descritas en la Tabla 2 y un control de amplificación libre de ADN. Para las amplificaciones se empleó el kit WarmStart Colorimetric LAMP 2X de New England Biolabs que incluye un buffer diseñado para LAMP, la enzima *Bst pol II* y MgSO_4 como fuente de Mg^{+} para la polimerasa. Las concentraciones y reactivos incluidos en la reacción se describen en la Tabla 3. La reacción tuvo un volumen final de 25 μl y, a cada vial, se adicionaron 5 μl de aceite mineral estéril para evitar la evaporación. Finalmente, la reacción se incubó por 30 minutos a 65°C usando un bloque seco para permitir la amplificación, siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit seleccionado para la amplificación posee un sistema de revelado incorporado que consiste en el indicador de pH rojo fenol, el cual vira de color rojo a amarillo cuando hay disminución del pH causada por la acumulación de los ácidos nucleicos.

Para las amplificaciones se empleó el kit Warm-

Start Colorimetric LAMP 2X de New England Biolabs que incluye un buffer diseñado para LAMP, la enzima *Bst pol II* y MgSO_4 como fuente de Mg^{+} para la polimerasa. Las concentraciones y reactivos incluidos en la mezcla maestra se describen en la Tabla 3 y se utilizaron 1-2 μl de ADN molde a 25 ng/ μl . La reacción tuvo un volumen final de 25 μl y, a cada vial, se adicionaron 5 μl de aceite mineral estéril para evitar la evaporación de la mezcla maestra. Finalmente, la reacción se incubó por 30 minutos a 65°C usando un bloque seco para permitir la amplificación, según las instrucciones del fabricante. El kit seleccionado para la amplificación posee un sistema de revelado incorporado que consiste en el indicador de pH rojo fenol, el cual vira de color rojo a amarillo cuando hay disminución del pH causada por la acumulación de los ácidos nucleicos. De esta forma, luego de los 30 minutos de incubación, se puede discriminar visualmente si hay amplificación (Figura 1).

Tabla 2: Cepas bacterianas utilizadas para la estandarización de LAMP

CEPA BACTERIANA	GENES QUE POSEE
E. coli ATCC25922	rARN 23s de E. coli
E. coli C27	rARN 23s de E. coli, blaCTX-M
E. coli C2	rARN 23s de E. coli, blaCTX-M, blaSHV
E. coli C4	rARN 23s de E. coli, blaCTX-M
E. coli C5	rARN 23s de E. coli, blaCTX-M
E. coli C6	rARN 23s de E. coli, blaCTX-M, blaTEM
E. coli C12	rARN 23s de E. coli, blaCTX-M, blaTEM
E. coli C13	rARN 23s de E. coli, blaCTX-M
K. pneumoniae ATCC700503	blaSHV, blaTEM
K. pneumoniae ATCCBAA1705	blaSHV
P. mirabilis	Control negativo (BLEE negativo)
S. aureus	Control negativo (BLEE negativo)

Tabla 3: Composición y concentraciones de la reacción LAMP

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Iniciador FP	0.2 μ M
Iniciador FIP	1.6 μ M
Iniciador BP	1.6 μ M
Iniciador BIP	0.2 μ M
dNTPs	1,4 mM
Bst Pol II	0.32 U/ μ l
MgSO4	6 mM
Buffer de reacción LAMP	1 X
ADN blanco	50ng

Resultados

En este estudio se desarrollaron cuatro protocolos LAMP para la detección de los genes bla^{CTX-M} , bla^{TEM} , bla^{SHV} y ARNr 23S de *E. coli*. Los iniciadores LAMP diseñados para amplificar el gen rARN 23s detectaron específicamente las cepas de *E. coli* (Figura 1) y las discriminaron de otras enterobacterias y patógenos involucrados en ITU incluidos: *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* y *S. aureus*. Igualmente, el protocolo LAMP estandarizado

para la amplificación de los genes bla^{CTX-M} , bla^{TEM} y bla^{SHV} detectó la presencia de la secuencia blanco únicamente en las cepas portadoras del gen BLEE específico (Figura 2). Para todas las reacciones se utilizó un kit colorimétrico lo que permitió la visualización de los resultados sin necesidad de adicionar un revelador o realizar una técnica adicional para evidenciar la amplificación.

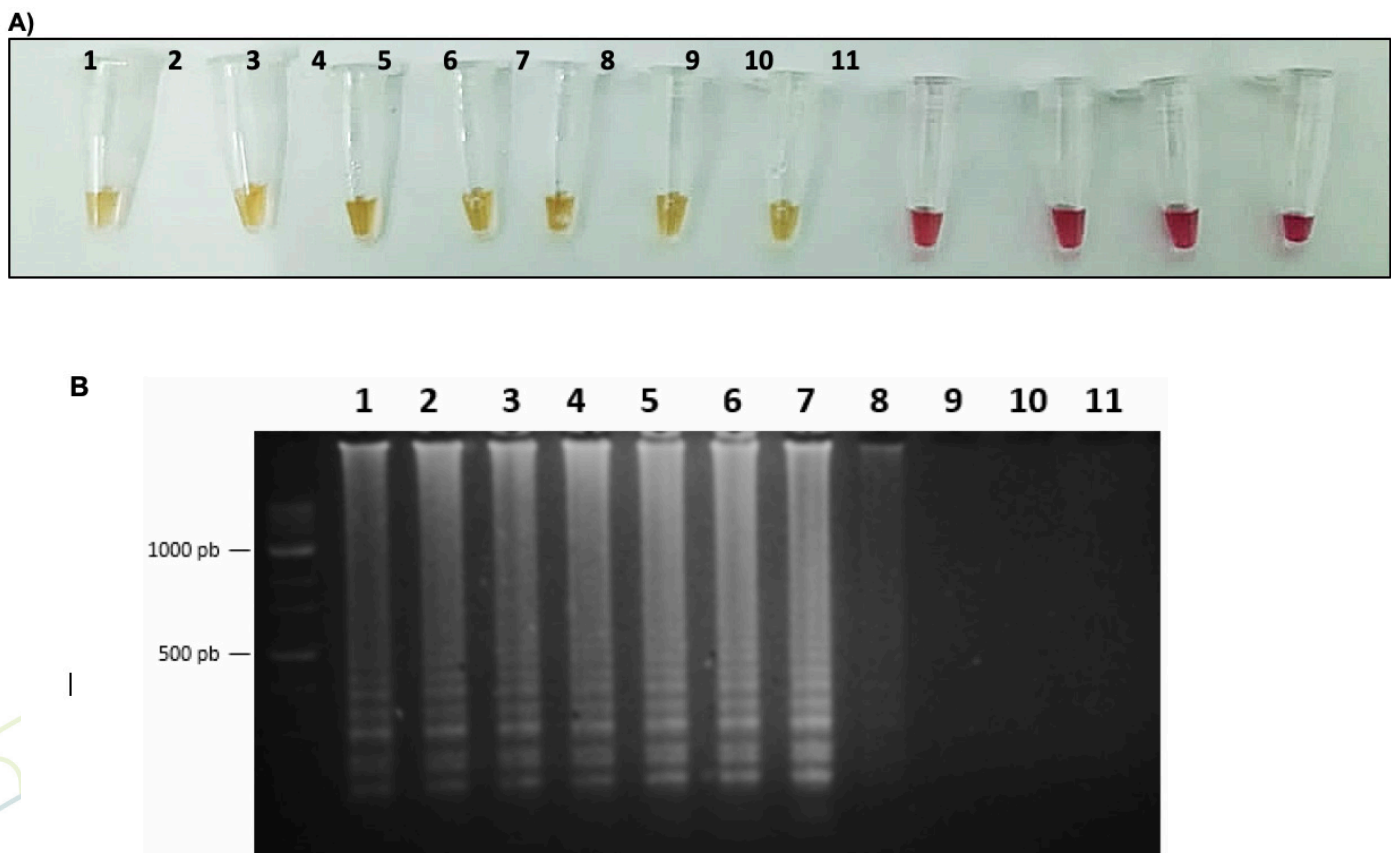
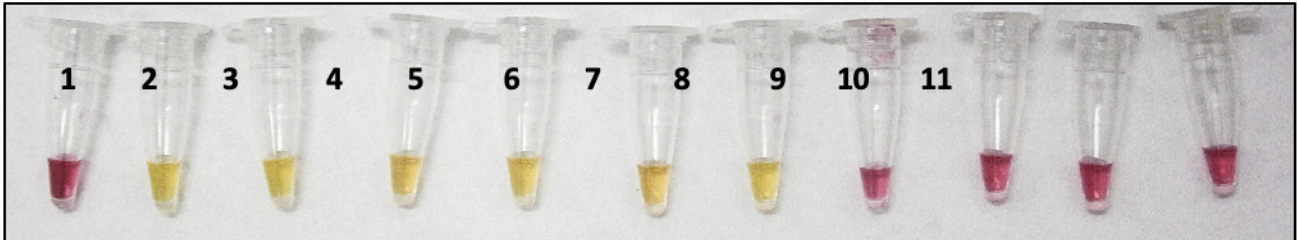
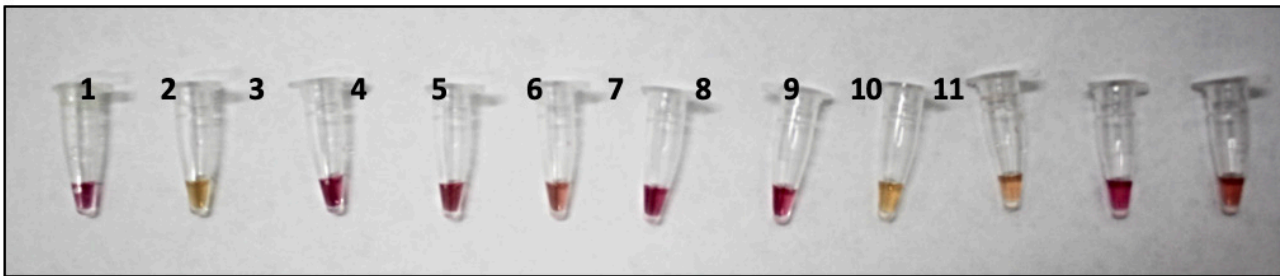


Figura 1. (A) Amplificación LAMP colorimétrica para el gen 23s rARN de *E. coli*. (B) Electroforesis de los amplificados LAMP en gel de agarosa al 2% que evidencia el típico bandejo en escalera. 1, *E. coli* ATCC 25922 ; 2, *E. coli* C2; 3, *E. coli* C12; 4, *E. coli* C13; 5, *E. coli* C4; 6, *E. coli* C6; 7, *E. coli* C27; 8, *P. mirabilis*; 9 – *S. aureus*; 10-11, control negativo sin ADN .

A)



B)



C)

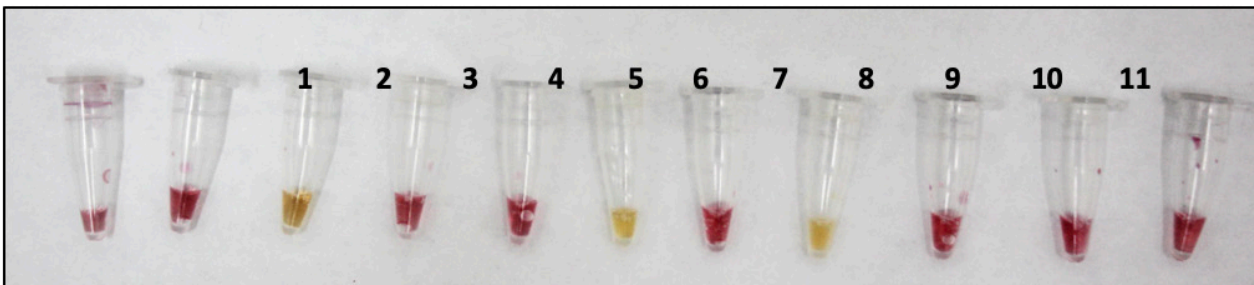


Figura 2. Amplificación LAMP colorimétrica para los genes (A) bla_{CTX-M} (B) bla_{SHV} y (C) bla_{TEM} . Tubo 1, *E. coli* ATCC25922; 2, *E. coli* C2; 3, *E. coli* C12; 4, *E. coli* C13; 5, *E. coli* C4; 6, *E. coli* C6; 7, *E. coli* C27; 8, *K. pneumoniae* ATCC700503; 9, *K. pneumoniae* ATCCBAA1705; 10, *Proteus mirabilis*; 11, control negativo sin ADN.

Conclusiones

Los iniciadores LAMP diseñados permitieron la identificación específica, rápida y sencilla del gen 23s rARN de *E. coli*, así como los genes codificantes para BLEE bla_{CTX-M} , bla_{TEM} , bla_{SHV} , en ADN extraído de las cepas de referencia empleadas para

este estudio. Estos protocolos podrían ser implementados como una técnica molecular alternativa para la detección temprana de ITU en pacientes pediátricos con el fin de disminuir el tiempo de diagnóstico.

Agradecimientos

Agradecemos a la doctora Giovanna Rincón Cruz por el préstamo de las cepas de *E. coli* y su colaboración en el desarrollo de este trabajo.

Financiación

Esta investigación fue financiada por la Universidad Industrial de Santander, Convocatoria Capital Semilla, 2019, proyecto 2708 "Caracterización de los aislamientos bacterianos asociados a infección del tracto urinario en pacientes pediátricos, atendidos en el Hospital Universitario de Santander"

Referencias

1. de Castaño I, González C, Buitrago ZY, de Rovetto C. Etiología y sensibilidad bacteriana en infección urinaria en niños. Hospital Infantil Club Noel y Hospital Universitario del Valle, Cali, Colombia. *Colomb Med.* 2007;38(2):100-6.
2. Kaufman J, Temple-Smith M, Sancí L. Urinary tract infections in children: An overview of diagnosis and management. *BMJ Paediatr Open.* 2019;3(1).
3. Pinzón-Fernández MV, Zúñiga-Cerón LF, Saavedra-Torres JS. Infección del tracto urinario en niños, una de las enfermedades infecciosas más prevalentes. *Rev la Fac Med.* 2018;66(3):393-8.
4. Hoyos Á, Serna L, Ortiz G, Aguirre J. Infección urinaria adquirida en la comunidad en pacientes pediátricos: clínica, factores de riesgo, etiología, resistencia a los antibióticos y respuesta a la terapia empírica. *Infectio.* 2012;16(2):94-103.
5. Ardila M, Rojas M, Santisteban G, Gamero A, Torres A. Infección urinaria en pediatría. *Rev Repert Med y Cirugía.* 2015;24(2):113-22.
6. Restrepo de Rovetto C. Urinary tract infection: a prevalent problem in Pediatrics. *Bol Med Hosp Infant Mex [Internet].* 2017;74(4):241-2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmhix.2017.06.001>
7. Simões e Silva AC, Oliveira EA. Atualização da abordagem de infecção do trato urinário na infância. *J Pediatr (Rio J) [Internet].* 2015;91(6):S2-10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpmed.2015.05.003>
8. Yang YS, Ku CH, Lin JC, Shang ST, Chiu CH, Yeh KM, et al. Impact of Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* on the Outcome of Community-onset Bacteremic Urinary Tract Infections. *J Microbiol Immunol Infect [Internet].* 2010;43(3):194-9. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1684-1182\(10\)60031-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1684-1182(10)60031-X)
9. Ochoa SA, Cruz-Córdova A, Luna-Pineda VM, Reyes-Grajeda JP, Cázares-Domínguez V, Escalona G, et al. Multidrug- and extensively drug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* clinical strains: Phylogenetic groups widely associated with integrons maintain high genetic diversity. *Front Microbiol.* 2016;7(DEC).

Referencias

13. Ardila M, Rojas M, Santisteban G, Gamero A, Torres A. Infección urinaria en pediatría. Rev Repert Med y Cirugía [Internet]. 2015 Jun 1;24(2):113–22. Available from: <https://revistas.fucsalud.edu.co/index.php/repertorio/article/view/632>
14. Vila J, Gómez MD, Salavert M, Bosch J. Métodos de diagnóstico rápido en microbiología clínica: necesidades clínicas. Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]. 2017;35(1):41–6. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-metodos-diagnostico-rapido-microbiologia-clinica-S0213005X16303500>
15. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res [Internet]. 2000;28(12):e63. Available from: https://watermark.silverchair.com/2800e63.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kKhW_

COMPARATIVO ENTRE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE POLIHIDROXI-ALCANOATOS DE ORIGEN BACTERIANO.

C.R. Flores-Juárez1*, M.G. Nateras-Ramírez1, D. Hernández-Arriaga2, J.C. González-Olvera3, J.G. Bocarando-Chacón 1, C.B. Ynzunza-Cortés1

1 División industrial área de Nanotecnología, Universidad Tecnológica de Querétaro, C.P. 76148 Querétaro, Qro., México

2Departamento de Ingeniería Eléctrica y Electrónica, Tecnológico Nacional de México, Campus Querétaro, C.P. 76000, Querétaro, Qro., México

3 Universidad Politécnica de Santa Rosa Jáuregui, Parque Industrial Querétaro, C.P. 76220, Santa Rosa Jáuregui, Qro., México

*cyntia.flores@uteq.edu.mx

Resumen



Diversas especies bacterianas, bajo condiciones específicas, son capaces de producir y almacenar gránulos de polihidroxi-alcanoatos (PHAs) como producto de su metabolismo.

Los PHAs presentan propiedades termoplásticas semejantes a los polímeros convencionales sintéticos. En el presente estudio se evaluaron diferentes técnicas de extracción y purificación de los PHAs producidos a partir de una cepa del género *Pseudomonas*. Se seleccionaron tres metodologías basadas en el uso de cloroformo y dos métodos más basados en técnicas verdes con el uso de solventes menos contaminantes como el

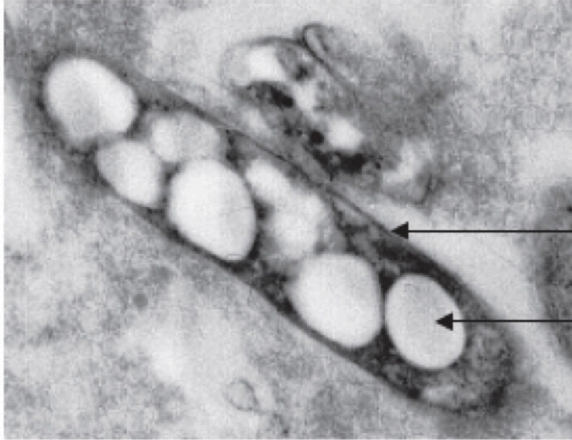
propileno carbonato y ácido acético. La producción de los PHAs se determinó de forma gravimétrica y mediante cuantificación por espectrofotometría UV-VIS a través de la conversión de PHAs a ácido crotonico. La técnica con hipoclorito de sodio/cloroformo y precipitación con metanol mostró el mejor rendimiento de 1.28 g/L y un porcentaje de acumulación de 23.9%, sin embargo, posteriormente se espera optimizar las técnicas verdes para reducir el uso de solventes tóxicos.

Palabras clave: Polihidroxi-alcanoatos, *Pseudomonas*, extracción con solventes.

Introducción

El uso extensivo de los plásticos tradicionales, debido a sus propiedades tan variadas, especialmente propiedades térmicas, mecánicas y durabilidad, han causado una gran problemática en la gestión de los residuos que afectan ciudades, masas de agua, zonas naturales y en general a todos los ecosistemas. La acumulación de desechos plásticos se ha convertido en una gran

preocupación en términos de medio ambiente [1]. Los polihidroxi-alcanoatos son biopolímeros biodegradables, biocompatibles, insolubles en agua, no tóxicos y exhiben propiedades termoplásticas [2, 3]. Mientras para la producción de plásticos sintéticos se requiere materia prima de origen petroquímico, los PHAs se pueden obtener a partir de diversas especies bacterianas como



Pseudomonas aeruginosa

Polyester granulum

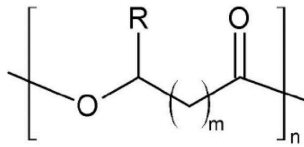
parte de su metabolismo y es posible usar fuentes de carbono tan variadas como carbohidratos, lípidos y diferentes desechos agroindustriales, que constituyen materiales orgánicos de bajo costo [4]. Dependiendo de la especie bacteriana, del sustrato utilizado y de la fase de crecimiento microbiana, éstos pueden llegar a representar hasta el 90% del peso seco de la bacteria almacenados en forma de gránulos intracelulares (Figura 1). Se ha reportado que el déficit de algún nutriente como el nitrógeno, fósforo o magnesio así como la relación C/N promueven la producción del PHA como respuesta al estrés nutricional [5, 6]. Entre las especies más estudiadas destacan bacterias

gram-positivas y gram negativas como *Ralstonia eutropha*, *Cupriavidus necator* (antes *Alcaligenes eutrophus*), *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas oleovorans* y *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus cereus* *Burkholderia cepacia* *Paracoccus denitrificans*, *Protomonas extorquens*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhizobium ORS571*, *Rhodospirillum rubrum*, *Caulobacter crescentus* y *Escherichia coli* recombinante (con genes de *Cupriavidus necator*) [2, 7]. Entre ellos *Ralstonia eutropha*, *Cupriavidus necator* y *Bacillus megaterium* son frecuentemente estudiadas por su capacidad de acumular una alta tasa de peso seco [2, 8].

Figura 1. SEM de gránulos de *Pseudomonas aeruginosa* [8].

Los PHA se clasifican de acuerdo al número de carbonos del monómero, PHA de cadena corta (3-5 carbonos), PHA de cadena media (6-14 carbonos) y PHA de cadena larga (más de 14 carbonos). También se ha reportado la producción de co-polímeros. Los PHAs más comunes son los de cadena corta siendo los más estudiados P3HB (poli-3-hidroxi-butyrate) y P3HV (poli-3-hidroxi-valerato) [9, 10]. Esta longitud se refiere al tamaño de la cadena lateral de cada

monómero y no al tamaño del polímero, el cual puede llegar a ser típicamente de 200,000 a 3,000,000 daltones (Figura 2). La longitud de la cadena lateral y el grupo funcional tienen una influencia considerable sobre las propiedades del polímero, como son, el punto de fusión y la cristalinidad y por lo tanto determinan el tipo de procesamiento que se requiere y la aplicación final que éste puede tener.



