

# INVESTIGACIONES Y DESARROLLOS TECNOLÓGICOS EN MÉXICO



TOMO I  
BIOLOGÍA Y QUÍMICA

## **PREFACIO**

El presente compendio reúne trabajos de investigación y desarrollo tecnológico realizados en diversas áreas de la ciencia, cuyo objetivo principal es contribuir a la difusión del quehacer científico y tecnológico que se realiza en México, así como promover el trabajo interdisciplinario entre miembros de diferentes disciplinas científicas.

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

Octubre de 2023  
León, Gto., México

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



## TABLA DE CONTENIDO

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PUNTOS CUÁNTICOS DE BASE CARBONO PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS .....	4
NANOARCILLAS COMO TRANSPORTADORES DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA PARA EL TRATAMIENTO ENFERMEDADES CRÓNICAS DE ALTA PREVALENCIA.....	9
DISEÑO Y ELABORACIÓN DE UN BLOQUEADOR DE RUV REGENERADOR DE PIEL .....	13
ACTIVIDAD GASTROPROTECTORA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE <i>Heliotropium indicum</i> EN EL MODELO DE LESIONES GÁSTRICAS INDUCIDAS CON ETANOL .....	17
IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN FRUTOS PRESENTES DE <i>SECHIUM EDULE</i> (JACQ.) SW. Y SU DINÁMICA FARMACOCINÉTICA .....	23
EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LA CÁSCARA DE MANGO ( <i>MANGIFERA INDICA</i> L.) VAR “KENT” .....	30
ANÁLISIS DE ASPECTOS DE LA DINÁMICA POBLACIONAL DE <i>Larrea tridentata</i> (D.C.) Coville EN EL ESTADO DE COAHUILA, MÉXICO .....	39
VALIDACIÓN DE DOS MARCAS DE TIRAS REACTIVAS PARA EL ESTUDIO DE LA CETOGÉNESIS EN EL MONO AULLADOR DE MANTO ( <i>Alouatta palliata</i> ) .....	44
ACTIVIDAD INHIBITORIA DE <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> SOBRE <i>SALMONELLA</i> SPP.....	51
IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL EXTRACTO METANÓLICO DE LIMA DULCE ( <i>Citrus limetta</i> Risso), POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS .....	56
RECUPERACIÓN DE <i>CRYPTOCOCCUS</i> SPP EN EUCALIPTOS DE LA FACULTAD DE QFB-UMSNH .....	60
DESARROLLO DE ALGORITMO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GENES BLANCO DE LOS RECEPTORES DE ACIDO RETINOICO Y RECEPTORES X DE ACIDO RETINOICO.....	65
SÍNTESIS BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA UTILIZANDO LA FLOR DE CEMPASÚCHIL ( <i>TARGETES ERECTA</i> ) PARA EL ESTUDIO DE SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA .....	74
BIOSORCIÓN MEDIANTE EL RESIDUO DEL ESPÁRRAGO PARA LA REMOCIÓN DINÁMICA DEL PLAGUICIDA QUÍMICO (2,4 DICLOROFENOL) PRESENTE EN SOLUCIÓN ACUOSA .....	79
PROPIEDADES QUÍMICAS DE SUELOS URBANOS EN AGREGADOS DE DIFERENTE TAMAÑO .....	94
PRODUCCIÓN DE BACTERIOCLOROFILA A POR CULTIVOS PUROS DE BACTERIAS FOTOSINTÉTICAS ANOXIGENICAS (NO SULFUROSAS) EN COMPUESTOS ORGÁNICOS ....	99
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA Y ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE LAVANDULA OFFICINALLIS e IPOMOEA STANS.....	103
INTERCAMBIO DE PARÁSITOS GASTROINTESTINALES ENTRE POBLACIONES SILVESTRES DE PRIMATES Y COMUNIDADES RURALES .....	109
COMPUESTOS ORGANOMETÁLICOS DE Manganeso(I) CON BASES DE SCHIFF BASADAS EN SISTEMAS AROMÁTICOS: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN .....	118
DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE FORMACIÓN DE [AUNP(N-ACETILCISTEÍNA) <sub>X</sub> ] A ÁCIDO GLUTÁMICO Y ASPARAGINA POR MEDIO DE ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS .....	122
FABRICACIÓN Y EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FOTOFÍSICAS DE NANOMATERIALES ORGÁNICOS.....	137
DESARROLLO DE UN MODELO QUIMIOMÉTRICO POR PLS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO PALMÍTICO EN UNA MEZCLA DE ÁCIDOS GRASOS MEDIANTE FTIR-ATR.....	141

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD GASTROPROTECTORA DE LAS SEMILLAS DE <i>Schinus molle</i> EN RATAS WISTAR .....	153
PRODUCCIÓN DE BIOSÍLICE AMORFA DE CÁSCARA DE ARROZ PARA SU EMPLEO COMO REFUERZO EN COMPÓSITOS .....	157
PREVALENCIA Y RIQUEZA DE PARÁSITOS GASTROINTESTINALES EN <i>ATELES GEOFFROYI</i> EN RELACIÓN A LA CERCANÍA CON EL HOMBRE: UN ESTUDIO PRELIMINAR.....	164
USO DE LA HERBOLARIA PARA EL DISEÑO DE SISTEMA BIOADHESIVO CON ACCIÓN BIOLÓGICA DE IMPORTANCIA EN ODONTOLOGÍA.....	176
GRADO DE CONOCIMIENTO DE LA DISTRIBUCIÓN DEL CINCUATE <i>PITUOPHIS DEPPEI</i> EN MÉXICO .....	184
ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE EN LA DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA POR UV-VIS DE CICLAMATO SÓDICO, MICROEXTRAÍDO MEDIANTE EMULSIFICACIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO .....	190
ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE EN UN MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE LOS COLORANTES AZUL 1 Y AMARILLO 5 EN MEZCLA BINARIA MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA UV-V .....	205
EVALUACIÓN DE LA INGESTA DE UNA DIETA CETOGÉNICA SOBRE EL MATERIAL GENÉTICO EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 .....	223
INFLUENCIA DEL GRUPO FUNCIONAL EN LA EMISIÓN DE COMPUESTOS LUMINISCENTES MONONUCLEARES .....	234
POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR DE CU Y ER PARA LA REMOCIÓN SELECTIVA .....	240
PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> CULTIVADA CON CR (III) EN MEDIO MÍNIMO YNB ORIENTADA A LA PRODUCCIÓN DE SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS .....	246
EFFECTO DE LA TEMPERATURA AMBIENTAL, HUMEDAD, Y RESPUESTA CONDUCTUAL TERMORREGULADORA SOBRE EL DESCANSO DEL MONO AULLADOR ( <i>ALOUATTA PALLIATA</i> ).....	253
FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOMATERIALES ORGANICOS LUMINISCENTES .....	261
MATERIAL ELECTROHILADO BIODEGRADABLE CON PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS Y ANTIOXIDANTES CON POTENCIAL USO COMO EMPAQUES DE FRESA .....	265
CUANTIFICACIÓN DE METALES POR ICP-OES EN PARTÍCULAS ATMOSFÉRICAS EN TABASCO .....	274
SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOESTRUCTURAS HÍBRIDAS DE $TiO_2@SiO_2$ -pABA .....	284
MEDICIÓN ELÉCTRICA DE <i>GEOBACTER SULFURREDUCTENS</i> EN UNA CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANO DE DOBLE CÁMARA.....	296
OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE BIOPELÍCULAS A BASE DE RESIDUOS ORGÁNICOS .....	304
EVALUACIÓN DE ASPECTOS DE LA DINÁMICA POBLACIONAL DE <i>Ferocactus pilosus</i> ( <i>Galeotti ex Salm-Dyck</i> ) <i>Werderm</i> EN LA SIERRA DE CATORCE, SAN LUIS POTOSÍ .....	309
SÍNTESIS VERDE DE COMPLEJOS METÁLICOS DE BASES DE SCHIFF TIPO SALEN EN UNA SOLA ETAPA A TEMPERATURA AMBIENTE .....	314
EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE <i>MONTANOA TOMENTOSA</i> , EN LA RESPUESTA A LA PRUEBA DE NADO FORZADO Y ÁREAS HIPOTALÁMICAS DE RATAS MACHO WISTAR .....	319
CONTENIDO DE HUMEDAD DE LAS PARTES VEGETALES QUE CONSUME <i>Alouatta palliata</i> Y SU APORTE HÍDRICO (ESTUDIO PRELIMINAR).....	327



ANÁLISIS DE LAS ESPECIES DE MURCIÉLAGOS EN LOS TIPOS VEGETACIÓN DE PUEBLA, MÉXICO .....	336
AISLAMIENTO DE LEVADURAS DE <i>CRYPTOCOCCUS SPP</i> A PARTIR DE EXCRETAS DE PALOMAS UBICADAS EN EL CALLEJÓN DEL ROMANCE DE MORELIA, MICHOACÁN .....	343
LAS CÉLULAS MADRE, UN EJEMPLO DE LA REACTANCIA PSICOLÓGICA PARA SOBREVIVENCIA .....	350

## SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PUNTOS CUÁNTICOS DE BASE CARBONO PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS

Xóchitl Michel García de Jesús<sup>1</sup>, Jorge Alberto Granados Olvera<sup>1</sup>, Karelía Liliana Rangel Ruiz<sup>1</sup>, Ivan Arroyo Ordoñez<sup>1</sup>, Airy Aketzalli Guillón Flores<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Politécnica de Cuautitlán Izcalli, <sup>2</sup>Global Pharmaceutical(PPD).

[jorgealberto.go@upci.edu.mx](mailto:jorgealberto.go@upci.edu.mx)

### RESUMEN

Los recientes descubrimientos realizados por la comunidad científica que permiten observar, controlar y manipular estructuras a escalas nanométricas, han habilitado un nuevo campo de investigación: La nanotecnología. Las posibles aplicaciones de esta nueva ciencia basada en el desarrollo de materiales nanoestructurados y de nuevas herramientas que actúen a este nivel, ha generado un gran impacto social y económico. Se espera que la nanotecnología traiga consigo una revolución en diferentes áreas, entre ellas la biomédica, ya que los nanomateriales podrían brindar poderosas herramientas de diagnóstico y tratamiento de enfermedades desde un nivel molecular. Los Puntos Cuánticos de carbono (CQDs) son un tipo de nanopartícula esférica (CNP) que presentan atractivas propiedades luminiscentes y elevada biocompatibilidad. Gracias a la baja toxicidad que presentan, a diferencia de las nanopartículas metálicas. Los CQDs podrían llegar a ser muy útiles en el desarrollo de numerosas aplicaciones bioanalíticas y clínicas como nuevos inmunoensayos, técnicas de biomarcaje y liberación controlada de fármacos. Este trabajo se centra en las propiedades que este tipo de nanopartícula tiene, la síntesis usada para su fabricación y por último su posible uso como herramienta en la nanomedicina. La síntesis empleada es una síntesis verde en la cual se usa un precursor orgánico (glucosa) y 2 bases ( $\text{NH}_3$  y  $\text{NaOH}$ ) con el fin de comparar el efecto del  $\text{pH}$  en la formación de los CQDs. De las propiedades de más valor e interés de los CQDs son sus propiedades ópticas, las cuales fueron determinadas por absorción de luz UV-Visible y por fotoluminiscencia. Un aspecto importante en este trabajo es que la emisión de estos puntos cuánticos se encuentra en los 280nm, lo cual es un indicativo de la formación de CQDs. Los puntos cuánticos de carbono fueron expuestos a radiación UV, en el cual se comprobó su fotoluminiscencia. En conclusión, usando una síntesis verde se obtienen puntos cuánticos de carbono que pueden ser usadas en la medicina y rentables por su bajo costo de síntesis.

### INTRODUCCION

Los puntos cuánticos de carbono son nuevos nanomateriales basados en carbono, que es un elemento abundante y generalmente no tóxico, por lo tanto, son atractivos para múltiples aplicaciones en biomedicina. Se han informado varias técnicas para la síntesis de CQDs, como pirólisis, carbonización de grupos de polímeros, ablación con láser, hidrotermal, microondas, ultrasonido y métodos electroquímicos, deposición química de vapor, etc.; para obtener partículas carbonosas, amorfas o cristalinas con forma, tamaño y morfología diversas (S. Tao,2019).

Con frecuencia, los CQDs se obtienen mediante la funcionalización de la superficie de nanopartículas de carbono con moléculas de hidrocarburos, sin embargo, muchos estudios informan el uso de fuentes naturales para su síntesis, es decir, se emplea el método de síntesis verde. Existen numerosas investigaciones sobre la síntesis de CQDs a partir de residuos de fuentes naturales de jugo de frutas, cáscaras de frutas, semillas, hojas de árboles, ajo y una gran variedad de productos naturales que están altamente compuestos de carbono (W. Meng,2019).

Las fuentes naturales contienen diferentes grupos funcionales orgánicos que permiten la funcionalización de la superficie durante el proceso de síntesis de CQDs y, en consecuencia, las propiedades luminiscentes se muestran sin tratamiento posterior a dicho procedimiento. La mayoría de los métodos de síntesis verde resultan en propiedades ópticas menos controlables y especialmente en los CQDs de desechos naturales son menos pronunciadas en comparación con los que se encuentran en los puntos cuánticos de semiconductores tradicionales, sin embargo, las principales ventajas de la síntesis verde de CQDs a partir de biomasa son el costo-beneficio y que son amigables con el medio ambiente debido a la facilidad de obtención y la abundancia de recursos naturales, además, presenta una alternativa económica prometedora a los QDs(Quantum Dots) convencionales a base de metales tóxicos. Por lo tanto, la producción ecológica de nanomateriales basados en carbono es de gran interés (W. Wenshuo,2018).

En este trabajo, los CQDs se obtuvieron mediante el método de síntesis verde usando glucosa obtenida del piloncillo. El piloncillo es un producto alimenticio con excelentes características que se obtiene de la evaporación de los jugos de la caña de azúcar y de la caña panelera dando como resultado la cristalización de la sacarosa que contiene minerales y vitaminas, fructuosa y glucosa (FIRA VERACRUZ, s.f.).

La novedad de este trabajo es el uso del piloncillo para la síntesis de CQDs altamente fluorescentes mediante un método de microondas asistido por ultrasonido, que es rápido y de bajo costo.

## TEORIA

Los QDs o puntos cuánticos son NPs de materiales semiconductores normalmente contienen desde 100,000 átomos, con diámetros en el intervalo de 2-10 nanómetros(nm). Debido a su minúsculo tamaño, los QDs sufren una serie de efectos cuánticos como es la discretización de sus bandas de energía. Como propiedad interesante, estas NPs semiconductoras presentan confinamiento cuántico en las tres direcciones del espacio, debido a que los electrones están restringidos a moverse en regiones muy pequeñas, menores de 10nm. El confinamiento cuántico se da cuando el diámetro del cristal es menor que su radio de Bohr e influye en que las propiedades de los QDs sean muy diferentes a las de los materiales macroscópicos (B.H Juárez, 2011).

Al ser nanocristales formados por materiales semiconductores poseen una banda de valencia (llena de electrones) y una banda de conducción (banda energética vacía) separadas por una diferencia energética llamada gap.

El proceso luminiscente se produce cuando los electrones de la banda de valencia son excitados con un haz de luz de determinada energía a la banda de conducción dejando huecos en la banda de valencia. Cuando dicha excitación finaliza, se produce una combinación radiativa entre los electrones y los huecos generados lo que provoca la emisión de fotones con una energía definida que viene determinada por la separación entre ambos niveles energéticos y, por tanto, dicha radiación tiene una longitud de onda característica. Dentro de la nanomedicina, Los QDs han sido enormemente utilizados como sistemas para obtener imágenes biomédicas. Este es una de las aplicaciones de mayor potencia, ya que su tamaño posibilita el estudio de procesos biológicos en organismos, incluso in-vivo, permitiendo obtener información acerca de muchas enfermedades. Sin embargo. A pesar del significativo interés que se ha suscitado entorno a este tipo de NPs para uso biomédico, muchos investigadores afirman que los QDs nunca se podrán usar para tratar pacientes a causa de su potencial toxicidad debido a la presencia en el núcleo del nanocristales de metales pesados como el cadmio (K.M. Tsoi,2012).

Por ello, con el objetivo de reducir la toxicidad y aumentar la biocompatibilidad un tipo de NP que esta ganando mucho auge en los últimos años son los CQDs.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Materiales y Método

La síntesis de puntos cuánticos de carbono se realizó usando una síntesis verde tomando como precursor la glucosa, 1 base de Hidróxido de sodio y una base de Amoniaco, de esta manera se obtiene una solución homogénea, la cual será procesada mediante la técnica de microondas asistido por ultrasonido.

### Preparación de las soluciones de glucosa y agua destilada.

Se compro piloncillo claro, ya que presenta una mejor calidad en su concentración, con ayuda de un mortero se trituro la muestra hasta obtener un polvo fino, se prepararon 2 muestras en donde se mezcló una solución a 1M de polvo de piloncillo con 15 ml de agua destilada cada una y mediante agitación magnética se adiciono hasta obtener una mezcla homogénea, una vez obtenida las 2 soluciones homogéneas de piloncillo y agua destilada, se expusieron a una cuba ultrasónica durante 30 minutos (Figura1).





Figura 1. Proceso de ultrasonido.

### Preparación de las soluciones de NaOH y NH<sub>3</sub>

Se prepararon 2 soluciones una con Hidróxido de sodio y otra con amoníaco, para la primera se emplearon 15ml de agua destilada y 5.9ml de NaOH, para la segunda de emplearon 15ml de agua destilada y 2.55ml de amoníaco, ambas se mezclaron usando agitación magnética hasta disolverlas completamente (Figura 2).



Figura 2. Mezcla de NaOH y agua destilada.

### Preparación de las soluciones de glucosa con NaOH y NH<sub>3</sub>

En un vaso de precipitado se agregó la mezcla homogénea de piloncillo y la solución de NaOH, en otro vaso de precipitado se agregó la mezcla homogénea de piloncillo y la solución de NH<sub>3</sub>, ambas mezclas se agitaron durante 15 minutos, posteriormente se expusieron durante 30 minutos a la cuba ultrasónica, finalmente se sometieron a microondas durante 7 minutos a una potencia de 10 Watts (Figura3).



Figura 3. Mezclas expuestas a microondas.

### Actividad Fluorescente

Para evaluar la actividad fluorescente se empleó una lámpara de UV, en el cual se pretende comparar el azul neón irradiado, que es un color característico en la obtención de CQDs.

### RESULTADOS

Las diferentes soluciones que contenían los CQDs fueron expuestas a una radiación de luz ultravioleta, para comprobar visualmente si presentaban propiedades luminiscentes. En la Figura 4 se observan las muestras obtenidas de CQDs con y sin radiación ultravioleta en donde se confirma la presencia de propiedades luminiscentes.



Figura 4. QDPs sin y con exposición UV

Los espectros UV-Visible muestran una amplia absorción a 280nm (Figura 5) que es consistente con lo reportado en diversas investigaciones (A. Mewada,2013).

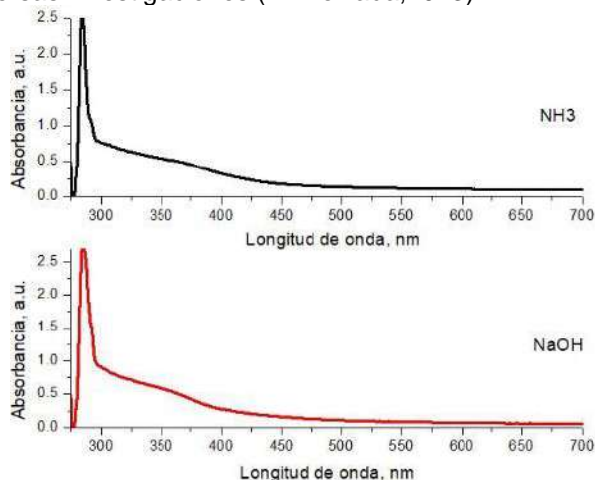


Figura 5. Espectros de absorción de QDPs con diferentes bases.

## CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se pueden extraer del presente trabajo son las siguientes:

Se sintetizaron puntos cuánticos de carbono de manera satisfactoria usando una síntesis verde.

Los CQDs a base de glucosa al cambiar el pH, se aprecia una variación en las propiedades luminiscentes, dando mejores resultados con el NaOH.

Se evaluó las propiedades luminiscentes mediante radiación ultravioleta, visualizando el color característico de los CQDs

Mediante espectroscopia UV-Vis se confirmó la presencia de CQDs

La técnica de microondas asistida por ultrasonido se presenta como una alternativa costo-beneficio a las técnicas convencionales.

Las propiedades luminiscentes de los CQDs pueden ser utilizados en biomedicina en inmunoensayos ópticos, los cuales comprenden: Fluorescencia, quimioluminiscencia, electroquimioluminiscencia, resonancia de plasmón superficial y espectroscopia Raman.

## BIBLIOGRAFIA

A. Mewada, S. Pandey, S. Shinde, N. Mishra, M. Thakur, M. Sharon, and M. Sharon, Mater. Sci. Eng. C. Mater. Bio. Appl. 33, 2914 (2013))

B.H. Juárez, Nanopartículas Semiconductoras Coloidales y Aplicaciones. *Anales de Química*,2011,107,3.

K.M. Tsoi; Q.Dai ; B.A. Alman; W.C. Chan, Are Quantum dots toxic? Exploring the discrepancy between cell culture and animal studies. *Accountsof chemical research*, 2012,46,3: 662-671

Presentaciones y calidades de piloncillo. FIRA VERACRUZ. (s.f.). *Monografía del piloncillo* <https://siiba.conadesuca.gob.mx/siaca/Consulta/verDoc.aspx?num=411>

S. Tao, T. Feng, C. Zheng, S. Zhu, and B. Yang, "Carbonized Polymer Dots: A Brand New Perspective to Recognize Luminescent CarbonBased Nanomaterials," *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 10, pp. 5182–5188, 2019.

W. Meng, X. Bai, B. Wang, Z. Liu, S. Lu, and B. Yang, "BiomassDerived Carbon Dots and Their Applications," pp. 172–192, 2019.

W. Wenshuo, D. Cornelia, W. Simon, T. Martin, and P. Wolfgang, "Microwave-assisted one-step synthesis of white light-emitting carbon dot suspensions," *Opt. Mater. (Amst).*, vol. 80, no. December 2017, pp. 110–119, 2018.



## NANOARCILLAS COMO TRANSPORTADORES DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA PARA EL TRATAMIENTO ENFERMEDADES CRÓNICAS DE ALTA PREVALENCIA

Beatriz Adriana Andrade Espinoza\*, Andrés Issac Gutiérrez Ruiz, Jenny Arratia Quijada, Karla Janetté Nuño Anguiano.

Centro Universitario de Tonalá, Universidad de Guadalajara, Nuevo Periférico Oriente 555, Ejido San José, Tatosco, 45425, Tonalá, México).

\*beatriz.andrade@academicos.udg.mx.

### RESUMEN

Recientemente, las prácticas para preservar y mantener la salud se han enfocado en la aplicación de estrategias basadas en la dieta y alimentación, así como en los nutrientes contenidos en los alimentos que presentan efectos benéficos para la salud. Estos incluyen productos encaminados a mantener la salud de la microbiota intestinal. La microbiota intestinal influye en el metabolismo y la respuesta inmunitaria principalmente a través de sus productos de fermentación, los ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Los AGCC regulan el metabolismo lipídico y de la glucosa activando los receptores de AGCC en cerebro, hígado, páncreas y tejido adiposo. Se ha demostrado que ácidos incrementan la secreción de insulina, la masa de las células  $\beta$  del páncreas, regulan el metabolismo de la glucosa y reducen la secreción de glucagón. AGCC como el butirato de sodio pueden ser transportados al organismo mediante nanosistemas como las arcillas aniónicas. Entre estas arcillas destaca el uso de Hidróxidos Dobles Laminares (HDLs). Los HDLs como transportadores de moléculas bioactivas se han utilizado con mayor frecuencia debido a que son amigables con el medio ambiente, poseen una formulación ajustable, biocompatibilidad, elevada capacidad de carga y sensibilidad a cambios de pH, entre otras. Comparados con las moléculas bioactivas, las moléculas bioactivas intercaladas en arcillas mejoran su estabilidad térmica y potencian su capacidad antioxidante. Por lo antes mencionado, en este estudio se diseñó y preparó un transportador híbrido a base de butirato y nanoarcillas, para su posterior evaluación biológica como adyuvantes en el tratamiento de enfermedades crónicas de alta prevalencia. Las arcillas fueron preparadas mediante la técnica de coprecipitación y caracterizadas por Difracción de Rayos X y Espectroscopía Infrarroja. Los resultados confirmaron que el método de síntesis fue adecuado para preparar híbridos a base de nanoarcillas y butirato, sin alterar el arreglo cristalino de los HDLs. Se logró preparar con éxito un sistema de transporte para AGCC. El nanocompuesto resultante es un candidato prometedor para futuras aplicaciones como adyuvante en el tratamiento de enfermedades crónicas de alta prevalencia.

### INTRODUCCIÓN

Recientemente, las prácticas para preservar y mantener la salud se han enfocado en la aplicación de estrategias basadas en la dieta y alimentación, así como en los nutrientes contenidos en los alimentos que presentan efectos benéficos para la salud. Estos incluyen productos encaminados a mantener la salud de la microbiota intestinal. La microbiota intestinal influye en el metabolismo y la respuesta inmunitaria principalmente a través de sus productos de fermentación, los ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Los AGCC regulan el metabolismo lipídico y de la glucosa activando los receptores de AGCC en cerebro, hígado, páncreas y tejido adiposo. Se ha demostrado que ácidos incrementan la secreción de insulina, la masa de las células  $\beta$  del páncreas, regulan el metabolismo de la glucosa y reducen la secreción de glucagón<sup>1</sup>.

AGCC como el butirato de sodio pueden ser transportados al organismo mediante nanosistemas como las arcillas aniónicas<sup>2</sup>. Entre estas arcillas destaca el uso de Hidróxidos Dobles Laminares (HDLs). Los HDLs son una clase de compuestos iónicos formados por capas cargadas positivamente con una región interlaminar que contiene aniones<sup>3</sup>. Como transportadores de moléculas bioactivas se han utilizado con mayor frecuencia debido a que son amigables con el medio ambiente, poseen una formulación ajustable, biocompatibilidad, elevada capacidad de carga y sensibilidad a cambios

de pH, entre otras. Comparados con las moléculas bioactivas, las moléculas bioactivas intercaladas en arcillas mejoran su estabilidad térmica y potencian su capacidad antioxidante<sup>2,4</sup>.

Por lo antes mencionado, en este estudio se diseñó y preparó un transportador híbrido a base de butirato y nanoarcillas, para su posterior evaluación biológica como adyuvantes en el tratamiento de enfermedades crónicas de alta prevalencia.

## PARTE EXPERIMENTAL

El compuesto HDLs-Butirato fue preparado por el método de co-precipitación. Para ello se pesaron 1.5 g de  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  y 1 g de  $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$  y se disolvieron en 100 mL de agua bidestilada. Después, se pesó 0.3 g de butirato y se agregaron a la solución con los nitratos. Se ajustó el pH de la solución a 8 goteando  $NH_4OH$  al 6% y se dejó agitar durante 24 h a temperatura ambiente. El sólido formado se recuperó por centrifugación, se lavó hasta llegar a un pH neutro y se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez secó fue molido para obtener un polvo fino. El material fue caracterizado mediante las técnicas fisicoquímicas Difracción de Rayos X (DRX) y Espectroscopía Infrarroja (IR).

## RESULTADOS

El patrón de DRX de los HDLs preparados presenta señales agudas e intensas a valores de  $2\theta$  que corresponden a las reflexiones características de los hidróxidos dobles laminares con las señales basales correspondientes a las familias de planos (003) y (006)<sup>2</sup> (Fig. 1).

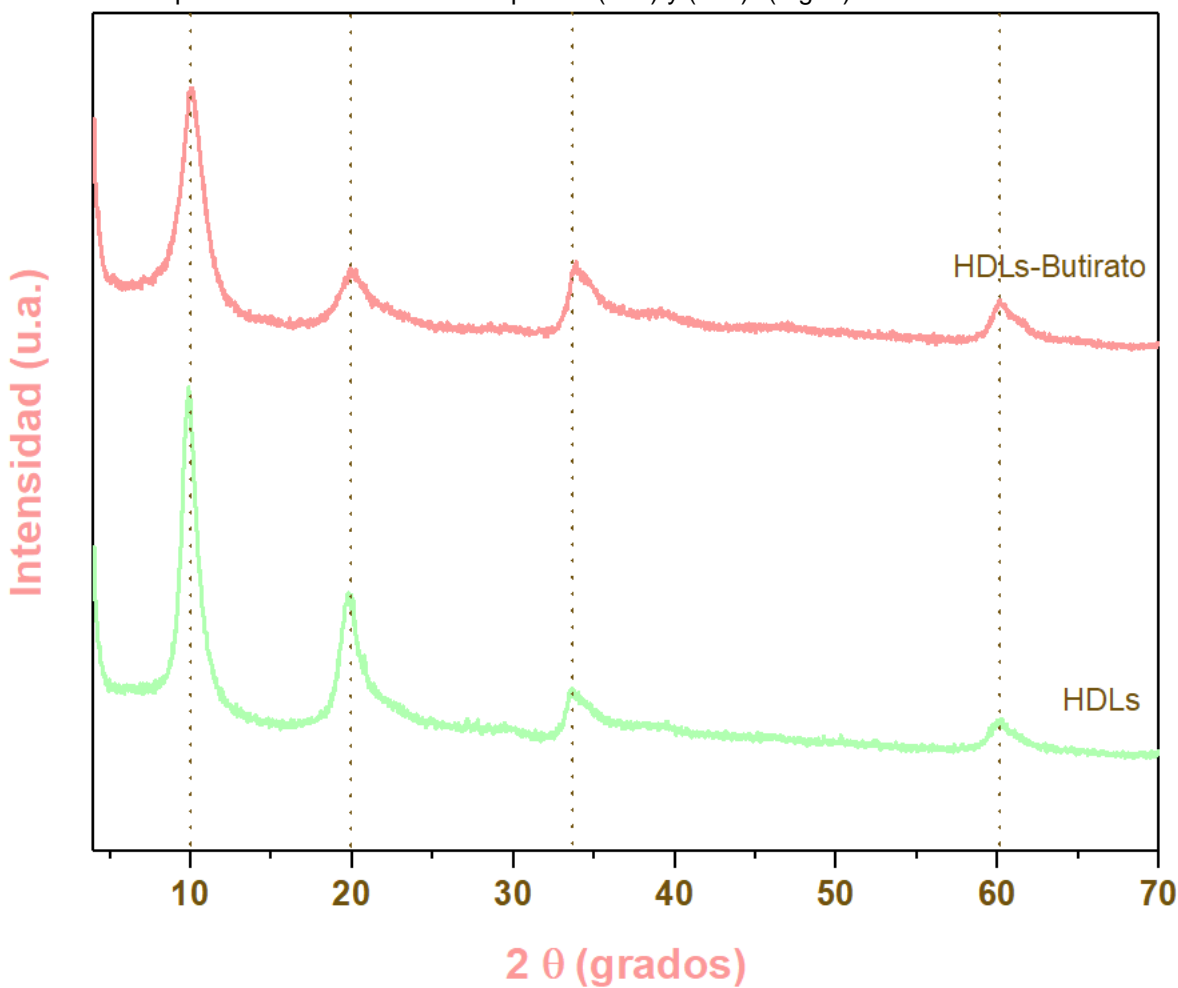


Figura 1. Patrón de difracción correspondiente a las muestras de Hidróxidos Dobles Laminares (verde) y Hidróxidos Dobles Laminares-Butirato (rosa). En la figura es posible observar las señales basales características de los Hidróxidos Dobles Laminares a 10, 20, 30 y 61 grados 2 theta.