Valor de m	Naturaleza de R	Nombre del PHA	Abreviación
m=1	R = H	Poli(3-hidroxiopropionato)	P3HP
	R = CH ₃	Poli(3-hidroxiobutirato)	P3HB
	R = C ₂ H ₅	Poli(3-hidroxi valerato)	P3HV
	R = C ₃ H ₇	Poli(3-hidroxi hexanoato)	P3HH
	R = C ₅ H ₁₁	Poli(3-hidroxi octanoato)	P3HO
m=2	R = H	Poli(4-hidroxi butirato)	P4HB
	R = CH ₃	Poli(4-hidroxi valerato)	P4HV
m=3	R = H	Poli(5-hidroxi valerato)	P5HV
m=4	R = H	Poli(6-hidroxi hexanoato)	P6HH

Figura 2. Estructura general de los polihidroxicanoatos y tipo de PHA dependiendo de su grupo funcional [11].

Las características principales de los PHA de cadena corta son ser rígidos y frágiles, mientras los PHA de cadena media son más elásticos pero dotados de menos fuerza mecánica [6]. La composición química de los PHA va a depender del sustrato utilizado, de la enzima PHA-sintasa y de la ruta metabólica involucrada (Figura 3). Para mejorar las propiedades de los polímeros de cadena corta, se ha promovido la producción de copolímeros como 3HB-co-3HV que mejora las propiedades físico-mecánicas como flexibilidad y elasticidad en comparación con el P3HB [12, 13]. El poli(3-hidroxi butirato) o P3HB es el poliéster de origen biológico más producido por microorganismos. El P3HB presenta propiedades como cristalinidad entre el 55% y el 80%, sin embargo, dentro de la célula bacteriana

las moléculas se encuentran en estado amorfo, como gránulos insolubles en el citoplasma. El peso molecular del P3HB obtenido de forma bacteriana por lo general oscila entre 1×10⁴ g/mol y 3×10⁶ g/mol, la temperatura de transición vítrea es de 4°C, su temperatura de fusión va de 175-180°C y su temperatura de degradación es aproximadamente 270°C. Las densidades del P3HB cristalino y amorfo son de 1.26 g/cm³ y 1.18 g/cm³ respectivamente y sus propiedades mecánicas como el módulo de Young (3.5 GPa) y la tensión de rotura (43 MPa) son similares a las del polipropileno, aunque su elongación de ruptura es significativamente baja (5%), lo que lo hace un material bastante más rígido y frágil que la mayoría de los polímeros de origen sintético [11].

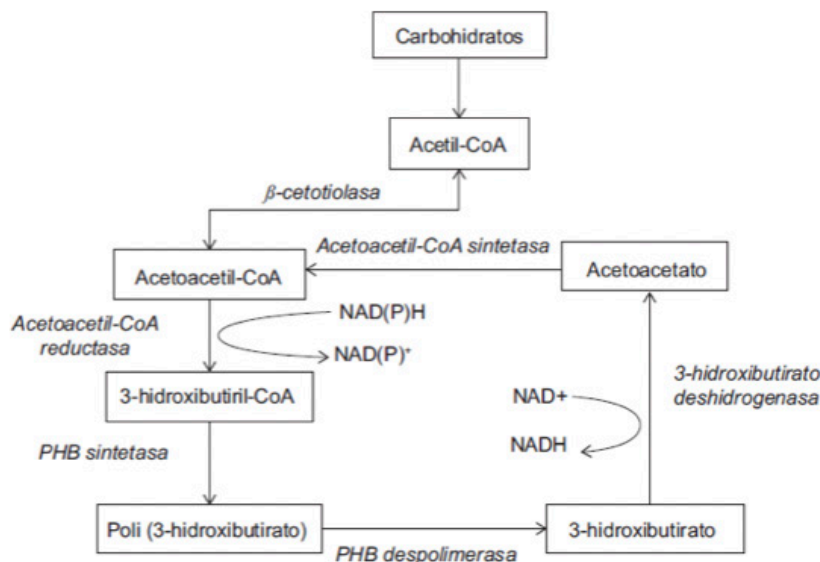


Figura 3. Ruta metabólica para biosíntesis y biodegradación del P3HB [6].

Se estima que gran parte del costo del proceso de producción corresponde al proceso de extracción del gránulo, que abarca desde la etapa de lisis celular hasta la purificación y liofilización del biopolímero por lo tanto la selección y optimización de este proceso es crucial para la producción exitosa y viable a nivel industrial [11].

Entre los principales métodos de extracción de PHAs se encuentran los métodos químicos con hipoclorito de sodio (NaClO) o dodecilsulfato de sodio (SDS) que actúan principalmente como pretratamiento promoviendo el rompimiento celular, el NaClO es un oxidante fuerte que destruye las membranas biológicas y todos los componentes celulares; sin embargo en baja concentración puede ser usado en la purificación los PHA. Usualmente se continúa con el uso de solventes orgánicos para recuperar PHB de biomasa debido a la naturaleza lipídica de los gránulos. El método del cloroformo es el más popular, otros como el dicloroetano, cloruro de metileno, etilen carbonato y propilen car-

bonato también son muy usados, estos solubilizan al polímero que posteriormente son precipitados con etanol, metanol o acetona. Debido a la elevada viscosidad que muestran los PHAs, se requieren grandes cantidades de solventes para la extracción, lo que eleva considerablemente el costo de producción del polímero [14–17]. Actualmente se están utilizando métodos alternativos a los solventes halogenados denominados como “verdes” que consideran parámetros como toxicidad, impacto ambiental y solubilidad. Muñoz-Ariza, O. [18], propuso al acetato de butilo, acetato de etilo, Metiletil cetona y ácido acético como alternativas al uso de cloroformo basado en la guía de selección de solventes GlaxoSmithKline (GSK).

Dicho lo anterior, este trabajo de investigación se centra en evaluar diversas metodologías de extracción y purificación de PHA con solventes orgánicos como el cloroformo, 1,2-propilen carbonato y ácido acético para determinar el que genere el mejor rendimiento de producción de PHA.

METODOLOGÍA

Materiales

Todos los reactivos utilizados son grado reactivo marca J.T. Baker, ácido crotonico marca Sigma-Aldrich y medios de cultivo marca BD Difco.

Microrganismo y medio de cultivo

Se utilizó una cepa de la bacteria gram negativa *Pseudomona putida*, aislada y caracterizada previamente por tinción de Gram, pruebas bioquímicas, crecimiento en medio selectivo King A y B, y mediante la amplificación del fragmento 16S del ADNr mediante PCR, posterior secuenciación y comparación con la base de datos de NCBI usando el software BLAST (datos no mostrados). Se utilizó un medio de cultivo mínimo mineral preparado de la siguiente manera: 10g/L de glucosa, 1 g/L de (NH₄)₂SO₄, 3 g/L de K₂HPO₄, 0.2 g/L de MgSO₄•7H₂O y 1 mL de solución de metales traza que

contiene 0.3 g/L de MnSO₄•4H₂O, 0.5g/L de FeSO₄•7H₂O, 0.2 g/L de EDTA y 1 g/l de CaCl₂•7H₂O. El medio de cultivo se autoclavó a 121°C por 15 minutos para asegurar esterilidad. El CaCl₂ y MgSO₄ se esterilizaron por separado para evitar precipitación. La producción del biopolímero se realizó en tubos cónicos de 50 mL añadiendo 10% de inóculo al medio de cultivo. Se incubó a 30°C durante 72 h en agitación constante a 150 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó a 4000 rpm durante 30 minutos para recuperar la biomasa. Se descartó el sobrenadante y la biomasa se secó a 40°C durante 24 h para determinar el peso seco. Se procedió a evaluar los diferentes métodos de recuperación de PHA.

Recuperación de PHA mediante dispersiones de hipoclorito de sodio/ cloroformo (método 1)

La biomasa seca se pretrató con el oxidante hipoclorito de sodio diluido con la finalidad de destruir las membranas biológicas y todos los componentes celulares. Se adicionó 1 mL de hipoclorito de sodio al 5% (v/v) y 1 mL cloroformo (CHCl₃) al 50% (v/v) por cada 0.02 g de biomasa seca. La mezcla se agitó por 1 h a temperatura ambiente y posterior a ello se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos, se descartó la fase acuosa conteniendo el hipoclorito de sodio, tratando de no descartar la película que se forma entre ambas fases. Se adicionó 1 volumen de metanol y se dejó reposar a 4°C durante 24 h para precipitar los PHA. Por último se centrifugó, se descartaron los solventes orgánicos y se dejó evaporar hasta peso constante [4].

Recuperación de PHA mediante lavados con acetona, etanol y cloroformo (método 2)

La biomasa seca se digirió con hipoclorito de sodio al 5% durante 1 h a 50°C, se centrifugó a 12000 rpm durante 30 minutos y se lavó el pellet de forma secuencial con agua destilada, acetona y etanol. Después del lavado, el pellet se disolvió en cloroformo y se incubó 24 h. Posteriormente se evaporó a temperatura ambiente hasta peso constante [19].

Recuperación de PHA con cloroformo (método 3)

Se adicionó cloroformo a la biomasa seca en una proporción de 1 mL de cloroformo por cada 10 mg de biomasa. Se incubó a 40°C por 36 h en

agitación constante. Se adicionó etanol absoluto en proporción de 2 mL por cada 10 mg de biomasa seca y se dejó reposar a 4°C por 1 h. Se centrifugó a 12000 rpm durante 30 min, se retiró el sobrenadante y se dejó secar hasta peso constante [20].

Recuperación de PHA con 1,2-propilen carbonato (método 4)

Con la finalidad de utilizar solventes menos contaminantes se utilizó el 1,2-propilen carbonato. Se adicionó 1,2-propilencarbonato en una proporción de 25 ml por 1 g de biomasa seca. Se incubó a 100°C durante 30 minutos. Se dejó reposar 24 h, se añadió 1 volumen de acetona para precipitar el PHA, se centrifugó la mezcla y se descartó el sobrenadante, dejando evaporar a hasta secar completamente [17, 20].

Recuperación de PHA con ácido acético glacial (método 5)

Siguiendo la metodología propuesta por Muñoz-Oriza [18], por 1 g de biomasa seca se agregó 20 ml de ácido acético glacial. Se incubó a 90°C por 1 h. Se evaporó el ácido acético y se realizó un lavado con metanol. Se agitó por 40 minutos y se centrifugó a 12000 rpm, se retiró el sobrenadante y se dejó secar a 60°C hasta peso constante.

Determinación del rendimiento de PHA

El cálculo de rendimiento de los PHAs se realizó mediante el método gravimétrico de la siguiente manera [20]:

$$\text{Acumulación PHA \%} = \frac{(\text{masa PHA (g)})}{(\text{biomasa seca (g)})} \cdot 100\%$$

Donde masa PHA (g) es la cantidad de PHA

recuperada de la biomasa seca inicial (g).

La cantidad de PHA también se cuantificó mediante espectrofotometría UV, mediante la adición de H₂SO₄ concentrado a las muestras

de PHA recuperado. Las muestras se incubaron a 100°C durante 1 h, promoviendo la ruptura de los polímeros a monómeros y la posterior oxidación de estos hasta ácido crotonico, el cual se cuantificó mediante espectrofotometría a

Resultados y discusión

Curva de calibración con ácido crotonico comercial

Para cuantificar la concentración de PHA mediante espectrofotometría UV, se utilizó ácido crotonico comercial (Sigma-Aldrich) y se realizaron diluciones seriadas a partir de una solución 0.1

M. Se determinó la absorbancia a 235 nm en un espectrofotómetro UV. En la figura 4 se muestra la curva de calibración utilizada para cuantificar las muestras de PHA.

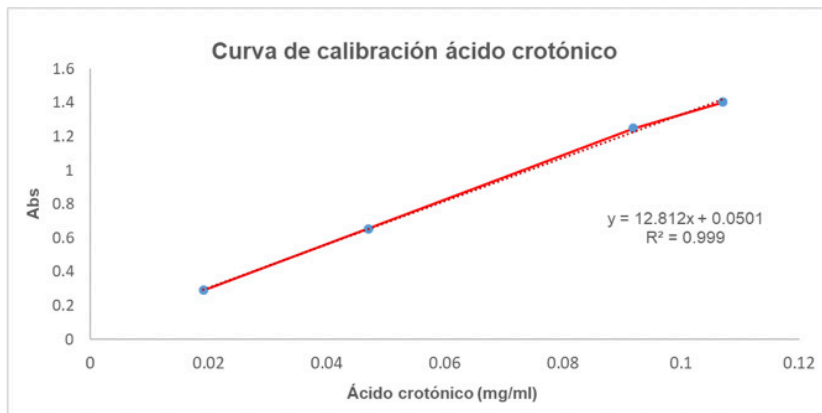


Figura 4. Curva de calibración con ácido crotonico comercial.

Comparativo entre metodologías para recuperación de PHA

De acuerdo con las rutas metabólicas de este tipo de microorganismo y el sustrato utilizado, se espera que el biopolímero obtenido sea P3HB, aunque es necesario caracterizar mediante espectroscopía infrarroja (FT-IR) para identificar el enlace éster-carbonilo característico de los PHA. En cuanto a las técnicas para determinar la composición monomérica, peso molecular y propiedades térmicas de los PHA destacan: la cromatografía de gases acoplada a masas y la resonancia magnética nuclear (RMN) y la calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis termo-gravimé-

trico (TGA), principalmente.

Se realizaron fermentaciones con *Pseudomonas putida* para evaluar su capacidad para producir PHA, así mismo, se evaluaron diferentes metodologías para recuperar el polihidroxicanoato de la biomasa celular. Tres métodos tienen su fundamento en el uso de cloroformo como solvente principal, debido a su alta solubilidad con compuestos lipídicos. Alternativamente se evaluaron dos metodologías con solventes menos contaminantes como el 1,2-propilencarbonato y el ácido acético glacial. La Tabla 1 muestra los resultados del comparativo

entre los métodos de extracción. La metodología que involucra el uso de hipoclorito de sodio como pretratamiento y solubilización con cloroformo (método 1) mostró claramente mejores rendimientos, con 1.275 g/L de PHA y 23.9% del total de la biomasa seca. Este método fue usado como referencia ya que históricamente ha sido el método más utilizado, sin embargo tiene como desventaja el uso de un solvente altamente tóxico. Con los métodos de lavados secuenciales de acetona, etanol y cloroformo (método 2) así como el método con cloroformo sin pretratamiento (método 3) se recuperaron 1.111 g/L y 0.929 g/L respectivamente y porcentajes de acumulación de PHA menores al obtenido con el método 1, lo cual deja ver la necesidad de un paso previo para liberar los gránulos de PHA ya que para las cinco metodologías evaluadas se partió de caldos de cultivo con una cantidad

similar de biomasa seca de 0.65 g/L, por lo tanto las cinco pruebas deberían contener potencialmente la misma cantidad de PHAs. El método con 1,2-propileno carbonato (método 4) mostró una recuperación de PHA de 0.843 g/L lo cual lo hace un método menos competente en comparación con el cloroformo. Por último el método 5 fue el que mostró el rendimiento más bajo. Esta metodología fue propuesta por Muñoz-Ariza [18] quien realizó un amplio estudio con la bacteria *Burkholderia cepacia* B27 donde evaluó diferentes solventes tanto clorados como los considerados como verdes, así mismo evaluó diferentes temperaturas y tiempos de contacto y entre ellos destacó el resultado obtenido con ácido acético donde se determinó que a 90°C y 60 min es posible obtener resultados comparables con los obtenidos con la metodología clásica con cloroformo.

Tabla 1. Resultados del comparativo entre métodos de extracción del PHA

MÉTODO EVALUADO	PHA RECUPERADO (G/L)	ACUMULACIÓN PHA %	ÁC. CROTÓNICO (G/L)
Hipoclorito/cloroformo	1.275	23.9	0.3
Acetona, etanol y cloroformo	1.111	20.8	0.206
Cloroformo	0.929	17.4	0.253
1,2-propileno carbonato	0.843	15.8	No determinado
Ácido acético	0.586	11.0	No determinado

Estudios realizados por Fiorese et al. [17] mostraron un comparativo entre la extracción de PHAs a partir de *Cupriavidus necator* con cloroformo y el 1,2-propilencarbonato donde se evaluaron tres diferentes pretratamientos, ya sea térmico a 60°C, elevación del pH a 9.0 e inmediatamente un descenso a 4.0 y la combinación de ambos, así como diferentes tiempos de contacto con el 1,2-propilencarbonato de 15, 30 y 45 min con temperaturas de incubación de 100, 115, 130 y 145°C. Este estudio mostró la dificultad para alcanzar rendimientos cercanos a los obtenidos con el cloroformo y solo a 130°C y 30 minutos se obtuvieron valores aproximados sin embargo se afectó el peso molecular del polímero obtenido.

Kumar et al. [22] mostraron en su estudio a partir de *Bacillus thuringiensis* EGU45 y glicerol crudo como fuente de carbono la producción de 1.5 a 3.5 g/L de PHA a partir de extracción con cloroformo. Thammasittirong et al. [23] reportaron una producción de PHA de 2.278 g/L, con un 60.07% del peso celular seco a partir de jugo de caña de azúcar como fuente de carbono y *Bacillus thuringiensis* B417-5. Otros estudios como el de Sayyed et al. [15] reportaron una producción acumulada de PHA a partir de *Alcaligenes faecalis* de 5.6 g/L usando hipoclorito de sodio, posterior adición de cloroformo caliente y precipitación con etanol y acetona (1:1) y compararon sus resultados con los reportados previamente por ellos mismos

de 1.34 g/L y 0.63 g/L mediante extracción con cloroformo y 1.1 g/L por el método de dispersiones. También observaron que a las 24 h se obtuvo la mayor cantidad de PHA y al paso del tiempo esta

cantidad disminuyó drásticamente debido a que las bacterias utilizan esta reserva de carbono cuando se agota la fuente de carbono presente en el medio.

Conclusiones

Los resultados mostrados son la primera aproximación para la optimización de una metodología eficiente y que de ser posible elimine el uso de solventes halogenados. Es importante mencionar que la bacteria utilizada es una bacteria nativa aislada de suelo, en contraste con algunas bacterias recombinantes que generalmente se utilizan en este tipo de procesos. Actualmente se está realizando una evaluación con diferentes sustratos como son glucosa, sacarosa, glicerol crudo, glicerol residual del proceso de producción de biodiesel y residuos de lactosueros de la región con la finalidad de revalorizar estos residuos.

Es importante evaluar diferentes tiempos de fermentación, ya que se ha visto que en ocasiones la misma bacteria consume los gránulos almacenados en ausencia de carbono en el medio. Así mismo se evaluarán otros métodos de digestión alternativos al hipoclorito de sodio como son el SDS y Triton X-100.

Se agradece a CONACYT por el apoyo para la realización de este trabajo mediante el financiamiento del proyecto A1-S-43130 de la convocatoria de Ciencia básica.

Referencias

- [1] Rameshwari, R. & Meenakshisundaram, M. (2014). A Review on Downstream Processing of Bacterial Thermoplastic-Polyhydroxyalkanoate. *Int J Pure Appl Biosci*, 2,68–80.
- [2] Márquez-Romero, A. (2020). Influencia de las condiciones de operación (pH, temperatura, relación C/N/P) en la producción de polihidroxialcanoatos (PHAs) a partir de efluentes acidogénicos de biomasa lignocelulósica. Tesis de maestría, Universidad de Cadiz.
- [3] Segura, D. (2007). Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables. *Biotecnología*, 14:361–372.
- [4] Sánchez-Moreno, S.A., Marín-Montoya, M.A., Mora-Martínez, A.L. & Yepes-Pérez M. del S. (2012.) Identificación de bacterias productoras de Polihidroxialcanoatos (PHAs) en suelos contaminados con desechos de fique. *Rev Colomb Biotecnol*, 14:89–100.
- [5] Sangkharak, K. & Prasertsan, P. (2008). Nutrient optimization for production of polyhydroxybutyrate from halotolerant photosynthetic bacteria cultivated under aerobic-dark condition. *Electron J Biotechnol*, 1-12. <https://doi.org/10.2225/vol11-issue3-fulltext-2>
- [6] González-García, Y., Meza-Contreras, J.C., González-Reynoso, O. & Córdova-Lopez, J.A. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: plásticos de origen microbiano. *Rev Int Contam Ambie*, 29:21–28.
- [7] Barbosa, M., Espinosa-Hernández, A., Malagón-Romero, D. & Moreno-Sarmiento, N. (2005). Producción de poli-β-hidroxibutirato (PHB) β por *Ralstonia eutropha* ATCC 17697. *Univ Sci*, 10:45–54.

- [8] Rehm, B.H.A. (2007). Biogenesis of microbial polyhydroxyalkanoate granules: A platform technology for the production of tailor-made bioparticles. *Curr Issues Mol Biol* 9:41–62. <https://doi.org/10.21775/cimb.009.041>
- [9] Vishnuvardhan Reddy, S., Thirumala, M. & Mahmood, S.K. (2009). Production of PHB and P (3HB-co-3HV) biopolymers by *Bacillus megaterium* strain OU303A isolated from municipal sewage sludge. *World J Microbiol Biotechnol*, 25:391–397. <https://doi.org/10.1007/S11274-008-9903-3>
- [10] Reddy, C.S.K., Ghai, R. & Rashmi y Kalia, V.C. (2003). Polyhydroxyalkanoates: An overview. *Bioresour Technol*, 87:137–146. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00212-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00212-2)
- [11] Farfán, F.R. (2019). Extracción, purificación y modificación de un biopolímero del tipo poli (3- hidroxibutirato) obtenido de la fermentación de ácidos grasos con *B. cepacia*. Andrés. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia.
- [12] Koller, M. (2018). A review on established and emerging fermentations schemes for microbial production of polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters. *Fermentation* 4:2-30. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020030>
- [13] Sukan, A., Roy, I. & Keshavarz, T. (2015) Dual production of biopolymers from bacteria. *Carbohydr Polym* 126:47–51. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.001>
- [14] Ortega-Arias-Carbajal, G.M. & Bell-García, A. (2014). Separación, purificación y caracterización de poli-hidroxibutirato. *ICIDCA Sobre los Deriv la Caña Azúcar* 48:7–15
- [15] Sayyed, R.Z., Gangurde, N.S., Chincholkar, S.B. (2009). Hypochlorite digestion method for efficient recovery of PHB from *Alcaligenes faecalis*. *Indian J Microbiol*, 49:230–232. <https://doi.org/10.1007/s12088-009-0036-7>
- [16] Hahn, S.K., Chang, Y.K., Kim, B.S., et al. (1993). The recovery of poly(3-hydroxybutyrate) by using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnol Tech* 7:209–212. <https://doi.org/10.1007/BF02566149>
- [17] Fiorese, M.L., Freitas, F., Pais, J., et al. (2009). Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate. *Eng Life Sci* 9:454–461. <https://doi.org/10.1002/elsc.200900034>
- [18] Muñoz-Ariza, O.M. (2019). Evaluación del proceso de extracción y purificación del polímero Poli(-Hidroxibutirato) PHB obtenido de la cepa *Burkholderia cepacia* B27 con un solvente orgánico no halogenado. *Fund Univ América* 132
- [19] Bhuwal, A.K., Singh, G., Aggarwal, N.K. et al. (2013). Isolation and screening of polyhydroxyalkanoates producing bacteria from pulp, paper, and cardboard industry wastes. *Int J Biomater*, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2013/752821>
- [20] Gahlawat, G., Soni, S.K. (2017). Valorization of waste glycerol for the production of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer by *Cupriavidus necator* and extraction in a sustainable manner. *Bioresour Technol*, 243:492–501. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.139>
- [21] Law, J.H. y Slepecky, R.A. (1960). Assay of poly-13-hydroxybutyric acid. *J Bacteriol*, 82:33–36
- [22] Kumar, P., Ray, S., Patel, S.K.S, et al. (2015). Bioconversion of crude glycerol to polyhydroxyalkanoate by *Bacillus thuringiensis* under non-limiting nitrogen conditions. *Int J Biol Macromol*, 78:9–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.03.046>.
- [23] Thammasittirong, A., Saechow, S. & Thammasittirong, S.N.R. (2017). Efficient polyhydroxybutyrate production from *Bacillus thuringiensis* using sugarcane juice substrate. *Turkish J Biol*, 41:992–1002. <https://doi.org/10.3906/biy-1704-13>.

BACILLUS SPP. PRODUCTOR DE COMPUESTOS VOLÁTILES INHIBIDORES DEL CRECIMIENTO DE HONGOS CAUSANTES DE PUDRICIÓN DE FRUTOS.

Alonso Solórzano Olga Mariana¹, Pacheco Aguilar Juan Ramiro¹, Arvizu Medrano Sofía María¹, Cruz Hernández Andrés², Campos Guillen Juan³, Martínez Peniche Ramón Álar¹.

¹Departamento de investigación y posgrado en alimentos (DIPA), Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, Qro, México CP 76010.

²Escuela de Agronomía, Universidad de La Salle Bajío, Blvd Torres Landa Pte 1002, Las Américas, León Gto, México CP 37150.

³Departamento de posgrado de ciencias ambientales, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, Qro, México CP 76010.

[*omariana.as@hotmail.com](mailto:omariana.as@hotmail.com) juanramiro29@yahoo.com.mx

Resumen



Bacillus se destaca por su potencial antagonico contra enfermedades agrícolas y recientes estudios, muestran que algunas cepas además producen compuestos volátiles con esta capacidad. El objetivo del trabajo fue evaluar la actividad inhibitoria de los volátiles producidos por *Bacillus velezensis* FLB14.18 y *Bacillus* FR4B12 sobre el crecimiento de hongos de interés agrícola. Los ensayos de elección de medio de cultivo y de inhibición se realizaron usando la técnica de placas invertidas. Los resultados

mostraron que la inhibición de *Alternaria alternata* fue de 50-57%, *Fusarium oxysporum* de 26-37% y de *Colletotrichum gloeosporoides* 7-14%. Se ha concluido que, los nutrientes disponibles están relacionados con la capacidad inhibitoria de los volátiles producidos por *Bacillus* y que dichos volátiles no tienen la misma capacidad inhibitoria con diversos hongos patógenos, sugiriendo que pueda deberse a las diferencias en la composición micelial entre géneros y/o la concentración de los compuestos volátiles formados por *Bacillus*.

Palabras clave: biocontrol, podredumbre, lesión, fruto, inhibición de hongos.

Introducción

Las enfermedades fúngicas son las principales causas biológicas que afectan al fruto, siendo las principales las provocadas por los géneros *Alternaria*, *Fusarium* y *Colletotrichum* [1].

El principal método de control de estas

enfermedades es el uso de fungicidas de síntesis [2]. Sin embargo, el uso prolongado de dichos productos, deriva en la contaminación ambiental, causa toxicidad en humanos y puede llegar a causar resistencia en el microorganismo, lo que disminuiría la eficacia del producto [3].

Por otra parte, el control biológico es una alternativa que tiene como finalidad el uso de antagonistas naturales que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos [4; 5; 6]. Éstos generalmente son aislados de plantas sanas provenientes de campos infectados con el fitopatógeno que se desea controlar, ya que se considera que su resistencia al patógeno pudiera deberse a la presencia de microorganismos antagonistas [7], siendo el género *Trichoderma* uno de los hongos más conocidos con estas características, ya que este presenta actividad antagónica a través de modos de acción tales como el microparasitismo, antibiosis, competencia por nutrientes, entre otros [8].

Por el lado de las bacterias, el género *Bacillus* es conocido por su uso como agente de biocontrol, especies como *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis* son de interés científico por sus capacidades de mitigar la incidencia de enfermedades agrícolas. En estas especies se

han identificado diversos modos de acción, dentro de los que destacan, la producción de lipopéptidos, producción de enzimas líticas, producción de sideróforos, producción de endotoxinas y producción de moléculas elicitoras que desencadenan la respuesta sistémica inducida [9].

En nuevas investigaciones se han identificado compuestos orgánicos volátiles (COV) como responsables del antagonismo contra hongos patógenos, se cree que tienen un gran potencial como reductores de enfermedades. [10]. Los COV pueden actuar como antibióticos e inhibir directamente el crecimiento micelial y la germinación de esporas de hongos patógenos [11;12].

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad de producción de compuestos volátiles, en condiciones *in vitro*, de dos cepas de *Bacillus* con capacidad de inhibir el crecimiento de hongos patógenos.

METODOLOGÍA

Material biológico

Se utilizaron las cepas *Bacillus velezensis* FLB14.18 y *Bacillus methylotrophicus* Fr4B12, aisladas de manzana de una huerta experimental del municipio de Amealco, Querétaro (20°09'LN, 100°07'LO y 2279 msnm) por la M. en C. Rocío Crystabel López González. La cepa *Bacillus velezensis* FLB14.18 fue aislada de la flor de un manzanero de la variedad Joya en el año 2018, mientras que la cepa *Bacillus methylotrophicus* Fr4B12 se aisló del fruto en etapa de maduración 4 en un manzanero de variedad Royal Gala en el año 2017 [13]. Como cepa de referencia se utilizó *Bacillus subtilis* Q11, cepa comercial utilizada para la inhibición de *Fusarium oxysporum* con estudios previos no reportados de producción de volátiles. Estas fueron crecidas en

caldo nutritivo y mantenidas en glicerol a -20°C para su conservación.

Los hongos patógenos a utilizados fueron *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, y *Colletotrichum gloeosporioides*, siendo algunas obtenidas de la colección del laboratorio de plantas y biotecnología agrícola y otras por donación del Dr. Ulises Esquivel Naranjo, investigador de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. Los hongos fueron cultivados en PDA y mantenidos en glicerol a -20°C [14].

Elección de medio de cultivo para crecimiento de *Bacillus spp.*

En placas de 50mm, usando la técnica de placas invertidas, se usó Agar Nutritivo (AN) y Agar Soya Trypticaséina (AST) para la inoculación por estriado de manera individual cada una de las cepas de *Bacillus* y Agar Papa Dextrosa (APD) donde se

colocó un disco de 5 mm de micelio de cada hongo patógeno a evaluar. Se incubó a 28°C durante 3 días. Pasado este tiempo se midió el crecimiento de micelio y se eligió el medio de cultivo con el cual el desarrollo del hongo fuera menor.

Ensayo *in vitro* de inhibición por compuestos volátiles.

Con la técnica de placas invertidas se evaluó el porcentaje de inhibición de los compuestos volátiles producidos por las cepas de *Bacillus*. Se inocularon de manera masiva 100 µl de suspensión de células de cada cepa de *Bacillus* a una concentración de 6 logaritmos en placas de petri con AST, mientras

que, por otra parte, se colocó un disco de 5mm de micelio de cada patógeno por separado sobre placas de petri con APD. Una vez listas las placas inoculadas con las cepas de *Bacillus* y los hongos patógenos a evaluar (*Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum gloesporioides*), se retiró

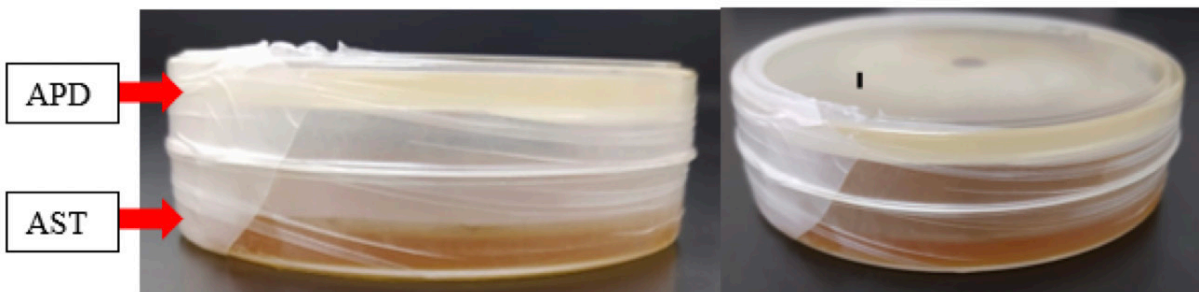


Figura 1. Ensayo de placas invertidas

la tapa de la placa de petri con inóculo de las cepas de *Bacillus* y se colocó la placa inoculada con el micelio de manera invertida sobre esta, sellando ambas placas juntas con Parafilm. Se incubaron a 28°C durante 7 días. Finalmente, se midió el diámetro del crecimiento micelial para

calcular el porcentaje de inhibición. El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo con siguiente la fórmula: % de inhibición = $(CT/C) \times 100$, donde C es el valor de control y T es la medición del hongo en cada tratamiento [15].

Resultados y discusión

Elección de medio de cultivo para crecimiento de *Bacillus spp.*

Al examinar el desarrollo del mismo hongo contra *Bacillus* crecido en diferentes medios de cultivo, en la Figura 2 se observa que los hongos

que estuvieron contra las bacterias crecidas en AST tuvieron menor crecimiento del diámetro de micelio.

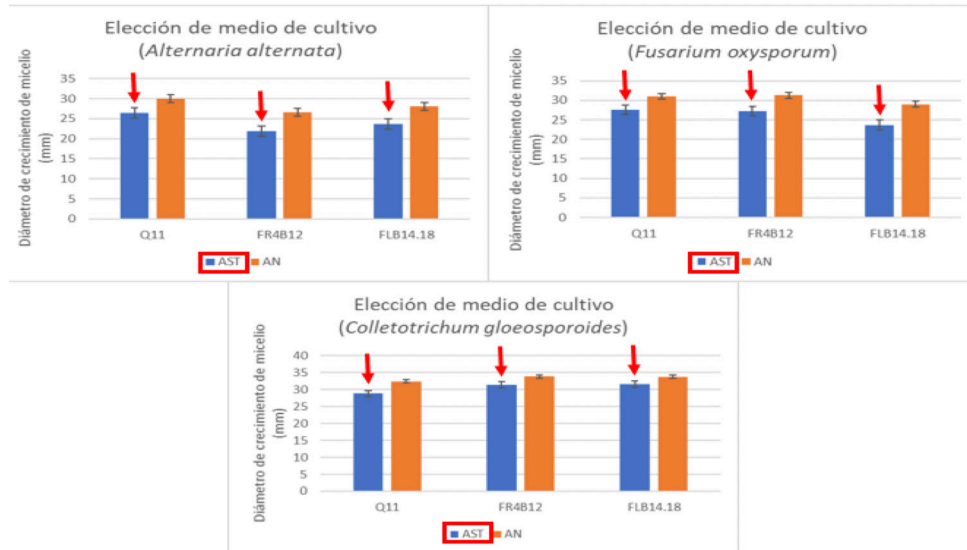


Figura 2. Gráfico de ensayo para elección de medio de cultivo.

Según Rath et al. (2018) [16] esto se debe a que la diferencia entre la composición de los medios de crecimiento estimula la producción diferencial de compuestos volátiles que puedan estar

relacionados con la inhibición. Es así que se decide continuar los ensayos siguientes usando AST para el crecimiento de las cepas de estudio.

Ensayo in vitro de inhibición por compuestos volátiles

Los resultados de este ensayo arrojaron que la inhibición del crecimiento de micelio es distinta entre géneros de hongos, sin embargo, los resultados fueron similares entre cepas de *Bacillus* contra un mismo hongo como se observa en la Figura 3. Siendo así que el hongo más susceptible fue *Alternaria alternata*, teniendo una inhibición entre el 50-57% en comparación al control negativo,

seguido de *Fusarium oxysporum* que presentó una inhibición entre 28-33% y finalmente *Colletotrichum gloeosporoides* que tuvo una inhibición entre el 7-11%, el cual en el análisis estadístico no muestra una diferencia significativa, por lo que se considera que su inhibición es muy baja y no es de interés para el estudio, por lo que para los ensayos siguientes se descarta este hongo.

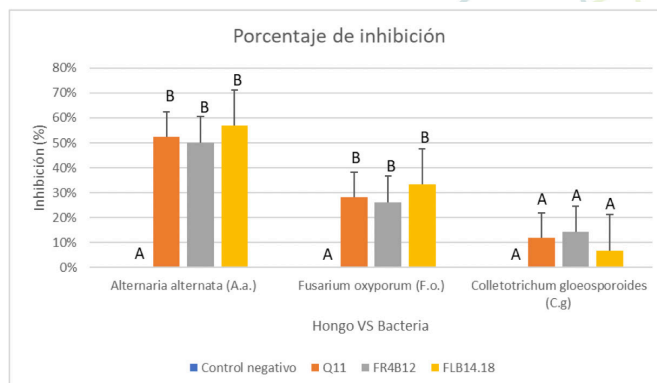


Figura 3. Porcentaje de inhibición de cada hongo patógeno vs cada cepa de *Bacillus*. Las letras distintas representan una diferencia significativa con respecto a su control negativo ($P \leq 0.05$).

Bajo lo reportado por Xing-Yu et al (2015) se sabe que la naturaleza química de los COV determina sus diferentes actividades antifúngicas, siendo así que, los aldehídos alifáticos y las cetonas son más efectivos que los alcoholes en la inhibición. Asimismo, según lo mencionado por Patiño et al (2019) [17] la actividad antifúngica esta relacionada

con la interacción entre organismos, lo que induce la producción de los compuestos inhibidores, es así que la composición del micelio es de importancia, ya que debido a esta podría deberse la inducción del metabolismo encargado de la producción de dichos volátiles.

Conclusiones

Es así que bajo los resultados obtenidos se concluye que, la producción de compuestos volátiles inhibidores de crecimiento micelial, está relacionado a los nutrientes que la bacteria tenga a disposición. Por otra parte, el potencial

inhibitorio, aparte de estar relacionado con los compuestos volátiles, también se ve afectado por la composición del micelio, lo cual puede hacer al hongo más o menos susceptible a estos.

Referencias

- [1] Mahovic, M.J.; Sargent, S.A.; Bartz, J.A.; Lon Kan, E.E. (2009). Identificación y control postcosecha de las enfermedades del tomate en la Florida. University of Florida IFAS Extension. Publicación HS1080.
- [2] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la agricultura. (2008). Recuperado de <http://www.fao.org/faostat/es/#home>
- [3] Martínez, N. (2010). Manejo integrado de plagas: Una solución a la contaminación ambiental. Comunidad y Salud, 8(1), 073-082. Recuperado de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-32932010000100010&lng=es&tlng=es
- [4] Navarro Montes, D. A. (2010). Manejo Integrado de Plagas. University of Kentucky College of Agriculture, Food and Environment Cooperative Extension Service, 181. Recuperado de <http://www2.ca.uky.edu/agcomm/pubs/ID/ID181/ID181.pdf>
- [5] Heath, M.C. (2000). Non host resistance and nonspecific plan defense. Current Opinion in Plant Biology 3,315-319.
- [6] Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M.M., Heydrich-Pérez, M. (2011) Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 4(3), 131-138 Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181222321004>
- [7] Janisiewicz, W. & L. Korsten (2002), "Biological control of postharvest diseases of fruits", Annual Review of Phytopathology, 40, 411-441.
- [8] Michael Aceves, A.C., Hernández Morales, J., Toledo Aguilar, R., Sabino López, J.E., Romero Rosales, T. (2019). Capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. nativa contra *Phytophthora* parasítica y *Fusarium oxysporum* aislados de cultivos de jamaica. Revista de Fitotecnia Mexicana. 42 (3): 235-241.

[9] Villarreal-Delgado, M.F., Villa-Rodríguez, E.D., Cira-Chávez, L.A., Estrada- Alvarado, M.I., Parra-Cota, F.I., & de los Santos-Villalobos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(1), 95- 130. <https://dx.doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>

[10] Xing-Yu Li, Zi-Chao Mao, Yi-Xing Wu, Hon-Hing Ho & Yue-Qiu He (2015) Comprehensive volatile organic compounds profiling of *Bacillus* species with biocontrol properties by head space solid micro extraction with gas chromatography-mass spectrometry, *Biocontrol Science and Technology*, 25:2, 132-143, doi: 10.1080/09583157.2014.960809

[11] Kai, M., Effmert, U., Berg, G. & Piechulla, B. (2007). Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Archives of Microbiology*. 187, 351–360. doi: 10.1007/s00203-006- 0199-0

[12] Vespermann, A., Kai, M., Piechulla, B. (2007). Rhizobacterial Volatiles Affect the Growth of Fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Applied and environmental microbiology*. 73. 5639-41. 10.1128/AEM.01078-07.

[13] López González, R. C., Martínez Peniche, R. A., & Pacheco Aguilar, J. R. (2019). Bacterias antagonistas a *Botrytis cinerea* aisladas de flor del manzano. *Revista Nthe*, 31, 69-75. Recuperado de <http://nthe.mx/revista.php>

[14] Velázquez-Robledo, R., Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Hernández-Morales, A., Aguirre, J., Casas-Flores, S., López-Bucío, J., & Herrera-Estrella, A. (2011). Role of the 4-phosphopantetheinyl transferase of *Trichoderma virens* in secondary metabolism and induction of plant defense responses. *Molecular plant-microbe interactions*, 24(12), 1459-1471.

[15] Gotor-Vila, A., Teixidó, N., Di Francesco, A., Usall, J., Ugolini, L., Torres, R., & Mari, M. (2017). Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. *Food Microbiology*, 64, 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.006>

[16] Rath, M., Mitchell, T., & Gold, S. (2018). Volatiles produced by *Bacillus mojavensis* RRC101 act as plant growth modulators and are strongly culture-dependent. *Microbiological Research*, 208, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.12.014>

[17] Patiño M, Nieto-Ramírez IJ, Chegwin-Angarita C, Torres-Rojas E. Actividad biocontroladora in vitro de macrohongos contra diferentes hongos fitopatógenos. *Acta biol. Colomb.* 2020;25(2):265-279. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v25n2.75303>

EVALUACIÓN DE LA INMOVILIZACIÓN DE LIPASA CÁNDIDA ANTÁRTICA B EN SOPORTE PGV

A. A. Díaz Barbosa¹, J. E. Pliego Sandoval^{2*}, L. A. Reyes Nava³, L. E. Iñiguez Muñoz³, M. A. Camacho Ruíz⁴.

¹Estudiante de la Ingeniería en Sistemas Biológicos del Centro Universitario Sur, Av Enrique Arreola Sirva 883, Col Centro, C.P. 49000, Ciudad Guzmán Jalisco, México.

^{2*}Departamento de Ciencias Computacionales e Innovación Tecnológica del Sur, Av Enrique Arreola Sirva 883, Col Centro, C.P. 49000, Ciudad Guzmán Jalisco, México.

³Departamento en Ciencias de la Naturaleza del Sur, Av Enrique Arreola Sirva 883, Col Centro, C.P. 49000, Ciudad Guzmán Jalisco, México.

⁴Laboratorio de Investigación en Biotecnología, Centro Universitario del Norte, Universidad de Guadalajara, Carretera Federal No. 23, Km. 191, C.P. 46200, Colotlán Jalisco, México.

*jorge.pliego@cusur.udg.mx

Resumen



Las enzimas, encargadas de acelerar el metabolismo, están conformadas por una o más cadenas polipeptídicas formando en ellas un sitio catalítico. Las lipasas, un tipo de enzimas, hidrolizan grasas y aceites y se han convertido en uno de los biocatalizadores más importantes de la industria principalmente utilizadas en el área alimentaria, abarcando hasta un 35% del mercado enzimático. A pesar de sus funciones se ven limitadas por su naturaleza conllevando a una pérdida

de actividad y estabilidad al extraerlas de su ambiente y exponerlas a distintas condiciones como temperatura y pH. Por eso, se han ideado técnicas como la inmovilización que mejoran sus características y rendimiento fuera de su ambiente natural. La inmovilización es el confinamiento de la enzima a una región del espacio. En este trabajo se evaluó la eficiencia de inmovilizar lipasas en una membrana PGV obteniendo una actividad enzimática de 0.7855 U/ml.

Palabras clave: Enzima, soporte, confinamiento.