El patrón de difracción muestra varias reflexiones en  $2\theta$  con valores de 10, 20, 34 y 61 grados. Este resultado confirma que el método de síntesis propuesto fue eficiente para obtener materiales cristalinos de HDLs. El patrón de difracción de rayos X de la muestra que corresponde a los HDLs-Butirato en la Fig. 1 muestra señales que pertenecen solamente a los HDLs, estos resultados indican que el Butirato no altera el arreglo cristalino de los HDLs y que la combinación de estos no conduce a un producto de intercalación ya que conserva la reflexión basal en el mismo ángulo que los HDLs vacíos.

Para estudiar la presencia de grupos funcionales en los compuestos HDLs y HDLs-Butirato se realizó un análisis Espectroscopía Infrarroja que se representa en la Figura 2. El espectro IR de los HDLs muestra una banda de absorción ancha e intensa alrededor de  $3400\text{ cm}^{-1}$ , que se debe a las vibraciones de estiramiento de los grupos -OH intermolecularmente unidos por H, situados entre las capas de los HDLs. La vibración de flexión de la molécula de agua entre capas aparece como una banda a  $1640\text{ cm}^{-1}$ , los nitratos correspondientes a las sales precursoras se observan a  $1340\text{ cm}^{-1}$ , y la vibración del enlace metal-oxígeno aparece en la frecuencia más baja por debajo de  $650\text{ cm}^{-1}$ . La muestra correspondiente a los HDLs-Butirato (Figura 2) presenta las mismas bandas, aunque adicionalmente exhibe una señal a  $\sim 3000\text{ cm}^{-1}$  atribuible a la vibración de enlaces C-H de los carbonos de la molécula orgánica Butirato<sup>2,5</sup>.

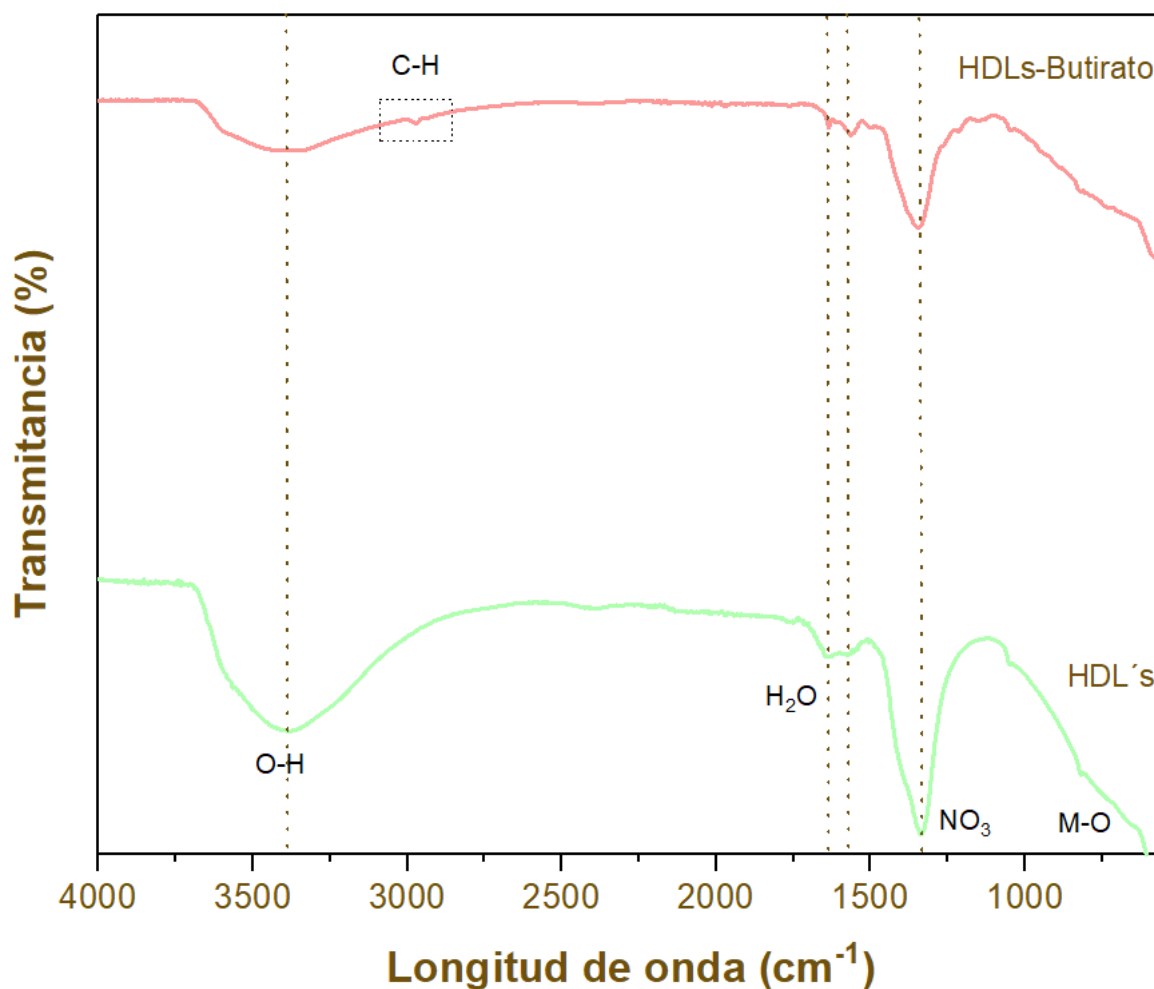




Figura 2. Espectro Infrarrojo correspondiente a las muestras de Hidróxidos Dobles Laminares (verde) e Hidróxidos Dobles Laminares-Butirato (rosa). En la figura es posible observar las señales características de los Hidróxidos Dobles Laminares y corroborar la presencia de la molécula orgánica alrededor de  $3000\text{ cm}^{-1}$ .

En conjunto, los resultados de Difracción de Rayos X y Espectroscopía Infrarroja confirmaron que el método de síntesis fue adecuado para preparar híbridos a base de nanoarcillas y butirato, sin alterar el arreglo cristalino de los Hidróxidos Dobles Laminares, es decir, se logró preparar con éxito un sistema para transporte de ácidos grasos de cadena corta.

## CONCLUSIONES

En este trabajo, se logró preparar un material a base de Hidróxidos Dobles Laminares y Butirato, el método de co-precipitación resultó útil para la formación de este compuesto. Su estructura fue confirmada por medio de Difracción de Rayos X. La presencia de cada uno de los agentes que integran este material híbrido se observa a través de Espectroscopía Infrarroja. El enfoque aquí descrito podría proporcionar una solución prometedora en el desarrollo de un híbrido para liberación de compuestos bioactivos novedoso y eficiente para aplicaciones en el tratamiento de enfermedades crónicas de alta prevalencia.

## BIBLIOGRAFÍA

1. D.K. Mandaliya & S. Seshadri, "Short Chain Fatty Acids, pancreatic dysfunction and type 2 diabetes", *Pancreatology*, Vol 19, 2019, pp 617-622.
2. D. Wang, et al., "Butyrate-inserted Ni-Ti layered double hydroxide film for  $\text{H}_2\text{O}_2$ -mediated tumor and bacteria killing", *MatTod*, Vol 938, 2017, pp 1-20.
3. Q. Wang & D. O'Hare, "Recent advances in the synthesis and application of layered double hydroxide (LDH) nanosheets", *Chem Rev*, 112(7), 2012, pp 4124-4155.
4. Q. Zhang, et al., "Antioxidant intercalated Zn-Containing Layered Double Hydroxides: Preparation, Performance and Migration Properties", *NJC*, 2017.
5. J. Kavitha, et al., "Mass cultivation of UV-B adapted *Arthrospira plantensis* RRGK under open raceway pond for the production of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate", *Int J Biol Macromol*, Vol 93 pt A, 2016, pp 1304-1316

## DISEÑO Y ELABORACIÓN DE UN BLOQUEADOR DE RUV REGENERADOR DE PIEL

Rubi Cruz Garduño , Jesús Eduardo Eugenio Padilla , María Teresa Fuentes Romero, Sandra Paola Hernández Ferrer , Noemí Guadalupe González Jiménez , Melany Elizabeth Chavez Treviño  
Nayeli Salinas Martínez

División Académica de Ciencias de la Salud de la Universidad Tecnológica Fidel Velázquez,  
División Académica de Nanotecnología de la Universidad Tecnológica Fidel Velázquez , División  
Académica de Tecnología Ambiental de la Universidad Tecnológica Fidel Velázquez.

20318009@utfv.edu.mx

### RESUMEN

El alto impacto de los rayos UV que dañan y deterioran la piel, surge la necesidad de realizar un producto que cubra las necesidades de protección y regeneración celular. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue realizar un bloqueador solar con componentes que humecten, protejan y regeneren la piel con ingredientes amigables con el medio ambiente. Este tipo de productos son importantes para prevenir y tratar enfermedades dermatológicas como el cáncer de piel. Dado que el uso de estos productos está altamente influido por la percepción que los consumidores tienen de sus características finales, se relacionaron algunas percepciones comunes de los consumidores con propiedades físicas del producto, que consideran las preferencias que se tienen sobre cada una de ellas. La tarea consistía en investigar que la Organización Mundial de la Salud (OMS) distingue que hasta el 90% de los cánceres de piel están asociados a la radiación ultravioleta. Por ello, con el bloqueador propuesto en esta investigación se reducen los efectos dañinos del sol como el envejecimiento prematuro de la piel y el cáncer de piel. Dado lo anterior, se propuso utilizar una mezcla de aceites y algunos óxidos para integrar el bloqueador solar que, a diferencia de los que se ofrecen en el mercado, este producto contiene un ingrediente con propiedades regenerativas, dando este aporte, el quitosano; el cual se obtiene de manera natural o sintética. El quitosano es un polímero natural bien documentado, no tóxico, biocompatible y biodegradable. Se ha demostrado que el quitosano se une excelentemente a una serie de células microbianas de mamíferos, por lo que tiene numerosas aplicaciones, tanto en la administración de fármacos, implantes de relleno de espacio y apósitos para heridas (como cicatrizante o regenerador de piel). Dadas dichas características, este material nanoestructurado fue seleccionado para ser parte de este bloqueador solar. Se realiza un estudio, para encontrar la maximización de la preferencia del consumidor sobre las características del producto. Se lleva a cabo un muestreo de individuos, los cuales presentaron características propias como color de tez clara, piel sensible, piel mixta, piel grasa y seca.

En conclusión, el bloqueador solar obtenido se acondiciona sin problema, no presenta grumos o aspecto graso, la apariencia de este fue semilíquida que favorecía en los diferentes tipos de piel, permitiendo verificar las propiedades que ayudan a que la piel cicatrice, disminuya resequedad, aumente el cuidado de la piel, con un toque aclarante y regenerativa que proporcionaron los ingredientes, dando una excelente cobertura para la protección contra los rayos UV y UVA.

### INTRODUCCIÓN

Los protectores solares se definen como sustancias exógenas (tópicas y sistémicas) o endógenas destinadas a proteger el tegumento humano del daño producido por los rayos Ultra violeta UV, UVA y UVB, así bien ayudar a prevenir el cáncer de piel que se genera a lo largo del tiempo por la exposición del mismo.

Estos son utilizados de forma terapéutica, para ello la participación del quitosano regenerante de piel y disminución de cicatrices. Dicho producto posee propiedades formadas en una especie de película que pueden promover una reducción en la pérdida de agua cutánea; así ayudado al aumento de elasticidad y suavidad de la piel, haciéndola interesante en aplicaciones cosméticas hidratantes.

Todo ser humano debe utilizar bloqueador solar diariamente, aun cuando trabajan en zonas que están cubiertas a la exposición solar, ya que la mayoría de los cristales no cubren por completo el traspaso de los rayos UVA. Por lo tanto, es necesaria su aplicación aun en estos casos.

### TEORIA

En base a la investigación realizada a diferentes productos tópicos para la piel, se pudo deducir cuales eran los que tendrían un alto impacto positivo para la piel, dicho antes esto, con el bloqueador

propuesto en esta investigación se reducen los efectos dañinos del sol como el envejecimiento prematuro de la piel y el cáncer de piel.

Dado lo anterior, se propuso utilizar una mezcla de aceites y algunos óxidos para integrar el bloqueador solar que, a diferencia de los que se ofrecen en el mercado, este producto contiene un ingrediente con propiedades regenerativas, dando este aporte, el quitosano; el cual se obtiene de manera natural o sintética.

El extracto de semilla de uva es rico en antioxidantes que ayudan a proteger la piel contra los daños ocasionados por los rayos UV del sol.

Además, el aceite de almendras nos aportará ese extra de protección a la piel lo que ayudará a multiplicar el efecto de tu protector solar. Incluso puede ser utilizado este verano para reparar cabellos secos y dañados por el Sol, o por un exceso de cloro o salitre, de la piscina o de la playa.

Por otro lado “El aceite de coco bloquea alrededor del 20% de los rayos UVA y no bloquea los rayos UVB, que son esenciales para la síntesis de la vitamina D”, apunta la especialista. Además de proteger, este producto impide que las capas de la piel se dañen por la sobreexposición solar, garantizando un bonito bronceado.

El quitosano; es un polímero natural bien documentado, no tóxico, biocompatible y biodegradable. Se ha demostrado que el quitosano se une excelentemente a una serie de células microbianas de mamíferos, por lo que tiene numerosas aplicaciones, tanto en la administración de fármacos, implantes de relleno de espacio y apósitos para heridas (como cicatrizante o regenerador de piel).

Dadas dichas características, este material nanoestructurado fue seleccionado para ser parte de este bloqueador solar. Se realiza un estudio, para encontrar la maximización de la preferencia del consumidor sobre las características del producto.

Se lleva a cabo un muestreo de individuos, los cuales presentaron características propias como color de tez; tez clara, piel sensible, piel mixta, piel grasa y seca utilizando así un muestreo en el cual probamos la eficacia.

El método científico empleado en dicha investigación es inductivo, ya que se buscó el saber ¿por qué ayudaba el quitosano a la regeneración y cuidado de la piel? dicho antes esto se demostró que tiene ciertas propiedades ya que es un material nanoestructurado que tiene una serie de células microbianas de mamíferos. Nos ayudó a darnos cuenta del ¿Por qué los rayos UV causan cáncer en la piel? Fue cuando comprendimos que los rayos UV pueden causar daño a las células de la piel. A corto plazo, este daño puede provocar una quemadura solar. Con el tiempo, el daño de los rayos UV se acumula, causando cambios en la textura de la piel, envejecimiento prematuro de la piel y, a veces, cáncer de piel.

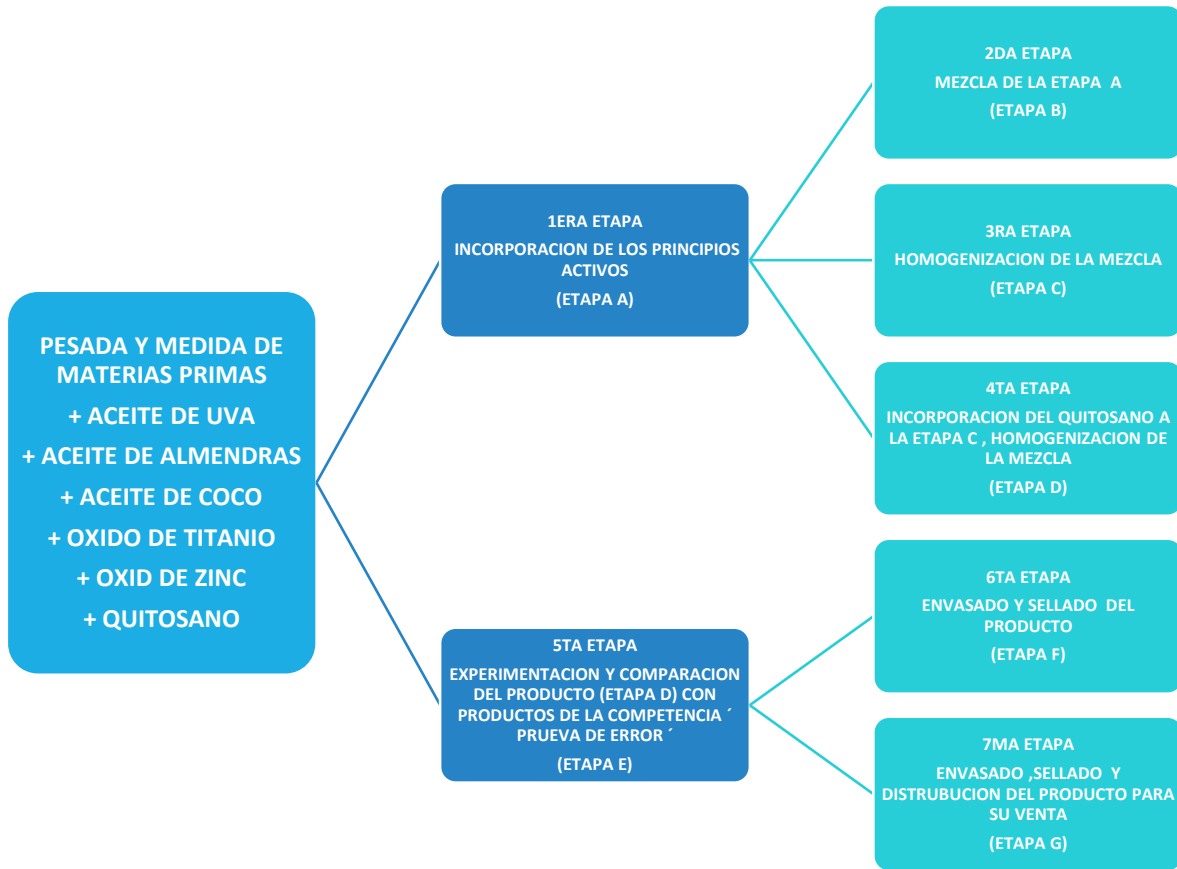
## **PARTE EXPERIMENTAL**

Uno de los principales motivos por los que debes utilizar protector solar a diario es porque ayuda a prevenir el cáncer de piel. Debes saber que existen múltiples tipos de cáncer de piel, así como diferentes causas, como el factor genético. Sin embargo, las radiaciones del sol están estrechamente ligadas con este padecimiento, así como las quemaduras solares frecuentes que puedes haber sufrido en la niñez.

Además del factor salud, utilizar protector solar todos los días contribuye a retrasar el envejecimiento de la piel. Si te proteges del exposoma todos los días, podrás retrasar que la piel se torne flácida, que aparezcan arrugas y manchas. Recuerda que existen otros factores que ocasionan este envejecimiento, como la alimentación, factores genéticos y ambientales (contaminación) y hábitos como el tabaco.

Una de las principales preocupaciones de las mujeres y a lo que tanto temen ante una exposición prolongada al sol son las manchas que este ocasiona. Las manchas afectan a todos los tipos de piel y sí es posible tratarlas una vez que aparecen, pero lo mejor es nunca tener que hacerlo, es decir, evitar que aparezcan. Esto puedes conseguirlo cuidando tu piel con una buena crema protectora solar cómo lo es SANDUL que es un bloqueador y a la vez regenerante del tejido celular gracias a sus componentes.





## ESQUEMA DE TRABAJO Y ELAVORACION DE BLOQUEADOR SOLAR RESULTADOS

Cuando se expone a los rayos UV durante 8 horas, nuestro producto se compara con el producto de la competencia. Observamos el deterioro de la piel del producto de la competencia, ya que había desgaste en la piel, como enrojecimiento (prueba en patas de cerdo recién cortadas). Por otro lado, se observó que el protector solar creado por los estudiantes de la Universidad Fidel Velázquez no desgasta ni enrojece la piel y mejora el rejuvenecimiento de la piel, optando por nuestro producto como una buena opción ante la exposición al sol.

Proteger la piel y corregir errores? Esto es posible con SANDUL BLOQUEADOR SOLAR. Se trata de un producto que pertenece a la nueva generación de fotoprotección diaria. Y no solo protege, sino que corrige los daños ya existentes en la piel. No es como todos los protectores solares, sino que tiene una textura muy ligera que hidrata la piel durante 24 horas mientras la cuida.

Este producto limita los daños de la piel ocasionados por los rayos UVB/UVA, IR-A y la contaminación ambiental. Protege también del estrés oxidativo. También corrige las arrugas, manchas y la flacidez visible gracias a sus activos: aceites y quitosano.

## CONCLUSIONES

En conclusión, el protector solar obtenido se acondicionó sin problema, no presentó grumos, no aspecto graso, su aspecto fue semilíquido, lo que favorecía diferentes tipos de piel, permitiendo verificar las propiedades que ayudan a la piel a cicatrizar, disminuye la sequedad, aumentan el cuidado de la piel, con un toque aclarante y regenerativo. Proporcionaron los ingredientes, dando una excelente cobertura para la protección contra los rayos UV y UVA.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cázares, J. P. C., Álvarez, B. T., González, G. V., & Pérez, A. E. (2013). In vitro evaluation of the UV protection of prescription sunscreens in Mexico. *Medical Gazette of Mexico*, 149(3), 292-298.

[http://anmm.org.mx/GMM/2013/n3/GMM\\_149\\_2013\\_3\\_292-298.pdf](http://anmm.org.mx/GMM/2013/n3/GMM_149_2013_3_292-298.pdf)

App, T. (2021, June 18). The importance of sunscreen on the skin | TelepharmacyApp. Telepharmacy App. Retrieved January 25, 2023, from <https://telefarmaciaapp.com/importancia-protector-solar/>

Arteaga, J., Ocampo, L., Ospina, D., & Mejía, M. (2014). Manufacture and evaluation of a sunscreen based on titanium dioxide, oils and fruit extracts. *Colombian Magazine of Materials*, (5), 146-151.

(2022, May 27). The chemistry of sunscreens. *Quimicafacil.net*. <https://quimicafacil.net/notas-de-quimica/la-quimica-de-los-bloqueadores-sociales/>

Khalil K., H., & Naeem, M. (nd). Introduction to biomaterials and Scalfolds by Tissue Engineering. In A. Haider, & S. Haider, *Biomaterial Fabrication Techniques* (pp. 30-34). Bentham Science Publishers LTD.

Sarabia-Bañuelos, P., Mendoza-García, D., & & et al. (June 8, 2015). Comprehensive use of crustaceans: obtaining chitin and chitosan. Mexico, Mexico, Mexico.

Solís, Y., & et al. (sd from 2010 sd). *Materials composed of chitosan and hydroxyapatite*. Havana, La Habana, Cuba.

## ACTIVIDAD GASTROPROTECTORA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE *HELIOTROPIMUM INDICUM* EN EL MODELO DE LESIONES GÁSTRICAS INDUCIDAS CON ETANOL

Paola Janette González Cruz, Arantza Valdivia Salas, María Elena Sánchez Mendoza

Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.  
mesmendoza@hotmail.com

### RESUMEN

La úlcera péptica es una de las enfermedades gastrointestinales más frecuentes que afecta aproximadamente del 5 al 10% de la población a nivel mundial en alguna etapa de su vida. Existen diversos factores asociados a su etiología, que generan un desequilibrio entre los factores agresivos (ácido clorhídrico, pepsina, y especies reactivas de oxígeno) y los factores protectores de la mucosa gástrica (barrera de moco, flujo sanguíneo y sistema antioxidante). Actualmente existen diversos fármacos para su tratamiento que incluyen a los antisecretores, análogos de prostaglandinas y antiácidos. Los más eficaces son los inhibidores de la bomba de protones, sin embargo, su uso crónico produce efectos adversos, como daño neurológico, anemia, infarto del miocardio y cáncer pancreático, por lo que, existe la necesidad de una terapia alternativa más segura con menos efectos adversos. Las plantas medicinales se han utilizado desde la antigüedad para tratar diversas enfermedades y se ha demostrado que algunas de ellas son eficaces contra las úlceras gástricas. En nuestro país, en el estado de Chiapas se utiliza la planta *Heliotropium indicum*, conocida de manera popular como cola de alacrán, para tratar la úlcera gástrica. En un estudio previo, nuestro grupo de trabajo aisló un compuesto activo a partir del extracto de diclorometano de dicha planta. Por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar la actividad gastroprotectora del extracto hexánico a través de un estudio biodirigido. El extracto hexánico de *Heliotropium indicum* se preparó empleando la extracción vía maceración, utilizando las partes aéreas de la planta. El extracto hexánico fue evaluado a las dosis de 30 y 100 mg/kg (vía oral) en el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol (0.2 mL, vía oral) en ratón. Se obtuvieron valores de gastroprotección de 59.6 y 95.20%, a las dosis de 30 y 100 mg/kg, respectivamente. El extracto hexánico fue separado por cromatografía en columna y se obtuvieron 5 fracciones, utilizando hexano y mezclas de hexano/acetato de etilo en diferentes proporciones (9:1, 8:2, 7:3 y 5:5). Todas las fracciones se evaluaron a la dosis de 100 mg/kg, y produjeron una gastroprotección mayor a 50%. La actividad de las fracciones fue comparada con un fármaco de referencia que fue carbenoxolona, a la dosis de 100 mg/kg. Se encontró diferencia significativa entre las fracciones F3 y F4 con carbenoxolona, lo que indica que dichas fracciones son más activas que el fármaco de referencia. Se concluye que el extracto hexánico de *Heliotropium indicum* ejerce actividad gastroprotectora en el modelo de lesiones causadas por etanol en ratón, y que contiene más de un compuesto activo.

### INTRODUCCIÓN

La úlcera gástrica es la enfermedad más común del tracto digestivo y tiene una prevalencia del 10-15% en la población mundial (1). Ocurre como consecuencia de la acción del jugo gástrico y la pepsina sobre la mucosa del estómago (2). Su etiología se asocia con un desequilibrio entre los factores de protección gástrica y los factores agresivos sobre el epitelio de la mucosa. Dentro de los factores protectores se encuentran la capa de moco-bicarbonato, el sistema antioxidante, las prostaglandinas y el óxido nítrico (NO). Mientras que los factores agresivos incluyen el estrés físico, el consumo crónico de tabaco y alcohol, ciertos tipos de medicamentos (particularmente los fármacos antiinflamatorios no esteroideos) e infección por *Helicobacter pylori* (3). Actualmente, existen dos enfoques principales para el tratamiento de la úlcera gástrica (4). En el primer enfoque se encuentran los fármacos antisecretores (como antagonistas del receptor de histamina-2 y los inhibidores de la bomba de protones), cuyo objetivo es reducir la producción de ácido gástrico y en el segundo los fármacos análogos de prostaglandinas (5) que refuerzan la protección de la mucosa gástrica (4). Los más utilizados son los inhibidores de la bomba de protones, sin embargo, el uso prolongado de ellos produce efectos adversos como daño neurológico, anemia, infarto del miocardio y cáncer pancreático, por lo que, existe la necesidad de una terapia alternativa (2). Las plantas medicinales se han utilizado desde la antigüedad para tratar diversas enfermedades y en la actualidad se

considera que el 80% de la población de la mayoría de los países en desarrollo depende de las plantas medicinales para sus necesidades de atención primaria de la salud (4). La Organización Mundial de la Salud estima que de un total de 422,000 plantas con flor reportadas a nivel mundial se utilizan más de 50,000 con fines medicinales (4). No obstante, existe una amplia necesidad de estudios científicos de plantas para descubrir compuestos bioactivos que puedan ser alternativos a los medicamentos existentes (3).

En el caso del tratamiento de la úlcera gástrica se ha demostrado la eficacia de algunas plantas medicinales, y algunas de ellas han resultado comparables o superiores a fármacos como el omeprazol o cimetidina, tanto en estudios en modelos con animales como en ensayos clínicos (6). En el caso de la planta de este estudio, *Heliotropium indicum*, utilizada en el estado de Chiapas con ese propósito, nuestro grupo de trabajo aisló un compuesto con actividad gastroprotectora en el modelo de etanol en ratón a partir del extracto de diclorometano (2). Sin embargo, el extracto hexánico de *Heliotropium indicum* no había sido estudiado, por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar su actividad gastroprotectora en el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol en ratón.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Animales

Se utilizaron ratones CD1 de un peso de entre 25 a 30 g, los cuales se mantuvieron en ayuno de 24 h antes de iniciar las diferentes evaluaciones. En cada etapa experimental se utilizaron 7 animales por grupo. El cuidado y manejo de los animales se realizó conforme a los lineamientos que señala la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

### Material vegetal

El material vegetal se colectó en julio de 2021 en Copainalá en el estado de Chiapas, México, y posteriormente un ejemplar fue identificado en el Jardín Botánico del estado de Chiapas y se le asignó el número de registro de 27855.