Introducción

Las enzimas son proteínas conformadas estructuralmente por una o más cadenas polipeptídicas plegadas formando un sitio denominado centro activo; estas, son encargadas de acelerar los procesos metabólicos de la célula catalizando reacciones químicas y disminuyendo la energía de activación necesaria a través de la

unión de un sustrato al centro activo y su catálisis para la formación posterior de un producto (1). Una de las enzimas más utilizadas son las lipasas (triacilglicerol hidrolasa, EC. 3.1.1.3), éstas se encargan de la hidrólisis de grasas y aceites, contienen una unidad de oligopéptidos que protegen su centro activo el cual, al encontrarse

traslada exponiendo el sitio catalítico de la enzima para la unión del sustrato (2). Esta enzima se ha convertido en uno de los biocatalizadores con mayor potencial para la industria biotecnológica utilizada en metabolismo de lípidos *in situ* y en aplicaciones industriales multifacéticas *ex situ* (3). La lipasa presenta propiedades como gran actividad catalítica, especificidad de sustrato, capacidad de regular su actividad por medio del control de estímulos y factores externos a la reacción, no aportan efectos negativos medioambientalmente, creación de detergentes, procesamiento de alimentos, industria farmacéutica, creación de biodiesel, tratamiento de residuos, entre otras aplicaciones (1,4,5). Las enzimas son mayormente utilizadas en el área de alimentos y bebidas abarcando un 35% del mercado enzimático, 25% se encuentran en el mercado de los agentes de limpieza, 20% alimentación animal, 10% biocombustibles y 10% en otros (6), de esta forma, principalmente se encuentran enfocadas en la parte alimenticia con aportaciones como síntesis de ácidos grasos saturados, síntesis de saborizantes, procesamiento de aceites vegetal, aceleración y mejoramiento de procesos como horneado, procesamiento de huevos para la mejora de propiedades emulsificantes, creación de ingredientes como cocoa, mantequilla, quesos, producción de ésteres de sabor, tratamiento de desperdicios alimenticios, entre otras (6,7)

A pesar de las distintas funciones que las lipasas aportan, se ven limitadas dada su naturaleza presentando desventajas como falta de estabilidad

a largo plazo, gran dificultad en su recuperación y purificación para ser reutilizadas, aunado a esto al tener costos elevados significa un mayor gasto para lograr su uso en diversos procesos; a su vez, debido a su naturaleza proteica, las enzimas/lipasas en general son sensibles a sufrir desnaturalización al aislarla de su ambiente natural; así, esto la afecta estructuralmente y por consiguiente una disminución o pérdida de su función catalítica (5). No obstante a las desventajas que presenta, su estabilidad en la utilización industrial se ha visto mejorada en los últimos años por tecnologías como ingeniería, inmovilizaciones o alteración de procesos (8). El uso de inmovilizaciones como técnica para el mejoramiento enzimático en las industrias es debido a que la técnica provee ventajas tales como facilidad en la separación del producto y la enzima, reducción de posible contaminación proteica del producto, recuperación y reutilización de la enzima para futuros procesos logrando una reducción de los costos, aumento de la estabilidad enzimática ante condiciones desnaturalizantes como temperatura o pH; también, mejora características de su actividad a dependencia del tipo de inmovilizado utilizado, entre otras. En general se pueden nombrar 3 métodos de inmovilización más utilizados: soporte, atrapamiento y entrecruzamiento caracterizados por el confinamiento de la enzima a un espacio reducido en el que desempeñará su acción a un sustrato dado (9). De esta manera en este trabajo se realiza una inmovilización de la enzima lipasa en una membrana de PGV para evaluar su eficiencia como soporte.

METODOLOGÍA

Materiales

Lipasa Cándida Antártica B (CALB), Nanoarcilla Hidrofílica de Bentonita (PGV) obtenidos de Sigma Aldrich, paranitrofenol (pNP), paranitrofenol butirato (pNPB), 2-propanol,

agitador lateral UltraRocker de BIORAD, cámara de vacío de Hergum phlegm suction, espectrofotómetro de microplacas Thermo con Multiskan GO Scientific,

Preparación de la membrana

Se pesaron 0.5 g de reactivo PGV y colocándolo con 4.5 ml de alcohol en agitación lateral por 30 minutos. Terminando el tiempo se añadieron 2.25 ml de agua y se colocó nuevamente en agitación durante 15 minutos. Pasando los 45 minutos se filtró y lavó (10)

Inmovilización de la enzima

La enzima CALB fue inicialmente diluida 1:10 y se le añadieron 0.5 ml a la membrana PGV, se dejó por 24 hrs a 4°C. Se realizó un filtrado y lavado con agua (10). Para finalizar la membrana se colocó en una cámara de vacío a presión de 0.5 MPa por dos tiempos de 15 minutos con un intervalo de 5 minutos entre ellas.

Análisis espectrofotométrico

Las muestras se analizaron en el espectrofotómetro a 415 nm y 30°C. La medición se realizó por cuadruplicado utilizando una microplaca de 96 pozos. Primeramente, se añadieron 0.003 g del inmovilizado. La mezcla utilizada para la reacción consistió en 18 partes de buffer y 1 parte del sustrato, el cual fue preparado a una concentración de 5 mM de pNPB en 2-propanol (11). La medición se realizó por cuadruplicado utilizando una microplaca de 96 pozos. La actividad fue calculada en base a una curva estándar de pNP en concentraciones de 0 a 500 M utilizando la ecuación 1. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μmol de pNP por minuto.

$$U/ml = ((Abs/min)/pendiente\ std) * (0.0002\ lt / 10\ \mu l) * (1000\ \mu l / 1ml)$$

Ecuación 1. Fórmula de obtención de actividad enzimática

Resultados y discusión

En la tabla 1 se muestra los datos obtenidos de la inmovilización realizada en el soporte PGV. El análisis se realizó por cuadruplicado obteniendo la

pendiente y actividad enzimática de cada uno de ellos por medio de la ecuación 1 para finalmente tener un promedio de cada dato. La actividad enzimática presente en el PGV fue de 0.7855 +/- 0.0036 U/ml

Tabla 1. Análisis de la inmovilización

Cuadruplicados	Actividad Enzimática (U/ml)	Desviación Estándar	Error
1	0.52105263		
2	0.85263158		
3	0.96842105	0.0036	17.9220
4	0.8		
Promedio			
	0.78552632		

En la figura 2 se muestra la gráfica de la cinética enzimática durante 10 minutos obtenida por medio del espectrofotómetro. Al no observarse un decremento la medición puede exponerse aún a un análisis con un periodo más extenso.

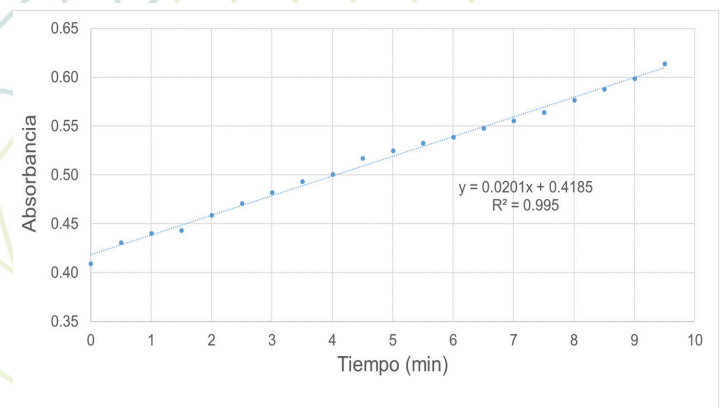


Figura 2. Cinética enzimática en soporte.

El PGV posee una composición hidrófoba a base bentonita con un tamaño de partícula de 20 μm y un área superficial de 64 m^2/g (10) la cual, al presentar una alta superficie permite una alta carga de enzimas, así como mantener a las enzimas inmovilizadas aisladas del medio ambiente (11). La utilización del etanol como solvente ha demostrado afectar las propiedades o eficiencia de las variedades de arcillas (12,13) además de poder intervenir directamente en la inmovilización debido a la posible adsorción de moléculas de

etanol en los poros del material (14). Conforme a la literatura el método de inmovilización con soportes naturales inorgánicos (como bentonita) forma uniones químicas enzima-soporte de tipo puramente físico, iónico o covalente (1) por lo que el problema de la baja actividad radica en los pasos que se realizaron para la inmovilización o bien el solvente como ya se mencionó antes y no en cuanto a los elementos principales (nanoclay y enzima), elementos que se evaluarán en futuras pruebas.

Conclusiones

Se comprobó la inmovilización efectiva de enzima *Lipasa Candida Antartica B* por soporte en una membrana de PGV obteniendo una actividad enzimática relativamente baja. Para próximos estudios se plantea optimizar el método de

inmovilización, así como la modificación de alguno de los reactivos utilizados, y la identificación de posibles variables limitantes como tiempo, temperatura y pH para evaluar su impacto en la actividad final.

Referencias.

1. Cebrián S. Nuevos métodos y soportes para la inmovilización de enzimas. 2020.
2. Reetz M. Lipases as practical biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol.* 2002;6(2):145–50.
3. Mehta A, Bodh U, Gupta R. Fungal lipases: A review. *J Biotech Res.* 2017;8(1):58–77.
4. Bhushan I, Parshad R, Qazi GN, Gupta VK. Immobilization of lipase by entrapment in Ca-alginate beads. *J Bioact Compat Polym.* 2008;23(6):552–62.
5. Homaei A, Sariri R, Vianello F, Stevanato R. Enzyme immobilization: An update. *J Chem Biol.* 2013;6(4):185–205.
6. Guerrand D. Lipases industrial applications: Focus on food and agroindustries. *Oilseeds fats, Crop Lipids.* 2017;24(4).
7. Aravindan R, Anbumathi P, Viruthagiri T. Lipase applications in food industry. *Indian J Biotechnol.* 2007;6(2):141–58.

8. Won K, Kim S, Kim KJ, Park HW, Moon SJ. Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. *Process Biochem.* 2005;40(6):2149–54.
9. Sheldon R. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Adv Synth Catal.* 2007;349(8–9):1289–307.
10. Rivera I. Síntesis de biodiesel a partir de desechos grasos catalizada por lipasas inmovilizadas de fabricación propia. 2009.
11. Fajardo-Ochoa R, Osuna-Castro JA, Villavelazquez-Mendoza C, Escalante-Minakata P, Ibarra-Junquera V. Inmovilización de células y enzimas. *Rev Cient la Univ Autónoma Coahuila.* 2011;3(6):42–56.
12. Feng X, Hu G, Meng X, Ding Y, Zhang S, Yang M. Influence of ethanol addition on the modification of montmorillonite by hexadecyl trimethylammonium bromide. *Appl Clay Sci.* 2009;45(4):239–43.
13. Metz S, Anderson RL, Geatches DL, Suter JL, Lines R, Greenwell HC. Understanding the Swelling Behavior of Modified Nanoclay Filler Particles in Water and Ethanol. *J Phys Chem C.* 2015;119(22):12625–42.
14. Perez F. Acidificación de bentonitas para su uso como catalizador en síntesis de solketal. *Investig Joven Univ Nac La Plata.* 2019;6:2019.





TRABAJOS DE MODALIDAD CARTEL



DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE ACTIVIDAD QUITINOLÍTICA EN HONGOS FILAMENTOSOS PARA SU USO COMO EFECTO FERTILIZANTE.

J.M. Rodríguez Ruíz¹, G. Sánchez Tejeda², J.E. Pliego Sandoval^{3*}, L.A. Reyes Nava⁴, D.N. Sánchez Cruz³, C. Cortez Ramírez⁵, L.E. Iñiguez-Muñoz⁴.

¹Licenciatura en Agrobiotecnología, Centro Universitario del Sur, Av. Enrique Arreola Silva 883, Col. Centro, C.P. 49000, Ciudad Guzmán, Jalisco, México.

²Licenciatura en Ingeniería en Sistemas Biológicos, Centro Universitario del Sur, Av. Enrique Arreola Silva 883, Col. Centro, C.P. 49000, Ciudad Guzmán, Jalisco, México.

³Departamento de Ciencias Computacionales e Innovación Tecnológica, Centro Universitario del Sur, Av. Enrique Arreola Silva 883, Col. Centro, C.P. 49000, Ciudad Guzmán, Jalisco, México.

⁴Departamento de Ciencias de la Naturaleza, Centro Universitario del Sur, Av. Enrique Arreola Silva 883, Col. Centro, C.P. 49000, Ciudad Guzmán, Jalisco, México.

⁵Departamento de Química, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Blvd. Gral. Marcelino García Barragán 1421, Col. Olímpica, C.P. 44430, Guadalajara, Jalisco, México.

*jorge.pliego@cusur.udg.mx

Resumen



La contaminación en suelos agrícolas causada por el uso de fertilizantes nitrogenados es un tema que ha tomado mayor relevancia en los últimos años, ya que su aplicación puede aumentar la emisión de óxido nitroso. El uso de enzimas quitinolíticas, ha demostrado tener un alto potencial como efecto fertilizante debido a los productos de la descomposición de la quitina, tales como el amonio y sus derivados. Por lo que, en el presente trabajo se han buscado

microorganismos productores de quitinasas para ser utilizadas en suelos agrícolas. Se realizaron pruebas bioquímicas en 15 hongos filamentosos utilizando púrpura de bromocresol como un indicador de pH y quitina coloidal como inductor de la enzima, obteniendo 7 hongos con actividad enzimática quitinasa, de los cuales, la cepa A4-VC-I-I mostró un índice de potencia con un valor de 5.12 respectivamente. Siendo esta una alternativa para reducir el consumo de fertilizantes nitrogenados inorgánicos

Palabras clave: Fertilizantes nitrogenados, contaminación, residuos agroindustriales, hongos filamentosos, quitinasas.

Introducción

En los últimos años, el sector agrícola mexicano ha crecido, tan solo a finales del 2019 el valor de producción superó los 675.000 millones de pesos mexicanos (1). Así pues, Jalisco es el estado número uno en la producción agrícola, aportando 13.6% del volumen de la producción nacional (2). Los principales sistemas productivos agrícolas en el Estado de Jalisco emplean grandes cantidades de agroquímicos como son fertilizantes, herbicidas y plaguicidas, que provocan un gran impacto ambiental en el suelo, agua y biodiversidad (3). Con respecto al uso de fertilizantes nitrogenados, sobresale el efecto contaminante tanto en el agua como en la atmósfera. Por ello, la industria agroalimentaria requiere fertilizantes que sean eficientes y amigables con el medio ambiente.

La aplicación excesiva de fertilizantes o el uso ineficiente de los principales nutrientes en los fertilizantes son los principales contribuyentes a los problemas ambientales vinculados a la agricultura. Estos nutrientes son una fuente de contaminación difusa. El N en exceso también puede perderse en la atmósfera a través de las emisiones de gases de efecto invernadero. El uso excesivo de fertilizantes puede llevar a la salinidad

del suelo, a la acumulación de metales pesados, a la eutrofización del agua y a la acumulación de nitrato, los cuales pueden ser una fuente de contaminación ambiental y una amenaza para la salud humana (4).

Las enzimas quitinolíticas han demostrado tener un alto potencial biotecnológico, debido a las diversas aplicaciones que tienen. Dentro de sus usos en agricultura destaca su aplicación como biocontrolador de hongos fitopatógenos, promotor de crecimiento de microorganismos antagonistas, estímulo de crecimiento de micorrizas y como efecto fertilizante. La importancia de estas enzimas como efecto fertilizante se debe a los productos de la descomposición de la quitina, tales como amonio y sus derivados, estos pueden constituir una fuente lenta pero sostenible de nitrógeno, teniendo una duración de hasta de tres meses (5).

Por tal motivo en el presente trabajo de investigación se realizaron pruebas bioquímicas con púrpura de bromocresol y quitina coloidal, para determinar enzimas quitinolíticas en hongos filamentosos obtenidos en investigaciones previas.

METODOLOGÍA

Materiales

Se utilizaron cajas petri desechables, quitina coloidal, púrpura de bromocresol, Sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$, fosfato de potasio (KH_2PO_4) , ácido cítrico monohidratado, agar, Tween 80.

Reactivación de las cepas

Las cepas seleccionadas se encontraban en conservación en tubos Eppendorf a una temperatura de $-20C$. Para su reactivación se

tomaron 5 l de la muestra y se sembraron en medio PDA. Las cajas fueron puestas en incubación a $35^{\circ}C$ durante 72 horas. Posteriormente se colocaron en refrigeración a una temperatura de $4^{\circ}C$ para su conservación.

Determinación cualitativa de actividad quitinasa

La actividad enzimática se determinó en medio sólido utilizando púrpura de bromocresol como inductor de pH. El medio se preparó con las siguientes concentraciones $0.3g/L$ de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,

3.0 g/L de (NH₄)₂SO₄, 2.0 g/L de KH₂PO₄, 1.0 g/L de ácido cítrico monohidratado, 15 g/L de agar, 200 µl de Tween 80, 4.5 g/L de quitina coloidal y 0.15 g/L de púrpura de bromocresol, se ajustó el pH a 4.7 utilizando hidróxido de sodio. Las cajas sembradas se dejaron en incubación a 30 C por 72 horas. La actividad enzimática se determinó ante la presencia de halo de color púrpura.

Posteriormente las cepas fueron clasificadas de acuerdo a su índice de potencia (IP), para esto se utilizó el software ImageJ, para medir el área del halo de la actividad y el área de la colonia, aplicando posteriormente la fórmula propuesta por de la Rosa-Hernández, et al. (6), la cual establece lo siguiente:

$$I.P = \frac{(\text{área del halo de actividad})}{(\text{halo de la colonia})}$$

Resultados y discusión

Se determinó actividad enzimática quitinasa en 7 hongos filamentosos utilizando la metodología de García-Espejo (7). La cual se midió mediante un cambio de coloración en el medio pasando de una tonalidad amarilla brillante a un purpura, este cambio de coloración se debe a la degradación de la quitina en la N-acetilglucosamina.

En la tabla 1 se muestra un comparativo de la actividad enzimática de las cepas. Donde podemos observar que 4 cepas presentaron una actividad alta, 1 cepa presento actividad media, 2 cepas presentaron actividad baja y 8 cepas no presentaron actividad.

Tabla 1.- Presencia de actividad quitinasa en púrpura de bromocresol, en donde “+++” representa una actividad alta, “++” una actividad media, “+” una actividad baja y “-” una actividad nula.

ACTIVIDAD QUITINASA			
+++	++	+	-
HACA	A4-VC-I-I	A7-II	AI-2-1-1
HQ=II		CI.AI	JD
AM-2-2-1-1			CCC2
CI.AII			A4-A2-1-1.1
			AM-C-I-I-I
			CSC
			A2-1-1-1
			AM-C-1-1-1.2

En la figura 1A se muestra la cepa HACA, en la figura 2B la cepa A4-VC-I-I y en la figura 2C la cepa CI.AII, cepas positivas a actividad quitinasa en púrpura de bromocresol donde se puede observar

un cambio de coloración en el medio. En la figura 1D se muestra la cepa CCC2 cepa negativa donde no se muestra un cambio de coloración.

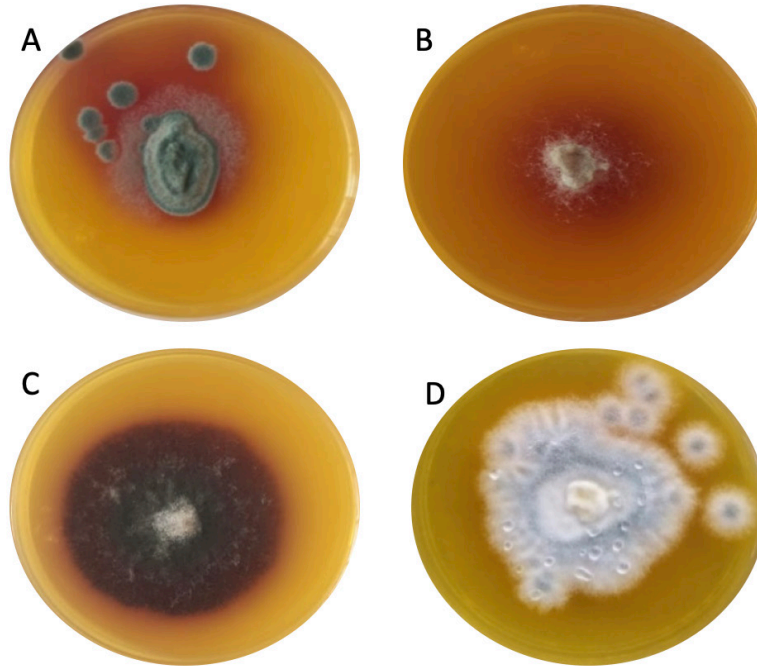
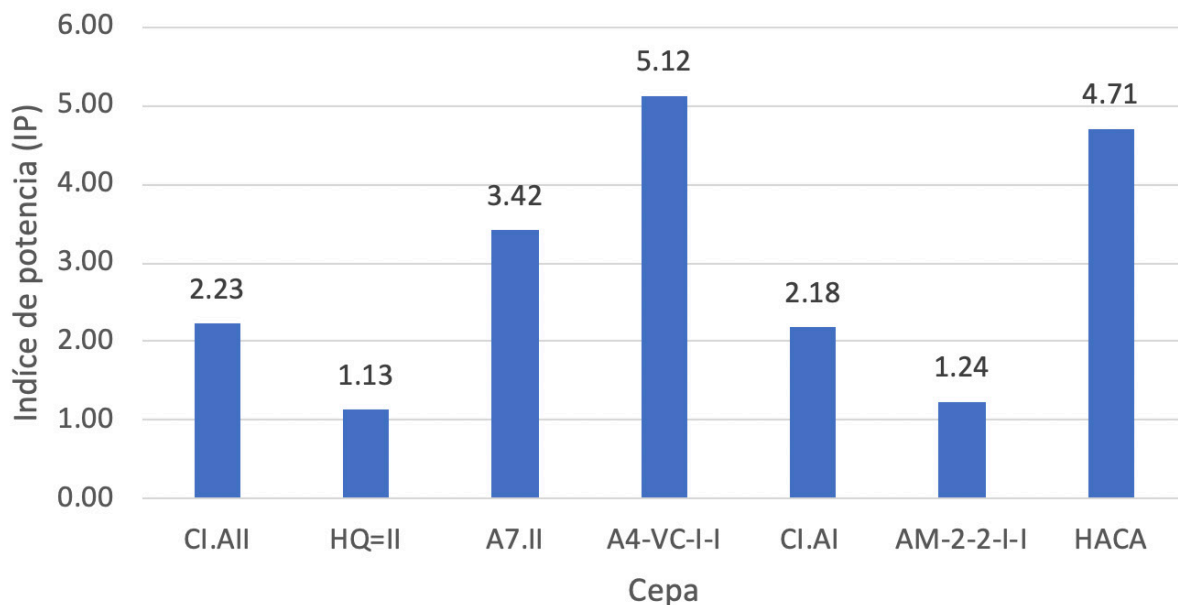


Figura 1.- Pruebas bioquímicas de actividad quitinasa.

Posteriormente se midieron las áreas de las cepas y de su actividad presentada. Una vez obtenidos estos datos se pudo conocer su IP y así compa-

rar la actividad enzimática de cada una. Los datos del IP presentado por las 7 cepas con actividad se muestran en la gráfica 1.

Determinación por IP.



Gráfica 1. Se muestran las medidas del Índice de Potencia (I.P) de los hongos de control positivo para elegir la cepa favorable para obtener los extractos enzimáticos a partir de FMS.

Una vez comparadas las cepas, se puede observar que la cepa que presentó una mayor actividad quitinasa de acuerdo con su IP es la cepa A4-VC-I-I con un valor de 5.12.

En relación con el presente trabajo de investigación, Cabrera et al. (8) determinó actividad quitinasa en bacterias del género *Bacillus*, utilizando un medio sólido complementado con quitina coloidal como inductor de la enzima, evaluando el porcentaje de inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos, aplicándolas como un control biológico, proponiendo una alternativa para el uso de agroquímicos. En comparación con este trabajo de investigación se determinó activi-

dad quitinasa en hongos filamentosos utilizando quitina coloidal como inductor de la enzima, creando así una alternativa para la reducción de agroquímicos, principalmente de fertilizantes nitrogenados.

Por otra parte, García-Espejo (7) determinó actividad quitinolítica en *Trichoderma inhamatum*, utilizando púrpura de bromocresol y quitina coloidal. En este trabajo de investigación se mostró que existe actividad quitinasa en hongos filamentosos utilizando la metodología antes mencionada, evidenciando un cambio de coloración en el medio en relación con el crecimiento y la esporulación de las cepas.

Conclusiones

Se lograron obtener 7 cepas productoras de quitinasas para su aplicación en suelos agrícolas, siendo la cepa A4-VC-I-I la que obtuvo el mayor IP con un valor de 5.12. En una segunda etapa se determinará cuantitativamente la producción

de la enzima en fermentación en medio sólido, utilizando como soportes residuos de origen agrícola, para así evaluar su potencial como efecto fertilizante.

Referencias

1. Statista. El sector agrícola en México [Internet]. 2020 [cited 2021 Jun 21]. Disponible en: <https://es.statista.com/temas/7029/el-sector-agricola-en-mexico/>
2. SADER. Jalisco urge a revertir la contaminación por agroquímicos [Internet]. 2020. Disponible en: <https://sader.jalisco.gob.mx/prensa/noticia/2997>
3. SEMADET, SADER. Estrategia del estado de jalisco para la integración de la biodiversidad en los sectores agropecuario, pesquero-acuícola y forestal. 2020.
4. Rodríguez N, MacLaughlin M, Pennock D. La contaminación del suelo: una realidad oculta. 2019. 144 p.
5. Lárez C, Rojas M, Chirinos A, Rojas L. Nuevos retos en agricultura para los biopolímeros de quitina y quitosano. Parte 1: efectos beneficiosos para los cultivos. Revista Iberoamericana de Polímeros y Materiales. 2019;20(3):118–36.
6. de la Rosa-Hernández MC, Mercado-Flores Y, Evangelista-Martínez Z, Arana-Cuenca A. Estudio de la actividad enzimática extracelular en cepas de actinomicetos aisladas del parque nacional el Chico. 2008;1(1):2008.
7. García-Espejo N, Mamani-Mamani M, Chávez-Lizárraga G, Álvarez-Aliaga M. Evaluación de la actividad enzimática del *Trichoderma inhamatum* (BOL-12 QD) como posible biocontrolador. Selva Andin Reserch Soc. 2016;7(1):20–32.
8. Cabra Cendales T, Rodriguez C, Villota Cuásquer C. Capacidad antagónica y quitinolítica de microorganismos aislados de residuos de higuera (*ricinus communis*). Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 2014;12(1):56–61.

MODELAMIENTO DE LA BIOSORCIÓN DE CONTAMINANTES EN EL AGUA CON *SPIRULINA MÁXIMA* COMERCIAL

J.E. Hernández Leos, N.V. Pérez Aguilar, M.I.L. Gallegos García

Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Ingeniería Química, Saltillo, Coahuila, Mexico.

jleos@uadec.edu.mx, nancyperez@uadec.edu.mx, mirenegallegos21@uadec.edu.mx

Resumen

La contaminación del agua por colorantes y metales pesados es uno de los problemas más importantes que perjudican al medio ambiente y el desarrollo de los ecosistemas. Para resolver esta situación se han hecho estudios de métodos de remoción de estas sustancias con biosorbentes de diferente tipo, uno de ellos es la microalga *Spirulina maxima*, la cual se produce y maneja de manera sencilla, por su crecimiento en ambientes que pueden contener contaminantes y además es de bajo costo, tiene buena capacidad de biosorción de sustancias tóxicas, por lo cual son una excelente alternativa para aplicarlos con este objetivo.

En este estudio se presenta el uso de *Spirulina máxima* en la remoción del colorante rojo congo y el ión plomo de manera simultánea, y los datos experimentales se analizaron con los modelos de isotermas de Langmuir, Freundlich, Prausnitz-Radke y Sips. Las isotermas de biosorción de plomo y del rojo congo, tuvieron mejor ajuste con el modelo de Sips, el factor de correlación R^2 fue 0.91 y 0.94, respectivamente. La isoterma de cada contaminante mostró principalmente el efecto de antagonismo, el cual fue más pronunciado en bajas concentraciones de plomo y del colorante RC.

Palabras clave: *Spirulina máxima*, biosorción, modelamiento, contaminantes del agua, microalgas

Introducción



En la actualidad existen distintos problemas de contaminación ambiental, es de interés particular la contaminación del agua causada por la descarga de efluentes originados en industrias que utilizan colorantes y/o metales pesados en sus procesos (Gómez García, 2016), ya que, al no ser biodegradables, éstos son bioacumulados por los organismos vivos causando impactos negativos por su toxicidad. Con frecuencia, la carga de estos contaminantes en los efluentes industriales ha superado los límites de concentración máxima permitida (LMP), por lo que sus efectos se han multiplicado rápidamente debido al notable crecimiento de la industria en

años recientes. Es frecuente identificar en aguas residuales de diferentes localidades la presencia de tintes como azul de metileno (MB), rojo Congo (RC), anaranjado de metilo (MO) y también de metales pesados como Cu^{2+} , Cr^{3+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , As^{3+} , Pb^{2+} . Recientemente, se han reportado nuevos estudios acerca de materiales adsorbentes que se utilizan con el propósito de remover contaminantes del agua que se encuentran en bajas concentraciones, por ejemplo, los adsorbentes con base en materiales biológicos se han llamado biosorbentes. Estos materiales son considerados de bajo costo y con mejor selectividad (Al-Ghouti, 2010), por ejemplo, las microalgas presentan varias ventajas sobre otros adsorbentes (Wang, 2020). La mayoría

de los estudios acerca del desarrollo de materiales adsorbentes se enfocan en evaluar la capacidad del material para remover un solo contaminante en solución acuosa, ya sea un metal pesado o un colorante, pero son pocos los que han investigado cómo ocurre el proceso de eliminación cuando dos tipos de contaminantes están presentes en soluciones bicomponente. En este trabajo se evalúa la *Spirulina maxima* como biosorbente, debido a que varios estudios han revelado que

su composición química favorece la remoción de contaminantes en aguas residuales (Ahmad, 2010). Además, se presenta el análisis de los datos experimentales de la biosorción con los modelos de isotermas de Langmuir, Freundlich, Prausnitz-Radke y Sips. En los casos analizados en soluciones bicomponentes, se observó principalmente el efecto de antagonismo tanto para el Pb como para el colorante RC.

METODOLOGÍA

Las soluciones madre de Pb (II) y RC se prepararon a partir de las sales de grado reactivo analítico, nitrato de plomo y rojo congo, respectivamente, disueltas con agua desionizada, a partir de estas soluciones se realizaron diluciones para obtener soluciones con concentraciones desde 0.01 hasta 1 mM. Para determinar la concentración de cada contaminante en solución se prepararon las curvas de calibración adecuadas y se midieron con el equipo adecuado para cada analito, en el caso del ión de Pb se utilizó un electrodo de ión selectivo para plomo, ISE-Pb y para el RC un espectrofotómetro UV-Vis utilizando la longitud de onda de 500 nm. Con las soluciones individuales de cada contaminante, se prepararon mezclas binarias, de manera que la concentración inicial, C_0 , de Pb y de RC en estas soluciones estuvo entre 0.05 hasta 0.5 mM. Posteriormente, se utilizaron viales de vidrio para colocar una masa inicial de la microalga *Spirulina máxima* en contacto con un volumen de las soluciones binarias, manteniendo la relación de masa y volumen en $m/V=1$ mg/

mL. Estos ensayos se ajustaron para que su pH inicial fuera 5 y se colocaron en una incubadora con agitación orbital a temperatura constante de 25°C, manteniendo en agitación por 24 h. Al terminar, las soluciones de los viales se filtraron para posteriormente medir la concentración en el equilibrio, C_e , de Pb y de RC. Con los datos experimentales de la concentración al inicio y en el equilibrio de cada contaminante, así como la masa del biosorbente y el volumen de la solución, se determinó la masa de cada contaminante que quedó retenida sobre la superficie la microalga al llegar al equilibrio, q_e .

El modelamiento de los datos de la biosorción de Pb y de RC se realizó con los modelos de las isotermas de Langmuir, de Freundlich, de Prausnitz-Radke y de Sips, para identificar aquél que describiera mejor la tendencia de los datos experimentales, utilizando como criterio el porcentaje de desviación entre los datos experimentales y los calculados con cada uno de los modelos.

Resultados y discusión

La biomasa de la microalga *Spirulina maxima* removió Pb y RC en solución, en la Figura 1 se presenta una micrografía de este biosorbente después de haber estado en contacto con el ión Pb, en ella se observaron algunas partículas

brillantes del metal depositadas sobre la pared de la biomasa, lo que confirmó que este contaminante quedó retenido sobre las estructuras externas e internas de la microalga.

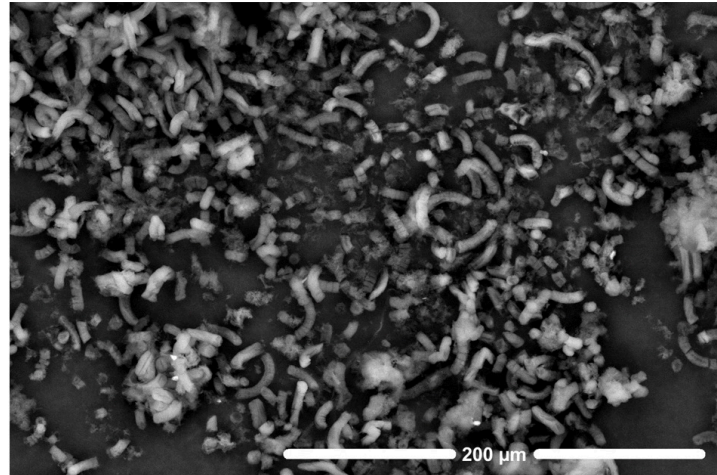


Figura 1. Micrografía observada por microscopía electrónica de barrido, SEM, para una muestra de *Spirulina maxima* después de haber estado en contacto con plomo en solución acuosa a pH 5 y 25°C.

Efectos sinérgicos

Los datos experimentales de las isothermas de biosorción se analizaron con los modelos de isothermas de Langmuir, de Freundlich, de Prausnitz-Radke y de SIPS. Debe mencionarse que solo se presentan los datos de la isoterma de SIPS, ya que este modelo representó con mejor ajuste a los datos del laboratorio, reportando un valor para R2 de 0.91 y 0.94, para Pb y RC, respectivamente. En la Figura 1 se muestran las isothermas de adsorción de soluciones bicomponentes conteniendo Pb y RC, los datos experimentales se analizaron para cada adsorbato, éstos se representaron con figuras de círculos para el Pb o cuadros para RC, y las líneas continua y segmentada representan las isothermas modeladas con la ecuación de SIPS.

Al analizar el comportamiento de los datos, se puede sugerir que la presencia de los dos contaminantes en la solución da lugar a dos efectos en función de la concentración. Cuando los dos contaminantes se encuentran en concentración menor que 0.3 mM, la biomasa retiene una cantidad mayor del colorante RC en comparación con el Pb, este efecto representa una competencia de los adsorbatos por los sitios activos en los que pueden quedar retenidos por algún mecanismo, este efecto se conoce como antagónico. Cuando la concentración de cada contaminante es mayor

que 0.3 mM, se observó que la masa retenida de Pb sobre la microalga fue cerca de 10% menor que la de RC, en este caso el efecto antagónico fue considerablemente menor, aun así, es probable que el gradiente de concentración del ión Pb y el tamaño de este ión, que es mucho menor que el de la molécula del RC, determinen que otros mecanismos como la formación de enlaces covalentes con las proteínas de la pared de la microalga, favorezcan la retención del Pb.

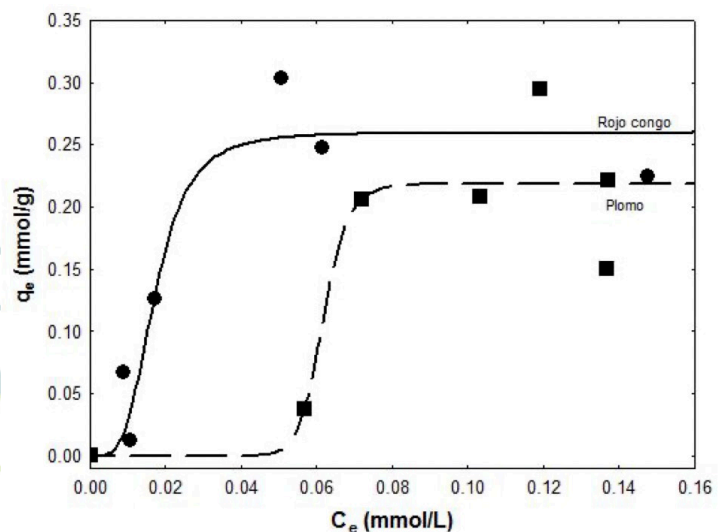


Figura 2. Isothermas de Adsorción de Rojo Congo (círculos) y de Plomo (cuadros), a pH 5 y 25°C, las líneas representan la tendencia de los datos modelados con la ecuación de SIPS.

Conclusión

Los efectos de biosorción que se observan para el plomo y el colorante rojo Congo fueron principalmente de antagonismo, éste efecto es más pronunciado cuando la concentración de cada especie en solución es menor que 0.3mM, y puede estar determinado por el gradiente de

concentración y el tamaño del ión Pb con respecto al de la molécula del RC. Las isotermas de adsorción de plomo y del rojo Congo son representadas con menor desviación cuando se utiliza el modelo de SIPS.

Referencias

- Ahmad, A., Ghufran, R., & Wahid, Z. A. (2010). Cd, As, Cu, and Zn transfer through dry to rehydrated biomass of *Spirulina platensis* from wastewater. *Polish Journal of Environmental Studies*, 19(5), 887-893.
- Al-Ghouti, M. A., Li, J., Salamh, Y., Al-Laqtah, N., Walker, G., & Ahmad, M. N. (2010). Adsorption mechanisms of removing heavy metals and dyes from aqueous solution using date pits solid adsorbent. *Journal of hazardous materials*, 176(1-3), 510-520.
- Gómez García, M. T. (2016). Adsorción en Continuo del Colorante AB25 y el Metal Cadmio en Soluciones Binarias sobre Carbon Modificado. *CONCIENCIA TECNOLÓGICA*, Julio-Diciembre (52), 35-41.
- Lebron, Y. (2019). Remediation of methylene blue from aqueous solution by *Chlorella pyrenoidosa* and *Spirulina maxima* biosorption: Equilibrium, kinetics, thermodynamics and optimization studies. *Journal of Environment Chemical Engineering*, 6(5), 6680-6690.
- Segovia Sandoval, S. J. (2019). Simultaneous removal of metronidazole and Pb(II) from aqueous solution onto bifunctional activated carbons. Springer, Springer Nature.
- Wang, J., Huang, J., Xu, M., Li, Z., Fan, L., Chen, R., ... & Shen, L. (2020). A composite FeOOH@ microalgae for heavy metals and Congo red removal from aqueous solution. *DESALINATION AND WATER TREATMENT*, 191, 263-284.

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD LACASA EN HONGOS FILAMENTOSOS PARA SU USO COMO DEGRADADORES DE CLOROFENOLES

G. Sánchez Tejeda¹, J.E. Pliego Sandoval^{2*}, L.A. Reyes Nava³, L.E. Iñiguez Muñoz³, O. Hernández Rodríguez⁴

¹Estudiante de la Licenciatura en Ingeniería en Sistemas Biológicos, Centro Universitario del Sur, Universidad de Guadalajara, Av. Enrique Arreola Silva No. 883, Colón, Ciudad Guzmán Centro, C.P. 49000, Ciudad Guzmán, México.

^{2*} Departamento de Ciencias Computacionales e Innovación Tecnológica, Centro Universitario del Sur, Av. Enrique Arreola Silva 883, Col Centro, C.P. 49000, Ciudad Guzmán Jalisco, México.

³ Departamento de Ciencias de la Naturaleza, Centro Universitario del Sur, Av. Enrique Arreola Silva 883, Col Centro, C.P. 49000, Ciudad Guzmán Jalisco, México.

⁴ Universidad Tecnológica de México (UNITEC), Campus Toluca. Av. Paseo Tollocan 701, Delegación Sta. Ana Tlaxpaltitlán, 50160 Toluca de Lerdo, México.

*jorge.pliego@cusur.udg.mx

Resumen



La contaminación es un tema que ha tomado mayor relevancia en los últimos años, debido a que se encuentra en constante aumento como resultado de las diferentes actividades humanas, agrícolas e industriales. Una de las soluciones a dicha problemática es la biorremediación, que tiene por objetivo implementar sistemas biológicos para eliminar o disminuir contaminantes. Por lo que, en el presente trabajo se han buscado microorganismos

productores de enzimas oxidativas, específicamente lacasas, para ser utilizadas en la degradación de compuestos orgánicos presentes en las aguas residuales, en donde se aislaron 21 hongos de la corteza de árboles y una vez aplicada la metodología a base de 2,2'azino- bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS) se obtuvieron 6 hongos con actividad enzimática lacasa, de los cuales, la cepa F presentó mayor índice de potencial con un valor de 5.76.

Palabras clave: *Biorremediación, hongos filamentosos, enzimas, lacasa, contaminantes orgánicos, fermentación en medio sólido*

Introducción

La contaminación es la incorporación de un agente extraño o contaminante a un ambiente natural, de modo que una vez dentro del entorno puede ser causa de alteraciones en el ecosistema, medio físico o ser vivo; en su mayoría la contaminación es el resultado de la actividad humana, y puede ser desde una sustancia química hasta el sonido

o luz que sobrepase los niveles normales del ecosistema específico (1). En Jalisco la principal causa de contaminación del agua se debe a la descarga de aguas residuales sin tratar, y como segunda fuente los basureros, rellenos sanitarios, subproductos agropecuarios, etc. En las zonas rurales de Jalisco se han incrementado los cultivos

fertilizados a un ritmo de 20,000 hectáreas anuales (2). Representando un problema para la salud ya que de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud aproximadamente 2,000 millones de personas suelen abastecerse de fuentes de agua altamente contaminadas, por lo que implementar procesos biotecnológicos como la biorremediación podría mejorar considerablemente la calidad del agua(3).

La biorremediación se define como un proceso natural para eliminar o reducir contaminantes en el medio ambiente, haciendo uso de organismos o productos de los mismos (4). Existen diferentes tipos de biorremediación microbiana, en específico, la enzimática destaca por la mínima generación de subproductos tóxicos al desecharlos vía in situ por microorganismos endógenos; así como el control en el crecimiento del microorganismo y, por ende, la producción de la enzima de interés. Las enzimas se caracterizan por ser altamente específicas, y su producción se puede llevar a gran escala para obtener una mayor actividad y estabilidad (5).

Una de las enzimas más empleadas en el tratamiento de aguas residuales son las lacasas por su capacidad de degradar compuestos fenólicos y no fenólicos, entre los que destacan los plaguicidas clorofenólicos, al ser los más utilizados en el sector agrícola y que pueden llegar por lixiviación proveniente de suelos de uso agrario que se encuentran cercanos a los cuerpos acuíferos(6). Por tal motivo se propone utilizar hongos filamentosos como medio de obtención enzimática, ya que son buenos candidatos para la descomposición de compuestos orgánicos y en la producción de enzimas (7).

Las enzimas son proteínas y actúan como catalizadores biológicos, es decir, permiten acelerar o disminuir la velocidad de una reacción química, éstas actúan sobre diferentes sustratos (reactivos) y dan lugar a un gran número de reacciones. Estos biocatalizadores se clasifican en 6 grandes grupos:

oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas (8), en donde, con su nombre se puede deducir el tipo de reacción que catalizan, por ejemplo, las oxidorreductasas, encargadas de la transferencia de electrones y dentro de las cuales se puede encontrar enzimas como la lignina. La lignina es un polímero vegetal que se deriva de los alcoholes hidroxicinamílicos. Las ligninasas o enzimas modificadoras de lignina son producidas por hongos y bacterias encargadas de la degradación de la lignina, misma que se puede clasificar de dos maneras, ya sea las peroxidasas de hemo o las lacasas (9).

La fermentación en medio sólido (FMS) es uno de los procesos más convenientes para la industria como método de obtención de enzimas, ya que los mismos microorganismos son excelentes fuentes biológicas para la producción de enzimas al producirse fácilmente a gran escala, metabólicamente vigorosas y de fácil manipulación (10). Para la FMS es necesario crear un ambiente óptimo que les permita a los microorganismos crecer sobre una superficie sólida que sea total o parcialmente ausente de la presencia de agua, el sustrato empleado deberá presentar la humedad necesaria para el crecimiento del microorganismo, de modo que pueda desarrollarse en un entorno adecuado (11).

El uso de microorganismos como los hongos filamentosos productores de enzimas oxidativas tiene como objetivo la aceleración de reacciones de oxidorreducción (12), para que de esta manera se puedan degradar los componentes que se encuentran en lagos, lagunas y cuencas, esperando obtener una buena alternativa para disminuir la presencia de contaminantes en agua.

Por lo cual, en el presente trabajo aislaron microorganismos de la corteza de diferentes árboles productores de lacasas para su posterior aplicación en biorremediación de aguas contaminadas principalmente con plaguicidas de tipo clorofenólicos.

METODOLOGÍA

Materiales

Tubos de ensayo, Tween 80, agar papa dextrosa (PDA), cajas de Petri desechables de 60 x 15 milímetros, antibiótico, asa bacteriológica, frascos de vidrio de 4 ml, glicerina, tubos eppendorf de 1.5 ml, extracto de levadura peptona dextrosa (YPD), matraces de 250 ml, gasas estériles, vaso de precipitado estériles, barra magnética de agitación, 2,2'azino- bis (3-etilbenzo-tiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS), glucosa, fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄), sulfato de magnesio (MgSO₄), agar, extracto de levadura, sulfato de amonio (NH₄SO₄).