### Preparación del extracto hexánico de *Heliotropium indicum*

La planta fue secada en la sombra a temperatura ambiente, una vez seca se molió en un molino manual y se colocó en un garrafón de vidrio para su extracción con hexano a través del proceso de maceración. El disolvente estuvo en contacto con el material vegetal por un periodo de tres días, al cabo de dicho tiempo el disolvente se filtró y se concentró en un rotaevaporador, y posteriormente el proceso se repitió dos veces más. Una vez obtenido el extracto hexánico, este fue evaluado en el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol en ratón.

### Obtención de fracciones

El extracto hexánico fue separado por cromatografía en columna y se obtuvieron 5 fracciones. Como fase móvil se utilizó hexano y mezclas de hexano/acetato de etilo en proporciones de: 9:1, 8:2, 7:3, y 5:5.

### Preparación biológica

El extracto, las fracciones, el fármaco de referencia (carbenoxolona) y/o vehículo fueron administrados oralmente (0.1 mL/10 g) a los ratones, conforme al experimento correspondiente. Treinta minutos después, se les administró 0.2 ml de etanol vía oral, y dos horas después los animales fueron sacrificados en una cámara de CO<sub>2</sub>. Se realizó la disección de los estómagos y fueron llenados con formalina al 2% por 5 minutos. Posteriormente, los estómagos se abrieron por la curvatura mayor, para cuantificar las lesiones gástricas con ayuda de un microscopio estereoscopio provisto de un micrómetro ocular. Las lesiones gástricas se determinaron obteniendo el índice de úlcera en mm<sup>2</sup> y también se calculó el porcentaje de gastroprotección con la fórmula de:

$$\% \text{ gastroprotección} = (IUC - IUT) \times 100 / IUC$$

donde IUC es el promedio del índice de úlcera del grupo control y IUT es del grupo experimental (7).

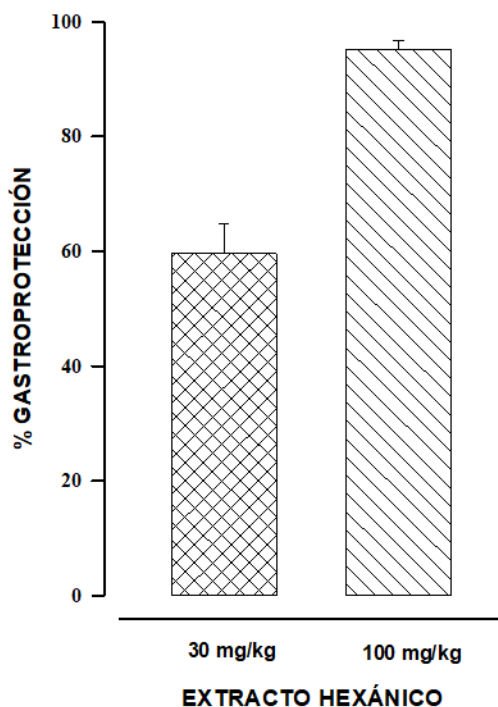
### Estadística

Los datos se expresaron como media  $\pm$  EEM de 7 animales por grupo. Las diferencias entre los grupos tratados se analizaron por la prueba de ANOVA seguida de la prueba de Dunnett. Se consideró una diferencia estadística con un valor de  $p \leq 0.05$ .

## RESULTADOS

### EVALUACIÓN DEL EFECTO GASTROPROTECTOR DEL EXTRACTO HEXÁNICO

El extracto hexánico de *Heliotropium indicum* se evaluó a las dosis de 30 y 100 mg/kg, los resultados se muestran en la gráfica 1, donde se observa que el extracto presentó actividad en ambas dosis evaluadas.



Gráfica 1. Efecto gastroprotector del extracto hexánico de *Heliotropium indicum*

### EVALUACIÓN DE LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO HEXÁNICO

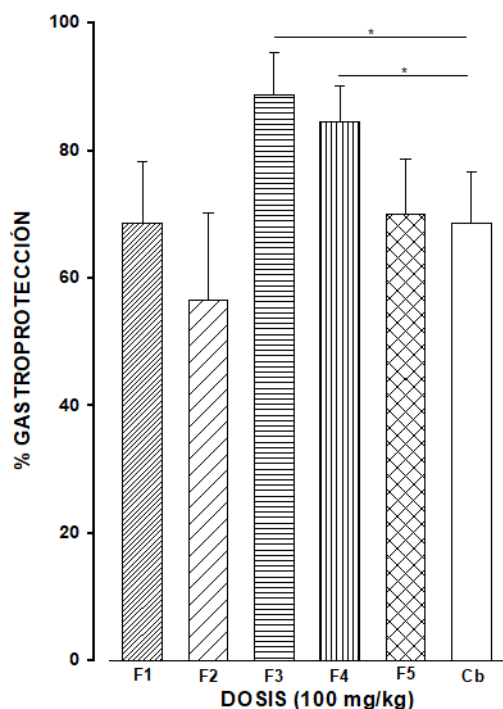
El extracto hexánico fue separado por cromatografía en columna y todas las fracciones indujeron una gastroprotección mayor al 50%, a la dosis de 100 mg/kg (Gráfica 2). Las fracciones F3 y F4, fueron estadísticamente significativas respecto a carbenoxolona (Gráfica 2).

## DISCUSIÓN

La investigación de plantas medicinales en el tratamiento de la úlcera gástrica ha tenido gran interés y evidencia de ello es el reporte de estudios tanto clínicos como experimentales. En algunos casos se ha demostrado que las plantas medicinales exhiben un beneficio terapéutico en el tratamiento de la úlcera gástrica con pocos efectos adversos (6). Dentro de las plantas estudiadas en modelos *in vivo* se encuentra *Heliotropium indicum*, de la cual se ha aislado a partir del extracto de diclorometano a uno de los compuestos responsables de la actividad gastroprotectora que es el: (E)-Etil-12-ciclohexil-4,5-dihidroxiodec-2-enoato (2). Por lo que este trabajo se enfocó en el estudio del extracto



hexánico de *Heliotropium indicum*, con la intención de demostrar si también ejercía actividad gastroprotectora.



Gráfica 2. Efecto gastroprotector de las fracciones del extracto hexánico de *Heliotropium indicum* y carbenoxolona (Cb). F1: hexano, F2: hexano/AcOEt (9:1), F3: hexano/AcOEt (8:2), F4: hexano/AcOEt (7:3) y F5: hexano/AcOEt (5:5). \* $p < 0.05$  ANOVA seguida de Dunnett.

La actividad biológica se determinó utilizando el modelo de inducción de lesiones gástricas por la administración de etanol. Dicho modelo es de gran utilidad para la identificación de potenciales compuestos con actividad citoprotectora. Se ha descrito que el etanol ejerce efectos dañinos en la mucosa gástrica al solubilizar el moco protector exponiendo el tejido a las acciones del ácido clorhídrico y la pepsina, lo que lleva a la muerte celular. El etanol también genera radicales libres y reduce el flujo sanguíneo produciendo lesiones microvasculares (8). Los resultados indicaron que el extracto hexánico protegió los estómagos del daño inducido con etanol y todas las fracciones obtenidas fueron activas ya que protegieron más del 50%, lo que sugiere que el extracto hexánico está constituido por más de un compuesto activo. Las fracciones F3 y F4 fueron más activas que el fármaco de referencia a 100 mg/kg, lo que indica que son más eficaces que la carbenoxolona. Se ha reportado que la planta contiene diversos compuestos como taninos, saponinas, esteroides, aceites y glicósidos (2), y para compuestos de tales grupos químicos se ha reportado actividad gastroprotectora (9-11). Por lo anterior, los resultados obtenidos sientan las bases para continuar con la purificación de dichas fracciones, con la finalidad de aislar e identificar los compuestos activos.

## CONCLUSIONES

El extracto hexánico de *Heliotropium indicum* ejerce actividad gastroprotectora en el modelo de lesiones causadas por etanol en ratón. En el fraccionamiento cromatográfico del mismo se encontró que las cinco fracciones ejercen actividad gastroprotectora mayor al 50%, lo que sugiere que el extracto hexánico contiene más de un compuesto activo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. M. Abreu Miranda, M. Lemos, K. Alves Cowart, D. Rodenburg, J. McChesney, M.M. Radwan, N.A. Furtado, J. Kenupp Bastos, "Gastroprotective activity of the hydroethanolic extract and isolated compounds from the leaves of *Solanum cernuum* Vell". *J Ethnopharmacol.*, Vol.172, 2015, pp. 421–429.
2. Y. López-Lorenzo, M.E. Sánchez-Mendoza, D. Arrieta-Baez, A.G. Perez-Ruiz, J. Arrieta, "Gastroprotective activity of (*E*)-ethyl-12-cyclohexyl-4,5-dihydroxydodec-2-enoate, a compound isolated from *Heliotropium indicum*: role of nitric oxide, prostaglandins, and sulfhydryls in its mechanism of action", *Pharm Biol.*, Vol. 60, 1, 2022, pp.1207-1213.
3. A.M. Mousa, N.M. El-Sammad, S.K. Hassan, A.E.N. Madboli, A.N. Hashim, E.S. Moustafa, S.M. Bakry, E.A. Elsayed, "Antiulcerogenic effect of *Cuphea ignea* extract against ethanol-induced gastric ulcer in rats". *BMC Complement Altern Med.*, Vol. 19, 1, 2019, pp. 345.
4. T.K. Motawi, M.A. Hamed, R.M. Hashem, M.H. Shabana, R.H. Ahmed, "Protective and Therapeutic Effects of *Argyrea speciosa* against Ethanol-Induced Gastric Ulcer in Rats". *Naturforsch.*, Vol. 67 c, 2012, pp. 47–57.
5. M.K. Tolbert, "Gastroprotective Therapy", *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, Vol. 51, 1, 2021, pp. 33-41.
6. W.P. Bi, H.B. Man, M.Q. Man, "Efficacy and safety of herbal medicines in treating gastric ulcer: a review". *World J Gastroenterol.*, Vol. 20, 45, 2014, pp. 17020–17028.
7. M.E. Sánchez-Mendoza, Y. López-Lorenzo, L. Cruz-Antonio, D. Arrieta-Baez, M.C. Pérez-González, J. Arrieta, "First Evidence of Gastroprotection by *Schinus molle*: Roles of Nitric Oxide, Prostaglandins, and Sulfhydryls Groups in Its Mechanism of Action", *Molecules.*, Vol. 27, 21, 2022, pp.7321.
8. M.B. Adinortey, C. Ansah, I. Galyuon, A. Nyarko, "In vivo models used for evaluation of potential antigastroduodenal ulcer agents", *Ulcers.*, Vol. 2013, 2013, pp. 12.
9. M. Yoshikawa, T. Morikawa, N. Li, A. Nagatomo, X. Li, H. Matsuda, "Bioactive saponins and glycosides. XXIII. Triterpene saponins with gastroprotective effect from the seeds of *Camellia sinensis*--theasaponins E3, E4, E5, E6, and E7". *Chem Pharm Bull (Tokyo).*, Vol. 53, 12, 2005, pp.1559-1564.

10. Y.T. Cheng, C.C. Lu, G.C. Yen, "Beneficial Effects of Camellia Oil (*Camellia oleifera* Abel.) on Hepatoprotective and Gastroprotective Activities". *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*., Vol. 61. Suppl: S100-S102, 2015.
11. G.M. Vieira Júnior, C.Q. da Rocha T. de Souza Rodrigues, C.A. Hiruma-Lima, W. Vilegas, "New steroidal saponin and antiulcer activity from *Solanum paniculatum* L". *Food Chem.*, Vol. 186, 2015, pp.160-167.

## IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN FRUTOS PRESENTES DE *SECHIUM EDULE* (JACQ.) SW. Y SU DINÁMICA FARMACOCINÉTICA

Eugenia Elisa Delgado-Tiburcio <sup>1</sup>, Ramón Marcos Soto-Hernández <sup>2</sup>, Itzen Aguiñiga-Sánchez <sup>2</sup>, Jorge Cadena-Iñiguez, <sup>1</sup> Lucero del Mar Ruiz-Posadas <sup>1</sup> e Israel Castillo-Juárez <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados, <sup>2</sup>Facultad de Medicina, FES Zaragoza, UNAM.  
delgado.eugenia@colpos.mx.

### RESUMEN

Recientemente un híbrido de *Sechium edule* denominado H-387-07-GiSeM® ha demostrado su potencial como agente antiproliferativo, citotóxico y apoptótico en líneas celulares cancerígenas como leucemia y cáncer de mama, lo que principalmente esta atribuido por el contenido fitoquímico de fenoles, flavonoides y cucurbitacinas dentro del extracto. Por ello, las especies de plantas productoras de estos compuestos tienen un gran potencial para desarrollar terapias alternativas en las que se utilicen mezclas complejas o extractos orgánicos para el tratamiento de cáncer, sin embargo, para mejorar los diseños en el régimen de dosificación en la producción de un fármaco, es necesario realizar evaluaciones preclínicas en los que se determinen diversos parámetros farmacológicos. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar algunos parámetros farmacocinéticos por HPLC del contenido de cucurbitacinas, fenoles y flavonoides procedente del extracto de H-387-07-GiSeM®, luego de la administración oral en ratones, así como también se compararon la caracterización fitoquímica de los segregantes 387M20 y 387M16 provenientes del híbrido H-387-07-GiSeM® para futuros bioensayos y evaluaciones farmacológicas.

### INTRODUCCIÓN

El consumo de plantas medicinales ha tenido un papel significativo en los últimos años, ya sea con fines preventivos o curativos, atributo principalmente dado por la presencia de fitoquímicos como cucurbitacinas, fenoles y flavonoides. Recientemente, la especie comestible *Sechium edule* ha cobrado relevancia en su caracterización fitoquímica por el contenido de algunos de estos metabolitos (Aguiñiga-Sánchez, 2017), ya que su presencia, está relacionada con su capacidad antineoplásica en diferentes líneas celulares de cáncer como HeLa (Salazar-Aguilar et al., 2017), capacidad antioxidante (Aguiñiga-Sánchez et al., 2015), antihipertensivo (Aguiñiga-Sánchez et al., 2015, Gordon et al., 2000), antimicrobiano (Ordoñez et al., 2003), nefroprotectores (Firdous et al., 2012), antiinflamatorio y efecto cardíaco (Salama et. al., 1986).

Por ello, el grupo interdisciplinario de investigación de *S. edule* en México (GiSeM) desarrollo un híbrido a partir del grupo varietal *virens levis* y *amarus sylvestris* dando como resultado el híbrido *Sechium* H387, poseyendo incluso una estabilidad mayor en cuanto al contenido de sus metabolitos que el de los progenitores (Cadena-Iñiguez et al., 2007), ya que estudios realizados por Aguiñiga-Sánchez, (2017) demostraron que este híbrido posee efectos antiinflamatorio y antioxidante, además de antitumoral, con capacidad de inhibir hasta mil veces más células tumorales con respecto a especies comestibles del género *Sechium*. por lo que esto, denota la importancia de obtener segregantes a partir del híbrido *Sechium* H 387, ya que, al obtener una progenie de mayor biodiversidad, es posible encontrar, alguna característica de interés en estudios antineoplásicos.

Bajo este esquema, el híbrido *Sechium* H 387 podría tener un gran potencial para desarrollar terapias alternativas en las que se utilicen mezclas complejas o extractos orgánicos. Sin embargo, es necesario conocer los intervalos de dosificación y los parámetros farmacológicos para lograr su aplicación (Rao et al., 2019; Turfus et al., 2017). Sin embargo, hasta el momento no se cuentan con ensayos farmacocinéticos que permitan conocer la eficiencia de este extracto en un sistema biológico. En ese sentido, resulta importante evaluar la farmacocinética de extractos de *Sechium* H 387 así como ampliar estos estudios hacia genotipos que son productos segregantes de este híbrido, ya que la obtención de progenie con mayor biodiversidad aumenta la posibilidad de encontrar

características de interés en estudios antineoplásicos, lo que finalmente permitiría diseñar mejores tratamientos como futuro fitofármaco.

## PARTE EXPERIMENTAL

Para este estudio se trabajó con el material biológico del híbrido *Sechium* H 387 y el segregante derivado del mismo 387 M16 del Banco Nacional de Germoplasma de *Sechium edule* en México (Cadena Iñiguez et al., 2011). Los frutos fueron colectados en madurez hortícola a los  $18 \pm 2$  días posterior de la antesis (Cadena-Iñiguez et al., 2007), el material biológico se lavó, seco pesará y rebano el exocarpo, mesocarpo, espinas y semilla, posteriormente se secó a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un horno con circulación de aire (BLUE-M, electronic company/blue Island, Illinois, USA.) hasta su deshidratación completa. Después se molieron hasta obtener un tamaño de partícula de 2 mm, esto se pesó y se calculó el porcentaje de rendimiento del material biológico.

### Dilución del extracto

Se realizó una extracción discontinua para los genotipos segregantes de *Sechium* H 387 al sumergir 1.5 kg del macerado en metanol por 48 horas a temperatura ambiente. Después de ese tiempo se cambió el solvente, para ello, se filtró con papel Whatman No.1 y evaporara en un rotaevaporador (IKA® RV10, control automático/BUCHI R-114 Switzerland) a  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ , este procedimiento se repitió varias veces hasta que el solvente se tornó incoloro. Los extractos obtenidos se mantendrán en frascos ámbar a temperatura ambiente. Finalmente se calculó el porcentaje de rendimiento para cada uno de los extractos y de los genotipos.

### Análisis colorimétrico y por cromatografía en capa fina (CCF)

Para las pruebas preliminares se colocó 0.5 mL de las muestras en tubos de ensayo, en el caso de alcaloides fue necesario utilizar estándares de la planta *E. coralloides* como control de muestra positiva. Posteriormente se mezcló con 2 mL de HCL a 1% en H<sub>2</sub>O, se metieron en baño caliente por 20 min y una vez atemperado se agregó 4 gotas del reactivo de Dragendorff, donde el control positivo desarrolló un color naranja. En el caso de saponinas se colocó como positivo un extracto ya estandarizado de saponinas y se tomó 1.5 mL de la solución A y 1.5 mL de la solución B, después se colocó 0.5 mL de una mezcla de la solución y después 0.5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 5%, posterior a ello se dejaron hervir por 30 min, la prueba positiva se representó con un precipitado color rojo.

Para el caso de taninos, se consideró como control positivo ácido gálico, se añadió 0.5 mL de agua destilada y se agitó, posteriormente se agregó unas gotas de reactivo de cloruro férrico y el resultado se corroboró con la prueba positiva mediante una coloración azul-negro o verde.

Para la determinación de flavonoides se tomó como referencia positiva a la quercetina, donde se le añadió una tira de magnesio y unas gotas de HCL concentrado y considero la prueba positiva mediante un débil color naranja de una solución efervescente. En la metodología de terpenos, se colocó como control positivo ácido ursólico, las muestras fueron colocadas en baño María hasta su evaporación después de ello, estas se resuspendieron en gotas de cloroformo y se realizó la prueba de Liberman la cual consistió en la aplicación de 4 gotas de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y 4 gotas de anhídrido acético. El resultado final se comparó mediante una coloración azul oscuro o verde.

### Análisis de 2,2-difenil-picrilhidrazil (DPPH)

Para determinar la actividad del DPPH, se realizó una solución de 0.1 mM de DPPH (Sigma-Aldrich) preparada en metanol con dos repeticiones por cada muestra en cinco diferentes concentraciones (30, 20, 10, 5 y 2.5 mg mL<sup>-1</sup>). La absorbancia inicial del DPPH en metanol se midió a 517 nm; en seguida se tomaron 500 µL de las diferentes concentraciones y colocaran en tubos de ensayo, a los cuales se les adicionara 500 µL de metanol y 2 mL de la solución de DPPH. La decoloración fue medida a 517 nm, después de una incubación por 30 min a  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  en oscuridad, en un espectrofotómetro. El porcentaje de DPPH (% DPPH) se calculó empleando la fórmula:  
$$\% \text{ DPPH} = (A_{\text{Control}} - A_{\text{muestras}}) \times 100 / A_{\text{control}}$$



Dónde: AControl (DPPH 0.1 mM) es la absorbencia del control, y Amuestras es la absorbancia de la muestra.

#### Manejo de ratones

Para la determinación de diversos parámetros farmacocinéticos, se utilizaron ratones hembras (*Mus musculus* L.) de la cepa CD-1 con alrededor de 12 semanas de edad y un peso de ~30 g, los cuales fueron proporcionados por el bioterio en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los ratones estuvieron acondicionados con agua estéril y alimento estándar ad libitum hasta el tratamiento.

#### Tratamiento de ratones.

Los ratones (n=4 ratones por dosis) fueron tratados con el extracto del híbrido de H387, en tiempos establecidos de 0, 1, 0.5, 2, 6, 24 y 48 h por vía gástrica en dosis de 0, 8, 125 y 250 mg kg<sup>-1</sup>.

#### Evaluación farmacocinética

Antes del sacrificio los ratones fueron pesados y el valor fue registrado, para la obtención de suero sanguíneo los ratones fueron anestesiados con 0.3 mg kg<sup>-1</sup> de pentobarbital sódico. Una vez anestesiados, se tomó sangre del plexo axilar de cada ratón y este se recuperó en tubos vacutainer para suero, posteriormente se centrifugó durante 5 min a 3000 rpm. Una vez obtenido el suero del paquete globular, estos fueron almacenados en el ultracongelador para su posterior valoración por HPLC.

A su vez, también fueron llevado a cabo los análisis de distribución, metabolismo y excreción para ello, una vez que el ratón se sacrificó a través de la recolección en cada muestra de sangre, se extrajo cuidadosamente el corazón, hígado, riñones, bazo y cerebro, así como también hubo recolección de la orina.

Los órganos fueron limpiados con PBS y se hizo un registro de su peso. Finalmente, las muestras de órganos, sangre y orina fueron almacenados en el ultracongelador para su posterior evaluación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

#### Identificación de metabolitos secundarios por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)

En este proceso se pesaron 20 mg de cada extracto y se diluyó en 1 mL de metanol grado HPLC (Sigma- Aldrich, USA), los cuales fueron filtradas con una membrana de 0.22 µm (Millipore, Irlanda) y puestas en viales de tipo HPLC. Las muestras se analizaron por HPLC para cada extracto y cada grupo de metabolitos.

## RESULTADOS

#### Comparación de los metabolitos secundarios del extracto de H 387 y 387 M16

El extracto crudo del híbrido *Sechium* H387 denoto mayor porcentaje de rendimiento con un 28.4 % frente a un 19.44 % de 387 M16, lo que se correlaciona, con valores anteriormente reportado del híbrido con una diferencia casi del 1% (Aguñiga-Sánchez, 2017). Siendo además que la cuantificación de metabolitos secundarios es mayor en el híbrido de *Sechium* H387 con respecto con los identificados para 387 M16.

En 387 M16 no hubo contenido de florizina, naringenina o fletina, mientras que Aguiñiga- Sánchez (2017) detecto H 387 hasta 0.0165 mg g<sup>-1</sup> de extracto de florizina, 3.304 mg g<sup>-1</sup> de extracto de naringenina y 4.616 mg g<sup>-1</sup> de extracto de fletina, en el caso de la rutina, mirecitina, quercetina 387 M16 solo detecto 5.94x10<sup>-6</sup>, 3.82x10<sup>-6</sup>, 3.20x10<sup>-6</sup> mg g<sup>-1</sup> de extracto respectivamente a diferencia de H 387 con 1.273, 0.889 y 0.005 mg g<sup>-1</sup> de extracto. En promedio se ha reportado un promedio de

hasta 32.40 mg g<sup>-1</sup> de extracto de flavonoide (Aguñiga-Sánchez, 2017) frente a 0.003 mg g<sup>-1</sup> de extracto en 387 M16, reportando en este trabajo, siendo además que en el segregante se detectó concentraciones apenas detectables de Cucurbitacina B (CuB), Cucurbitacina D (CuD) y Cucurbitacina (CuI), en comparación con su progenitor donde se ha descrito la presencia de CuB, CuD, Cucurbitacina E (CuE) y CuI.

Análisis preliminar y por cromatografía en capa fina (CCF)

Las pruebas preliminares, denotaron la presencia en los frutos de *S. edule* de los segregantes de 387 M20, 387 M16 de metabolitos secundarios como fenoles, flavonoides, saponinas, terpenoides, específicamente de la familia de las cucurbitacinas B, D, I y E y la ausencia de taninos y alcaloides para ambos genotipos, así como la escasa o nula presencia de estos metabolitos secundarios para el segregante 387 M 20 proveniente de callo.

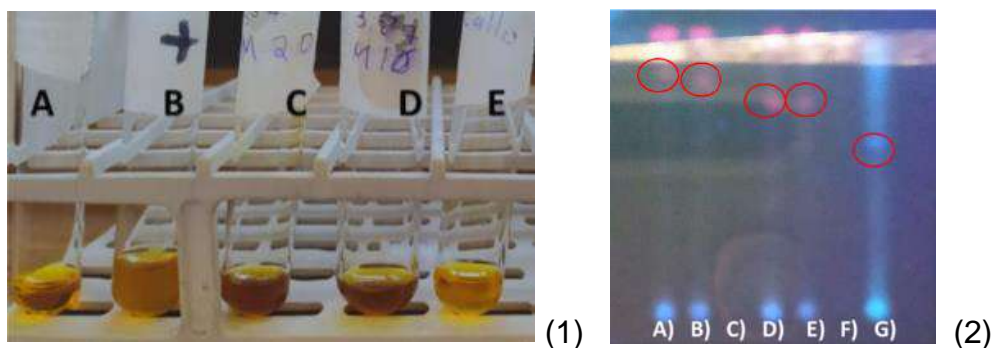


Figura. 1 (1) Resultado de las muestras de los diferentes segregantes de *S. edule* de alcaloides donde: A) corresponde al control negativo, B) el control positivo, C) 387 M20, D) 387 M 16 y E) callo de 387 M 20. (2) Prueba de alcaloides separados en cromatografía en capa fina en el sistema de diclorometano-metanol 9:1 y revelador dragendorff A) 387 M20 con rf de 0.71, B) 387 M16 rf de 0.72, C) muestra de callo de 387 M 20 con un rf de 0, D) repetición de 387 M20, E) repetición de 387 M 16, F) repetición de callo de 387 M 20 y G) estándar de *Lupinus* rf 0.60.

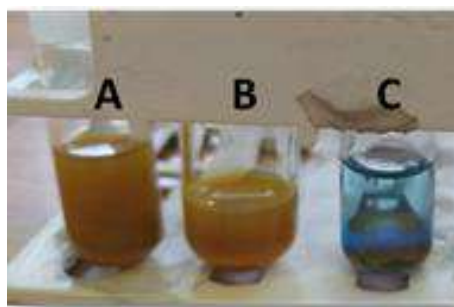


Figura. 2 Resultado de las muestras para determinar saponinas de los diferentes segregantes de *S. edule* donde: A) corresponde a 387 M20, B) 387 M 16 y C) callo de 387 M 20.

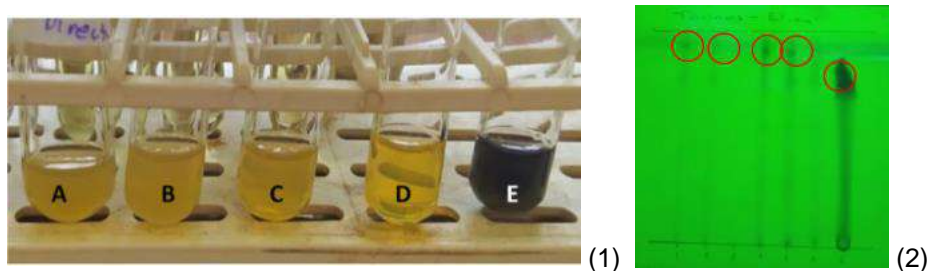


Figura. 3 Resultado de las muestras de taninos de los diferentes segregantes de *S. edule* donde: (1) corresponde a 387 M 20 B) 387 M 16, C) callo de 387 M 20 D) control negativo E) control positivo. B) (2) Prueba de taninos separados en cromatografía en capa fina en el sistema de acetato de etilo-metanol 1:1 y revelador de  $FeCl_3$  y  $Na_2CO_3$  al 20 % donde A) 387 M20 rf 0.93, B) 387 M16 rf 0.93, C) muestra de callo de 387 M 20 rf 0, D) repetición de 387 M20, E) repetición de 387 M 16, F) repetición de callo de 387 M 20 y G) estándar de ácido tánico rf 0.87.

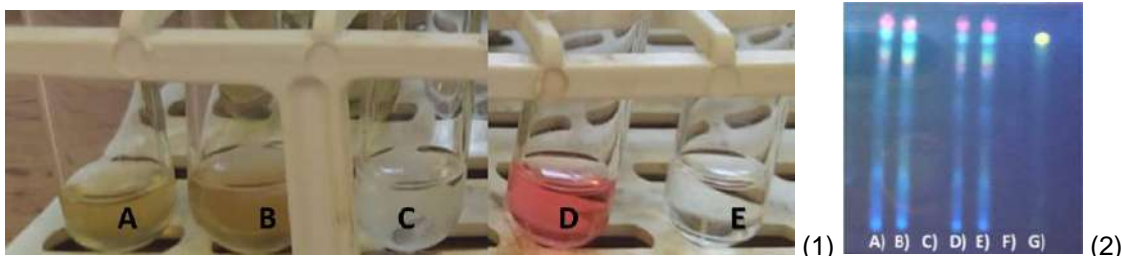


Figura. 4 Prueba para flavonoides donde (1) corresponde a 387 M 20 B) 387 M 16, C) callo de 387 M 20 D) control positivo E) control negativo. (2) Prueba de flavonoides en un sistema de acetato y revelador de NP y polietilenglicol donde A) 387 M20 rf 0.71, B) 387 M16 rf 0.72, C) muestra de callo de 387 M 20 rf 0, D) repetición de 387 M20, E) repetición de 387 M 16, F) repetición de callo de 387 M 20 y G) estándar de quercetina rf 0.70.



Figura. 8 Prueba para fenoles donde corresponde (1) 387 M 20 B) 387 M 16, C) callo de 387 M 20 D) control positivo E) control negativo. (2) Prueba de fenoles en un sistema de acetato de etilo y metanol 9:1 revelado con Folín donde A) 387 M20 rf 0.76, B) 387 M16 rf 0.76, C) muestra de callo de 387 M 20 rf 0, D) repetición de 387 M20, E) repetición de 387 M 16, F) repetición de callo de 387 M 20 y G) estándar de ácido gálico rf 0.86.

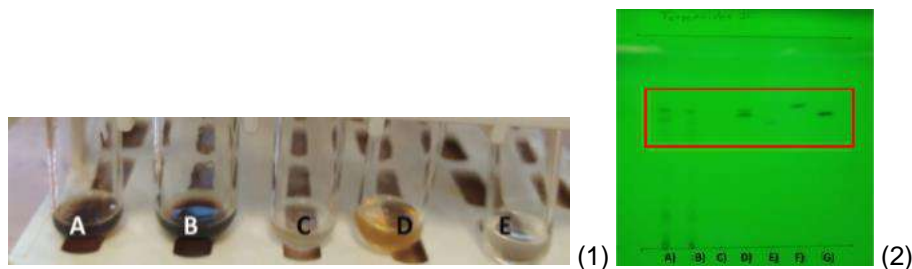


Figura. 9 Prueba para terpenos donde (1) corresponde a 387 M 20 B) 387 M 16, C) callo de 387 M 20 D) control positivo E) control negativo. (2) Prueba de terpenos en un sistema de tolueno, cloroformo y etanol 4:4:2 y revelado con vainillina donde A) 387 M20 rf 0.67, B) 387 M16 rf 0.67, C) muestra de callo de 387 M 20 rf 0, D) estándar de cucurbitacina B rf 0.66 E) estándar de cucurbitacina D rf 0.66 F) estándar de cucurbitacina E rf 0.68 y G) estándar de cucurbitacina I rf 0.65

Determinación de capacidad antioxidante (DPPH)

Para el análisis de DPPH se encontró que las primeras dosis de entre 1.5 y 3 mg mL<sup>-1</sup> se redujo la inhibición del DPPH casi a 30%, con un valor IC<sub>50</sub> del 7.14 mg/mL<sup>-1</sup>, frente a 14.18 mg/mL<sup>-1</sup> para alcanzar el efecto de inhibición en DPPH. Estos datos precisan que el segregante 386 M16 no posee características mayormente relevantes que su progenitor.

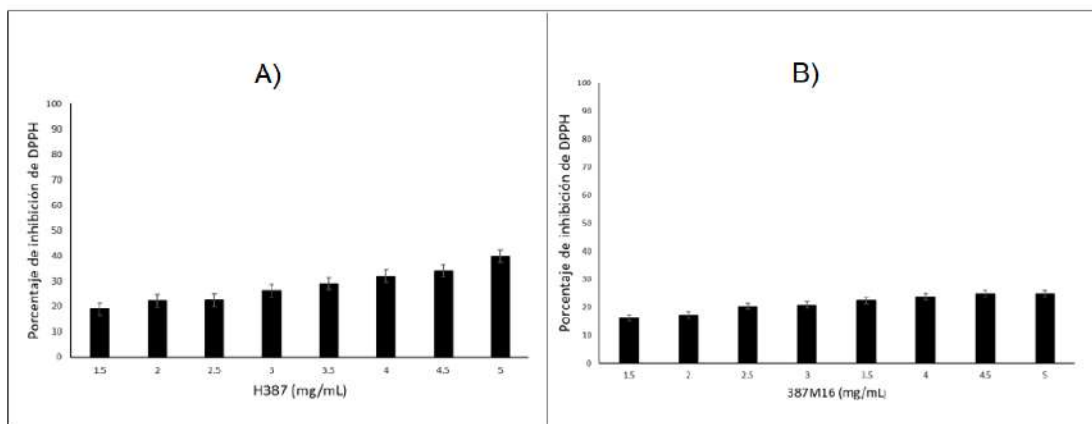


Figura. 10 Inhibición del DPPH por el extracto H 387 07 y 387 M16 (n=3 ± desviación estándar. Índice de órganos.

Al emplear la dosis de 8, 250 y 250 mg kg<sup>-1</sup> con el extracto del híbrido de *Sechium* H387 vía intraperitoneal y gástrica, se observó que el extracto administrado vía oral induce alteraciones en el tamaño del índice del cerebro, corazón, pulmones, renal, hepático timo y bazo a diferencia del control (Tukey p<0.05), lo que contrasta con los resultados del mismo extracto suministrado por vía intraperitoneal obtenidos por Aguiñiga-Sánchez (2017) en el que hubo diferencias notables en cuanto al tamaño infiriendo una posible inmunestimulación.

## CONCLUSIONES

Hasta el momento se ha obtenido resultados sobresalientes de *Sechium* H 387 en cuanto a la cantidad y contenido de metabolitos secundarios como fenoles, flavonoides, saponinas, terpenoides, específicamente de la familia de las cucurbitacinas B, D, I y E frente al segregante 387 M16 y 387 M20, sumado a una capacidad antioxidante superior del híbrido, estos resultados contribuyen a la caracterización de las variedades en *Sechium edule* para su uso potencial, sin embargo, aún se tiene previsto integrar los análisis farmacocinéticos, la determinación del número de principios activos para estudios de farmacocinética es sustancial ya que podría ayudar a mejorar el diseño de estrategias para una adecuada dosificación terapéutica como agente antineoplásico. Existe una amplia gama de especies vegetales, especialmente neotropicales, de las que se originan metabolitos, y que aún no han sido exploradas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Aguiñiga-Sánchez, (2017). Efecto antitumoral in vivo de *Sechium* P. Browne (Cucurbitaceae), Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados, México.
2. Aguiñiga-Sánchez, I., Cadena-Iñiguez, J., Santiago-Osorio, E., Gómez-García, G., Mendoza-Núñez, V. M., Rosado-Pérez, J., & Soto-Hernández, R. M. (2017). Chemical analyses and in vitro and in vivo toxicity of fruit methanol extract of *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*. *Pharmaceutical biology*, 55(1), 1638-1645.
3. Aguiñiga-Sánchez, I., Soto-Hernández, M., Cadena-Iñiguez, J., Ruiz-Posadas, L. del M., Cadena-Zamudio, J. D., González-Ugarte, A. K., Weiss Steider, B., & Santiago-Osorio, E. (2015). Fruit Extract from A *Sechium edule* Hybrid Induce Apoptosis in Leukaemic Cell Lines but not in Normal Cells. *Nutrition and Cancer*, 67(2), 250-257.
4. Cadena Iñiguez, J., Soto Hernández, M., Arévalo Galarza, M. de L., Avendaño Arrazate, C. H., Aguirre Medina, J. F., & Ruiz Posadas, L. del M. (2011). Caracterización bioquímica de

- variedades domesticadas de chayote *Sechium edule* (Jacq.) Sw. Comparadas con parientes silvestres. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 17(SPE2), 45-55.
5. Cadena, J., Arévalo, L., Avedaño, C., Soto, M., Ruíz, L., Santiago, E., Acosta, M., Cisneros, V., Aguirre, J., Ochoa, D. (2007). Production, genetics, postharvest management and pharmacological characteristics of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. *Fresh produce*, 1(1):41-53.
  6. Firdous, S., Sravanthi, K. A., Debnath, R. A., & Neeraja, K. A. (2012). Protective effect of ethanolic extract and its ethylacetate and n-butanol fractions of *Sechium edule* fruits against carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. *Int J Pharm Pharm Sci*, 4(1), 354-9.
  7. Gordon, E. A., Guppy, L. J., & Nelson, M. (2000). The antihypertensive effects of the Jamaican Cho-Cho (*Sechium edule*). *The west indian medical journal*, 49(1), 27-31.
  8. Ordoñez, A. A. L., Gomez, J. D., Cudmani, N. M., Vattuone, M. A., & Isla, M. I. (2003). Antimicrobial activity of nine extracts of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz. *Microbial ecology in health and disease*, 15(1), 33-39.
  9. Rao, T., Tan, Z., Peng, J., Guo, Y., Chen, Y., Zhou, H., & Ouyang, D. (2019). The pharmacogenetics of natural products: A pharmacokinetic and pharmacodynamic perspective. *Pharmacological Research*, 146, 104283.
  10. Salama, A. M., Polo, A. E., Contreras, C. R., & Maldonado, L. (1986). Analisis fitoquímico preliminar y determinacion de las actividades anti-inflamatoria y cardiaca de los frutos de *Sechium edule*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 15(1), 79-82.
  11. Salazar-Aguilar, S., Ruiz-Posadas, L. D. M., Cadena-Iñiguez, J., Soto-Hernández, M., Santiago-Osorio, E., Aguiñiga-Sánchez, I., Rivera-Martínez, A. R., & Aguirre-Medina, J. F. (2017). *Sechium edule* (Jacq.) Swartz, a New Cultivar with Antiproliferative Potential in a Human Cervical Cancer HeLa Cell Line. *Nutrients*, 9(8), 798.
  12. Turfus, S. C., Delgoda, R., Picking, D., & Gurley, B. J. (2017). Chapter 25—Pharmacokinetics. En S. Badal & R. Delgoda (Eds.), *Pharmacognosy* (pp. 495-512). Academic Press.



## EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LA CÁSCARA DE MANGO (*MANGIFERA INDICA* L.) VAR “KENT”

Arantxa Roa Tort, Isay Ruiz Aguilar, Ofelia Gabriela Meza Márquez, Guillermo Ismael Osorio Revilla

Instituto Politécnico Nacional, ENCB-Zacatenco.  
atxart98@gmail.com

### RESUMEN

El mango es una de las frutas tropicales más importantes del mundo y la cáscara es uno de los subproductos durante su procesamiento. Estudios señalan a la cáscara como una potencial fuente de compuestos bioactivos (fenoles, flavonoides, mangiferina, antocianinas, carotenoides y ácido ascórbico). Estos compuestos son antioxidantes, por lo tanto, tienen beneficios en la salud como protección en enfermedades crónicas, enfermedades cardiovasculares, acciones antiinflamatorias, entre otros.

El mango tiene grandes producciones en la industria, lo que implica grandes cantidades de desechos, considerando esto, el trabajo tuvo como objetivo evaluar, optimizar y concentrar los compuestos así como determinar la capacidad antioxidante de la cáscara de mango var “Kent”.

Se realizó la caracterización de los compuestos bioactivos de la cáscara fresca por medio de una extracción etanólica, posteriormente se realizó un secado con aire caliente, se molió y pasó por un tamiz (250  $\mu$ m) para la obtención de partículas homogéneas. Se llevó a cabo una extracción inicial (25°C, 80% etanol, 90 min) y se realizaron extracciones seriadas con el fin de obtener el mayor porcentaje acumulado de fenoles (mg equivalentes de ácido gálico) y flavonoides (mg equivalentes de quercetina) que son de los principales componentes en la cáscara de mango.

Posteriormente se implementó un diseño de optimización con el fin de determinar las mejores condiciones para maximizar la extracción de compuestos bioactivos (30-40°C, 50-80% etanol, 30-90 min), como resultado se observó que con dos extracciones consecutivas, baja temperatura, mayor cantidad de disolvente y mayor tiempo de extracción las cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides aumentaron respecto a la extracción inicial realizada.

Una vez que se cuantificó el extracto optimizado se realizó una concentración de éste mediante la evaporación del disolvente con un rotavapor, esto dio como resultado el aumento de flavonoides y de compuestos fenólicos así como de la actividad antioxidante debido a que existe una correlación positiva entre éstos. Por otro lado, el contenido de mangiferina, antocianinas, carotenoides y ácido ascórbico sufrieron pérdidas debido a que son sensibles a la degradación térmica provocadas por las condiciones en las que se opera el equipo de rotavapor durante la concentración del extracto (40°C, 73 mbar, 45 min).

Este trabajo demostró que la cáscara de mango var. “Kent” es una rica fuente de compuestos bioactivos, por lo que si se procesa de la manera correcta podría ser un ingrediente para dar un valor agregado a productos existentes y con ello los consumidores podrán adquirir los beneficios que estos tienen.

### INTRODUCCIÓN

Actualmente, hay una marcada tendencia en la industria de los alimentos hacia el desarrollo y fabricación de productos funcionales a partir de frutos tropicales. Los subproductos de diferentes industrias procesadoras de frutas, que tradicionalmente son tratados como contaminantes ambientales están siendo reconocidos como fuente para la obtención de componentes valiosos entre los que se encuentran los compuestos bioactivos<sup>1</sup>.

El mango es una de las frutas tropicales más importantes del mundo. La cáscara es uno de los principales subproductos durante su procesamiento y ésta constituye alrededor del 15-20% del peso

de la fruta<sup>2</sup>. La cáscara del mango proporciona energía, fibra dietética, carbohidratos, proteína y grasas, además, es buena fuente de compuestos bioactivos como compuestos fenólicos, flavonoides, antocianinas, carotenoides y ácido ascórbico. Estos compuestos fitoquímicos son antioxidantes y por ende tienen efectos benéficos en la salud como protección contra enfermedades crónicas, acciones antiinflamatorias y mejora la respuesta inmune<sup>3, 4</sup>.

## TEORÍA

Un compuesto bioactivo es aquél que tiene actividad biológica con efectos fisiológicos o celulares en un organismo vivo. Estos efectos pueden ser positivos o negativos dependiendo de la naturaleza de la sustancia, dosis y biodisponibilidad. Diversos frutos y verduras proporcionan una gama de nutrientes y diferentes compuestos bioactivos, incluidos los fitoquímicos (fenólicos, flavonoides, carotenoides, entre otros.) varios de éstos tienen efectos únicos en diferentes enfermedades crónicas como cáncer, diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, ciertas condiciones neurológicas, entre otros padecimientos<sup>5</sup>.

La industria de alimentos genera diariamente gran cantidad de subproductos, principalmente debido a la producción de jugos, jaleas, caramelos y frutas recién cortadas. Se estima que los frutos procesados pueden generar subproductos que comprenden aproximadamente del 30 al 90% de éstos, sin embargo, los subproductos pueden tener cantidades considerables de componentes bioactivos, como compuestos fenólicos, carotenoides, vitaminas, fibra, entre otros. Estos subproductos pueden ser procesados para extraer los compuestos bioactivos y utilizarlos como ingredientes para producir alimentos funcionales, nutraceúticos o bebidas funcionales que otorguen beneficios a la salud<sup>6</sup>.

El mango es una de las frutas más populares y apreciadas en el mundo, principalmente por sus excelentes características sensoriales de sabor, aroma y coloración atractiva. En México, el mango se encuentra entre las tres frutas más consumidas, después del plátano y la manzana<sup>7</sup> y es el principal exportador de este fruto. El mango es una drupa cuya forma y color de la cáscara varía según la variedad, la pulpa es de color amarillo-anaranjado, es bastante jugosa y aromática<sup>8</sup>.

La semilla es central, plana, grande, la epidermis es lisa, punteada con lenticelas, bastante delgada pero resistente. La coloración de la fruta puede ser homogénea o parcial y depende de la variedad, de las cuales las principales en México son: Ataulfo, Manila, Haden, Tommy Atkins, Kent y Keit (Figura 1)<sup>7</sup>.



Figura 1. Principales variedades del mango.

Entre los diferentes cultivares de mango, “Kent” (Figura 1) es uno de los más aceptables para los consumidores, debido a sus buenos atributos sensoriales y atractivo color, esta variedad es de forma oval y base redonda, de 11 a 13 centímetros de largo, su peso oscila de 480 a 650 g, madura en color rojo y amarillo, contiene poca fibra y es sabor dulce. Es una de las principales variedades que se comercializa en México (24%) por debajo de la variedad “Tommy Atkins” (49%). Esta variedad se destina principalmente al mercado nacional y a la industria<sup>7,9,10</sup>.

Uno de los factores decisivos en la valorización del consumo de mango es la exploración de su calidad funcional, que se relaciona a su alto contenido de compuestos bioactivos y alta actividad antioxidante tanto en la pulpa como en la cáscara<sup>8</sup>.

La cáscara del mango proporciona energía, fibra dietética, carbohidratos, proteína y grasas, además son ricas en fitoquímicos como compuestos fenólicos, flavonoides, carotenoides y ácido ascórbico.

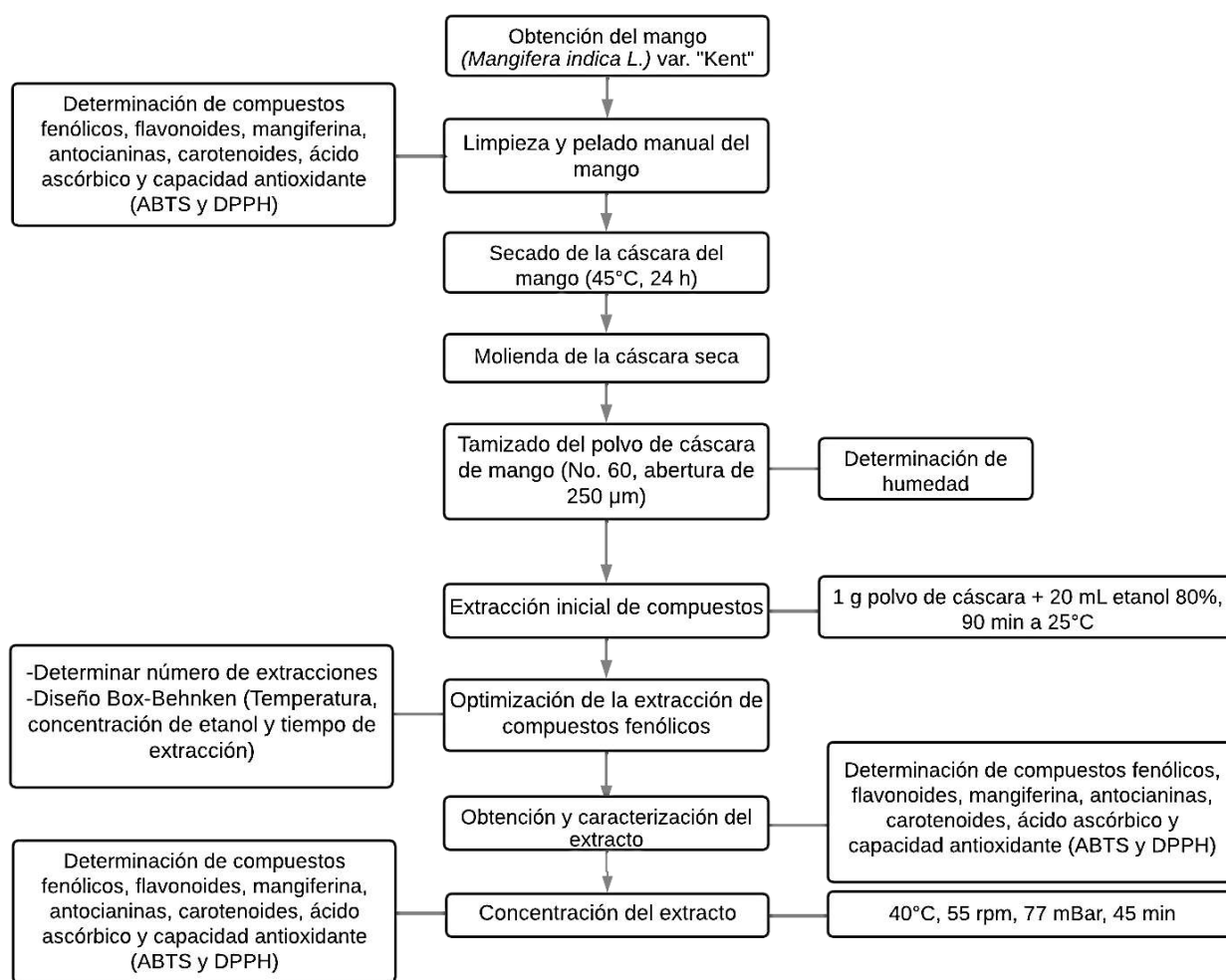
De acuerdo con sus estructuras moleculares, los compuestos fenólicos presentes en la cáscara del mango se pueden agrupar en ocho familias: xantonas; benzofenonas; ácido gálico, galatos y galotaninos; flavonoides; ácidos cinámicos y derivados; ácidos elágicos y derivados; otros ácidos fenólicos<sup>11</sup>.

El mango tiene grandes producciones en la industria, lo que implica grandes cantidades de subproductos, considerando esto, el trabajo tuvo como objetivo evaluar, optimizar y concentrar los compuestos bioactivos así como determinar la capacidad antioxidante de la cáscara de mango var "Kent".

**PARTE EXPERIMENTAL**

El desarrollo experimental del trabajo se presenta en la Figura 2.

Figura 2. Desarrollo experimental para la extracción y caracterización de compuestos bioactivos



presentes en el mango (*Mangifera indica* L.) var "Kent"

El mango se adquirió en estado de madurez sin daño visual aparente o daños causados por insectos. Las muestras se lavaron para eliminar la suciedad superficial. Se eliminó manualmente la mayor cantidad posible de pulpa y se obtuvo la fracción de pulpa, semilla y cáscara. Posteriormente, las cáscaras se secaron en horno a 45 ± 5 °C durante 24 h, se molieron en un procesador de alimentos

hasta obtener un polvo fino y se pasó a través de un tamiz con número de malla 60 (250  $\mu\text{m}$ ) para homogeneizar el tamaño de partícula.

La cáscara de mango (fresca y en polvo), el extracto optimizado y concentrado se caracterizó determinando compuestos fenólicos (González-Montelongo *et al.*)<sup>12</sup> expresados como mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto ( $\text{GAE}/\text{g}_{\text{extracto}}$ ), contenido de flavonoides (Yin-Thoo *et al.*)<sup>13</sup> expresados como mg equivalentes de quercetina por gramo de extracto ( $\text{mg QE}/\text{g}_{\text{extracto}}$ ), mangiferina (Sumaya-Martínez *et al.*)<sup>14</sup> expresado como mg equivalentes de mangiferina por gramo de extracto ( $\text{mg ME}/\text{g}_{\text{extracto}}$ ), antocianinas (Giusti y Wrolstad)<sup>15</sup> expresado como mg de cianidina-3-glucósido por gramo de extracto ( $\text{mg de cianidina-3-glucósido}/\text{g}_{\text{extracto}}$ ), carotenoides (Singh-Sogi *et al.*)<sup>16</sup> expresado como mg  $\beta$ -caroteno por gramo de extracto ( $\text{mg } \beta\text{-caroteno}/\text{g}_{\text{extracto}}$ ), ácido ascórbico (Sumaya-Martínez *et al.*)<sup>14</sup> expresado como mg ácido ascórbico por gramo de extracto ( $\text{mg AA}/\text{g}_{\text{extracto}}$ ) y capacidad antioxidante mediante ABTS (Re *et al.*; Pajaro-Castro *et al.*)<sup>17</sup>,<sup>18</sup> y DPPH (Brand-Williams *et al.*)<sup>19</sup> ambos expresados como  $\mu\text{moles}$  equivalentes de Trolox por gramo de extracto ( $\mu\text{moles TE}/\text{g}_{\text{extracto}}$ ).

La extracción de compuestos fenólicos se realizó con base en la metodología descrita por Martínez-Ramos *et al.*<sup>20</sup>: 1.0 g de cáscara de mango fresca o en polvo se mezcló con 20 mL de etanol 80%, a temperatura ambiente ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante 90 min con agitación constante a 1000 rpm. El extracto se analizó para compuestos fenólicos, flavonoides, mangiferina, antocianinas, carotenoides, ácido ascórbico y capacidad antioxidante (ABTS y DPPH).

La optimización del proceso de extracción se llevó a cabo determinando el número de extracciones seriadas y posteriormente se realizó un diseño Box-Behnken para la temperatura, porcentaje de etanol y tiempo de extracción.

#### Número de extracciones

Para determinar el número de extracciones necesarias para obtener el mayor porcentaje de compuestos fenólicos y flavonoides se siguió la metodología de Martínez-Ramos *et al.*<sup>20</sup>.

El extracto se obtuvo mezclando 1.0 g de polvo de cáscara de mango con 20 mL de etanol 80%. La extracción se realizó durante 90 min a temperatura de ambiente ( $25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), con agitación constante a 1000 rpm. Una vez finalizado el tiempo de extracción se retiraron los 20 mL de disolvente y se agregaron otros 20 mL de etanol (80%) para la siguiente extracción durante 90 min con agitación constante a 1000 rpm. Este procedimiento se realizó hasta obtener cinco extracciones consecutivas. Cada extracto obtenido se centrifugó durante 10 min ( $1364 \times g$ ) y se filtró (Whatman No.1). Los extractos se almacenaron a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis (no más de 8 días). El extracto se analizó para compuestos fenólicos y flavonoides.

#### Diseño Box-Behnken

Para obtener el mayor contenido de compuestos fenólicos y de flavonoides en los extractos se propuso un diseño Box-Behnken. Se evaluó el efecto de la temperatura (30, 35 y  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), concentración de disolvente (50, 65 y 80%) y el tiempo de extracción (30, 60, 90 min).

Una vez que se obtuvieron las condiciones óptimas, el extracto optimizado se analizó para compuestos fenólicos, flavonoides, mangiferina, antocianinas, carotenoides, ácido ascórbico y capacidad antioxidante (ABTS y DPPH).

El extracto optimizado de la cáscara de mango var. "Kent" se concentró mediante la evaporación del disolvente con un rotavapor Buchi V-300 a 55 rpm, el baño de agua operó a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una presión de vacío de 77 mBar. El extracto concentrado se analizó para compuestos fenólicos, flavonoides, mangiferina, antocianinas, carotenoides, ácido ascórbico y capacidad antioxidante (ABTS y DPPH).

**RESULTADOS**

En la figura 3 se presenta la cáscara de mango antes y después del proceso de secado y molido. Se obtuvo una humedad promedio de  $74.84 \pm 1.49 \%$  en la cáscara fresca, dato que coincide con lo reportado (62-83%) por Marçal y Pintado<sup>11</sup>. Posteriormente la cáscara se secó, molió y tamizó para la obtención del polvo mismo que presentó una humedad de  $3.6 \pm 0.06 \%$ , este valor es menor a lo reportado ( $5.8 \pm 0.03 \%$ ) por Marcillo-Parra *et al.*<sup>4</sup> quienes utilizaron la liofilización como método de secado.



Figura 3. Cáscara de mango var. “Kent” fresca (izquierda), después de secado a 45°C durante 24 h (en medio) y en polvo molido y tamizado (derecha).

La caracterización inicial de la cáscara de mango fresca y en polvo se realizó con la finalidad de identificar cómo afectan los diferentes factores que se analizaron en el diseño Box-Behnken y los tratamientos posteriores. El contenido de compuestos fenólicos, flavonoides, mangiferina, antocianinas, carotenoides, ácido ascórbico y capacidad antioxidante (ABTS y DPPH) de la cáscara de mango fresca y en el polvo coincide con lo reportado por otros autores<sup>4, 14, 24</sup>.

**Optimización**

El número de extracciones secuenciales se determinó con el fin de obtener el mayor porcentaje acumulado de fenoles (mg GAE/g<sub>extracto</sub>) y flavonoides (mg QE/g<sub>extracto</sub>).

Las Figuras 4 y 5 presentan el porcentaje acumulado de fenoles y flavonoides obtenidos en cada extracción. Para el caso de fenoles con una extracción se logró extraer el 90.9%, al hacer la segunda extracción el porcentaje acumulado de los compuestos fue de 99.7% y en la tercera extracción se logró extraer el 100% de compuestos.

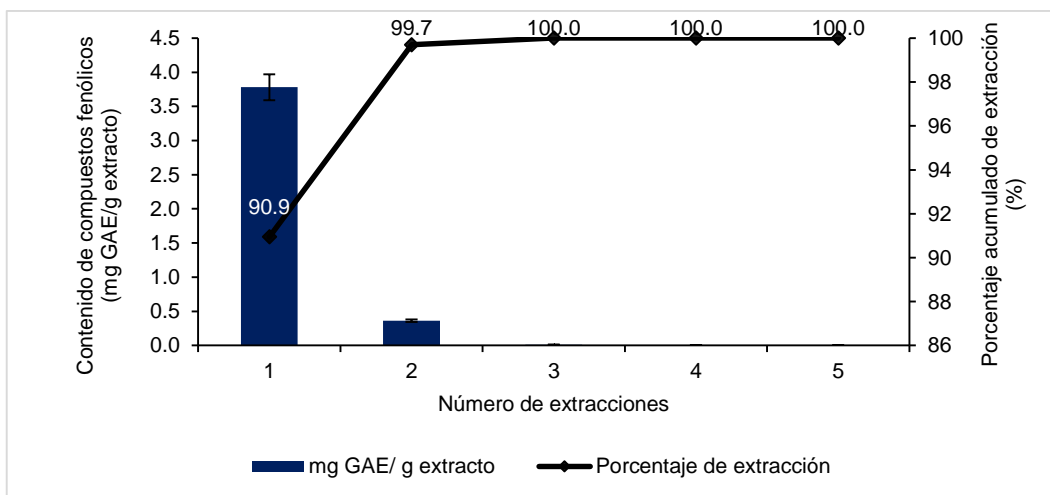


Figura 4. Determinación de compuestos fenólicos (mg GAE/g<sub>extracto</sub>) y porcentaje acumulado en cinco extracciones.