Toma de muestras

Se tomaron cinco muestras de hongos de la corteza de diferentes árboles ubicados en el municipio de Gómez Farias, Jalisco, se eligieron por interés visual cinco muestras presentes en la corteza de árboles y se colocaron en cinco tubos de ensayo diferentes.

Aislamiento de microorganismos

Para obtener los hongos se utilizó PDA colocando aproximadamente 13 ml de medio de cultivo en cada caja de petri. Para evitar la contaminación bacteriana se agregó amoxicilina de 500 mg para 260 ml de PDA, permaneciendo en incubación durante 5 días a una temperatura de 30°C. Realizando resiembra hasta obtener microorganismos puros, de los cuales se seleccionaron los hongos que presentaron características macroscópicas de crecimiento filamentosos y pudrición blanca.

Conservación de los hongos

La conservación se realizó en tubos con medio inclinado y microtubos, debido al tiempo de conservación de cada metodología, ya que el medio inclinado es un método de conservación a un año máximo y en microtubos un tiempo

máximo de diez años. Para medio inclinado se necesitaron frascos de 4 ml, en donde se colocó un aproximado de 3-3.5 ml de PDA en cada uno. Se sembró el hongo realizando un estriado y se colocaron los frascos en una incubadora marca Genie Temp-shaker 100, a 30°C durante cinco días, una vez obtenidas las cepas se adicionó glicerol al 50% v/v. Por último, se colocaron los tubos en refrigeración a 4°C para ser utilizados en estudios posteriores.

Para la conservación en microtubos se realizaron 10 alícuotas de cada muestra para garantizar su resguardo. Primeramente, se preparó medio PDA en matraces y una vez gelificado se sembró el hongo, permaneciendo bajo las mismas condiciones de incubación. Concluido el tiempo de crecimiento se preparó YPD + Tween 80 al 0.05% v/v. Se adicionaron 25 ml de YPD + Tween 80 a cada matraz, posteriormente se arrojó una barra magnética de agitación en condiciones estériles para obtener el máximo de esporas presentes en un agitador magnético de calefacción marca AREC, se filtró el medio en condiciones estériles. Seguidamente con ayuda de una micropipeta de 1 ml se agregaron 500 µl de glicerol estéril al 50 % v/v en Eppendorf de 1.5 ml previamente esterilizados. Los microtubos se colocaron en bolsas de papel Kraft y permaneciendo en refrigeración a 4°C durante un día, para después almacenarlas en ultracongelación a -20° C para su conservación.

Determinación cualitativa de actividad lacasa

El medio para indicar presencia de lacasas se preparó de acuerdo a lo propuesto por Montoya, et al. (13), el cual contenía glucosa (10 g/L), KH₂PO₄ (2 g/L), MgSO₄ (0.5 g/L), Agar (22 g/L), extracto de levadura (0.2 g/L), NH₄SO₄ (0.5 g/L) y ABTS (0.2 g/L). Se ajustó el pH del medio a 5.5 con un pHmetro Ohaus® STARTER 2100. El hongo sembrado permaneció en una incubadora marca Genie Temp-

Shaker 100, con una agitación de 100 revoluciones por minuto (rpm) a 30°C, durante 4-5 días. La determinación cualitativa de la actividad lacasa se obtuvo mediante el índice de potencia (IP). Para esto se utilizó el software ImageJ, para medir el área del halo de la actividad y el área de la colonia, aplicando posteriormente la fórmula propuesta

por de la Rosa-Hernández, et al. (14), la cual establece lo siguiente:

$$IP = \frac{(\text{área del halo de actividad})}{(\text{halo de la colonia})}$$

Resultado y discusión

La lignina es el segundo polímero más abundante que se encuentra en un porcentaje del 20 al 30% en la madera(15), al ser ésta su fuente natural, en donde un grupo reducido de microorganismos son los encargados de degradar lignina, entre ellos los hongos de pudrición blanca. Por lo que,

dicho lo anterior se buscaron hongos presentes en la corteza de árboles y una vez obtenidas las muestras (Figura 1), se aislaron 21 hongos a los cuales se les realizaron las respectivas pruebas de determinación enzimática lacasa.

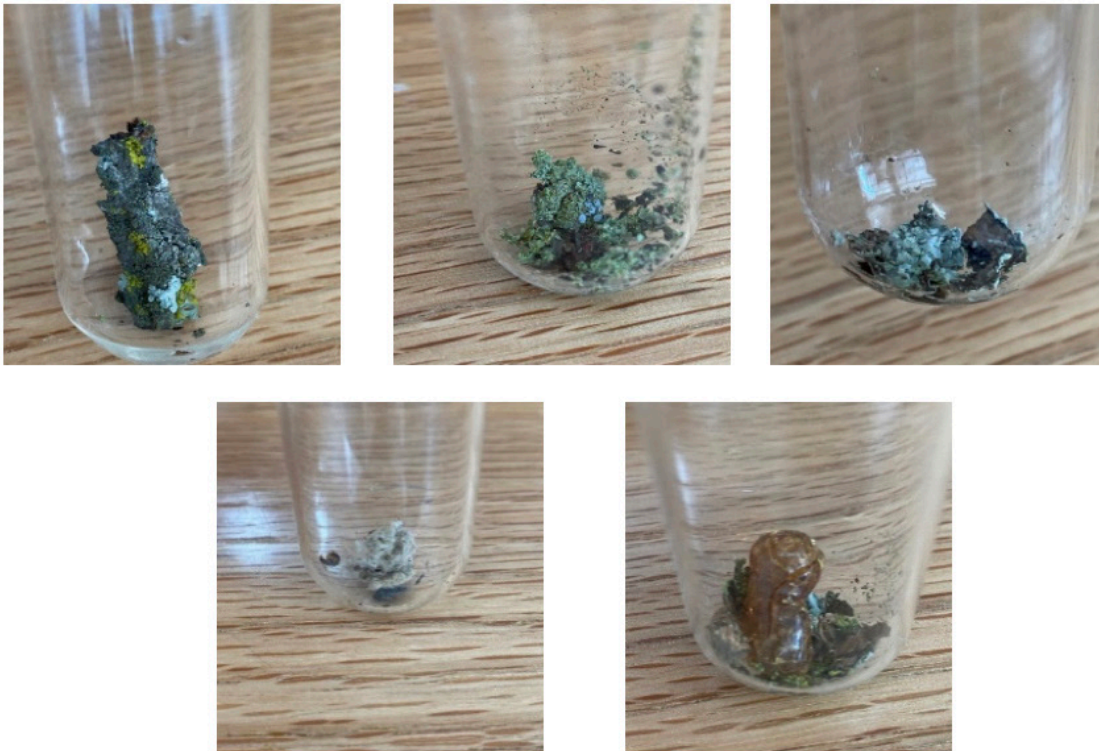


Figura 1. Muestras obtenidas de la corteza de árboles

La figura que se muestra a continuación corresponde a los 6 controles positivos de actividad lacasa. Todas las cepas fueron observadas con un

estereoscopio LeicaZoom 2000 para observar el crecimiento a detalle.

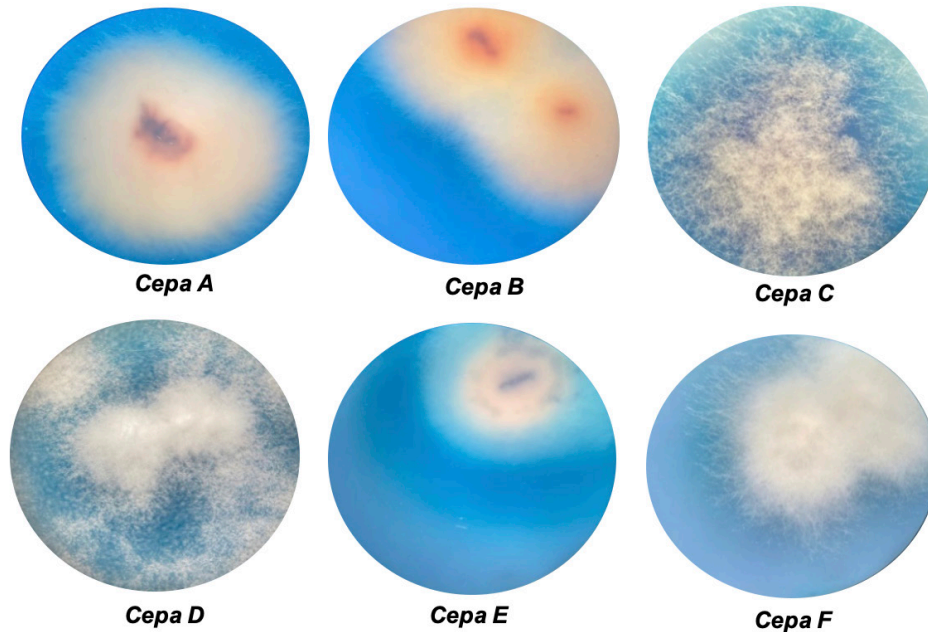


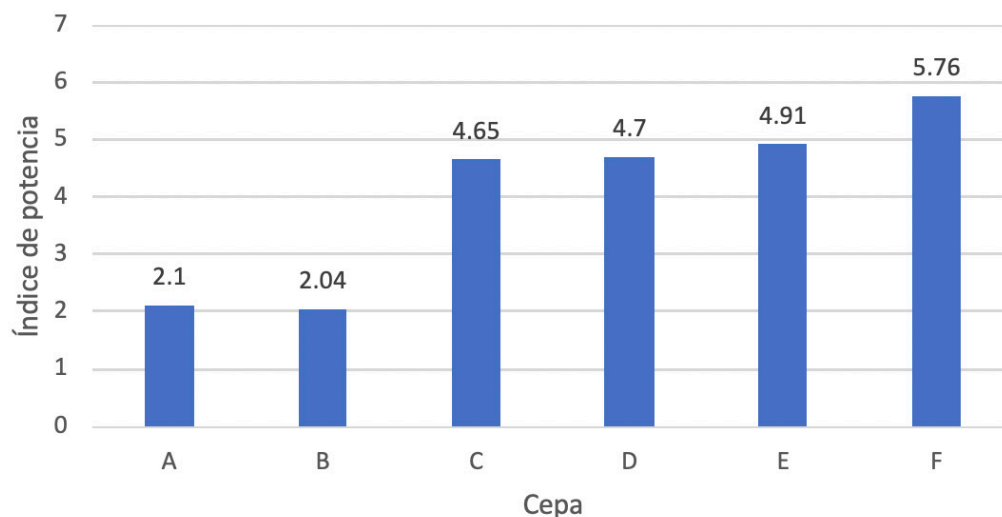
Figura 2. Cepas de los 6 hongos positivos a actividad lacasa, vistas en estereoscopio LeicaZoom 2000 para prueba bioquímica de lacasas.

De los 21 hongos aislados, 6 de ellos presentaron actividad enzimática lacasa (Fig.2), de acuerdo al método propuesto por Solís (16), al sembrar los microorganismos en un medio que contenía ABTS se observó un halo color azul / verdoso, que indica una reacción de oxidación con el cobre tipo 1 de las lacasas, y que según lo propuesto por Castillejos

(17) se confirma que presentan oxidación de compuestos orgánicos.

Una vez obtenidas las áreas tanto del halo como de la colonia por el software de ImageJ se obtuvieron los datos necesarios para conocer los IP de las cepas de la Figura 2. Dichas medidas se muestran en la gráfica 1.

Índice de Potencia



Gráfica 1. Se muestran las medidas del Índice de Potencia (IP) (eje Y) de las cepas (eje X) que corresponden a un control positivo a actividad lacasa.

Una vez comparadas las cepas de acuerdo a su IP, tal como se muestra en la gráfica 1, se puede observar que la cepa que presentó un mayor IP

es la cepa F con un índice de 5.76, seguida de las cepas E, D, C, A y B.

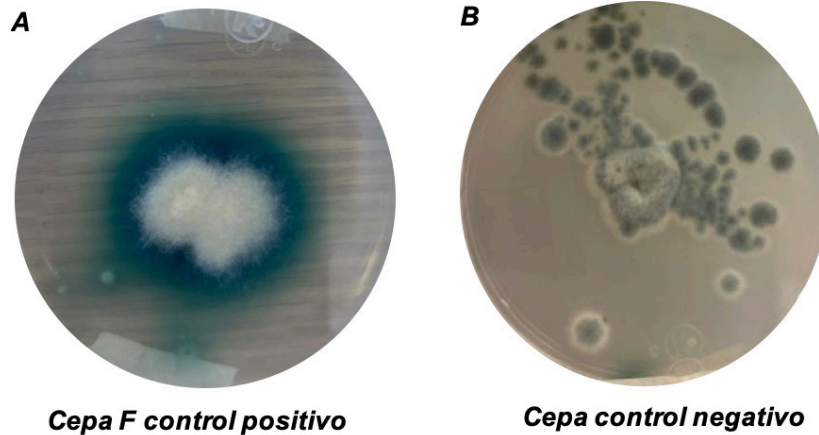


Figura 3. En la Figura 3A la Cepa F control positivo de enzima lacasa en donde se observa un halo azul/verdoso, mientras que la Figura 3B se muestra una cepa como control negativo sin actividad lacasa.

En la figura 3A se puede observar la cepa F como un control positivo a actividad lacasa debido a la presencia de un halo azul/verdoso en el perímetro del hongo, mismo que presentó pudrición blanca y un crecimiento filamentoso, y en la figura 3B una cepa negativa, el cual es un hongo polvoso y de color verde, no se observa presencia de halo.

Chan Cupul, et. al (18) evaluó la actividad lignolítica en hongos del género macromicetos, mostrando la oxidación del ABTS, sin embargo, la cantidad de lacasas que se producen a partir de hongos como el género ya mencionado o basidiomicetos suele ser mínima, por lo que autores como Elisashvili, et al. (19) definen que los nutrientes como la glucosa y el nitrógeno, además de iones metálicos

como el cobre en los medios de cultivo mejorará la producción de lacasas; ya que obtener una cepa con una alta producción enzimática puede emplearse como tratamiento en aguas residuales, de acuerdo a estudios como el de Atilano (20), en donde se confirma la degradación de compuestos orgánicos, entre ellos, fenoles a partir de lacasas obtenidas de hongos de pudrición blanca, al ser los más selectivos en la degradación de lignina. Aunado a lo anterior y a estudios anteriores se sugiere una determinación cuantitativa a partir de FMS, empleando sulfato de cobre como inductor de lacasas, tal como lo propone Gutiérrez (21) y bagazo de caña y agave como soportes (22), esto con la finalidad de conocer cuál es la cepa con mayor actividad enzimática.

Conclusiones

Se lograron aislar 21 microorganismos de la corteza de diferentes árboles, de los cuales 6 son productores de lacasas para su aplicación en biorremediación de aguas contaminadas, siendo la cepa F la que obtuvo el mayor IP con un valor de 5.76, relacionando así la actividad lacasa y el índice de potencial para disminuir clorofenoles.

Posterior a este estudio se realizarán pruebas confirmativas de generación de enzimas lacasas por fermentación en medio sólido. Con lo anterior, la producción de metabolitos de interés industrial, como las enzimas, entre ellas las lacasas pueden ser la solución a la degradación de clorofenoles presentes en aguas residuales.

Referencias

1. Boudreau D, McDaniel M, Sprout E, Turgeon A. *pollution* | National Geographic Society [Internet]. 2011 [cited 2021 May 18]. Disponible en: <https://www.nationalgeographic.org/encyclopedia/pollution/>
2. Sistema Intermunicipal de los Servicios de Agua Potable y Alcantarillado. *Agua y reservas hidrológicas* [Internet]. 2013. Disponible en: https://siapa.gob.mx/sites/default/files/entorno_y_vida_sustentable.pdf
3. World Health Organization. *Agua* [Internet]. 2019 [cited 2021 Apr 17]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>
4. Quintella C, Mata A, Lima L. Overview of bioremediation with technology assessment and emphasis on fungal bioremediation of oil contaminated soils. *J Environ Manage* [Internet]. 2019;241:156–66. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.019>
5. Alarcón D. *Diseño de nanopartículas de quitosano con actividad peroxidasa para la degradación de contaminantes*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California; 2017.
6. Raymundo-Raymundo E, Prado-Pano B, Nikolskii-Gavrilov I, Mendoza-Hernández J. Sorción, degradación y lixiviación de imazapyr en un suelo volcánico de México. *Tecnol y Ciencias del Agua*. 2011;2(3):61–75.
7. Moore D, Ahmadjian V, Constantino J. *Fungus - Importance of fungi* [Internet]. Enciclopedia Británica. 2020 [cited 2021 Jun 27]. Disponible en: <https://www.britannica.com/science/fungus/Importance-of-fungi>
8. Rogers K. *Enzyme*. In: *Encyclopaedia Britannica* [Internet]. 2019 [cited 2021 Feb 3]. p. 1–5. Disponible en: <https://www.britannica.com/science/enzyme>
9. Gunjal A, Patil N, Shinde S. *Enzymes in Degradation of the Lignocellulosic Wastes*. Springer,. 2020. 55–70 p.
10. Illanes A. *Enzyme production*. In: *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. 2008. p. 57–61.
11. Pliego J. *Sistema de monitoreo de temperatura y respirometría aplicado a fermentación de medio sólido en un reactor tipo columna*. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco; 2011.
12. Cabrera R. *Efecto de la poda de vid sobre los parámetros de crecimiento y producción de enzimas lignolíticas de Lentinula edodes* [Internet]. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo; 2010. Disponible en: <https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/280/1/CABRERA-RUIZ-R10.pdf>
13. Montoya S, Sánchez Ó, Levin L. *Evaluación de actividades endoglucanasa, exoglucanasa, lacasa y lignina peroxidasa en diez hongos de pudrición blanca*. Scielo. 2014;12(2):115–24.
14. de la Rosa-Hernández M, Mercado-Flores Y, Evageliista-Martínez Z, Arana-Cuenca A. *Estudio de la actividad enzimática extracelular en cepas de actinomicetos aisladas del parque nacional El Chico* [Internet]. Vol. 1. Pachuca; 2008. Disponible en: <https://smbb.mx/congresos/smbb/queretaro11/TRABAJOS/trabajos/II/carteles/CI-19.pdf>

15. Quintero JC, Feijoo G, Lema JM. Production of Ligninolytic Enzymes From Basidiomycete Fungi on Lignocellulosic Materials. *Vitae*. 2006;13(2):61–7.
16. Solís M, Bárzana E, García-Garibay M, Viniegra-González G. El ABTS agente oxidante de diversos compuestos químicos y su mecanismo de reacción entre la lacasa y el sustrato. *Rev Mex Ing Química*. 2006;6(3):275–81.
17. Castillejos S. Producción de lacasa a partir de hongos ligninolíticos utilizando vinazas y bagazo de origen mezcalero [Internet]. Universidad Tecnológica de la Mixteca; 2015. Disponible en: http://jupiter.utm.mx/~tesis_dig/12566.pdf
18. Chan Cupul W, Patricia G, Abarca H, Vázquez RR. Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática ligninolítica de macromicetos del estado de Veracruz, México. *Rev Int Contam Ambie*. 2016;32(3):339–51.
19. Elisashvili V, Torok T, Kachlishvili E, Khardziani T, Metreveli E, Kobakhidzea A, et al. Evaluation and regulation of the lignocellulolytic activity of novel white-rot basidiomycetes. *Glob J Biochem*. 2011;2(2):134–41.
20. Atilano M. Producción de enzimas lignolíticas en un reactor airlift y evaluación de su uso en el tratamiento de aguas azules [Internet]. Universidad Autónoma de Nuevo León; 2017. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/16499/1/1080289803.pdf>
21. Gutierrez J. Purificación y Caracterización Parcial de las Lacasas de *Trametes maxima* CU1 y su Aplicación en la Degradación de Colorantes Textiles [Internet]. Universidad Autónoma de Nuevo León; 2009. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/1962/1/1080179419.pdf>
22. Cabrera M. Producción de lacasa de *Pleurotus ostreatus* utilizando los residuos de *Agave tequilana* Weber como sustrato [Internet]. Instituto Politécnico Nacional; 2011. Disponible en: [https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/8856/1/Tesis Maria Luisa Cabrera Soto.pdf](https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/8856/1/Tesis%20Maria%20Luisa%20Cabrera%20Soto.pdf)

DETERMINACIÓN DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS EN HONGOS AISLADOS DE CÁSCARA DE CAMARÓN Y AGUACATE

J.M. Rodríguez Ruíz¹, J.D. Rentería Osorio¹, J.E. Pliego Sandoval^{2*}, L.E. Iñiguez Muñoz³, L.A. Reyes Nava³

¹Centro Universitario del Sur, Av. Enrique Arreola Silva, Col. Centro, C.P. 49000, Ciudad Guzmán, Jalisco, México.

²Departamento de Ciencias Computacionales e Innovación Tecnológica, Centro Universitario del Sur, Av. Enrique Arreola Silva, Col. Centro, C.P. 49000, Ciudad Guzmán, Jalisco, México.

³Departamento de Ciencias de la Naturaleza, Centro Universitario del Sur, Col. Centro, C.P. 49000, Ciudad Guzmán, Jalisco, México.

*jorge.pliego@cusur.udg.mx

Resumen



En México se generan cerca de 76 millones de toneladas de residuos orgánicos provenientes de la agroindustria. Los productos que mayor cantidad de desechos producen son el aguacate y el camarón, ya que por cada millón de toneladas cosechadas de aguacate el 45% se convierte en desecho y del 48 al 60% del peso de camarón corresponde una fracción no comestible. Dentro de los componentes de estos residuos podemos encontrar altas concentraciones de ácidos grasos y quitina, inductores de

microorganismos productores de enzimas hidrolíticas, entre las que destacan las lipasas. Por lo que, en el presente trabajo se han aislado microorganismos de residuos agroindustriales productores de enzimas hidrolíticas. Se obtuvieron 25 hongos, 20 hongos provenientes de residuos de aguacate y 5 hongos de residuos de camarón. Se realizaron pruebas bioquímicas utilizando Rodamina B para determinar actividad enzimática lipasa cualitativa encontrando 22 hongos con presencia de actividad hidrolítica lipasa.