En el caso de los flavonoides, en la primera extracción se logró extraer el 60.08% de los flavonoides totales, en la segunda extracción se obtuvo un acumulado de 78.57% de flavonoides, en la tercera 88.45% y realizando una cuarta y quinta extracción el 95.29% y 100% respectivamente.

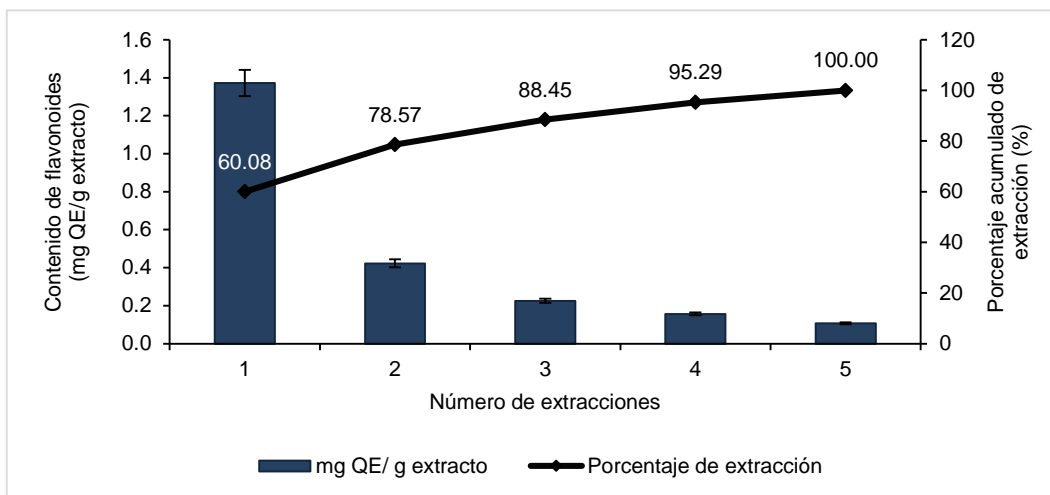


Figura 5. Determinación de flavonoides (mg QE/g<sub>extracto</sub>) y porcentaje acumulado en cinco extracciones.

Con base en lo anterior se decidió utilizar dos extracciones seriadas para las siguientes determinaciones, ya que representarían el 99.6% de compuestos fenólicos y el 78.57% de flavonoides presentes en la cáscara de mango variedad “Kent” extraídos con etanol al 80%. Una tercera extracción para incrementar el porcentaje de extracción de flavonoides al 88.45%, diluiría demasiado el extracto.

Una vez obtenido el número de extracciones se procedió a realizar un diseño Box-Behnken para la optimización en la extracción de los compuestos bioactivos teniendo como factores a la temperatura, porcentaje de disolvente y tiempo de extracción.

El diseño consistió en 15 extracciones con tres repeticiones en el punto central. En la Figura 6 se puede observar cómo los compuestos fenólicos se ven afectados por los tres factores que se están manejando, sin embargo, a mayor temperatura favorece la extracción al obtener mayores cantidades de componentes fenólicos, caso contrario a los flavonoides que ni la temperatura ni el tiempo afectan en la extracción, éstos se ven afectados más por el porcentaje de etanol utilizado, por lo que a mayor concentración de disolvente mayor cantidad de flavonoides se extraerán.

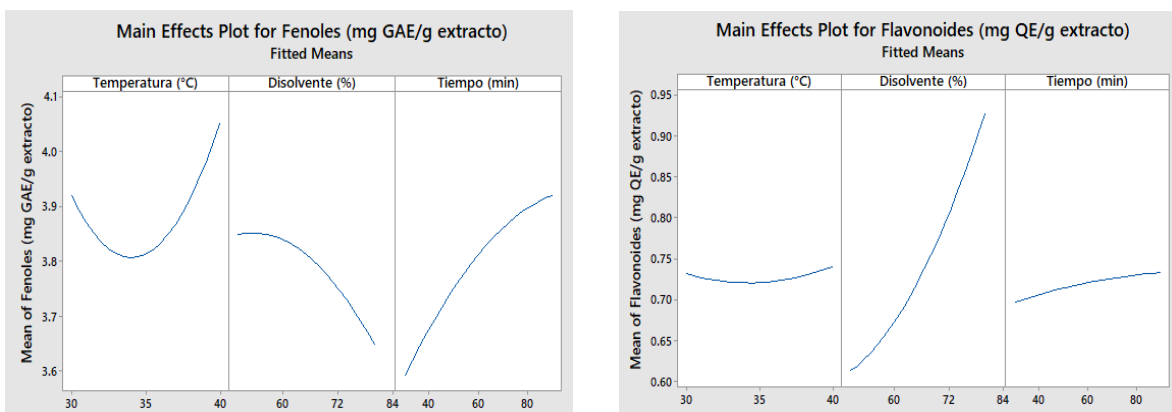
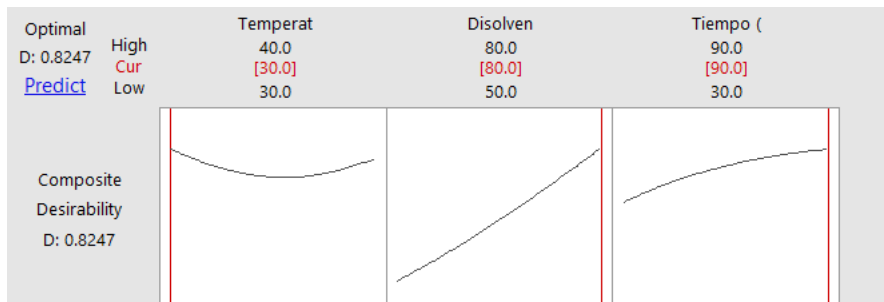


Figura 6. Gráfico de efectos principales en el contenido de compuestos fenólicos (izquierda) y flavonoides (derecha) en los diferentes extractos.

Al realizar la optimización para maximizar la concentración de dichos compuestos se obtuvo que, la extracción se debe realizar a una temperatura de 30°C, con etanol al 80% durante 90 min. La deseabilidad entre ambos compuestos (fenólicos y flavonoides) fue de 0.8247 (Figura 7).

Figura 7. Condiciones óptimas para maximizar la extracción de compuestos fenólicos y flavonoides



Una vez obtenido las condiciones óptimas para la extracción de compuestos se realizó la caracterización de éste y se procedió a la concentración del extracto. El contenido de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante (ABTS y DPPH) del extracto optimizado y concentrado coincide con lo reportado por otros autores<sup>2, 4, 10</sup>.

En el extracto concentrado aumentaron los compuestos fenólicos, flavonoides, mangiferina y la capacidad antioxidante. Las antocianinas, carotenoides y ácido ascórbico se perdieron en el concentrado probablemente debido a la degradación térmica provocada por las condiciones en las que se trabajó el rotavapor.

Se ha reportado que las antocianinas se pueden degradar durante el tratamiento térmico debido a la hidrólisis de enlaces glucosídicos, seguido de la conversión de las agliconas en chalconas que finalmente resultan en  $\alpha$ -diacetona<sup>24</sup>. De igual manera, se ha reportado que el contenido de carotenoides disminuye como consecuencia de los tratamientos térmicos aplicados en el procesamiento por los factores involucrados (temperatura y tiempo)<sup>25</sup>.

Asimismo, Dukare *et al.*<sup>26</sup> mencionan que los tratamientos térmicos oxidan rápidamente el ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico, lo convierten en ácido 2,3- dicetogulónico y, finalmente, lo polimerizan en otros compuestos nutricionalmente inactivos.

## CONCLUSIONES

Este trabajo demostró que la cáscara de mango var. "Kent" es una rica fuente de compuestos bioactivos, por lo que si se procesa de la manera correcta podría ser un ingrediente para dar un valor agregado a productos existentes y con ello los consumidores podrán adquirir los beneficios que éstos tienen.

## BIBLIOGRAFÍA

1. A. Wall-Medrano, F. J. Olivas-Aguirre, G. R. Velderrain-Rodríguez, A. González-Aguilar, L. A. de la Rosa, J. A. López-Díaz, E. Álvarez-Parrilla, "El mango: aspectos agroindustriales, valor nutricional/funcional y efectos en la salud", *Nutr Hosp*, Vol 31,1, 2015, pp. 67-75.
2. C. M. Ajila, L. Jaganmohan-Rao, U. J. S. Prasada-Rao, "Characterization of bioactive compounds from raw and ripe *Mangifera indica* L. peel extracts", *Food and Chemical Toxicology*, Vol 45,12, 2010, pp. 3406-3411.
3. A. Merizalde, D. S. Tupuna, J. Ruales, "Microencapsulación de carotenoides presentes en la pulpa de mango (*Mangifera indica* L. var. Tommy Atkins) mediante secado por atomización", Conferencia Internacional sobre Ciencia y Tecnología de los Alimentos, 2018.

4. V. Marcillo-Parra, M. Anaguano, M. Molina, D. S. Tupuna-Yerovi, J. Ruales, "Characterization and quantification of bioactive compounds and antioxidant activity in three different varieties of mango (*Mangifera indica* L.) peel from the Ecuadorian region using HPLC-UV/VIS and UPLC-PDA", *NFS Journal*, Vol. 23, 2021, pp. 1-7.
5. A. Walia, A. Kumar-Gupta, V. Sharma, "Role of Bioactive Compounds in Human Health", *Acta Scientific Medical Sciences*, Vol. 3,2, 2019, pp. 25-33.
6. T. de Moraes-Crizel, V. Stahl-Hermes, A. de Oliveira-Rios, S. Hickmann Flores, "Evaluation of bioactive compounds, chemical and technological properties of fruits byproducts powder", *Journal of Food Science and Technology*, Vol. 53,11, 2016, pp. 4067-4075.
7. I. Larios-Medrano, M. K. Campos-Serrano, M. Padilla-Sahagún, S. J. Villanueva-Rodríguez, "Materia prima", in *Introducción a la tecnología del mango* (S. J. Villanueva Rodríguez, Jalisco), pp. 1-13.
8. A. S. Bezerra de Sousa, M. C. Alves da Silva, R. Pereira-Lima, B. R. Lins de Albuquerque-Meireles, A. T. Magalhaes-Cordeiro, E. F. da Silva Santos, A. L. Amaro, M. M. Estevez-Pintado, S. de Melo-Silva, "Phenolic compounds and antioxidant activity as discriminating markers and adding value of mango varieties", *Scientia Horticulturae*, Vol. 287, 2021, 110259.
9. L. Segundo-Santiago, "Análisis de la producción y comercialización del mango (*Mangifera indica* L.) en México", Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma Agraria, México, pp. 87.
10. R. M. Robles-Sánchez, M. A. Rojas-Grau, I. Odriozola-Serrano, G. A. González-Aguilar, O. Martín-Belloso, "Effect of minimal processing on bioactive compounds and antioxidant activity of fresh-cut 'Kent' mango (*Mangifera indica* L.)", *Postharvest Biology and Technology*, Vol. 51,3, 2009, pp. 384-390.
11. S. Marçal, M. Pintado, "Mango peels as food ingredient / additive: nutritional value, processing, safety and applications", *Trends in Food Science & Technology*, Vol. 114, 2021, pp. 472-489.
12. R. González-Montelongo, L. M. Gloria, M. González, "Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds", *Food Chem*, Vol. 119, 2010, pp. 1030-1039.
13. Y. Yin-Thoo, D. Kheng-Hoa, J. Yun-Liangb, C. Wai-Hob, C. Ping-Tan, "Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*)", *Food Chemistry*, Vol. 120,1, 2010, pp. 290-295.
14. M. T. Sumaya-Martínez, R. E. Medina-Carrillo, E. González-Ocegueda, E. I. Jiménez-Ruiz, R. Balois-Morales, L. M. Sánchez-Herrera, G. López-Nahuatt, "Mango (*Mangifera indica* L.) pulping byproducts: Antioxidant activity and bioactive compounds of three mango cultivars, *Revista bio ciencias*, Vol. 6, 2019, 1-20.
15. M. M. Giusti, R. E. Wrolstad, "Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy", in *Handbook of food analytical chemistry Vol 2. Pigments, colorants, flavors, texture and bioactive food components* (New Jersey, 2001), pp. 19-31.
16. D. Singh-Sogi, M. Siddiq, I. Greiby, K. D. Dolan, "Total phenolics, antioxidant activity, and functional properties of 'Tommy Atkins' mango peel and kernel as affected by drying methods", *Food Chemistry*, Vol. 141, 3, 2013, pp. 2649-2655.
17. R. Re, P. Nicoletta, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay", *Free Radical Biol Med*, Vol. 9, 1999, pp. 1231-1237.
18. N. P. Pájaro, C. Granados, M. E. Torrenegra, M. Osorio, E. J. Pajaro, G. Leon, "Microencapsulation of pulp of *Mangifera indica* L. by spray drying and antioxidant activity, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol. 9, 12, 2017, pp. 181-185.
19. W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset, "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", *Lebensm Wiss u Technol*, Vol. 28, 1, 1995, pp. 25-30.
20. T. Martínez-Ramos, J. Benedito-Fort, N. J. Watson, I. I. Ruiz-López, G. Che-Galicia, E. Corona-Jiménez, "Effect of solvent composition and its interaction with ultrasonic energy on the ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Mango peels (*Mangifera indica* L.)", *Food and Bioproducts Processing*, Vol. 122, 2020 pp. 41-54.

21. B. De Ancos, C. Sánchez-Moreno, L. Zacarías, M. J. Rodrigo, S. Sáyago-Ayerdi, F. J. Blancas, J. A. Domínguez-Avila, G. A. González-Aguilar, "Effects of two different drying methods (freeze-drying and hot air drying) on the phenolic and carotenoid profile of 'Ataulfo' mango byproducts", *Journal of Food Measurement and Characterization*, Vol. 12, 2018, pp. 2145-2157.
22. N. Febres-Burneo, M. Mora-Medina, J. G. Figueroa, "Optimización de la deshidratación y extracción de compuestos fenólicos de piel de mango", *Quim. Nova*, Vol. 45, 5, 2022, pp. 621-629.
23. S. Akther, S. Jothi, R. Badsha, M. Rahman, G. Das, A. Alim, "Drying methods effect on bioactive compounds, phenolic profile, and antioxidant capacity of mango powder", *Journal of King Saud University*, Vol. 35, 2023, 102370.
24. D. M. Amaya Cruz, "Diseño y evaluación de un suplemento alimenticio, a base de subproductos agroindustriales, para la prevención de factores de riesgo cardiovascular", Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Querétaro, 2018, México, pp. 178.
25. D. R. Belén-Camacho, M. J. Moreno-Álvarez, R. Alemán, F. Álvarez F, "Efecto de la temperatura de secado sobre la degradación de carotenoides en frutos de coroba (*Jessenia polycarpa Karst*)", *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, Vol. 4,3, 2004, pp. 206-210.
26. A. Dukare, M. K. Samota, B. Bibwe, S. Dawange, "Using convective hot air drying to stabilize mango peel (Cv-Chausa): evaluating effect on bioactive compounds, physicochemical attributes, mineral profile, recovery of fermentable sugar, and microbial safety", *Food Measure*, Vol. 16, 2022, pp. 3898-3909.

## ANÁLISIS DE ASPECTOS DE LA DINÁMICA POBLACIONAL DE *LARREA TRIDENTATA* (D.C.) COVILLE EN EL ESTADO DE COAHUILA, MÉXICO

Rocío Zárate-Hernández<sup>1</sup>, Claudia Ballesteros-Barrera<sup>1</sup>, Selene Ortiz-Burgos<sup>2</sup>, Bárbara Vargas-Miranda<sup>1</sup>, Angelica Martínez-Bernal<sup>1</sup> y Christian Michel Acosta Rodríguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. C.P.: 09340, San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, D.F. México, <sup>2</sup>Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México. Batalla 5 de mayo S/N, Col. Ejército de Oriente, CP 09230. México, D.F.  
gsob@xanum.uam.mx

### RESUMEN

Las zonas áridas son regiones en México son muy importantes debido a que ocupan cerca de 57 millones de hectáreas donde encuentran una alta diversidad. Estas especies son importantes no tanto en su densidad, si no por las diferentes estrategias adaptativas que han desarrollado las especies debido a las difíciles condiciones y que son respuestas únicas a diferentes procesos evolutivos. No obstante, lo anterior es poco el conocimiento de estas especies y dentro de estos sistemas una de las más importantes debido a su amplia distribución es *Larrea tridentata* o también denominada “Gobernadora”. El objetivo de este trabajo es contribuir al conocimiento de la dinámica de la población de la gobernadora en el municipio de Juárez, en Coahuila, México. Se realizó un análisis descriptivo a la altura de los individuos y análisis de la estructura de tamaños. Se analizaron un total de 190 individuos de los cuales se registró la altura de cada individuo, determinándose un rango de entre 16-200 cm con una altura promedio de 97.62. Se reconocieron nueve clases de edades, donde la mayor cantidad de individuos de encontraron en las clases intermedias de la distribución, con pocos juveniles y pocos de edades avanzadas. La presencia de poco juveniles puede resultar en un bajo nivel de reclutamiento dentro de la población y esos repercutir en su dinámica de manera negativa, sino que también incidiría en otras especies con las cuales ha desarrollado una relación de nodricismo. Debido a los pocos trabajos se vuelve difícil hacer una comparación de la variación de en la población, por lo que es relevante promover el estudio de este arbusto perenne, debido al papel que juega al proveer microhábitats o como nodriza para varias especies de cactáceas y otras especies vegetales, además de la importancia económica de su explotación como forraje y de usos potenciales dentro del ámbito medicinal, la industria alimentaria y farmacéutica.

### INTRODUCCIÓN

México es considerado un país megadiverso, debido a la presencia de un mosaico de ecosistemas resultado de su posición geográfica y la combinación de organismos de diferentes regiones biogeográficas que convergen. De estos diferentes ecosistemas las zonas áridas y semiáridas son considerados de gran importancia debido a que ocupan cerca de 57 millones de hectáreas y donde se concentra una alta biodiversidad. Es importante destacar la diferencia entre una zona semiárida y una árida, la primera registra una evaporación mayor que sus lluvias anuales y su precipitación se encuentra entre los 300 a 700 mm, mientras que si la precipitación es de 100 mm o menos se considera una zona árida o desierto generando diferentes grados de aridez dependiendo de la zona y época climática (Sánchez *et al*, 2022). Estos ambientes únicos proveen de un ambiente que donde se establecen especies importantes no tanto en su densidad, si no por las diferentes estrategias adaptativas que han desarrollado, debido a las difíciles condiciones y que las obligan a desarrollar respuestas únicas por diferentes procesos evolutivos. No obstante, lo anterior es poco el conocimiento de estas especies y dentro de estos sistemas una de las más importantes en zonas semiáridas debido a su amplia distribución es la especie *Larrea tridentata* o también denominada “Gobernadora”. La cual se ha convertido en un importante recurso forestal, es una planta con forma erecta arbustiva perennifolia que se ramifica desde la base con una altura de 0.6 a 3m, la cual tiene

una amplia distribución en el norte del país, de la Península de Baja California a Tamaulipas e Hidalgo en altitudes que van desde los 400 a 1800 msnm. Debido a sus amplias respuestas fisiológicas a los ambientes áridos se distribuye en diferentes tipos de terrenos: planos, laderas, lomeríos bajos y en planicies aluviales. Es una especie que actualmente posee un alto grado de importancia debido a diferentes propiedades y aplicaciones que posee para industrias como la farmacéutica y agroquímica, así como el papel ecológico que juega para las comunidades naturales. Esta importancia es debida a que los extractos de la gobernadora poseen una actividad antifúngica en contra de hongos patógenos de diversos cultivos de importancia económica (Moreno-Limón *et al.*, 2011). Su importancia ecológica se debe a su fisonomía, donde su cobertura hace que la planta juegue el papel de nodriza al crear un microhábitat que favorece el establecimiento y reclutamiento de especies de cactáceas y otras plantas contribuyendo a la supervivencia de estas. A pesar de la importancia de esta especie pocos son los trabajos que se han llevado a cabo para conocer aspectos de su ciclo de vida y aspectos poblacionales, por lo que el objetivo de este trabajo es contribuir al conocimiento de la dinámica de la población de la gobernadora en el municipio de Juárez, en Coahuila, México.

## MÉTODOS

Este estudio se llevó a cabo en el municipio de Juárez (Figura 1) caracterizado por pendientes suaves excepto, las elevaciones en las sierras de Juárez y Samalayuca, alcanzando hasta 2000 msnm (Figura 1). Es parte de la ecoregión denominada Desierto Chihuahuense, una de las más importantes ecoregiones áridas en el mundo y el más grande de los desiertos de Norteamérica, es una de las tres áreas áridas y semiáridas con mayor biodiversidad en vertebrados y diversidad única de especies de cactáceas. Por ejemplo, se presenta la especie de cactus *Echinocactus parryi*, considerada "Amenazada" de acuerdo a la NOM-059, otra es la *Cordyalanthus wrightii*, considerada especie de distribución restringida cuya única población se cree se encuentra en este municipio. Otro ejemplo es el nopal *Opuntia arenaria*, el cual es candidato para declararlo como especie en peligro de extinción. En este sentido el área posee un amplio número de especies endémicas (De Lourdes Romo, 2010).



Figura 1. Toponimia del Municipio de Juárez, Chihuahua (Modificado de Ecured, 2015 y Wikipedia 2011).

Dentro del Municipio de Juárez se eligieron varios individuos de la especie y se registraron en cada individuo de *Larrea tridentata* la altura y el diámetro, realizándose un análisis descriptivo para la estructura de edades (tamaños). Además, de una correlación simple (Pearson) se aplicó una



regresión lineal para determinar si existe una relación y de que tipo entre la altura y el diámetro de las plantas.

**RESULTADOS**

Se midieron un total de 190 individuos de la especie de acuerdo a la altura de los organismos se realizó un análisis descriptivo el cual presento un promedio de 97.62 cm, las alturas se encontraron en un rango que de 16-200 cm, con una desviación estándar de  $\pm 32.04$ .

El análisis de estructura de tamaños mediante el histograma y su polígono de frecuencia (Figura 2) obtenido de la altura de *L. tridentata* presento 9 clases de tamaño, donde los individuos tendieron a ser en mayor número de tamaños intermedios, siendo un número reducido de individuos de los tamaños pequeños y de los más altos.

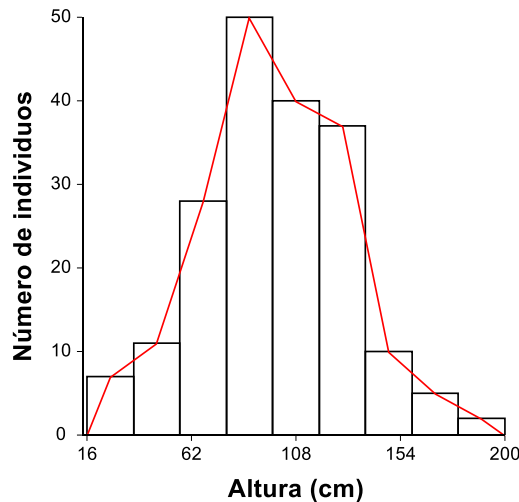


Figura 2. Histograma y polígono de frecuencia de la altura de la especie *L. tridentata*

El diámetro (m) de los organismos registrados presentaron un promedio 1.41m, el intervalo se encontró entre 0.007 a 5.31 m, la distribución de los individuos (Figura 3), se observa una distribución unimodal donde encontramos que existe un alto número de individuos con diámetros reducidos y muy pocos con diámetros entre 4 a 5 metros.

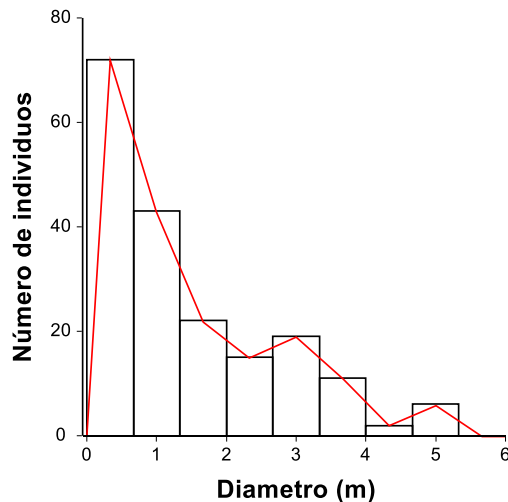


Figura 3. Histograma y polígono de frecuencia obtenidos del diámetro de la especie *L. tridentata*

Se realizó una correlación de Pearson para determinar si existe una relación entre altura y diámetro, el análisis mostro una distribución de las observaciones y una línea de tendencia que muestra un acomodo lineal de los mismos (Figura 4). Esto se sustenta con el valor de  $r= 0.726$  ( $p<0.0001$ ), resultado que confirma que la relación existe encontrándose entre un rango de asociación media entre las variables. La regresión lineal mostro una  $r^2= 0.527$  ( $p<0.0001$ ).

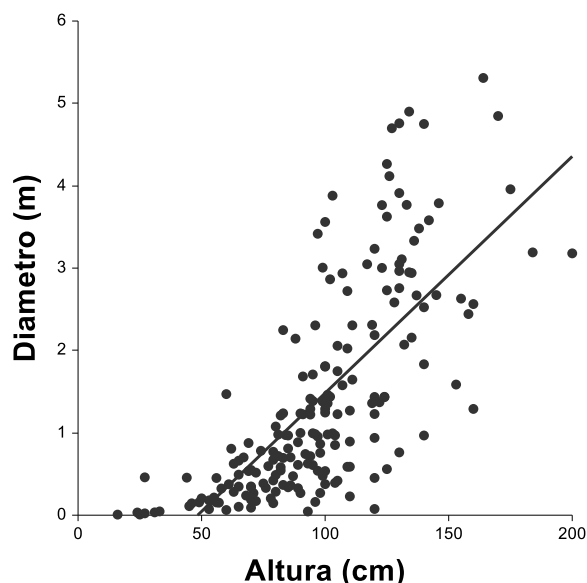


Figura 4. Distribución y línea de tendencia de la regresión lineal entre la altura y el diámetro de la especie *L. tridentata*

## CONCLUSIONES

De acuerdo con el análisis de estructura de tamaños se determino que se observan nueve clases de tamaño y de diámetro, observándose pocos individuos juveniles y de edades avanzadas considerando la altura y una gran cantidad de individuos con diámetros reducidos. La baja presencia de juveniles puede resultar en un bajo nivel de reclutamiento dentro de la población y esos repercutir en su dinámica de manera negativa, que junto con el alto número de individuos con diámetros reducidos nos habla de que no se da un crecimiento proporcional entre la altura y el diámetro lo que se sustenta con los resultados de la correlación. Este aspecto es relevante ya que nos indica que hay crecimiento no proporcional entre la altura y el diámetro, lo que se relaciona con la cobertura que ofrece esta especie y su papel como nodriza para otras.

Debido a los pocos trabajos de *Larrea tridentata* se vuelve difícil hacer una comparación de la variación encontrada en esta la población, por lo que es relevante promover el estudio de este arbusto perenne, debido al papel ecológico que juega al proveer microhábitats para varias especies de cactáceas y otras especies vegetales, además de la importancia económica de su explotación como forraje y de usos potenciales dentro del ámbito medicinal, la industria alimentaria y farmacéutica por sus propiedades antimicóticas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. A. De Lourdes Romo. (Responsable del Proyecto) 2010. Programa de Ordenamiento Ecológico Territorial del municipio de Juárez. CONACYT-Gobierno Municipal de Juárez.
2. Ecured.2015. "Mapa Juárez, México". Disponible en: [https://www.ecured.cu/Ju%C3%A1rez\\_\(M%C3%A9xico\)#Caracter.C3.ADsticas](https://www.ecured.cu/Ju%C3%A1rez_(M%C3%A9xico)#Caracter.C3.ADsticas)

3. Coahuila, Gobierno del estado. 2023. Juárez. Disponible en: [https://coahuila.gob.mx/flash/conoce\\_coahuila/mapas/pdfs/juarez.pdf](https://coahuila.gob.mx/flash/conoce_coahuila/mapas/pdfs/juarez.pdf)
4. J. Sánchez, E. Estrada Castillón, M.A. García Aranda, M.F. Duarte Hernández, F. García González, L.M. Valenzuela Nuñez & G. Muro Pérez. "Los ambientes áridos y semiáridos: Su relación con la dispersión y germinación de especies". *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* Vol.14, 75, 2022, pp. 35-67.
5. S. Moreno-Limón, L.N. González-Solís, S.M. Salcedo-Martínez, M.L. Cárdenas-Avila & y A. Perales-Ramírez. "Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición in vitro de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp". *Polibotánica*, 32, 2011, pp.193-205.
6. Wikipedia, 2011. "Location of state xy (see filename) in Mexico". Disponible en: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/57/Coahuila\\_in\\_Mexico\\_%28location\\_map\\_scheme%29.svg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/57/Coahuila_in_Mexico_%28location_map_scheme%29.svg)

## VALIDACIÓN DE DOS MARCAS DE TIRAS REACTIVAS PARA EL ESTUDIO DE LA CETOGÉNESIS EN EL MONO AULLADOR DE MANTO (ALOUATTA PALLIATA)

<sup>1</sup>Cassandra Velasco-Jácome, <sup>2</sup>Rael Martín Palestino-Sánchez, <sup>1</sup>Mariana Morteo-Nava, <sup>3</sup>Rubén Mateo-Gutierrez, <sup>3</sup>Francisco García-Orduña y <sup>3</sup>María de Jesús Rovirosa-Hernández

<sup>1</sup>Facultad de Biología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, 91090, México

<sup>2</sup>Doctorado en Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, 91000, México

<sup>3</sup>Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, 91000, México

\*casandravj14@gmail.com

### RESUMEN

Cuando se experimenta una reducción en la ingesta de alimentos, se sufre un catabolismo de ácidos grasos y genera la presencia de cetonas en el organismo. La producción de cuerpos cetónicos a partir del consumo de ácidos grasos es un fenómeno generalizado entre mamíferos, en particular, en primates del Viejo Mundo, el estudio de la presencia de cetonas se ha asociado a los cambios en la alimentación y balance energético negativo por cambios en la disponibilidad de alimento o por demandas energéticas en diferentes estados reproductivos. Uno de los métodos más utilizados para medir las cetonas en la orina es por medio de métodos no invasivos, como el uso de tiras reactivas, el cual permite estudiar el estado energético de los individuos sin alterar la actividad normal y procesos fisiológicos en animales silvestres. En este caso, el objetivo del presente estudio fue validar dos marcas de tiras reactivas (*Mission* y *Spinreact*) comparando la lectura de cetonas con una marca de tiras reactivas (*Siemens*) que ha sido validada en estudios en primates neotropicales y de este modo tener opciones más accesibles y económicas en futuros trabajos de investigación que requieran el uso de tiras reactivas como un método no invasivo para el análisis de orina en especies de primates neotropicales. Para analizar la presencia de cuerpos cetónicos, se colectaron de forma oportuna las muestras de orina inmediatamente después de la micción en partes vegetales que quedaron almacenadas o en lonas de plástico. La colecta se realizó por medio de aspiraciones con una pipeta desechable, y el análisis de cuerpos cetónicos se realizó inmediatamente después de su colecta por medio de tiras reactivas (uroanálisis), el cual consistió en la reacción de cuerpos cetónicos con ácidos nitroprusiato para producir un cambio de color el cuál indicará la concentración de cetonas en la orina en un tiempo de 46 segundos. Para controlar el sesgo de interpretación de la lectura de cetonas, se contó con el apoyo de 4 estudiantes para corroborar la lectura. Los resultados demuestran que las marcas de tiras reactivas *Mission* y *Spinreact* tienen efectividad de lectura obteniendo los mismos resultados que la marca *Siemens* en la lectura de cetonas en la orina de individuos de *A. palliata*. Sin embargo, la marca *Mission* no resistieron las condiciones ambientales en trabajo de campo. Dados los resultados, se recomienda el uso de *Mission* y *Spinreact* para uroanálisis en *A. palliata*, teniendo los cuidados adecuados para la conservación de tiras reactivas marca *Mission*.

### INTRODUCCIÓN

Las cetonas o cuerpos cetónicos se conforman por el 3-  $\beta$ -hidroxibutirato (3-OHB), acetona y acetoacetato, estos son productos del catabolismo de los ácidos grasos (Graff *et al.*, 2016). Normalmente estos compuestos se encuentran de forma natural a lo largo del torrente sanguíneo, en una concentración de 2-4 mg/dL. Sin embargo, durante periodos de disminución de la disponibilidad de glucosa, aumenta su concentración hasta un 20% por el proceso de cetogénesis, es decir, la síntesis de cuerpos cetónicos o catabolismo de ácidos grasos (Graff *et al.*, 2016; Puchalska y Crawford, 2021), para funcionar como una fuente de energía alternativa en mamíferos, en prácticamente todos los tejidos, en particular en aquellos con un alto nivel de actividad, como el sistema nervioso central, el corazón y los músculos (Puchalska y Crawford, 2021).

Existen diversas causas por las que un individuo puede experimentar una baja disponibilidad de glucosa, y, por lo tanto, haya una mayor cetogénesis en su organismo, por ejemplo; por inanición, dietas muy bajas en carbohidratos o por deficiencia o resistencia a la insulina, llegando a causar patologías como la cetosis, cetoacidosis diabética o hipoglucemia (Paoli *et al.*, 2015; Botham y

Mayes, 2018). Sin embargo, la regulación de los cuerpos cetónicos está medida por diversas hormonas (glucagón, cortisol, tiroideas y las catecolaminas), aunque la insulina es la hormona principal en regular el catabolismo de ácidos grasos (Dhillon y Gupta, 2022).

Uno de los métodos más utilizados para el estudio de este proceso metabólico en mamíferos es por medio del uso de tiras reactivas, ya que al ser un método no invasivo, no se interfiere con la actividad normal y procesos fisiológicos en particular de fauna silvestre. Además, las tiras reactivas permiten también conocer la presencia o variaciones de otros parámetros bioquímicos en la orina, para conocer el estado de salud de los individuos (Bergstrom *et al.*, 2020). En particular, los estudios realizados en primates no humanos y usando tiras reactivas, sugieren una asociación de la presencia de cetonas en la orina, por medio de tiras reactivas, con cambios en la alimentación y balance energético negativo (Knott, 1998; Kaur y Huffman, 2004; Wich *et al.*, 2006; MacIntosh *et al.*, 2012; Naumenko *et al.*, 2019; Berstrom *et al.*, 2020)

Actualmente las tiras reactivas se utilizan de forma rutinaria en entornos clínicos en humanos y en veterinaria, ya que ofrece una forma rápida y rentable de medir las cetonas, y por lo tanto, evaluar los balances de energía negativos en los individuos. Sin embargo, a pesar de tener el mismo rango de medición entre ellas, existen diversas marcas que cuentan con diferencias en su sensibilidad y especificidad, aumentando la posibilidad de errores de diagnóstico (Vuljanic *et al.*, 2019). Además, la mayoría de las marcas de tiras reactivas están diseñadas para detección de parámetros bioquímicos en orina humana o de fauna doméstica (Naumenko *et al.*, 2019), y no para fauna silvestre. Por lo tanto, el presente estudio tiene por objetivo validar y comparar dos marcas de tiras reactivas (*Mission* y *Spinreact*), sobre la lectura de cetonas en orina, con una marca que ya ha sido utilizada en otros estudios de primates no humanos (*Siemens*), para evaluar si otras marcas más accesibles económicamente pueden ser consideradas en futuros estudios en fauna silvestre.

## TEORÍA

La alimentación es un son aspectos centrales de la biología de cualquier individuo, teniendo importancia en los niveles de organización bioquímicos y ecológicos. Los organismos necesitan obtener suficiente alimento con la composición nutricional apropiada para satisfacer sus requerimientos nutricionales y energéticos. En el caso particular de los monos aulladores de manto (*Alouatta palliata*) se alimentan de hojas, frutos y flores de árboles y enredaderas (Glandr, 1975; Smith, 1977; Milton, 1977). Su dieta incluye una gran cantidad de especies de plantas, y esto sugiere que puede ser necesario una dieta diversa para lograr una nutrición adecuada (Milton, 1977), y su preferencia alimentaria está influida por la distribución, abundancia y fenología de las especies vegetales, así como por factores intrínsecos como las necesidades energéticas de cada individuo (Serio-Silva *et al.*, 2002; Cristóbal-Azkarate y Arroyo-Rodríguez, 2007; Dias y Rangel-Negrín, 2015). Aunque, la disponibilidad de alimento está sujeta a los factores climáticos que influyen en la fenología y fructificación de las especies vegetales (Inouye, 2022), lo cual puede afectar la disponibilidad de alimento dentro de la dieta de individuos como *A. palliata* (Serio-Silva, 1995); esto puede afectar en la cantidad y calidad de su ingesta y en su balance energético, provocando la presencia de cuerpos cetónicos cuando su ingestión es deficiente o pasan por periodos de ayuno.

### Cuerpos cetónicos

Los cuerpos cetónicos se encuentran normalmente a lo largo del torrente sanguíneo, la concentración circadiana diurna de cuerpos cetónicos en humanos sanos esta en un rango de 50 - 250  $\mu\text{M}$ , contribuyendo solo al ~5% del gasto energético total y aumentando hasta el ~20% en estados de ayuno, en estos casos, una parte puede ser excretada en la orina (Puchalska y Crawford, 2021). En estas condiciones de inanición, aumenta la disposición de los ácidos grasos del hígado para su oxidación, llevando a la producción de moléculas ricas en energía, como la acetil coenzima A, la cual es utilizada para la síntesis de cetonas en las mitocondrias de los hepatocitos (Guyton y Hall, 2006). El acetoacetato y el 3-OHB viajan a través de la sangre hasta llegar a tejidos extrahepáticos que requieran energía, posteriormente se convierten en acetil-CoA nuevamente para entrar en el ciclo del ácido cítrico y así generar energía en forma de Adenosín trifosfato (ATP), proceso que se le conoce como cetogénesis (Guyton y Hall, 2006; Puchalska y Crawford, 2021).

En estados cetónicos en los que las cetonas circulantes superan 1 mM, la concentración de cetonas en orina aumenta (Robinson y Williamson, 1980; Puchalska y Crawford, 2021). Sumado a esto, los cuerpos cetónicos, en particular el 3-OHB, han tenido una importancia clínica ya que tienen diversos papeles en los campos de la neurología y enfermedades cardiovasculares (Møller, 2020); Se ha reportado que, la unión de éste 3-OHB a receptores específicos de ácido hidroxicarboxílico puede inhibir las enzimas histonas desacetilasa, los receptores de ácidos grasos libres y de proteínas, lo que resulta en la inhibición de la lipólisis (Nielsen *et al.*, 2014), de la inflamación (Graff *et al.*, 2016), el estrés oxidativo (Shimazu *et al.*, 2013) y el desarrollo del cáncer (Feng *et al.*, 2019).

Los métodos para evaluar la concentración de cetonas en mamíferos han sido llevados de forma rutinaria en medicina humana y veterinaria para conocer el estado de salud de los individuos (Caipira y Simões, 2021; Naumenko *et al.*, 2019). En especies silvestres el uso de uroanálisis por medio de tiras reactivas se ha convertido en el estándar para evaluar rápidamente el estado fisiológico y/o de salud (Naumenko *et al.*, 2019; Berstrom *et al.*, 2020), esto porque es un método no invasivo, lo cual permite conocer el estado actual sin ninguna alteración.

### **Uso de tiras reactivas para el estudio de la cetogénesis**

Existen estudios que utilizan las tiras reactivas urinarias para monitorear el estado de salud, en las cuales se evalúan analitos como glucosa, proteínas, pH, bilirrubina, así como cuerpos cetónicos (Wiedner *et al.*, 2009; Burrell *et al.*, 2017). En particular, se han hecho estudios en primates no humanos donde se considera a la presencia de cetonas como un indicador de un desbalance energético (Knott, 1998; Kaur y Huffman, 2004; Wich *et al.*, 2006; MacIntosh *et al.*, 2012; Naumenko *et al.*, 2019). Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han hecho en especies de primates del Viejo Mundo, y muy pocos sobre primates del Nuevo Mundo (Bergstrom *et al.*, 2020). Aunque estos estudios asocian la presencia de cetonas en orina con los cambios en la disponibilidad de alimento por temporadas fenológicas (Knott, 1998; Wich *et al.*, 2006), o por las demandas nutricionales que generan los diversos estadios reproductivos (Leendertz *et al.*, 2010). Y ninguno se ha enfocado en estudiar el posible efecto que tiene el aumento de la temperatura ambiental sobre la conducta diaria, lo cual también podría representar un riesgo dentro del balance energético de primates no humanos. Se ha reportado que el mono aullador de manto (*Alouatta palliata*) dedica gran parte de su tiempo al descanso (74%) debido a su biología y dieta folívora-frugívora (Estrada 1984; Dias y Rangel-Negrín, 2015) ya que necesita reducir los costos de energía con el fin de fermentar, digerir y extraer energía de los carbohidratos estructurales presentes en las hojas que consumen dentro de su dieta (Milton, 1981; Serio-Silva, 1992). A pesar de su patrón de actividades característico, se ha reportado que también puede invertir más tiempo al descanso durante periodos de altas temperaturas, asociado como un posible costo al termorregular con el ambiente (Palestino-Sanchez, 2021), lo cual se podría traducir como una reducción en otras actividades como la alimentación y locomoción, provocando que exista un desbalance energético al presentar una baja compensación nutricional, por la modificación del tiempo dedicado a la ingesta de alimentos.

### **Validación de marcas de tiras reactivas**

Actualmente existen diversas marcas de tiras reactivas para medicina humana que ha sido validada en fauna silvestre (Naumenko *et al.*, 2019), sin embargo, muchas de estas tienen una variabilidad sustancial entre los fabricantes con respecto a la sensibilidad, especificidad y rango de medición, lo cual aumenta la posibilidad de errores de diagnóstico (Vuljanic *et al.*, 2019). En particular, se han usado y validado en primates no humanos marcas como Chemstrip, Roche Diagnostics, Urotron, Uropaper VetScan, siendo las primeras las más utilizadas en primates del Viejo Mundo (Knott, 1998; Kaur y Huffman, 2004; Wich *et al.*, 2006; MacIntosh *et al.*, 2012; Naumenko *et al.*, 2019), mientras que, en primates del Nuevo Mundo, solo existe un reporte que ha utilizado tiras reactivas de la marca *Siemens* (Bergstrom *et al.*, 2020). Sin embargo, la mayoría de estas tiras tienen un alto costo y no son de fácil acceso.

Debido a que, el uso de tiras reactivas proporciona un método sencillo y rápido para estudiar la cetogénesis en primates no humanos, resulta importante evaluar otras marcas comerciales más económicas y de fácil acceso que no han sido validadas en fauna silvestre, con el fin de conocer su



precisión o sensibilidad, y de esta forma tener opciones más económicas y accesibles para el estudio de la cetogénesis en primates neotropicales.

**PARTE EXPERIMENTAL**

Este trabajo se realizó durante siete meses en dos fragmentos de selva alta perennifolia que se encuentran en la región de Los Tuxtlas, al sureste de la Sierra de Santa Martha, ambos sitios pertenecen al municipio de Tatahuicapan de Juárez, Veracruz, México, ubicados en las comunidades de Mirador Pilapa y Zapoapan. Geográficamente Mirador Pilapa se ubica entre las coordenadas 18°21'55.4"N y 0924°44'50.6"W, y el Zapoapan entre las coordenadas 18°26'56.2"N y 094°46'31.5"W.

En Mirador Pilapa se encuentra el primer grupo de estudio el cual está conformado por 11 individuos (son 4 hembras adultas, 4 machos adultos, 1 juvenil y 2 infantes). Mientras que en Zapoapan se encuentra un grupo conformado por 9 individuos (4 hembras adultas, 3 machos adultos, 1 juveniles y 1 infante). Para este estudio sólo registramos a los individuos adultos y juveniles, ya que los infantes, al alimentarse de la madre, podrían darnos resultados erróneos y generar un sesgo en la interpretación de las cetonas en su orina, a diferencia de los demás individuos, quedando para Mirador Pilapa (N=9) y Zapoapan (N=9).

**Colecta de orina y análisis de orina**

Para analizar la presencia de cuerpos cetónicos en la orina de *A. palliata*, se colectaron un total de 143 muestras. La orina se colectó de forma oportunista justo después de la micción por medio de aspiraciones con pipetas desechables en las hojas donde cae la muestra o colocando un plástico debajo de donde se encuentre el individuo (Knott 1997; Bergstrom *et al.*, 2020), para posteriormente almanecarla en tubos Eppendorf de 2 ml.

Las muestras de orina se analizaron inmediatamente después de su colecta, esto porque, el almacenamiento prolongado de la orina a temperatura ambiente puede dar lugar a contaminación microbiana, sumado a esto, la acetona se pierde en el aire si la muestra está a temperatura ambiente, lo que daría resultados "falsos positivos" o "falsos negativos" (Kurien *et al.*, 2004; Hendrix y Sirois, 2007; Shanahan y Mundt, 2011). El análisis se llevó acabo en tiras reactivas, en la almohadilla específica para cetonas la cual da resultados después de 60 segundos, observando el cambio de coloración en las dos marcas diferentes (*Mission* y *Spinreact*) con respecto a la tira control (*Siemens*). El examen está basado en la reacción de los cuerpos cetónicos con los ácidos nitroprusiato y acetoacético para producir un cambio de color que va desde un rosado pálido para resultados negativos, hasta un rosado oscuro o color púrpura para resultados positivos, de acuerdo con una colorimetría, de 0 a 160 mmol/L (Figura 1).

La lectura de las tiras para su validación, se realizó por dos pares de doble ciego para garantizar la homogeneidad de los resultados.



Figura 1. Colorimetría de las almohadillas de las tiras reactivas, que da la lectura de la concentración de cetonas en la orina.

**Análisis de datos (estadístico)**

Para analizar los datos y comparar las tiras reactivas con la control, lo primero fue realizar los análisis descriptivos correspondientes. Posteriormente se hizo una prueba de Shapiro-Wilks, para determinar qué prueba estadística utilizar (paramétrica o no paramétrica). Por último, comparamos los resultados entre las tres tiras, esto por medio de una prueba de Kruskal-Wallis, donde los grupos son las marcas de las tiras reactivas.

## RESULTADOS

Se analizaron un total de 143 muestras de orina con las marcas *Siemens*, *Spinreact* y *Mission*. Los resultados obtenidos demuestran que no existe una diferencia significativa en la lectura de cuerpos cetónicos entre las tres marcas (Kruskal-Wallis  $X^2=0.0949$ ,  $df=2$ ,  $p=0.954$ ) (Figura 2).

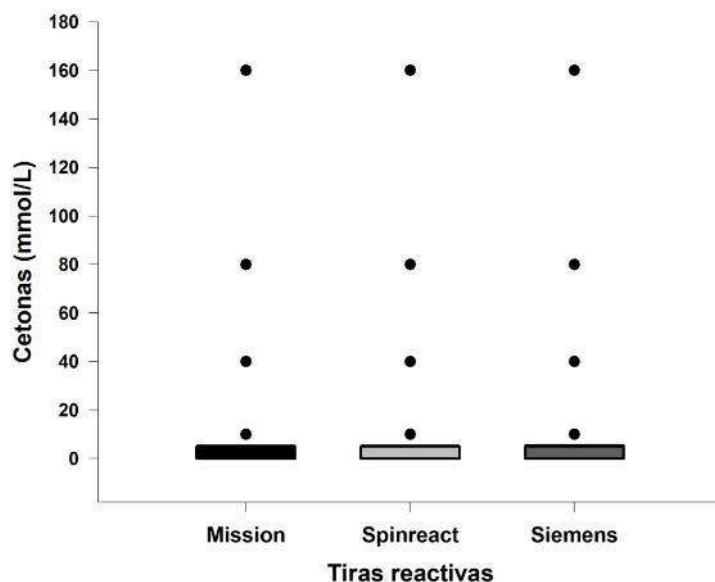


Figura 2. Comparación de los valores obtenidos de cuerpos cetónicos en dos marcas de uroanálisis respecto al grupo control.

## CONCLUSIONES

Se concluye que las tiras reactivas urinarias de la marca *Mission* y *Spinreact* no mostraron diferencias con los valores obtenidos por la tira control (*Siemens*), en las muestras de orina de *Alouatta palliata*. Por lo que, *Spinreact* y *Mission* tienen una efectividad de lectura de cetonas y pueden ser utilizadas en futuros estudios en primates no humanos para conocer y estudiar los cambios en la ingesta de alimento o el estado del balance energético. Sin embargo, cabe señalar que las tiras de marca *Misión* no resistieron tanto tiempo las condiciones ambientales en trabajo de campo, teniendo un deterioro a los tres meses de uso, por lo que se recomienda el almacenamiento de los tubos en otro recipiente hermético, en un lugar fresco y que no haya humedad, o bien, utilizar algún producto, como la diedrita ( $\text{CaSO}_4$ ), para controlar la humedad del ambiente durante su uso y almacenamiento en campo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. M. L. Bergstrom, U. Kalbitzer, F. A. Campos, A. D. Melin, M. Emery-Thompson y L. M. Fedigan, "Non-invasive estimation of the costs of feeding competition in a neotropical primate", *Hormones and Behavior*, Vol. 118, 2020, pp. 104632.
2. K. M. Botham y P. A. Mayes, "Oxidation of fatty acids: Ketogenesis", in V. W. Rodwell, D. A. Bender, K. M. Botham, P. A. Kennelly y P. A. Weil (Eds.), *Haper's Illustrated Biochemistry*, (McGraw-Hill Education, 2018) pp.223-231
3. C. Burrell, H. Zhang, D. Li, C. Wang, C. Li, y C. Aitken-Palmer, "Hematology, serum biochemistry and urinalysis values in the adult giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*)". *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, Vol. 48, 4, 2017, pp.1072-1076.
4. M. A. Caipira, y J. Simões, "Invited review: Ketosis diagnosis and monitoring in high-producing dairy cows", *Dairy*, Vol. 2, 2, 2021, pp. 303-325.

5. J. Cristóbal-Azkarate, y V. Arroyo-Rodríguez, "Diet and activity pattern of howler monkeys (*Alouatta palliata*) in Los Tuxtlas, México: Effects of habitat fragmentation and implications for conservation", *American Journal of Primatology*, Vol. 69, 9, 2007, pp. 1013–1029.
6. P.A.D. Dias, y A. Rangel-Negrín, "*Diets of howler monkeys*", En: M.M. Kowalewski, P.A. Garber, L. Cortés-Ortiz, B. Urbani, y D. Youlatos (Eds.), "Howler monkeys: Behavior, ecology, and conservation" (Springer Science, New York, United States of America, 2015) pp. 21-56
7. K. K. Dhillon, y S. Gupta, "Biochemistry, Ketogenesis", StatPearls, 2022.
8. P. A. D. Dias, y A. Rangel-Negrín, "Diets of Howler Monkeys". En M. M. Kowalewski, P. A. Garber, L. Cortés-Ortiz, y B. U. Dionisios-Youlatos (Eds.) *Howler Monkeys: Behavior, Ecology and Conservation* (Springer, New York Heidelberg Dordrecht London, 2015), Part I, pp.21-56
9. A. Estrada, "Resource use by howler monkeys (*Alouatta palliata*) in the rain forest of Los Tuxtlas, Veracruz, Mexico", *International Journal of Primatology*, Vol. 5, 1984, pp.105-131
10. S. Feng, H. Wang, A. Liu, J. Aa, F. Zhou, G. Wang, "Multi-dimensional roles of ketones bodies in cancer biology: Opportunities for cancer therapy", *Pharmacological Research*, Vol. 150, 2019, pp.104500.
11. K. Glander, "Habitat description and resource utilizations: a preliminary report on mantled howling monkeys ecology", *Socioecology and psychology of primates* (R.H. Tuttle, The Hague: Mouton. ed.), 1975, pp. 37-57.
12. E. C. Graff, H. Fang, D. Wanders, R. L. Judd, "Anti-inflammatory effects of the hydroxycarboxylic acid receptor 2" *Metabolism*, Vol. 65, 2, 2016, pp. 102-112
13. Guyton, A. C. y Hall, J. E. "Fisiología médica", España, Elsevier, 2006.
14. Hendrix, C. y Sirois, M. "Laboratory procedures for Veterinary Technicians. Missouri: *MOSBY*", Elsevier Fifth Edition, 2007.
15. D.W. Inouye, D.W. "Climate change and phenology", *WIREs CLIMATE CHANGE*, Vol. 13, 3, 2022, pp. e764.
16. T. Kaur, y M. A. Huffman, "Descriptive urological record of chimpanzees (*Pan troglodytes*) in the wild and limitations associated with using multi-reagent dipstick test strips", *Journal of medical primatology*, Vol. 33, 4, 2004, pp.187-196.
17. C.D. Knott, "Changes in orangutan caloric intake, energy balance, and ketones in response to fluctuating fruit availability", *International Journal of Primatology*, Vol. 19, 1998, pp. 1061–1079.
18. B. T. Kurien, N. E. Everds, R. H. Scofield, "Experimental animal urine collection: a review", *Laboratory Animals*, Vol. 38, 2004, pp. 333-361.
19. S. A. Leendertz, S. Metzger, E. Skjerve, T. Deschner, C. Boesch, J. Riedel, y F. H. Leendertz, "A longitudinal study of urinary dipstick parameters in wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*) in Côte d'Ivoire", *American journal of primatology*, Vol. 72(8), 2010, pp. 689–698.
20. A. J. J. MacIntosh, M. A. Huffman, K. Nishiwaki, y T. Miyabe-Nishiwaki, "Urological Screening of a Wild Group of Japanese Macaques (*Macaca fuscata yakui*): Investigating Trends in Nutrition and Health", *Int J Primatol*, Vol. 33, 2012, 460-478.
21. K. Milton, "The foraging strategy of the howler monkey (*Alouatta palliata*) in the tropical forest of Barro Colorado Island, Panama" (Ph.D. dissertation, New York Univ.), 1977.
22. K. Milton, "Food Choice and Digestive Strategies of Two Sympatric Primate Species", *The American Naturalist*, Vol. 117, 4, 1981, pp.496-505.
23. N. Møller, "Ketone body, 3-hidroxybutyrate: Minor metabolite-major medical manifestations", *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Vol. 105, 9, 2020, pp. 2884-2892.
24. D. J. Naumenko, M. Watford, S. S. Utami-Atmoko, W. M. Erd, y E. R. Vogel, "Evaluating ketosis in primate field studies: validation of urine test strips in wild Bornean orangutans (*Pongo pygmaeus wurmbii*)", *Folia Primatologica*, Vol. 91, 2, 2019, pp. 159-168.
25. T. S. Nielsen, N. Jessen, J. O. Jørgense, N. Møller, y S. Lund, "Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease", *Journal of Molecular Endocrinology*, Vol. 52, 3, 2014, pp. R199-R222.

26. R. Palestino-Sanchez, "Influencia de la temperatura ambiental y humedad sobre estrategias termorreguladoras y conducta diaria de los monos aulladores (*Alouatta palliata*)", [Tesis de maestría, INSTITUTO DE NEUROETOLOGÍA]. Universidad Veracruzana, 2021.
27. A. Paoli, G. Bosco, E. M. Camporesi y D. Mangar, "Ketosis, ketogenic diet, and food intake control: a complex relationship". *Frontiers in Psychology*, Vol. 6, 27, 2015.
28. P. PUCHALSKA, Y P. A. CRAWFORD, "METABOLIC AND SIGNALING ROLES OF KETONES BODIES IN HEALTH AND DISEASE", ANNUAL REVIEW OF NUTRITION, VOL. 41, 2021, PP. 49-77.
29. J. C. SERIO-SILVA, "PATRON DIARIO DE ACTIVIDADES Y HÁBITOS ALIMENTICIOS DE ALOUATTA PALLIATA EN SEMILIBERTAD" [TESIS DE LICENCIATURA]. UNIVERSIDAD VERACRUZANA. XALAPA, VERACRUZ, MÉXICO, 1992.
30. J.C. Serio-Silva, "Patrón diario de actividades y hábitos alimenticios de *Alouatta palliata* en semilibertad", En: E. Rodríguez-Luna, L. Cortés-Ortiz y J. Martínez-Contreras (Eds.). Estudios Primatológicos en México. (Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México, 1995) pp. 149-172.
31. J.C. Serio-Silva, V. Rico-Gray, L.T. Hernandez-Salazar, y R. Espinosa-Gomez, "The role of *Ficus* (Moraceae) in the diet and nutrition of a troop of Mexican howler monkeys, *Alouatta palliata mexicana*, released on an island in southern Veracruz, Mexico", *J Trop Ecol.*, Vol. 18, 2002, pp. 1-16.
32. K. SHANAHAN, Y L. MUNDT, "GRAFF. ANÁLISIS DE ORINA Y DE LOS LÍQUIDOS CORPORALES", EDITORIAL MÉDICA PANAMERICANA, MÉXICO, 2011.
33. T. Shimazu, M. D. HIRSCHHEY, J. NEWMAN. W. HE, K. SHIRAKAWA, N. LE-MOAN, C. A. GRUETER, H. LIM, L. R. SAUNDERS, R. D. STEVENS, C. B. NEWGARD, R. V. FARASE, R. DE CABO, S. ULRICH, K. AKASSOGLOU, Y K. VERDIN, "SUPPRESSION OF OXIDATIVE STRESS BY  $\beta$ -Hydroxybutyrate, an Endogenous Histone Deacetylase Inhibitor", *SCIENCES*, VOL. 339, 6116, 2013, PP. 211-214.
34. C.C. Smith, "Feeding behavior and social organization in howling monkeys", *Primate ecology* (T.H. Clutton-Brock, ed., London-New York: Academic Press), 1977, pp. 97-126.
35. A. M. Robinson, y D. H. Williamson, (1980). "Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues", *Physiological reviews*, Vol. 60, 1, 2980, pp. 143-187.
36. D. Vuljanić, A. Dojder, V. Špoljarić, A. Saračević, L. Dukić, J. Leniček-Krleža, J. Vlašić-Tanasković, I. Maradin, A. Grzunov, Ž. Vogrinc, A. M. Šimundić, "Analytical verification of 12 most commonly used urine dipsticks in Croatia: comparability, repeatability and accuracy", *Biochemia Medica*, Vol. 29, 1, 2019, pp. 010708.
37. S. A. Wich, S. S. Utami-Atmoko, T. Mitra-Setia, S. Djoyosudharmo, y M. L. Geurts, "Dietary and energetic responses of *Pongo abelli* to fruit availability fluctuations", *International Journal of Primatology*, Vol. 27, 6, 2006, pp.1535-1550.
38. E. Wiedner, A. R. Alleman, y R. Isaza, "Urinalysis in Asian Elephants (*Elephants maxumus*)", *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, Vol. 40, 4, 2009, pp. 659-666.

## ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LACTOBACILLUS PLANTARUM SOBRE SALMONELLA SPP

María Porfiria Barrón González, Valeria Alejandra Medina Ortiz, Yadira Quiñones Gutiérrez, Ramón Gerardo Rodríguez Garza y Daniel Julio Eguiarte Lara

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Monterrey, Nuevo León, México. CP 66455. Ciudad Universitaria  
maria.barrongn@uanl.edu.mx

### RESUMEN

Salmonella spp. es considerada como una bacteria patógena de gran importancia debido a los múltiples brotes de intoxicación alimentaria de los cuales es causante, así como de infecciones gastrointestinales que afectan a los humanos. Recientes estudios de la OMS y la FAO revelan que estos microorganismos son cada vez más resistentes a los fármacos, de ahí la gravedad del problema, por lo tanto es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para su tratamiento y control. Diversos trabajos demuestran que las bacterias ácido-lácticas consideradas como probióticos ayudan en el tratamiento y prevención de trastornos digestivos en el hombre al tener numerosas sustancias antimicrobianas específicas como ácido láctico, ácidos de cadena corta, y algunos metabolitos como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas. En este trabajo se evaluó bajo condiciones axénicas in vitro, la interferencia microbiana de los metabolitos totales de Lactobacillus plantarum (MT-Lp) a distintas concentraciones sobre el cultivo de Salmonella spp. Empleando el método espectrofotométrico y recuento bacteriano en placa, obteniendo como resultado la óptima inhibición de Salmonella spp a la dosis de 50µg/mL, además de también presentó actividad antioxidante. Los resultados que se obtuvieron se suman a las diversas investigaciones con probióticos encaminados al tratamiento de infecciones gastrointestinales y nos insta a investigar con mayor profundidad los metabolitos que se ven implicados en esta actividad inhibitoria que presenta L. plantarum y así obtener los tratamientos adecuados para controlar las enfermedades que desarrolla este microorganismo.