Palabras clave: Residuos agroindustriales, ácidos grasos, enzimas hidrolíticas, Rodamina B

Introducción

Los residuos agroindustriales son materiales en estado sólido o líquido que se generan a partir del consumo directo de productos primarios o de su industrialización, y que en su mayoría ya no son de utilidad para generar otro producto con valor económico, de interés comercial o social (1). Entre los productos que mayor cantidad de desechos generan encontramos el aguacate y el camarón, dichos productos son considerados de importancia socioeconómica, siendo el aguacate el cultivo con mayor producción en México generando grandes

ingresos y empleos en toda la cadena comercial (2), mientras que el camarón es el crustáceo más importante debido a su amplia distribución a nivel mundial y su uso en diversos platillos. Sin embargo, por cada millón de toneladas cosechadas de aguacate el 45% se convierte en desecho (3) y del 48% al 60% del peso de camarón corresponde a la fracción no comestible (4).

En la composición química de estos productos podemos encontrar altas concentraciones de

ácidos grasos y de quitina en el caso del camarón por lo que existe la posibilidad de obtener microorganismos productores de enzimas hidrolíticas. Una gran variedad de microorganismos secreta estas enzimas durante su crecimiento en residuos orgánicos y agroindustriales, ya que éstos contienen una abundante fuente de nutrientes que sirve como medio de cultivo para que los microorganismos sean capaces de generarlas (5).

En esta investigación se busca la obtención de hongos, microorganismos que naturalmente crecen en soportes sólidos y tienen diversas aplicaciones y son buenos candidatos para la descomposición de compuestos orgánicos y en la producción de enzimas (6). Las enzimas, como catalizadores biológicos, poseen una serie de características altamente importantes, debido a que tienen una elevada especificidad, trabajan en condiciones suaves, son fácilmente accesibles y no alteran el medio ambiente. En muchos casos, los procesos enzimáticos han demostrado ser muy competitivos y eficaces a gran escala (7).

Las hidrolasas son el grupo de enzimas más conocido, existiendo más de 200 hidrolasas que catalizan reacciones que rompen diferentes tipos de enlaces y además juegan un papel muy

importante en la descomposición de la materia orgánica tanto de origen vegetal como animal. Dentro de estas enzimas sobresalen las lipasas que son capaces de hidrolizar triglicéridos a ácidos grasos libres de cadena corta o larga (8). Se aplican principalmente en biorremediación de aguas contaminadas, desdoblado sustancias químicas indeseables como grasas, aceites y otros sustratos presentes en aguas residuales, dándole lugar a sustancias más simples de degradar por otros microorganismos (9).

La contaminación por dichos productos lipídicos se ha tornado un tema de suma importancia, ya que los efectos provocados por las grasas y aceites provenientes de la industria se deben principalmente a que por ser menos densos que el agua, se extienden sobre la superficie, creando películas que alteran los procesos biológicos de las aguas (10).

Por lo que en este trabajo de investigación, se busca aislar hongos que sean productores de lipasas a partir de residuos agroindustriales como la cáscara de camarón y aguacate, realizando pruebas bioquímicas con Rodamina B y aceite de oliva para determinar actividad enzimática.

METODOLOGÍA

Materiales

Se utilizaron cajas Petri, frascos de vidrio de 4 ml y 500 ml, agar papa dextrosa (PDA), glicerol, aceite de oliva, Rodamina B, peptona de caseína, extracto de levadura, cloruro de sodio (NaCl), agar-Bacto.

Obtención de los microorganismos

Las cáscaras de aguacate y camarón fueron colocadas en un frasco de vidrio durante 5 semanas, las cuales permanecieron en reposo con la finalidad de iniciar el proceso de degradación y

el crecimiento de organismos. Posteriormente se tomaron dos muestras, una de camarón y otra de aguacate, se sembraron en cajas Petri con medio PDA y se dejaron en incubación a 35°C durante 72 horas. Posteriormente se seleccionaron las cepas de acuerdo con su característica macroscópica tomando las que presentaron crecimiento fúngico. Dichas cepas fueron resembradas en medio PDA e incubadas bajo las mismas condiciones.

Conservación en medio inclinado

Para la conservación de las cepas se prepararon frascos estériles de 4 ml con agar PDA, se dejaron gelificar en un ángulo de 45° aproximadamente y

y se sembraron con asa bacteriológica. Se colocaron en una incubadora marca Genie Temp-shaker 100 a 35°C hasta observar crecimiento del organismo. Posteriormente se les agregó glicerol al 50 v/v y se colocaron en refrigeración a una temperatura de 4°C para su resguardo.

Determinación de actividad lipasa

La actividad lipasa se determinó mediante una modificación de la metodología de Alfonseca-Ladrón de Guevara et al. (11) utilizando aceite de oliva como única fuente de carbono y energía y Rodamina B como indicador de actividad lipasa.

Para lo cual se preparó un medio sólido que contenía aceite de oliva (2 g/L), Rodamina B (0.001 g/L), peptona de caseína (4 g/L), extracto de levadura (3 g/L), NaCl (20 g/L) y agar-Bacto (15 g/L), se ajustó el pH a 6 con un pH-metro Ohaus STARTER 2100. Se inocularon las cajas con asa bacteriológica y se colocaron en incubación a una temperatura de 35°C entre 3-4 días aproximadamente.

Para determinar la actividad, las cepas fueron expuestas a luz Ultravioleta (UV), las cuales ante la presencia de actividad enzimática mostraron halos de color anaranjado fluorescente, esto debido a la hidrólisis de los triglicéridos presentes en el aceite, obteniendo así ácidos grasos que forman un complejo con la Rodamina B.

Resultados y discusión

Se lograron aislar 25 cepas con características macroscópicas y microscópicas diferentes. De las cuales 20 cepas se obtuvieron de la cáscara de

aguacate y 5 cepas de la cáscara de camarón. Las cepas aisladas y sus características se muestran de la Ilustración 1 a la 25.

Cepa A1



Ilustración 1. Cepa A1

Crecimiento filamentoso asimétrico, con una coloración entre marrón y verde. Micelios alargados y ramificados, con gran cantidad de pseudohifas, septos rectos y alargados con esporas dentro, hifas desarrolladas, presenta ovoides septados alargados longitudinalmente. Véase ilustración 1.

Cepa A1.1



Ilustración 2. Cepa A1.1

Crecimiento filamentoso, estructuras poco alargadas, con coloración marrón oscuro, elevación embonada y margen filamentoso, hifas retráctiles, septadas y desarrolladas, septos rectos con un diámetro constante, presentando ovoides septados alargados longitudinalmente. Véase ilustración 2.

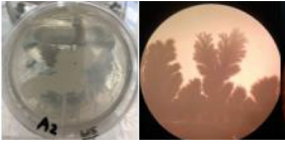
Cepa 2



Ilustración 3. Cepa A2

Crecimiento levaduriforme de color blanco, se pueden observar pequeñas vellosidades en su contorno, presenta una forma ovalada y cremosa, presenta ascas en forma de aguja con un gran número de ascosporas de forma esférica. Véase ilustración 3.

Cepa A2



Crecimiento levaduriforme de color blanco, se pueden observar pequeñas vellosidades en su contorno, presenta una forma ovalada y cremosa, presenta ascas en forma de aguja con un gran número de ascosporas de forma esférica. Véase ilustración 3.

Ilustración 3. Cepa A2

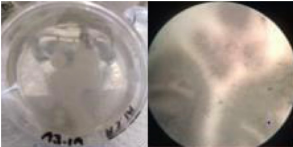
Cepa A3



Crecimiento levaduriforme de color blanco cremoso, pequeñas vellosidades en su contorno presentan formas redondas y micelio en forma de estrella, presenta ramificaciones alargadas y ascas en forma oval. Véase ilustración 4.

Ilustración 4. Cepa A3

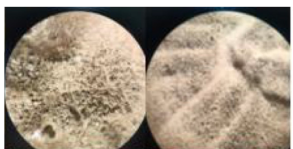
Cepa A3.1A



Crecimiento levaduriforme de color blanco cremoso, se pueden observar vellosidades en su contorno, presenta micelio en forma de agujas y estrella, se observa un gran número de ascas en forma oval y esporas esféricas y ovals. Véase ilustración 5.

Ilustración 5. Cepa A3.1A

Cepa A3.111



Se observa una estructura ramificada, con una coloración marrón oscuro, forma filamentosa, con un micelio vegetativo y margen filamentoso. Presenta micelio alargado con hifas entrelazadas, septos gruesos y rectos, y conidios en forma oval. Véase ilustración 6.

Ilustración 6. Cepa A3.111

Cepa A3.111R



Crecimiento filamentoso, estructura ramificada, con una coloración roja y micelio blanco, alargado sin tabiques con hifas entrelazadas, septos gruesos y delgados, en sus hifas presenta varias clamidosporas. Véase ilustración 7.

Ilustración 7. Cepa A3.111R

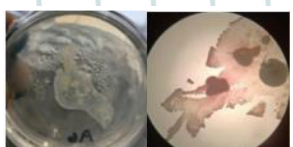
Cepa A5



Presenta un color blanco cremoso de forma levaduriforme, formación de colonias y se pueden observar vellosidades en todo el contorno, presenta micelio en forma de bastones y alargados, tiene un gran número de ascas en forma oval alargadas y esféricas con esporas en su interior. Véase ilustración 8.

Ilustración 8. Cepa A5

Cepa A6



Crecimiento levaduriforme de color blanco-transparente donde se observan pequeñas colonias redondas en su contorno con una forma ovalada y cremosa, presenta ascas en forma de aguja con ascosporas de forma esférica. Véase ilustración 9.

Ilustración 9. Cepa A6

Cepa A7

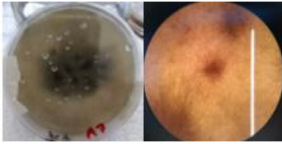


Ilustración 10. Cepa A7

Se expone un micelio vegetativo entrecruzado y de color verde-marrón, con un gran número de esporas muy distinguibles dentro de las hifas, las hifas son largas sin presentar constricciones ni tabiques, con macroconidias ovoides no septadas. Véase ilustración 10.

Cepa A7.1



Ilustración 11. Cepa A7.1

Se logra observar estructuras alargadas, con una coloración marrón oscuro, forma filamentosas, con una elevación embonada y margen filamentosos con color más claro. Hifas septadas bien desarrolladas presentando ovoides septados alargados longitudinalmente. Véase ilustración 11.

Cepa A9

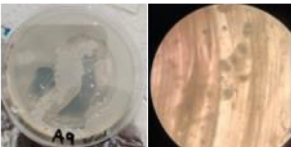


Ilustración 12. Cepa A9

Crecimiento levaduriforme de color blanco-transparente cremoso induciendo la formación de colonias, presenta ascas en forma oval y esféricas con esporas en su interior. Véase ilustración 12.

Cepa A9.1

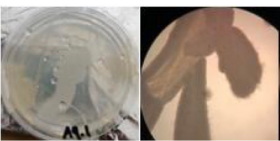


Ilustración 13. Cepa A9.1

Crecimiento levaduriforme de color blanco cremoso, se pueden observar pequeñas vellosidades en todo el contorno, presentando formas redondas, ascas en forma oval y esféricas conectadas. Véase ilustración 13.

Cepa A11

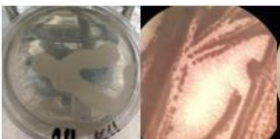


Ilustración 14. Cepa A11

Crecimiento levaduriforme de color blanco cremoso, se pueden observar vellosidades en su contorno, presenta micelio en forma de agujas y estrella, ascas en forma oval y esféricas conectadas entre sí formando una estructura bien definida. Véase ilustración 14.

Cepa A11.1



Ilustración 15. Cepa A11.1

Crecimiento levaduriforme de color blanco cremoso, presenta la formación de colonias y vellosidades en su contorno, presenta micelio en forma de bastones alargados, con ascas en forma oval alargadas con esporas en su interior. Véase ilustración 15.

Cepa C

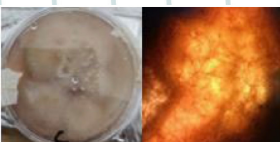


Ilustración 16. Cepa C

Crecimiento filamentoso de color marrón, se observa un micelio vegetativo entrecruzado alargado con hifas entrelazadas y con esporas en su interior, hifas alargadas sin constricciones ni tabiques, presentando macroconidias en forma de ovoides no septadas. Véase ilustración 16.

Cepa C1t

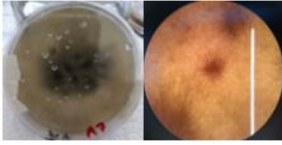


Ilustración 17. Cepa C1

Crecimiento levaduriforme de color blanco cremoso, se pueden observar vellosidades en el contorno, presenta micelio ramificado, con ascas en forma oval y esporas esféricas. Véase ilustración 17.

Cepa C1.A

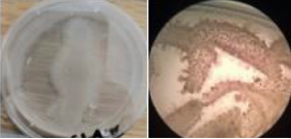


Ilustración 18. Cepa C1.A

Crecimiento levaduriforme de color blanco-transparente, se observan pequeñas colonias redondas en su contorno con una forma ovalada y cremosa, ascas en forma de aguja con ascosporas en forma esférica. Véase ilustración 18.

Cepa C1.A11

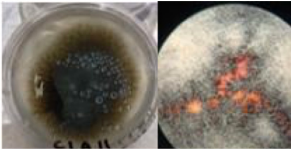


Ilustración 19. Cepa C1.A11

Crecimiento filamentoso con una coloración verde-marrón oscuro, estructuras alargadas, presenta micelio con hifas retráctiles, septos rectos y con un diámetro constante, hifas septadas bien desarrolladas alargadas longitudinalmente con esporas en su interior. Véase ilustración 19.

Cepa CSC



Ilustración 20. Cepa CSC

Crecimiento filamentoso, estructuras con una combinación de color entre verde y marrón, hifas alargadas y algunas septadas, ascas en forma oval conectadas con un gran número de esporas. Véase ilustración 20.

Cepa D3R



Ilustración 21. Cepa D3R

Estructuras con una combinación de colores, entre verde, naranja y rojo, con unas divisiones muy visibles en su estructura, formando anillos, pseudomicelio un poco polvoso sin septos muy distinguibles, con divisiones marcadas por constricciones, hifas alargadas y entrecruzadas con presencia de clamidosporas. Véase ilustración 21.

Cepa DIII

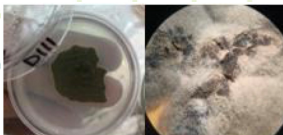


Ilustración 21. Cepa DIII

Crecimiento filamentoso, estructura ramificada con una coloración verde oscuro, micelio vegetativo de color gris verdoso, alargado con hifas entrelazadas, septos gruesos y rectos, conidios en forma ovoidal y esporas dentro. Véase ilustración 22.

Cepa HB



Ilustración 22. Cepa HB

Crecimiento filamentoso de color blanco, micelio vegetativo entrecruzado alargado, con hifas entrelazadas y esporas en su interior. Véase ilustración 23.

Cepa IA

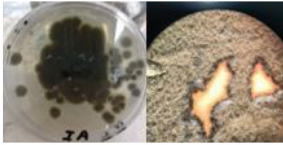


Ilustración 23. Cepa IA

Crecimiento filamentosos con una coloración verde/marrón, micelio vegetativo verdoso y amarillo en su contorno, alargado con hifas entrelazadas, septos gruesos y rectos sin tabiques, con un gran número de conidios en forma ovoidal y esporas dentro. Véase ilustración 24.

Cepa JD



Ilustración 24. Cepa JD

Crecimiento filamentosos con una coloración marrón oscuro, elevación embonada y margen con color más claro, hifas sin septos distinguibles y sin constricciones, entrelazadas y con conidios en forma oval y alargadas. Véase ilustración 25.

La actividad lipasa se determinó ante la presencia de halos fluorescentes vistos bajo luz UV. En la tabla 1 se muestran las cepas aisladas y la actividad enzimática presentada. Donde podemos observar

que 7 cepas presentaron una actividad alta, 10 cepas presentaron actividad media, 5 cepas presentaron actividad baja y 3 cepas no presentaron actividad.

ACTIVIDAD DE LAS CEPAS

+++	++	+	-
CSC	DIII	A2	A1.1
JD	A1	A3	D3R
C	A6	A3.IA	A11.1
A7.I	A3III	A5	
A3. IIIR	A7	A11	
CI.AII	A9		
HB	A9.1		
	C1.A		
	C1		
	IA		

Tabla 1.- Presencia de actividad lipasa de las cepas aisladas en Rodamina B, en donde “+++” representa una actividad alta, “++” una actividad media, “+” una actividad baja y “-” una actividad nula.

En la figura 2A se muestra la cepa CI.AII positiva a actividad lipasa vista en luz UV donde se puede observar la presencia de halos fluorescentes

alrededor del hongo, y en la figura 2B se muestra la cepa D3R sin presencia de halos fluorescentes.

Alfonseca-Ladrón de Guevara y Serrat-Díaz (11) aislaron cepas fúngica productoras de actividad lipasa asociadas a sitios contaminados con

residuos del procesamiento de aceites vegetales. Aislaron 40 cepas capaces de crecer en

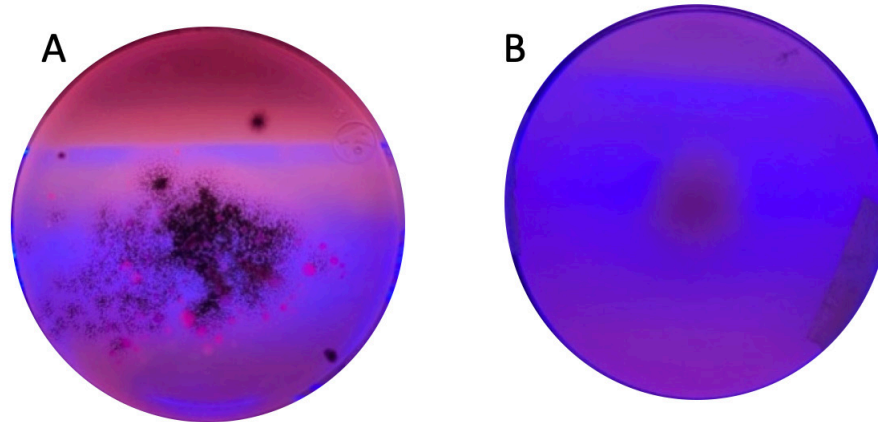


Ilustración 26. Pruebas bioquímicas de actividad lipasa. En la figura (A) se muestra una cepa positiva a actividad lipasa y en la figura (B) se muestra una cepa negativa donde no se observa presencia de halos.

aceite de soya como única fuente de carbono y energía. En comparación con esta investigación se aislaron 25 cepas fúngicas de residuos agroindustriales, capaces de crecer en medio con aceite de oliva como fuente de carbono y energía, presentando 22 cepas productoras de actividad enzimática lipasa.

De las enzimas hidrolíticas encontradas en residuos de camarón se encuentra la investigación

de Sirvas et al.(12) basada en residuos de langostinos, familia muy cercana a los camarones por lo que comparten muchas características entre sí, demostrando que las bacterias y enzimas microbianas son biocatalizadores y pueden ser usadas como alternativa en los procesos químicos industriales. Con respecto al aislamiento en esta investigación se obtuvieron 5 cepas de la cáscara de camarón.

Conclusiones

Se lograron aislar 25 cepas de la cáscara de camarón y aguacate, de las cuales 22 cepas presentaron actividad enzimática lacasa, siendo las cepas CSC, JD, C, A7.I, A3. IIIR, CI.All, HB las mejores

candidatas para su aplicación en biorremediación de aguas contaminadas con potencial para disminuir la presencia de grasas y aceites. En una segunda etapa se determinará cuantitativamente la producción de la enzima en fermentación en medio sólido, utilizando como soportes residuos de origen agrícola.

Referencias

1. Saval S. Aprovechamiento de residuos agroindustriales: Pasado, presente y futuro. *Biotecnología*. 2012;16(2):14–46.
2. Álvarez E. Cultivo del Aguacate (*Persea americana* Miller). 2018;27. Disponible en: http://centa.gob.sv/docs/guias/frutales/Guia_Centa_Aguacate_2019.pdf
3. Juárez-Morán L, Ariza-Ortega J, Ramos-Cassellis M, Luna-Suárez S, Díaz-Reyes J. Analysis of biodiesel production by transesterification of crude oil from the pulp of class III avocado (*Persea Americana* Mill var. Hass, Fuerte and Creole). *Interciencia*. 2016;774–80.
4. Rosellón G, Cassandra M, Ortíz R, Daniela G, Adriana R, Daniel L. Quitosano: Evaluación económica para la producción industrial de un biopolímero. 2019;15–8.
5. Aceves Angel, Castañeda, Laura. Producción biotecnológica de lipasas microbianas, una alternativa sostenible para la utilización de residuos agroindustriales. *Vitae, Revista de la facultad Química farmaceutica*. 2012;19(3):244–7.
6. Moore D. Fungus organism [Internet]. *Enciclopedia Britanica*. 2021 [cited 2021 Jul 30]. Disponible en: <https://www.britannica.com/science/fungus/Importance-of-fungi>
7. Acebal C, de la Mata I. Biotecnología enzimática y biotransformaciones de interés industrial [Internet]. 2009. p. 7–8. Disponible en: https://www.ucm.es/data/cont/docs/1334-2017-03-04-cacebal1_BIOTECNOLOGIA_ENZIMATICA_IM.pdf
8. García-Orozco KD. Caracterización bioquímica y estructural de una enzima tipo lipasa de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) [Internet]. Universidad de Sonora; 2019. Disponible en: <http://www.repositorioinstitucional.uson.mx/handle/unison/4260>
9. Montesino AIL, Armas JC, Marrero MD, Mendoza JD, Hernández JLM, Cipro DDB, et al. Biorremediación enzimática de residuales ricos en grasas y aceites. 1999;39(2). Disponible en: https://smbb.mx/congresos_smbb/merida05/TRABAJOS/AREA_IV/OIV-21.pdf
10. Jiménez S. Estudio teórico para el control de la contaminación por grasas y aceites generada por la actividad industrial, doméstica y de servicios. [Internet]. Instituto Politécnico Nacional; 2012. Disponible en: <https://tesis.ipn.mx/jspui/bitstream/123456789/18479/1/25-1-16898.pdf>
11. Alfonseca-ladrón de Guevara A, Serrat-díaz M. Aislamiento y selección de hongos lipolíticos de materiales contaminados con desechos de aceite vegetal. *Revista Cubana de química*. 2018;30(3):362–78.
12. Sirvas S, Buleje V, Salvatierra L, Jaramillo ML. Isolation and identification of proteolytic, amylolytic, lipolytic, and chitinolytic bacteria from shrimp waste. *Revista Peruana de biología*. 2021;28(1):1–10.