### INTRODUCCIÓN

Las epidemias de infección intestinal por Salmonella spp. hoy en día son uno de los problemas más comunes en todo el mundo, principalmente en países en desarrollo. En México este tipo de infecciones es frecuente y principalmente en la región noreste del país, en donde las condiciones ambientales son propicias para el desarrollo de este microorganismo en alimentos, aunado al escaso control que se tiene en la manufactura y distribución de alimentos. El tratamiento de este agente es a base de fármacos, pero su uso tiene como desventaja la generación de resistencia por parte del microorganismo, así como la manifestación de efectos secundarios desfavorables en los pacientes.

Se han evaluado el efecto de diferentes tipos de cultivos probióticos sobre poblaciones conocidas de Staphylococcus aureus, Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes y Salmonella enteritidis. Los resultados obtenidos demuestran que, existe un efecto inhibitorio evidente sobre las poblaciones de S. aureus, E. coli O157:H7 y L. monocytogenes. Este estudio confirma el efecto antagónico que poseen los cultivos probióticos sobre bacterias potencialmente patógenas para el ser humano y animales que pueden estar contenidas en alimentos (Castillo et al., 2012).

Los probióticos han sido definidos como “microorganismos vivos, que cuando son ingeridos en cantidades suficientes, tienen efectos beneficiosos sobre la salud, lo que va más allá de los efectos nutricionales convencionales”. Actúan benéficamente a una o varias funciones del organismo, proporcionan un mejor estado de salud y bienestar y/o reducen el riesgo de enfermedad. Pueden ser funcionales para la población en general o para grupos particulares de la misma. Hay que mencionar que, para ser considerada como probiótico, una bacteria tiene que sobrevivir el medio fuertemente ácido del estómago y colonizar el intestino delgado y grueso (Marquina, 1998).



## TEORÍA

Al estudiar la inhibición de *Escherichia coli* O157:H7 en queso fresco típico de Brasil conteniendo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, se encontró que las bacterias lácticas disminuyen significativamente la cantidad del patógeno. Se realizó un trabajo sobre la inhibición de *Salmonella enteritidis* var. *typhimurium* en quesos frescos. Observándose que los probióticos ejercieron una inhibición transitoria en el desarrollo de salmonella en las diferentes concentraciones inoculadas. Estos resultados muestran un panorama alentador para el uso de los probióticos como estrategia para contribuir al logro de la inocuidad alimentaria, además de los efectos en la salud que ya se han demostrado (Saad et al., 2001)

También se demostró que los probióticos ejercen inhibición transitoria en el desarrollo de *Salmonella*, que podría repercutir en prolongar la vida de anaquel de productos lácteos como el queso, lo cual podría incurrir en un menor riesgo de enfermedades gastrointestinales (González B. et al; 2006). En otros estudios se ha demostrado la actividad antagonista de diversas bacterias ácido-lácticas como inhibidoras del crecimiento de diversas bacterias patógenas para el humano como *Listeria monocytogenes* (De Waard et al.; 2002), *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* Beta-hemolíticos (Glück et al., 2003), *Helicobacter pylori* (Sgouras et al., 2004). En otro trabajo se reporta la actividad antagónica de *Lactobacillus plantarum* sobre *Salmonella typhi* y *Listeria monocytogenes*, los efectos fueron atribuidos a ácidos orgánicos. (Alvarado, 2009).

En este trabajo se busca demostrar la inhibición del crecimiento mediante la interferencia microbiana de *Lactobacillus plantarum* sobre *Salmonella* spp., empleando solamente los metabolitos producidos por el probiótico y procediendo posteriormente a liofilizarlo, para poder evaluar cantidades precisas de dichos postbióticos totales mediante la estrategia experimental que a continuación se presenta.

## PARTE EXPERIMENTAL

### *Salmonella* spp.

Mantenimiento. A partir de una cepa que se mantiene en refrigeración a 4°C, se hacen resiembras sucesivas en tubos de 13x100mm de borosilicato con tapón de rosca, que contenían 5mL de caldo nutritivo a los cuales se les inocula con 30 µL de la cepa, enseguida se incuban a 37°C por 24 hs.

Cinética de crecimiento: Se dispone de 9 tubos de borosilicato de 13x100 con tapón de rosca, los cuales contienen 5 mL de caldo nutritivo, se inoculan con 30 µL de *Salmonella* spp, la cual previamente se reactivó por dos resiembras sucesivas con el mismo volumen de inóculo, enseguida se incuban en un baño de agua a 37°C y cada hora se realizan las lecturas de absorbancia a 635nm durante un lapso de 24 hs, se registra y grafica cada lectura. Este ensayo se realiza efectuando tres eventos independientes por triplicado.

### *L. plantarum*

Obtención del medio condicionado con *L. plantarum*: Después de 9 horas de incubación de la cepa de *L. plantarum*, se agrega un inóculo de 10 mL a 2 litros del medio MPT para bacterias y se incuba 24 h a 37°C, posteriormente se centrifuga a 2500 rpm por 20 min. empleando recipientes de plástico de 250 mL, inmediatamente se somete a un proceso de prefiltración con bomba de vacío empleando filtros Whatman no.1 con matraz kitasato de 1000 mL. Después se realiza una segunda centrifugación a 2500 rpm por 20 min. empleando tubos cónicos, a continuación, se filtra por duplicado empleando filtro Millipore de 0.22 µm. Posteriormente se realiza una prueba de esterilidad, tomando un alícuota y colocándola en MPT-caldo e incubándolo a 37°C/24hs, cuando la prueba resulta positiva para esterilidad el sobrenadante obtenido se emplea como medio condicionado con *L. plantarum* (MCLp). Se almacena a 4°C por un día, a -20°C por 4 días y a -70°C por 15 días hasta su liofilización.

Obtención del liofilizado del MCLp. El Medio Condicionado con *L. plantarum* (MCLp) se almacena a 4°C por 1 día, a -20°C por 4 días y a -70°C por 15 días y se procede a liofilizar empleando un equipo Labconco a 0.133 mBar a una temperatura programada de -46°C, mediante este proceso se obtienen 8.35 g del liofilizado los cuales se diluyen en 15 mL de agua desionizada pH 7 en condiciones de



esterilidad, posteriormente se filtra la solución con filtros millipore de 0.22  $\mu\text{m}$ . se almacena hasta su uso y se realizan pruebas de esterilidad.

Preparación de la solución madre del (LMCLp). Se pesan 5 gramos del (LMCLp) y se disuelven bajo condiciones de esterilidad en 10 mL de agua desionizada estéril pH 7, se esteriliza empleando filtro millipore 0.22  $\mu\text{m}$ , se somete a prueba de esterilidad. Una vez que la prueba de esterilidad resulta positiva la solución madre se almacena a 4°C hasta su uso. A partir de esta solución madre se obtienen las concentraciones de 1,10, 50, 70 y 200  $\mu\text{g/ml}$ .

Bioensayos

Método espectrofotométrico: Se realizó el bioensayo conforme a la Tabla III y enseguida se incubaron a 37°C por 5 hs., se realizaron las lecturas de absorbancia a 570nm, e inmediatamente se registraron y graficaron las lecturas. Este ensayo se realizó efectuando tres eventos independientes por triplicado.

Método de Recuento Bacteriano en Placa (RPB): Después del periodo de incubación se escoge un tubo con la dosis seleccionada de acuerdo a los resultados y se plaquean por triplicado cada una de las concentraciones en diluciones de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-10</sup>, las cajas Petri inoculadas, se incuban a 37°C por 24 hs, y posteriormente se realiza el conteo de placas.

Determinación del CI50 del LMCLp contra Salmonella spp. mediante PROBIT: Este método se basa en la cuantificación de la vulnerabilidad de los individuos ante efectos físicos de una magnitud determinada que se suponen conocidos. El método consiste en la aplicación de correlaciones estadísticas para estimar las consecuencias desfavorables sobre la población u otros elementos vulnerables para los distintos niveles o dosis de los estímulos. La respuesta de una población ante un fenómeno físico se distribuye según una ley log-normal. El modelo es aplicable solo para aquellos fenómenos de los que se dispone de la "ecuación Probit" (Ferrán, 2001). Las absorbancias de los bioensayos que se obtuvieron de cada una de las dosis del LMCLp sobre Salmonella spp. se analizaron de acuerdo con el programa PASW Statistics 18.

Análisis estadístico: Para determinar in vitro el efecto del Liofilizado de Medio Condicionado con L. plantarum (LMCLp) sobre el cultivo de Salmonella spp, los bioensayos se realizan mediante tres eventos independientes por triplicado, los resultados se analizan mediante el Análisis de varianza con un P<0.05 empleando el paquete estadístico SPSS para Windows 2017

## RESULTADOS

Método de Turbidez: En la Figura 1 se muestra la lectura de absorbancia de las concentraciones 1, 10, 50, 70 y 200  $\mu\text{g/mL}$ , y el control a las 5 hs de incubación. Se observa que las dosis, muestran un marcado efecto inhibitorio de Salmonella spp en comparación con el control. Dicho efecto inhibitorio se aprecia a partir de la concentración de 1  $\mu\text{g/mL}$ , siendo mejor la inhibición del rendimiento celular al emplear 10  $\mu\text{g/mL}$ , estas dos concentraciones presentan una diferencia significativa entre sí, y también con respecto al control, de una manera más evidente la inhibición del rendimiento celular es muy marcada al emplear la concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$  obteniéndose una inhibición de aproximadamente 58% y al emplear la concentración de 70  $\mu\text{g/mL}$  la inhibición es muy similar con aproximadamente 0.2 de absorbancia, estas dos concentraciones no presentan diferencia significativa entre sí, pero con respecto a las concentraciones de 1 y 10  $\mu\text{g/mL}$  y el control sí presentan muy marcada diferencia significativa (ANOVA P<0.05); todo lo contrario a esto la dosis 200  $\mu\text{g/mL}$  fue la menos efectiva con respecto al control, dando a evidenciar que a mayor dosis no se logra la inhibición deseada.

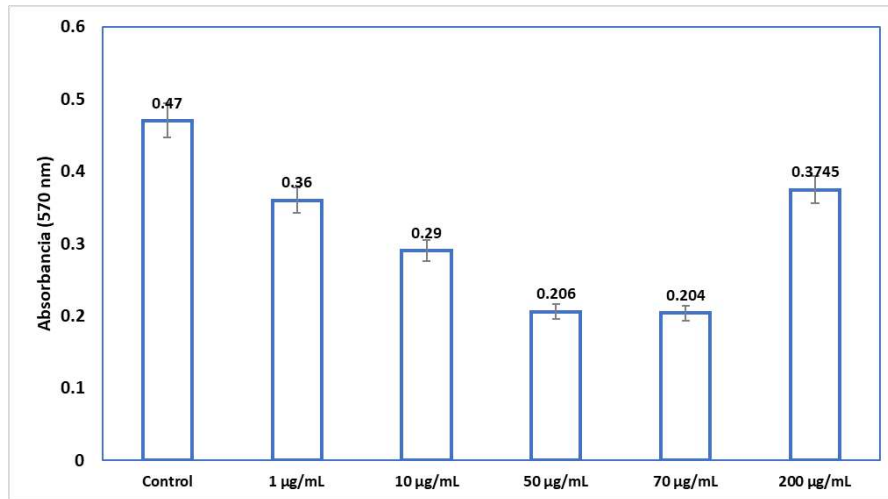


Figura 1. Actividad biológica de LMCLp contra *Salmonella spp.*

Evaluación de la CI50 de LMCLp sobre *Salmonella* por método de turbidimetría: Se realizó el análisis de datos relacionados a la Figura 1, mediante el paquete estadístico PROBIT y los resultados de porcentaje de inhibición se muestran en la Figura 2, donde observamos que *Salmonella spp* es inhibida un 38.3% en presencia del Tratamiento (LMCLp) guardando una relación aproximada del CI50 con respecto al control además de apreciar una inhibición del 92.2% de *Salmonella spp* en presencia de clindamicina.

Evaluación de la CI50 de LMCLp sobre *Salmonella* por método de Recuento bacteriano en Placa (RBP): Se llevó a cabo la determinación de UFC/mL a la CI50 LMCLp por el Método de RBP, en el control se obtuvieron 3,860x10<sup>9</sup> UFC/mL y al aplicar una concentración de 59.94 µg/mL (CI50 LMCLp) se obtuvieron 1.067x10<sup>9</sup> UFC/mL, estos valores presentan diferencia significativa entre el tratamiento y el control, lo cual representa inhibición del 99.97% de *Salmonella spp* en presencia del LMCLp.

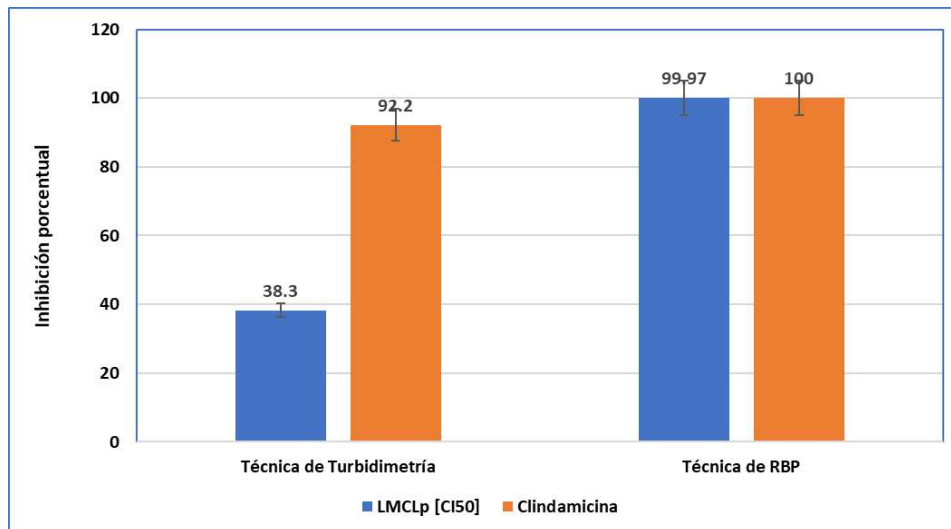


Figura 2. Comparación de la inhibición porcentual de *Salmonella spp.* por acción del LMCLp [CI<sub>50</sub>] tanto por la técnica de turbidimetría como por RBP.

**CONCLUSIONES**

El liofilizado del medio condicionado con *Lactobacillus plantarum* inhibe en un 99.9% el crecimiento in vitro de *Salmonella spp* de acuerdo con los resultados obtenidos al emplear la técnica de recuento

bacteriano en placa, y por la técnica de turbidimetría se obtuvo un 38.3% de inhibición, en comparación con la clindamicina que presentó inhibición de 100 y 92.9% en ambas técnicas respectivamente.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Castillo NA, AM LeBlanc , CM Galdeano , G. Perdigón. Probiotics: An alternative strategy for combating salmonellosis: Immune mechanisms involved, Food Research International, 45(2): 831-841, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.031>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996911002614>)
2. Marquina. D. Santos. A. (1998). Probióticos, Prebióticos y Salud. Universidad Complutense Departamento de Microbiología Facultad de Biología Madrid.
3. Saad, S.M.I. Vanzin, C. Oliveira, M.N. & Franco, B.D.G.M., (2001). Influence of lactic acid bacteria on survival of escherichia coli o157:h7 in inoculated minas cheese during storage at 8.5°C. J Food Protect. 64(8):1151-1155.
4. González B, Jiménez Z, Heredia N, Villarreal L, García G, Gómez M. Efecto de microorganismos prebióticos sobre el crecimiento de *Salmonella enteritidis* var *typhimurium*. REDALYC. 2006; 9(4):365-374.
5. De Waard, R., J. Garssen, G. Bokken And J.G. Vos, (2002). Antagonistic activity of *Lactobacillus casei* strain shirota against gastrointestinal Listeria monocitógenes Infection In Rats. Int. J. Food Microbiol. 73:93-100.
6. Glück, U. And G. Jan-Olaf., (2003). Ingested probiotics reduce nasal colonization with pathogenic bacteria (staphylococcus aureus, streptococcus pneumoniae, and beta-hemolytic streptococci). Am. J. Clinical Nutrition. 77:517-520.
7. Sgouras, D., P. Maragkoudakis, K. Petraki, B. Martínez-González, E. Michopoulos, G. Kalantzopoulos, E. Tsakalidou and A. Mentis. (2004). In vitro and in vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain shirota. Appl. Environ Microbiol. 70:518-526.
8. Alvarado-Rivas, C.C., Díaz- Rivero, C.G., (2009). Efecto antagónico de *Lactobacillus plantarum* aislado de pastizal de finca lechera, Revista Electrónica de Salud Pública Y Nutrición, II (1): 1-7.
9. Ferrán, Aranaz M., 2001. SPSS para Windows. Análisis Estadístico. Editorial Mcgraw-Hill Interamericana de España. Impreso en España. pp. 255-264.

## IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL EXTRACTO METANÓLICO DE LIMA DULCE (*CITRUS LIMETTA* RISSO), POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Jesús Nicodemo González Gallegos, Evelia Martínez Cano, Eglá Yareth Bivián Castro y Xochitl Aparicio Fernández

Centro Universitario de los Lagos. Universidad de Guadalajara. Enrique Díaz de León 1144, Col. Paseos de La Montaña, C.P. 47463 Lagos de Moreno Jalisco, México.  
[nicoglez30@gmail.com](mailto:nicoglez30@gmail.com)

### RESUMEN

*Citrus limetta* Risso, pertenece a la familia Rutaceae, su fruto se conoce popularmente como lima dulce, esta especie es utilizada en la medicina tradicional de México<sup>1</sup>. El fruto es ampliamente empleado por sus propiedades antiespasmódicas, diuréticas, y gracias a su alto contenido en vitamina C ayuda a mantener la piel saludable, protege el sistema inmunológico y contribuye en la prevención enfermedades respiratorias. Además, se usa como una alternativa natural en casos de reumatismo y gota, así como coadyuvante en la regulación de trastornos del sueño y modulador de la ansiedad<sup>2,3</sup>. El estudio consistió en la obtención del extracto metanólico crudo del fruto. A partir del extracto crudo se obtuvo una fracción rica en flavonoides por el método de extracción líquido-líquido con éter de petróleo. La fracción rica en flavonoides se particionó en 4 y a cada una se adicionó un solvente (éter etílico, acetato de etilo, ácido acético y n-butanol). Después, de cada partición se obtuvieron 15 fracciones por CC; como fase estacionaria se utilizó silica gel y como fase móvil un gradiente de concentración CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O (100, 50:50 y 20:80), respectivamente. Cada subfracción se analizó por CCF en placas de silica gel 60 F<sub>254</sub> para la identificación de fitoconstituyentes. Se midió una alícuota de cada fracción y se depositó en la placa de silica gel 60 F<sub>254</sub>. Finalmente, se procedió a realizar la CCF; para lo cual se utilizaron 4 fases móviles, una por cada una de las particiones antes mencionadas. La CCF reveló la presencia de compuestos fenólicos (flavonoides) únicamente en las fracciones correspondientes a la subfracción B2, mientras que en B1, B3 y B4 no se obtuvieron resultados positivos. Referente a las 15 fracciones obtenidas de la subfracción B2, se visualizaron 3 señales que corresponden a B2-MeOH-9, B2-MeOH-10 y B2-MeOH-11, mientras que en las fracciones B2-MeOH-12 y B2-MeOH-13 sólo se observaron 2 señales. En el presente estudio se encontró que el extracto metanólico del fruto contiene compuestos fenólicos que pueden estar relacionados con las propiedades terapéuticas que le son atribuidas en la medicina tradicional de México, por lo tanto, es posible utilizar el fruto de *Citrus limetta* Risso como fuente natural de estos compuestos bioactivos.

Palabras claves: fenoles, flavonoides, cromatografía en columna, cromatografía en capa fina.

### INTRODUCCIÓN

El uso de especies vegetales con propiedades terapéuticas es tan viejo como el hombre mismo, lo cual ha dotado a la medicina tradicional de México y del mundo como la base del conocimiento empírico. Actualmente, se conoce que las cualidades medicinales que poseen algunas especies de plantas se deben a su composición química. En las últimas décadas el interés por identificar las propiedades que se les atribuyen a algunas especies ha ido en aumento; ya que son una alternativa natural de prevenir, contrarrestar y atenuar los efectos de distintas enfermedades. Una de estas especies es *Citrus limetta* Risso, la cual es originaria de las zonas tropicales y subtropicales del mundo<sup>6-7</sup>. En la medicina tradicional de México se recomienda para prevenir y combatir diversas enfermedades; puesto que le son atribuidas una gama amplia de propiedades como lo son antiespasmódicas, así como diuréticas, y gracias al elevado contenido en vitamina C es utilizada para mantener una piel saludable, por otra parte, es conocida por proteger el sistema inmunológico y por prevenir enfermedades del tipo respiratorias. También, es una opción natural en casos de reumatismo y gota. Mientras que actúa como coadyuvante en la regulación de los trastornos del sueño y modulador de los síntomas de la ansiedad<sup>2</sup>. En publicaciones científicas realizadas a esta especie se ha demostrado que estas propiedades se asocian a su constitución química. Por lo que,

el objetivo del presente estudio fue identificar compuestos fenólicos en el extracto metanólico del fruto de *Citrus limetta* Risso a través de métodos cromatográficos.

## PARTE EXPERIMENTAL

### *Material vegetal y obtención de extractos*

El fruto de la especie *Citrus limetta* Risso, fue recolectado en la huerta “Los Mojica” ubicada en la ciudad de Lagos de Moreno, Jalisco. Los frutos fueron lavados con agua del grifo, después con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió a cortar el fruto en trozos pequeños. Se pesaron 10 g de muestra y se depositaron en un frasco previamente cubierto con papel aluminio. Se le adicionaron 70 mL de CH<sub>3</sub>OH y se dejó macerar por 48 horas. Luego se filtró y se obtuvo el extracto crudo que se almacenó en un frasco ámbar. Después se realizó una extracción líquido-líquido con éter de petróleo, donde la fase acuosa fue almacenada; esta se evaporó hasta el 50% de su volumen en baño María. La fracción obtenida se particionó en 4 subfracciones, ver Figura 1.



**Figura 1.** Recolección y preparación del material vegetal para la obtención del extracto metanólico.

### *Partición de subfracciones por CC*

La fracción rica en flavonoides se particionó en 4 subfracciones y a cada una se le adicionó un solvente (éter etílico, acetato de etilo, ácido acético y n-butanol). A continuación, de cada partición se obtuvieron 15 fracciones por CC; como fase estacionaria se empleó sílica gel y como fase móvil un gradiente de concentración diferente de CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O (100, 50:50 y 20:80), respectivamente<sup>8</sup>.

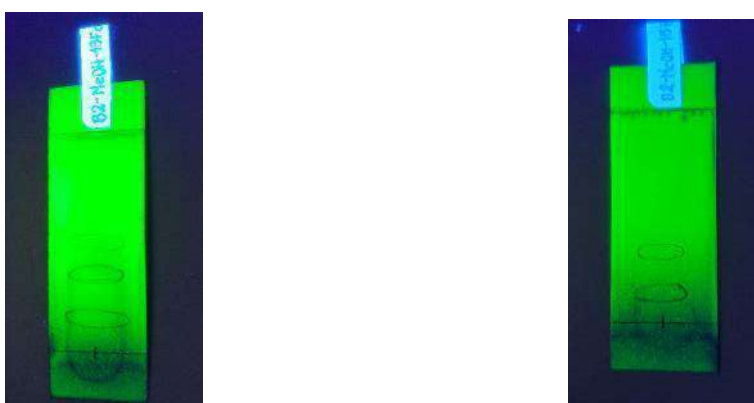
### *Determinación de flavonoides por CCF*

Posteriormente, las fracciones obtenidas fueron analizadas por cromatografía en capa fina (CCF) en placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub>, se emplearon cuatro fases móviles (una por subfracción); para B1: hexano: acetato de etilo (6: 4, v/v); para B2: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua (100: 11: 11: 27, v/v), sin emplear ninguna solución reveladora; para B3: cloroformo: metanol (99: 119, v/v); para B4: cloroformo: metanol (1: 1, v/v), la solución reveladora utilizada en ambas subfracciones

fue KOH al 10% en CH<sub>3</sub>OH. Se consideraron positivas aquellas pruebas si y solo si presentaban señales fluorescentes en el cromatofolio al ser expuestas a la lámpara de luz UV fluorescente a una longitud de onda igual a 254 nm. Finalmente, al haber sido visualizadas y marcadas las señales en los cromatofolios se calcularon los valores de Rf<sup>9-11</sup>.

## RESULTADOS

A partir de la fracción rica en flavonoides se llevó a cabo la obtención de fracciones por CC, se visualizó la presencia de grupos de metabolitos secundarios por CCF y se calculó el valor de Rf. En total se obtuvieron 60 fracciones, donde únicamente en las fracciones que corresponden a la subfracción B2-MeOH tratadas con acetato de etilo se evidenció la presencia de compuestos fenólicos en las fracciones B2-MeOH-9, B2-MeOH-10, B2-MeOH-11. Los valores de Rf calculados corresponden a 0.14, 0.35 y 0.49. Mientras que para las fracciones B2-MeOH-12 y B2-MeOH-13 se obtuvieron los valores de Rf corresponden a 0.14 y 0.33, como se puede observar en la Figura 3.



**Figura 3.** Cromatofolios representativos de las fracciones B2-MeOH-13 y B2-MeOH-15.

En un estudio realizado por Lederer, E. y Lederer, M. (1957) encontraron en los extractos de cáscara de lima dulce tres valores de Rf (0.036, 0.379 y 0.825), los cuales corresponden a eriocitrina, hesperidina y ácido cafeico. Donde observaron la presencia de eriocitrina, hesperidina y ácido cafeico con los siguientes valores de Rf 0.036, 0.379 y 0.825 respectivamente en el extracto de cáscara de lima. Al comparar los resultados obtenidos en nuestro estudio, los valores de Rf obtenidos podrían atribuirse a la presencia de compuestos como la hesperidina y el luteolin-7-glucósido<sup>14</sup>. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para corroborar la presencia de los compuestos antes mencionados, así como de otros metabolitos secundarios que pueden ser los responsables de la propiedad antioxidante de la lima dulce.

## CONCLUSIONES

En el presente estudio, se encontró que el extracto metanólico del fruto de la especie *Citrus limetta* Risso contiene compuestos fenólicos que están relacionados con las propiedades terapéuticas que se le atribuyen en la medicina tradicional de México, por ejemplo, la actividad antioxidante. Los antioxidantes son los responsables de contrarrestar el efecto causado por los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno a la célula; y así prevenir diferentes enfermedades.

Con los resultados obtenidos se pudo corroborar la presencia de compuestos bioactivos en el fruto de *Citrus limetta* Risso; por lo que, es ampliamente recomendable su consumo ya que es una fuente natural de estos compuestos. Sin embargo, consideramos que es necesario indagar más sobre la estructura y actividad biológica de los compuestos presentes en la lima dulce, lo cual se realizará en estudios posteriores.



**BIBLIOGRAFÍA**

1. Argueta-Villamar A, Cano-Asseleih LM, Rodarte ME. 1994. *Citrus limetta* In: Atlas de plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, México, D.F., 902-903.
2. Botanical-online. 2019. Propiedades de la lima. Disponible en: <https://www.botanical-online.com/alimentos/lima-propiedades-caracteristicas> Accesado el 14/10/2019.
3. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?|=3&t=Citrus%limetta&i d=7409>. 31July2017
4. Wagner, H., Bladt, S. 1996. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas, 2nd edn. Springer Berlin.
5. Andersen, O. M., Markham, K. R. 2005. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. NY, USA: CR Press Taylor Francis Group.
6. Argueta, V. A. 1994. "Citrus limetta," in Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, Instituto Nacional Indigenista, Cano A. L., y Rodarte, M. E. Eds. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana, Mexico. 902-903.
7. Muthiah, P. L. 2012. In vitro xanthine oxidase inhibitory activity of leaves, fruits and peel extracts of *Citrus aurantium*, *Citrus limetta* and *Citrus limon*. International Journal of Phytopharmacy. 2, 77-80.
8. Domínguez, X. A. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. México: Limusa.
9. Ospina, C. J., Ospina, P. J., Bacca, C. 2007. Análisis fitoquímico preliminar de las hojas de la especie *Columnea picta* (capitana), planta utilizada por la comunidad antiofídica. Revista Cubana de Química. 19: 59-63.
10. UNAD. Productos Naturales. 2014. Técnicas de extracción y separación de principios activos vegetales. Disponible en: [http://datateca.unad.edu.co/contenidos/401551/401551\\_Modulo\\_ProductosNaturales-Ajustes\\_Julio\\_18\\_2014.pdf](http://datateca.unad.edu.co/contenidos/401551/401551_Modulo_ProductosNaturales-Ajustes_Julio_18_2014.pdf). Accesado el 11/10/2019.
11. García, D. 2004. Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. Pastos y Forrajes. 27: 1-9.
12. Andersen, O. M., Markham, K. R. 2005. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. NY, USA: CR Press Taylor Francis Group.
13. Harborne, J. B. 1998. Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis. Chapman and Hall Ltd, London.
14. Lederer, E., Lederer, M, 1957. Cromatography 2nd Edition. Elsevier Publishing company. 103-107, 115-126, 162-167, 380-382

## RECUPERACIÓN DE *CRYPTOCOCCUS SPP* EN EUCALIPTOS DE LA FACULTAD DE QFB-UMSNH

<sup>1</sup>Rodrigo Díaz Balcázar, <sup>1</sup>Patricia Yazmín Figueroa Chávez.