USO DE DENDROGRAMAS PARA EL ANÁLISIS CUANTITATIVO DE DIFERENTES TIPOS DE TEQUILAS MEDIANTE ESPECTROSCOPIA RAMAN

M. E. Ramírez Galindo¹, J. E. Pliego Sandoval^{2*}, L. A. Reyes Nava³, A. J. López Villalvazo⁴.

¹Estudiante de la Licenciatura en Ingeniería en Sistemas Biológicos, Centro Universitario del Sur, Av. Enrique Arreola Silva 883, Col. Centro, C.P. 49000, Ciudad Guzmán Jalisco, México.

^{2*}Departamento de Ciencias Computacionales e Innovación Tecnológica, Centro Universitario del Sur, Av. Enrique Arreola Silva 883, Col. Centro, C.P. 49000, Ciudad Guzmán Jalisco, México.

³Departamento de Ciencias de la Naturaleza, Centro Universitario del Sur, Av. Enrique Arreola Silva 883, Col. Centro, C.P. 49000, Ciudad Guzmán Jalisco, México.

⁴Departamento de Ciencias Computacionales e Innovación Tecnológica, Centro Universitario del Sur, Av. Enrique Arreola Silva 883, Col. Centro, C.P. 49000, Ciudad Guzmán Jalisco, México.

*jorge.pliego@cusur.udg.mx

Eje Temático: Alimentaria.

Resumen



El alcohol adulterado es un factor de riesgo para la salud, y es que registros del año 2013 y 2015 señalan alrededor de 85, 000 muertes anuales a causa del consumo de alcohol en las Américas. Por tal motivo, en el presente estudio se utilizó la espectroscopia de Raman y CA por dendrogramas para realizar un análisis cuantitativo de las áreas bajo la curva de picos característicos de los espectros Raman proporcionados de 40 réplicas de muestras de tequila 100% agave y mixtos provenientes de diferentes empresas y marcas comerciales, con el fin de encontrar diferencias significativas y una herramienta que auxilie en la etapa de análisis y clasificación. Los resultados de los dendrogramas mostraron que existe una similitud entre los picos Raman 900 cm⁻¹ (CCO) y 1050-1150 cm⁻¹ (CO y OH). Por lo tanto, la información resultante puede ser

útil para caracterizar diferentes tipos de tequila en estudios subsecuentes.

Palabras clave: Tequila, espectroscopia Raman, dendrogramas, análisis cuantitativo.

Introducción

La ingesta de alcohol adulterado es uno de los principales factores de riesgo para la salud, y es que tan solo en el año 2013 y 2015 anualmente alrededor de 85, 000 personas murieron a causa del consumo de alcohol en el continente americano, posicionándolo como el mayor consumidor mundial (1).

Las bebidas alcohólicas conocidas como bebidas destiladas o espirituosas se producen mediante la destilación de una bebida que ha sido fermentada con antelación. La destilación se puede llevar a cabo una o varias veces pudiéndose añadir ingredientes mismos que pueden llegar a transformar el sabor conseguido del producto. Entre las principales

bebidas destiladas se encuentran: whisky, vodka, tequila, ron, ginebra, pisco, orujo, brandy y coñac (2).

Cada uno de los diferentes productos obtenidos de la destilación poseen distintos sabores y aromas. El sabor de la bebida es conferido por compuestos llamados congéneres. Diferencias mínimas en los niveles de congéneres varían entre las diversas bebidas. El principal compuesto de las bebidas destiladas en cuanto a cantidad es el etanol, en donde los congéneres se consideran como productos auxiliares de la producción natural de etanol. En las bebidas destiladas el etanol se elabora en función de los azúcares que se derivan de las materias primas empleadas en el proceso (3).

Es importante mantener un equilibrio de los compuestos que están presentes en las bebidas alcohólicas, puesto que, estos pueden afectar la calidad de dichas bebidas. Las bebidas alcohólicas se componen característicamente de compuestos volátiles. Por su parte, del tequila se destacan 300 compuestos volátiles los cuales se encuentran asociados a sus propiedades organolépticas (4).

El tequila es una bebida destilada emblemática de México, la cual comenzó su auge comercial desde la década de los noventa generando a partir de entonces importantes ingresos económicos para el país. El tequila posee altas ventas internacionales exportándose a más de 120 países (5). Entre los problemas que comprende dicha bebida y los cuales afectan en el desarrollo de su industrialización, se encuentra el proceso de transnacionalización debido a las varias alteraciones en su originalidad. En consecuencia, se tiene la problemática de las grandes demandas y exportaciones de la bebida alcohólica, obligando de cierta forma a las casas productoras de tequila a aumentar sus volúmenes de producción y a generar de ingresos económicos, poniendo en duda la calidad del tequila debido a la disminución no solo de la misma, sino también de sus propiedades sensoriales y su prestigio ante el consumidor (6). Existe un gran desafío en la autenticación de las bebidas destiladas, ya que, su composición química es compleja semejante a la de la cerveza y el vino. En cuanto al tequila, esto es debido a que incluye aromas y sabores conferidos

por la incorporación de otros compuestos.

Una de las falsificaciones más comunes en este tipo de bebidas es el incremento del contenido de metanol incumpliendo los límites permisibles por la norma NOM 006 SCFI 2012 (7). El metanol pone en riesgo la salud de los consumidores. Existen una gran variedad de factores que contribuyen en el contenido final de la bebida, uno de ellos es la especie de agave. Tanto el etanol como el metanol tienen propiedades físicas similares, la diferencia radica es que el metanol es un compuesto tóxico; por lo tanto, su contenido en bebidas está restringido. Sin embargo, es necesario realizar más estudios sobre la composición de bebidas como el tequila con el fin de verificar que los parámetros de sus especificaciones fisicoquímicas no infrinjan la norma (8).

Por esta razón, en el presente trabajo por medio del uso de espectroscopia Raman y análisis de conglomerados (CA) por dendrogramas se realizó un análisis cuantitativo de diferentes tipos de tequilas en la búsqueda de tendencias entre los datos que ayudarán a elegir la información necesaria que puede ser empleada en estudios posteriores que tengan como propósito el caracterizar y/o clasificar los distintos tipos de tequila y determinar su autenticidad y como consiguiente su calidad.

METODOLOGÍA

Materiales

Programa

Se utilizó el programa Matlab versión R2020b licencia 40979805 para el tratamiento de datos y la realización de gráficas de los espectros Raman con el fin de analizar de mejor manera los espectros en una sola figura por cada tipo de tequila en busca de picos característicos, así como para la obtención de las áreas bajo la curva.

El programa Minitab versión 18 se utilizó para realizar pruebas de normalidad de las áreas bajo la curva de los picos característicos seleccionados de los espectros Raman y para la elaboración de dendrogramas.

Métodos

Procesamiento de las muestras

Se trabajó con los espectros Raman proporcionados de 40 réplicas de marcas de tequila comerciales, de las cuales 13 marcas eran de tequilas blancos, 20 marcas de tequilas reposados y 7 marcas de tequilas extra añejos.

Resultados y discusión

Resultados

Dendrogramas

La Figura 2 muestra los dos dendrogramas resultantes del CA. En el inciso a) se observa el dendrograma de variables, las cuales se refieren a los cuatro picos Raman característicos previamente seleccionados de los espectros Raman de cada uno de los tres tipos de tequila estudiados. Este dendrograma muestra tres conglomerados en la partición final, el primero está indicado en color azul, el segundo en color tinto y el tercero en color verde. El primer conglomerado señala que hay una similitud de 97.55 entre los picos Raman 900 cm^{-1} (enlace CCO) y 1050-1150 cm^{-1} (enlace CO y OH); por lo que, se decidió elaborar un segundo dendrograma de observaciones a partir de dicha

Obtención de las áreas bajo la curva

Se seleccionaron los picos característicos y se calcularon sus respectivas áreas bajo la curva mediante el método de trapecio en Matlab.

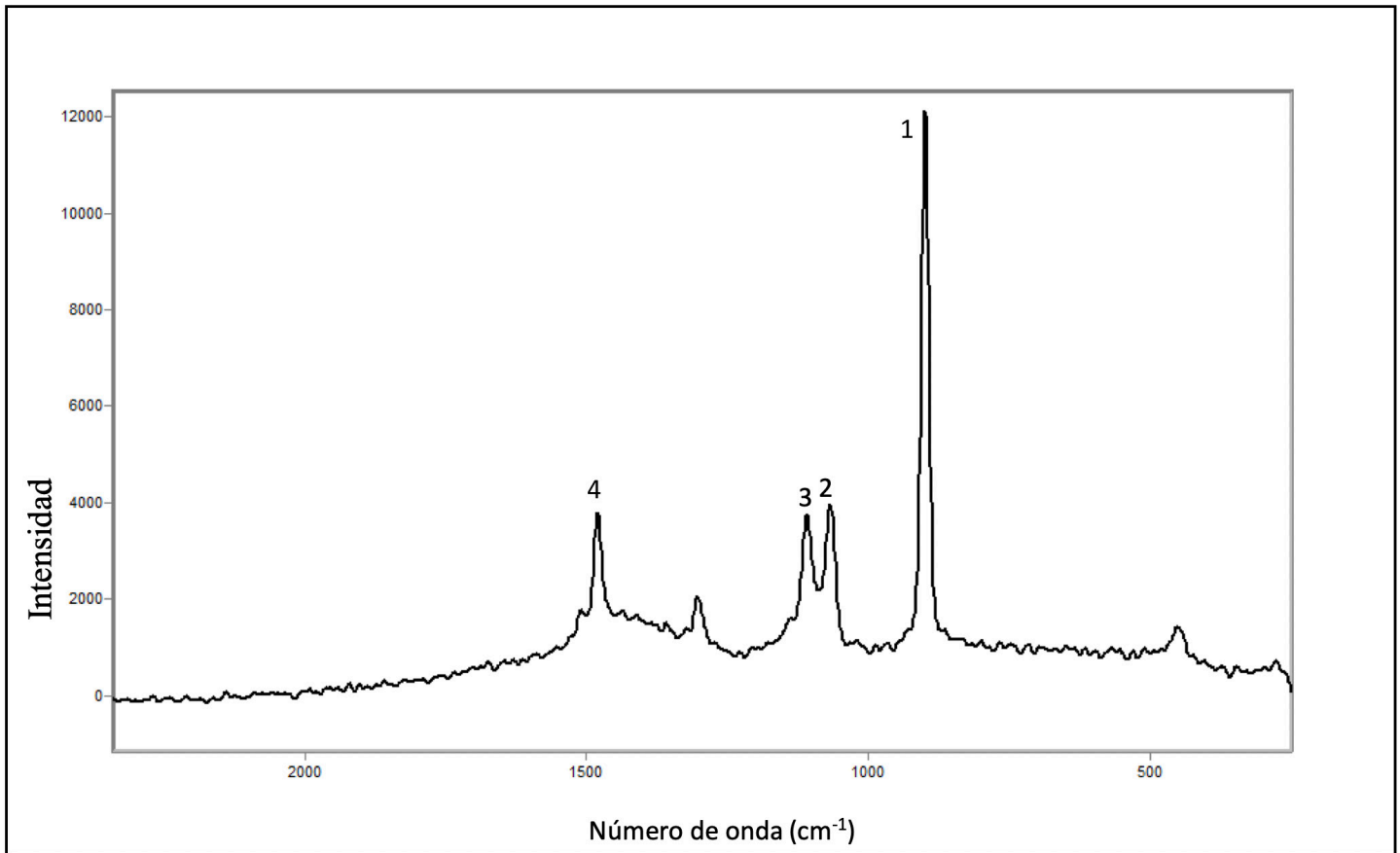
Dendrogramas

Se elaboraron dendrogramas de las áreas bajo la curva calculadas de los picos Raman característicos seleccionados, tomando como criterios de inclusión aquellos datos que presentaron una mayor diferencia significativa en los análisis de varianza simples que se llevaron a cabo previamente.

similitud entre estos picos Raman y estudiar a detalle la tendencia de los datos de las muestras de tequila.

La Figura 1 muestra un espectro Raman de un tequila comercial como ejemplo, en donde se observan cuatro picos característicos del etanol, los cuales son muy similares a los que se seleccionaron de los espectros Raman de los diferentes tipos de tequila estudiados en este trabajo; mismos que como se mencionó anteriormente, corresponden a las variables que se utilizaron para elaborar el dendrograma de variables del inciso a) de la Figura 2. El obtener el área bajo la curva de cada pico permite conocer la información que cada uno de estos contiene, puesto que las áreas son distintas para cada uno de ellos.

Figura 1 muestra un espectro Raman



En el inciso b) de la Figura 2 se observa el dendrograma de observaciones de los picos Raman característicos 900 cm^{-1} (enlace CCO) y 1050-1150 cm^{-1} (enlace CO y OH); en donde, las observaciones corresponden a las 40 áreas bajo la curva de tequilas comerciales indicadas con números que van desde el 1 hasta el 40; en donde, los números del 1 al 13 corresponden a tequilas blancos, del 14 al 33 corresponden a tequilas reposados y del 34 al 40 a tequilas extra añejos. En la partición final también se encuentran tres conglomerados y al igual que en el dendrograma a) el conglomerado uno se identifica en color azul, está compuesto por 11 tequilas de los cuales 8 corresponden a tequilas blancos (72.72%); el conglomerado dos en color tinto está compuesto por 21 tequilas de los cuales 11 corresponden a tequilas reposados (52.38%);

y el conglomerado tres en color verde está compuesto por 8 tequilas de los cuales 6 también corresponden a tequilas reposados (75%). Las similitudes de los tres conglomerados son 96.10, 88.9 y 81.89 respectivamente.

El eje vertical de ambos dendrogramas determina el nivel de similitud de los conglomerados y el eje horizontal determina las variables o las observaciones, según sea el caso.

El tipo de enlace y distancia en ambos dendrogramas se eligieron probando todas las opciones disponibles y prefiriendo aquellas que fueran más favorables para la similitud de los conglomerados.

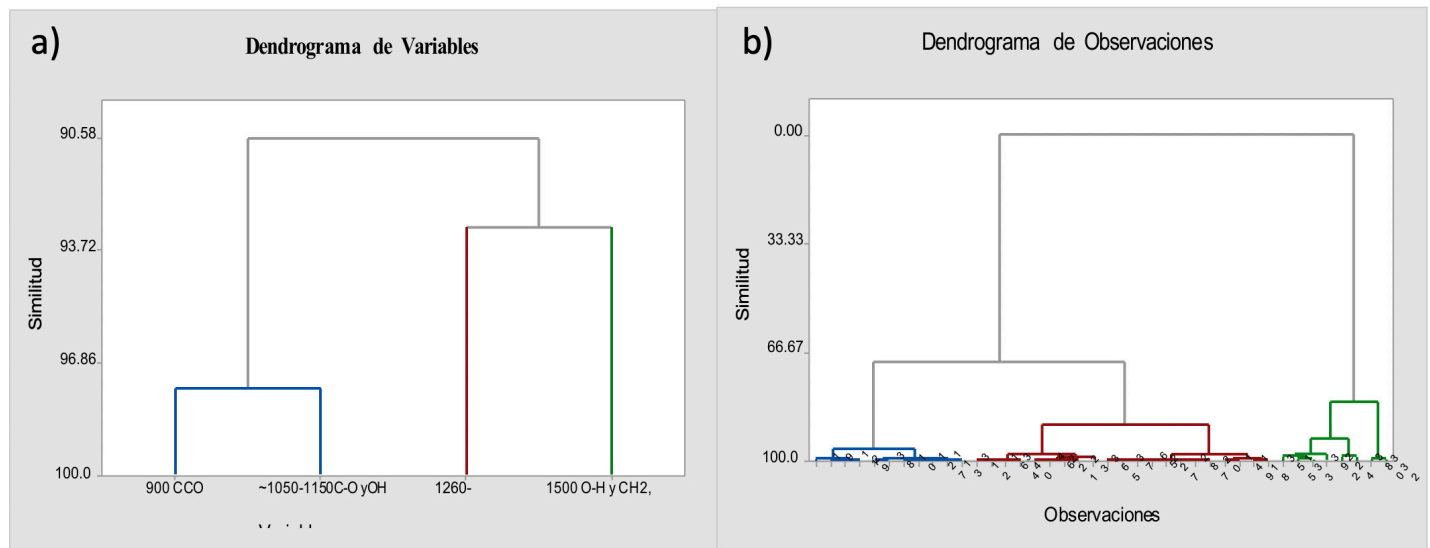


Figura 2. a) Dendrograma de los conglomerados de variables de los picos Raman 900 cm^{-1} (enlaces CCO), $1050\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$ (enlaces CO y OH), $1260\text{--}1340\text{ cm}^{-1}$ y $1470\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ (enlaces OH y CH₂). b) Dendrograma de los conglomerados de observaciones de los picos Raman 900 cm^{-1} (enlaces CCO) y $1050\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$ (enlaces CO y OH).

DISCUSIONES

En el año 2005 Frausto-Reyes et al. (9) aplicó la espectroscopia Raman y el análisis de componentes principales (PCA) para determinar cualitativamente el contenido de etanol en muestras de tequila de laboratorio y comerciales resultando ser un excelente método. Dicho estudio difiere del presente en que solo se analizaron 15 muestras de tequila del tipo blanco y añejo además de no ser multivariado, pues solo se utiliza como método estadístico PCA. Otro estudio realizado en el año 2016 por Carreon-Alvarez et al. (10) utilizó PCA, CA y análisis de varianza unidireccional por dendrogramas para analizar las propiedades fisicoquímicas (conductividad, densidad, pH, velocidad del sonido, viscosidad e índice de refracción) en marcas comerciales de tequila y determinar la autenticidad de las bebidas; resultando que PCA y CA por dendrogramas pueden empleados para dicha determinación. La diferencia radica en la utilización no solo de métodos estadísticos, sino también de análisis para saber la composición y estructura de la muestra por medio de la espectroscopia Raman, además de la búsqueda de tendencias en las variables y

las muestras por medio de CA por dendrogramas los cuales permiten reducir la mala clasificación estadística de los análisis proporcionando únicamente la información necesaria, ya sea para combinar o separar clases de datos.

En este caso, CA por dendrogramas permitió descartar aquellas áreas bajo la curva que se encontraban muy alejadas con respecto a la mayoría; y trabajar solamente con las áreas bajo la curva del conglomerado de los picos Raman característicos 900 cm^{-1} (enlaces CCO) y $1050\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$ (enlaces CO y OH) que resultaron tener una similitud entre ellos, para que de esta manera los datos ayuden a realizar una mejor caracterización y/o clasificación de los distintos tipos de tequila en estudios posteriores.

Conclusiones

La información resultante del análisis cuantitativo de los tequilas blanco, reposado y extra añejo por medio del uso de técnicas analíticas y herramientas quimiométricas como la espectroscopia Raman y CA por dendrogramas puede ser útil para la

caracterización y/o clasificación de los distintos tipos de tequila a través de la búsqueda de diferencias de las áreas bajo la curva de los espectros Raman de los picos característicos 900

cm⁻¹ (enlaces CCO) y 1050-1150 cm⁻¹ (enlaces CO y OH) y determinar la autenticidad y calidad de dos de los tres tipos de tequila aquí estudiados: el blanco y el reposado.

Referencias

1. Volkov S. *Unas 85.000 personas mueren al año por el alcohol en las Américas, el mayor consumidor mundial* | Noticias ONU [Internet]. 2021 [cited 2021 Jun 26]. Available from: <https://news.un.org/es/story/2021/04/1490742>.
2. Pérez R. *Clasificación de bebidas alcohólicas - El blog de Drinks&Co* [Internet]. 2020 [cited 2021 Aug 3]. Available from: <https://www.drinksco.es/blog/clasificacion-bebidas-alcoholicas>.
3. Palmer GH. *Beverages: Distilled*. In: *Encyclopedia of Food Grains: Second Edition*. Elsevier Inc.; 2015. p. 193– 205.
4. Charapitsa S, Sytova S, Kavalenka A, Sobolenko L, Kostyuk N, Egorov V, et al. *The study of the matrix effect on the method of direct determination of volatile compounds in a wide range of alcoholic beverages*. *Food Control*. 2021 Feb 1;120:107528.
5. Romo P. *Tequila, sector estratégico del mercado interno* [Internet]. *El Economista*. 2018 [cited 2021 Jul 21]. Available from: <https://www.economista.com.mx/estados/Tequila-sector-estrategico-del-mercado-interno-20181101-0138.html>.
6. Gómez-Cuevas K, Delgado-Cruz A, Palmas-Castrejón YD, Gómez-Cuevas K, Delgado-Cruz A, Palmas-Castrejón YD. *Originalidad del tequila como símbolo de identidad mexicana. Percepción del turista- consumidor a partir de su exportación*. *RIVAR (Santiago)* [Internet]. 2020 [cited 2021 Jun 26];7(21):59–80. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0719-49942020000300059&lng=es&nrm=iso&tlng=es.
7. Fernandez-Lozano C, Gestal-Pose M, Pérez-Caballero G, Revilla-Vázquez AL, Andrade-Garda JM. *Multivariate Classification Techniques to Authenticate Mexican Commercial Spirits*. *Qual Control Beverage Ind Vol 17 Sci Beverages*. 2019 Jan 1;259–87.
8. González Seguí HÓ, Hernández López J de J, Hendrik Giersiepen J, González Seguí HÓ, Hernández López J de J, Hendrik Giersiepen J. *Metanol: tolerancias y exigencias en las normas para mezcal y bebidas de agave*. *RIVAR (Santiago)* [Internet]. 2020 Nov 28 [cited 2021 Jul 30];7(19):1–21. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0719-49942020000100001&lng=es&nrm=iso&tlng=es.
9. Frausto-Reyes C, Medina-Gutiérrez C, Sato-Berrú R, Sahagún LR. *Qualitative study of ethanol content in tequilas by Raman spectroscopy and principal component analysis*. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc*. 2005 Sep 1;61(11–12):2657–62.
10. Carreon-Alvarez A, Suárez-Gómez A, Zurita F, Gómez-Salazar S, Soltero JFA, Barcena-Soto M, et al. *Assessment of Physicochemical Properties of Tequila Brands: Authentication and Quality*. *J Chem*. 2016;2016.



Número de Registro: 03-2022-111715334000-01