<sup>1</sup>Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Correo: rodrigo.diaz@umich.mx

### RESUMEN

Existen diferentes formas por las que el ser humano puede contraer enfermedades, todo va a depender de la vía de entrada, así como de la exposición del huésped susceptible, dentro de los microorganismos infecciosos están los hongos, de estos existen algunas estructuras levaduriformes capsuladas que afectan seriamente la salud de ser humano, la criptococosis es una enfermedad fúngica oportunista y sistémica, que se puede diseminar al ser humano por inhalación de las levaduras capsuladas presentes en el medio ambiente y en los árboles de los Eucaliptos causando meningitis, estas levaduras se pueden localizar en los árboles ya que han establecido asociaciones mutualistas con los sustratos vegetales de ellos. El objetivo es aislar especies de *Cryptococcus spp* de los árboles de Eucalipto, para su posterior utilización en el Laboratorio de enseñanza del área de Microbiología. La metodología es de tipo longitudinal, cuantitativa, se estuvieron analizando hojas y cortezas (ritidomas) durante 4 meses, es decir una vez por mes, para tener un total de 59 muestras, estas se sembraron en medio Níger y BHI, posteriormente se incubaron durante 7 días a 27°C y 35°C. Los resultados fueron conforme al crecimiento y características coloniales de *Cryptococcus spp*, se observaron todas las placas de los diferentes medios y el crecimiento en medio Níger fue abundante en un 20.3%, en un 42.4% moderado y en un 37.3% escaso, para el medio BHI abundante en un 28.8%, moderado en un 25.4% y 45.8% escaso, al aplicarse la prueba "t de student" se obtuvo un p valor de 0,003, es decir menor a un p valor de 0,005 demostrando que hay diferencia significativa en ambos medios conforme al crecimiento, resultando ser mejor el medio BHI para recuperar a *Cryptococcus spp*. Para concluir con este trabajo es necesario considerar todos los requerimientos nutricionales esenciales de estos hongos para poder seleccionar los medios a utilizar, con estos resultados podemos confirmar que es posible recuperar a *Cryptococcus spp* de las hojas y cortezas de los árboles de Eucalipto, si bien son crecimientos en su mayoría escasos y lentos, el medio que mejor favoreció la recuperación es el medio BHI.

### INTRODUCCIÓN

La criptococosis es una enfermedad fúngica oportunista y sistémica, causada por diferentes especies del género *Cryptococcus* el proceso infeccioso comienza cuando por inhalación de estructuras levaduriformes capsuladas que se pueden encontrar en el ambiente, éstas alcanzan vías respiratorias y se diseminan por el torrente circulatorio y de ahí al sistema nervioso central. <sup>(1)</sup> Es importante señalar que el hábitat principal se encuentra en algunas aves como: palomas, pichones, gallinas entre otras, que actúan como verdaderos hospederos y vectores manteniendo viable a la estructura levaduriforme, su principal fuente de infección radica en las heces fecales, las cuales por su alto contenido nitrogenado permite que las levaduras sobrevivan en el medio ambiente por periodos de meses <sup>(2,3)</sup>, un segundo hábitat del se encuentra en los Eucaliptos (*Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus tereticornis*) <sup>(4)</sup>, los cuales tienen una importante distribución a nivel mundial de ahí el objetivo de recuperar al género *Cryptococcus* de este hábitat

### TEORÍA

La criptococosis es una enfermedad de distribución mundial la cual generó su mayor auge cuando se identifica en pacientes cuya inmunidad se encuentra inmunodeprimida, especialmente en individuos con VIH con un porcentaje del 80-90%, la prevalencia descrita es variable ya que depende de cada país. Es considerada una micosis oportunista sin embargo puede presentarse en personas inmunocompetentes, el agente causal involucrado en este padecimiento es el *Cryptococcus neoformans*, cuya distribución predomina en Estado Unidos de América y algunos países de Europa como: Dinamarca, Alemania, Italia, Francia y Suiza sin embargo existen otras especies de importancia epidemiológica como *Cryptococcus gattii* (serotipo B y C) de predominio en Australia,

Asia, África y algunos países de América como México, la criptococosis afecta con mayor frecuencia a hombres. <sup>(5)</sup>

Comparativamente con otras enfermedades infecciosas como lo menciona Castañón Olivares <sup>(6)</sup> este tipo de micosis no representa aún un problema de salud pública en México, ya que su prevalencia es baja (por cada 10 mil personas hay alrededor de 28 infectados); pero su tasa de mortalidad es muy cercana a 50%; o sea, de esos 28 infectados, 14 mueren.

Las excretas de las palomas que se encuentran a la intemperie generalmente pueden tener los serotipos A o D, la variante *Cryptococcus gattii* se ha logrado aislar en desperdicios que rodean a los eucaliptos de las especies *camaldulensis* y *tereticornis*, las cepas que se han sido tipificado al momento son del serotipo B. La distribución de estas especies de eucaliptos en Australia coincide con la distribución de las infecciones debidas a *Cryptococcus neoformans* variante *gattii* en dicho país. <sup>(7)</sup>

El *Cryptococcus gattii* es un hongo levaduriforme perteneciente al filo Basidiomycota, mide aproximadamente entre 4-6 micras ( $\mu\text{m}$ ), sus colonias son esféricas o elipsoides y poseen cápsula rica en polisacáridos la cual hace crecer su tamaño hasta 25  $\mu\text{m}$ . La morfología colonial que presenta en medios de cultivo es típica de microorganismos que poseen capsula, cuyo rasgo lo manifiesta por su aspecto mucoide con una temperatura optima de crecimiento de 37°C. Existen cerca de 30 especies de *Cryptococcus*, sin embargo, la mayoría de las infecciones en humanos son causadas por *C. neoformans* y *C. gattii*. <sup>(5)</sup>

La característica más significativa que tiene este microorganismo es la cápsula, la cual puede visualizarse con una tinción denominada negativa, en la que se utiliza la nigrosina y puede utilizarle directamente en una preparación o bien directo de un fluido corporal como el LCR, hay que tener en cuenta que la presencia de la cápsula puede variar por ciertas condiciones, como el estado inmunitario del paciente y los traspasos consecutivos en un cultivo que ocasionan que dicha estructura pierda integridad. <sup>(1)</sup> El microorganismo tiene como reservorio principal a los humanos, el agua, el suelo, y en la vegetación con frecuencia de importancia en la corteza y detritus de árboles de eucalipto y hospedadores a animales domésticos de compañía como gatos, perros y aves. <sup>(4)</sup>

La criptococosis pulmonar es una enfermedad poco frecuente, la epidemiología en México no se encuentra del todo descrita; sin embargo, como lo describe Laura Mestre <sup>(5)</sup> en México, se aisló el hongo en 20.7% de las muestras de excremento de palomas en áreas urbanas; además, menciona que para 1970 se registraron sólo 25 casos de criptococosis en los hospitales de concentración de la Ciudad de México. Ahora bien, se debe considerar que se presenta con frecuencia ante una complicación como VIH o en otros cuadros donde haya cuadros de inmunosupresión. <sup>(1)</sup>

La infección por *Cryptococcus* era rara hasta que comenzó la epidemia del VIH, por tal razón es que se considera una enfermedad oportunista ya que posee la capacidad de infectar a pacientes cuyo sistema inmunológico se encuentra debilitado. Sin embargo, existen hallazgos donde las personas con un sistema inmunológico sano también pueden desarrollar criptococosis, y en ésta se encuentra involucrado el *Cryptococcus gattii*. También resulta probable que ocurra en personas con otro tipo de trastornos pulmonares como el tabaquismo crónico. <sup>(6)</sup> La infección inicia cuando por vía respiratoria se llegan a inhalar las esporas del hongo, éstas alcanzan alveolos pulmonares complicando la respiración, una vez instalado el microorganismo en pulmón por vía hematogena viaja a cerebro y tejidos que recubren al encéfalo y meninges provocando meningitis. La criptococosis por *Cryptococcus gattii* puede también tener diseminación a la piel y otros tejidos como articulaciones, huesos, hígado, riñones, bazo y próstata <sup>(5)</sup>

## PARTE EXPERIMENTAL

### Objetivo

- El **objetivo** fue recuperar a *Cryptococcus spp* en Eucaliptos en el laboratorio de microbiología de la Facultad de QFB-UMSNH.
- Es un estudio de tipo cuantitativo, de alcance descriptivo.

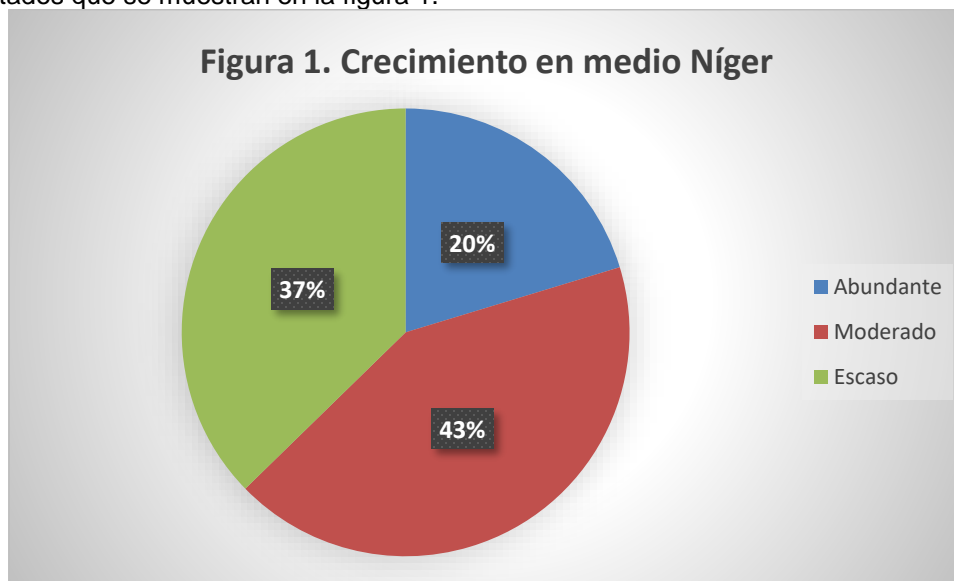
### METODOLOGÍA

1. Recolección de las muestras a procesar (cortezas y ritidomas)
2. Las cortezas y ritidomas se colocan en solución salina al 0.85% por dos horas
3. Del sobrenadante de las muestras se toma una gota con asa bacteriológica
4. Sembrar en medios de cultivo BHI y Níger.
5. Incubar a diferentes temperaturas (25°C y 37°C)
6. Periodo de incubación de 7 días.
7. Valoración de crecimiento. (A= Abundante crecimiento, M=Moderado crecimiento y E=Escaso crecimiento)

### RESULTADOS

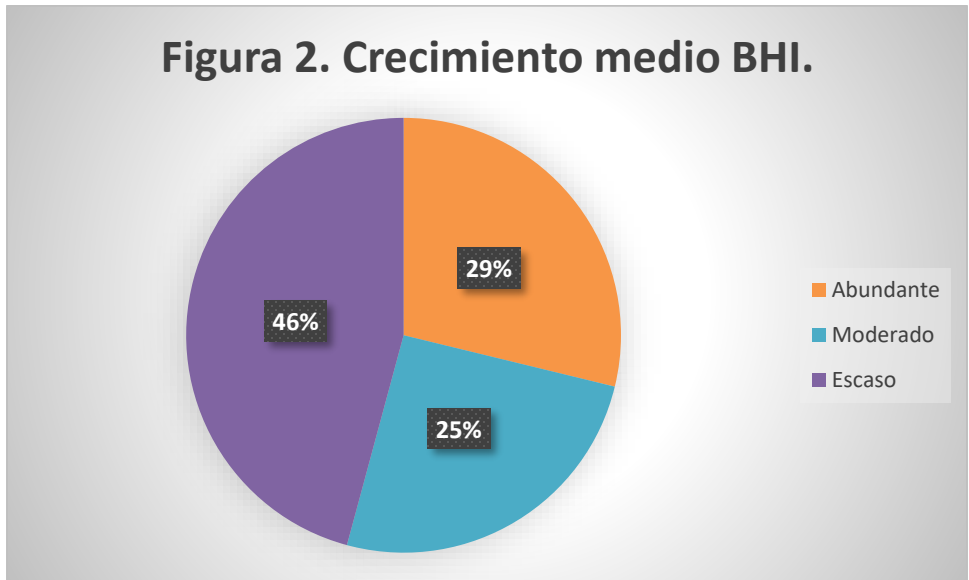
La recolección de las muestras de cortezas y ritidomas se hicieron durante 4 meses, en total se obtuvieron 59 muestras, cada una de ellas sembradas por duplicado, es decir la muestra 1 en medio Níger a 25°C y Níger a 37°C, para el caso del medio BHI fue igual, un BHI a 25°C y otro BHI a 37°C, se hizo de esa forma por la características que tienen los hongos de crecer en diferentes temperaturas, el periodo de incubación fue de 5 a 7 días, posteriormente se analizó el crecimiento donde se obtiene la siguiente información.

Para el medio Níger se realizó el registro de datos del crecimiento en ambos medios, obteniéndose los resultados que se muestran en la figura 1.



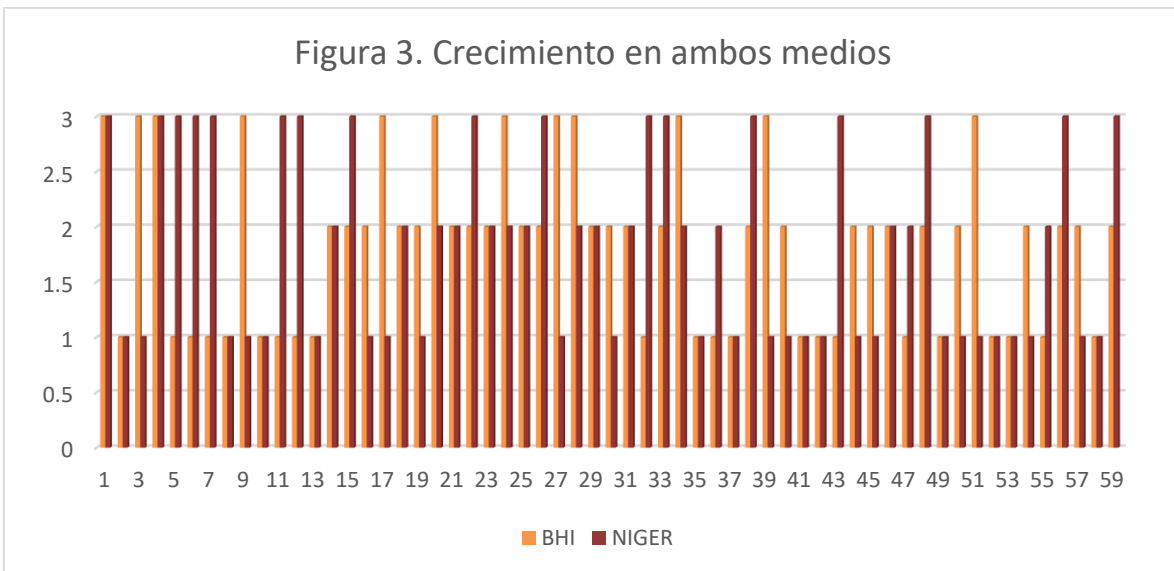
Fuente: Elaboración propia de los datos obtenidos en el Lab de Microbiología, QFB-UMSNH.

En el medio de BHI (infusión, cerebro, corazón), los resultados que se obtuvieron fueron los que se observan en la figura 2.



Fuente: Elaboración propia de los datos obtenidos en el Lab de Microbiología, QFB-UMSNH.

De manera general en la figura 3, se muestran la comparativa de los crecimientos en los diferentes medios de cultivo.



Fuente: Elaboración propia de los datos obtenidos en el Lab de Microbiología, QFB-UMSNH.

Si bien además de BHI y Níger, existen otros medios que se pueden utilizar para la recuperación de *Cryptococcus*, se decidieron evaluar para analizar cuál de los dos puede ser más viable, ya que el medio BHI es un medio básico que contiene todos los nutrientes en su formulación, el medio Níger debe de ser preparado de manera artesanal es decir agregar cada ingrediente, ya que la principal sustancia para estos hongos son los ácidos para su crecimiento, por ello se realizó la prueba estadística “t” student y valorar si la recuperación en ambos medios es igual o distinta, en la tabla 1, se muestran los resultados obtenidos de la ANOVA, en donde se tiene una significancia bilateral de 0,003 es decir menor al p valor de 0,005 por lo que se dice que existe diferencia significativa en ambos medios de cultivo conforme a los crecimientos.

Tabla 1. ANOVA de un factor					
Crecimiento en diferentes medios.					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	9.100	2	4.550	9.213	.003
Intra-grupos	28.150	57	.494		
Total	37.250	59			

Fuente: Elaboración propia de los datos obtenidos en el Lab de Microbiología, QFB-UMSNH.

## CONCLUSIÓN

Con los resultados obtenidos se concluye que son varios factores por los cuales se puede ver influenciado el crecimiento de *Cryptococcus spp.*, como lo son los medios de cultivo y las temperatura de incubación, ya que si estos no son adecuados no se tendrá crecimiento y no se podrá recuperar al microorganismo, con estos resultados podemos confirmar que es posible recuperar a *Cryptococcus spp.* de las hojas y cortezas de los árboles de Eucalipto, si bien son crecimientos en su mayoría escasos y lentos, el medio que mejor favoreció la recuperación es el medio BHI. Es importante también mencionar que como laboratorio tengamos medidas de control de calidad para lograr su recuperación, ya sea para el diagnóstico del paciente o con fines de enseñanza.

## REFERENCIAS

1. Escandón P., Quintero E., Granados D., Huerfano S., Ruiz A., Castañeda E. Aislamiento de *Cryptococcus gattii* serotipo B a partir de detritos de *Eucalyptus spp.* en Colombia. *Biomédica*. 2005 Septiembre; 25(3).
2. Araiza J., Tejeda OJ y Bonifaz A. Criptococosis, Torulosis, Enfermedad de Busse-Buschke, Blastomycosis Europea, Enfermedad señal. 2021.
3. López MR., Méndez TLJ., Manzano GP., Hernández HF., Principios de Micología Médica Clínica Diagnóstico y Terapéutica. In C.V. Méndez Editores., 2009 p. 154-155
4. Castañón OL., Criptococosis: una enfermedad que llega con el aire. *El universal*, 2016 Febrero P.16
5. Mestre OL. Vicuña GRM., Dominguez SFR y López VJC. Criptococosis : una pulmonar gigante en paciente: reporte de caso. *Neumonía y Cirujía de Tórax*. 2022 Abril-Junio 81 (2).
6. Carrada BT. Criptococosis en la era del sida. *Revista Mexicana de Patología Clínica*. 2003 Enero-Marzo; 50(1).
7. Tapia C y Correa N., Género *Cryptococcus*. *Revista Chilena de Infectología*. 2014 Diciembre; 31(6).



## DESARROLLO DE ALGORITMO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GENES BLANCO DE LOS RECEPTORES DE ACIDO RETINOICO Y RECEPTORES X DE ACIDO RETINOICO

Marisa Hernández Barrales<sup>1</sup>, Mitzy Karina Lara Dorado<sup>2</sup>, Jorge Luis Ayala Luján<sup>3</sup>, Adrián Reyes-López<sup>4</sup>

<sup>1-4</sup>Laboratorio de Patología y Diagnóstico Molecular, Unidad Académica de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Zacatecas.

adrianreyes.cq@uaz.edu.mx

### RESUMEN

El Ácido Retinoico y demás derivados del retinol (retinoides) han sido considerados como factores transcripcionales en varios procesos fisiológicos; esto debido a que los retinoides son ligandos de algunos receptores nucleares, principalmente los receptores de ácido retinoico (RAR) y a los receptores X del ácido retinoico (RXR). Los RAR y RXR se unen a los genes, como dímeros RAR/RAR, RAR/RXR y RXR/RXR, en secuencias conocidas como elementos de respuesta al ácido retinoico (RARE), presentes en los promotores de los genes; la unión de los dímeros al RARE puede modificar la expresión genética. Los RARE están compuestas por dos repeticiones directas compuestas por las secuencias hexámicas 5'- PuG(A/G)TCA-3'. Se han descrito algunos genes que son seleccionados por estos receptores, y resulta necesario abordar este tipo de estudios para identificar los genes que podrían estar modulados en su expresión, por RAR y RXR con el fin de entender los procesos en los que los retinoides tienen un papel importante. Con el objetivo de determinar los RARE en las regiones promotoras de los genes reconocidos, nos planteamos desarrollar un algoritmo en el sistema Python. El algoritmo fue utilizado en la secuencia del Cromosoma Humano 1 (versión GRCh 38.p14). Después de la aplicación del algoritmo, se encontró que 354 de los genes reportados en el cromosoma humano 1 corresponden a secuencias RARE en la región promotora. Estos resultados nos brindan un panorama sobre la aplicación de este algoritmo a la búsqueda de secuencias RAREs y las ventajas de utilizarlo en diferentes cromosomas humanos lo cual resulta de gran utilidad para la predicción de la participación en procesos biológicos de interés.

### INTRODUCCIÓN

Los Retinoides son compuestos responsables de regular varios procesos biológicos modificando a nivel transcripcional la expresión de genes diana mediante la activación de los Receptores Nucleares (RN) específicos RAR y RXR. Estos RN poseen un sitio de unión al ADN, el cual reconoce secuencias específicas y cuando interacciona con sus ligandos y demás moléculas puede activar o inhibir el proceso transcripcional. Por lo que es importante identificar esas secuencias de unión para entender mejor los procesos fisiológicos que están involucrados con los retinoides.

### TEORÍA

Los Retinoides son moléculas, naturales o sintéticas, que muestran actividades biológicas y características del Retinol, así como sus derivados<sup>1</sup>. Estas moléculas presentan coeficientes de partición alto ( $\log P$  retinol=5.68)<sup>2</sup> lo que los hace muy fáciles de atravesar membranas celulares. Los retinoides participan en múltiples procesos fisiológicos como la espermatogénesis, organogénesis<sup>3</sup>, regulación de la reproducción, en el sistema inmunológico, visión y el buen funcionamiento de algunos tejidos; además, en Takahashi (2022)<sup>4</sup> se enumeran varias otros procesos relacionados con la regulación del crecimiento celular y regulación en la diferenciación celular y apoptosis, entre otros.

Los retinoides son ligandos naturales de los Receptores nucleares de ácido retinoico (RAR) y receptores X de retinoides (RXR)<sup>1,5</sup>. Estos receptores han sido descritos como factores de transcripción activados por ligando<sup>6</sup>. Tanto los RAR como los RXR presentan una estructura de 6 dominios: 1) los dominios A/B, con la función de activador transcripcional, 2) el dominio C, con la función de unión al ADN (DNA binding domain), 3) el dominio D, con una participación importante en la dimerización del receptor, 4) el dominio E, el cual contiene el sitio de unión a Ligandos (LBD), así

como una participación importante en la dimerización del receptor y 5) el dominio F, que puede también ser el sitio de unión a Ligando y de interacción con algunos coactivadores y correpresores de la transcripción<sup>7</sup>.

La regulación de la transcripción mediada retinoides requiere que los ligandos se unan a los RAR en el núcleo de las células, esta interacción ocasiona que el receptor sufra un cambio conformacional que provoca que se forme un homodimero con otra molécula de RAR o heterodimero si se une con una molécula de RXR. Los dímeros reconocen secuencias de ADN presentes en la región promotora de algunos genes. Estas secuencias de reconocimiento son conocidas como elementos de respuesta al ácido retinoico (RARE) que se caracterizan por ser secuencias de repetición (DR) con la estructura 5'-PuG(G/T)TCA-3' separadas entre 0 a 8 secuencias motivos. Las DR pueden a su vez denominarse con un número característico dependiendo de la longitud de la secuencia motivo que las separa (e. g. DR3, si la secuencia motivo tiene una longitud de 3 pb) <sup>8-10</sup>.

Tanto lo RAR como los RXR presentan subtipos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , etc.) e isoformas de cada subtipo<sup>9</sup>; lo que produce una gran posibilidad de combinaciones entre los dímeros, la expresión de cada uno de los subtipos presenta una distribución amplia en diferentes tejidos del organismo<sup>11</sup>, lo cual puede explicar la amplia gama de procesos en los que los retinoides pudieran tener un rol esencial. En varias investigaciones se ha hecho patente la interacción de los RAR y RXR con la transcripción de algunos genes; sin embargo, aún hay muchas interrogantes que no han sido explicadas, como el estimar el total de genes que pudieran estar mediados su expresión por estos receptores. Es por ello, que en este trabajo desarrollamos un algoritmo basado en método bioinformático para estimar el total de genes que podrían estar regulados en cuanto a la transcripción por los receptores de ácido retinoico RAR y RXR.

## PARTE EXPERIMENTAL

En este trabajo desarrollamos un algoritmo en lenguaje de programación Python para la identificación de secuencias motivo (sitios RARE) de reconocimiento de los receptores de ácido retinoico (RAR) y los receptores X de retinoides (RXR). Este algoritmo fue probado en el Cromosoma Humano 1 (versión GRCh 38.p14). La secuencia del cromosoma humano fue descargada desde la página del National Library of Medicine<sup>12</sup> en formato fasta; adicionalmente, con la opción de “download track data” se descargó la información de la posición de los genes en formato “.csv”. Esta base de datos contiene la información de los genes: información: Accession, Start, Stop, Gene symbol, Strand, NCBI Gene ID y Name.

Los genes que conforman al cromosoma, esta información fue convertida a diccionario de Python con la siguiente estructura:

```
Genes_chr1={'Simbolo_Gen':{'Start':posición_inicio,'Stop':posición_final,
'Name': 'Nombre del Gen'},...}
```

El diccionario fue guardado en un módulo llamado genes, la cantidad de genes fue calculado con *len(genes\_p14.chr1\_p14)*. El cromosoma 1 presenta genes codificantes de proteínas y no codificantes, por lo que en este trabajo separamos los genes para analizar los genes codificantes; para ello, los genes que son considerados microRNAs, pseudogenes, MIRNAS, no caracterizados (uncharacterized), RNA codificantes no proteicos, los RNA de transferencia anticodon, RNA pequeño nucleolar, fueron colocados en una lista llamada no codificante, mientras que los genes codificantes se guardaron en una lista denominada codificantes con el siguiente algoritmo.

```
no_codificantes=[]
codificantes=[]
for i in genes_p14.chr1_p14:
    if 'pseudogene' in genes_p14.chr1_p14[i]['Name']:
        no_codificantes.append(i)
    if 'microRNA' in genes_p14.chr1_p14[i]['Name']:
```

```

        no_codificantes.append(i)
    if 'MIRNA' in genes_p14.chr1_p14[i]['Name']:
        no_codificantes.append(i)
    if 'tRNA-' in genes_p14.chr1_p14[i]['Name']:
        no_codificantes.append(i)
    if 'RNA, 5S ribosomal' in genes_p14.chr1_p14[i]['Name']:
        no_codificantes.append(i)
    if 'uncharacterized' in genes_p14.chr1_p14[i]['Name']:
        no_codificantes.append(i)
    if 'small nucleolar RNA' in genes_p14.chr1_p14[i]['Name']:
        no_codificantes.append(i)
    if 'spliceosomal RNA' antisense RNA in genes_p14.chr1_p14[i]['Name']:
        no_codificantes.append(i)
    if 'antisense RNA' in genes_p14.chr1_p14[i]['Name']:
        no_codificantes.append(i)
    if 'variant U1 small nuclear' in genes_p14.chr1_p14[i]['Name']:
        no_codificantes.append(i)
    if 'long intergenic non-protein' in genes_p14.chr1_p14[i]['Name']:
        no_codificantes.append(i)

for i in genes_p14.chr1_p14:
    if i not in no_codificantes:
        codificantes.append(i)

```

La secuencia del cromosoma humano en formato fasta fue cargada en la aplicación y transformada a tipo texto y guardada con el nombre SEQ\_c1:

```

x=open(r'directorio del archivo \Chr1_p14.fa','r')
a=x.read()
x.close()
b=a[68:]
SEQ_c1=b.replace("\n","")

```

La búsqueda de las secuencias motivo RARE fueron seleccionadas como elementos de regulación *cis* río arriba, es decir, buscamos las secuencias RARE en la región promotora de los genes codificantes<sup>13</sup>. Para definir la región promotora en cada gen se buscaron las secuencias del promotor central: iniciadores, caja TATA, BRE y DPE acorde a lo establecido en Watson<sup>14</sup>.

Las secuencias para los iniciadores fueron calculadas para ...C(C/T)AN(T/A)(C/T)(C/T)..., las secuencias TATA fueron calculadas para ...TATA(A/T)A(A/T)... y las secuencias BRE para ...(G/C)(G/C)(G/A)CGCCC... con el siguiente código:

```

a=['C','T']
b=['A','T','G','C']
c=['T','A']
d=['G','C']
e=['G','A']

iniciador=[]
for i in a:
    for j in b:
        for k in c:
            for l in a:
                for m in a:
                    Sequ=str('C'+i+'A'+j+k+l+m)
                    iniciador.append(Sequ)

tata=[]
for i in c:
    for j in c:
        Sequ=str('TATA'+i+'A'+j)

```

```

        tata.append(Sequ)

bre=[]
for i in d:
    for j in d:
        for k in e:
            Sequ=str(i+j+k+'CGCCC')
            bre.append(Sequ)

dpe=[]
for i in e:
    for j in c:
        Sequ=str(i+'G'+j+'CGTG')
        dpe.append(Sequ)

```

Una vez establecidas las secuencias, entonces buscamos esas secuencias en la secuencias de cada uno de los genes, y establecimos la región promotora desde el primer nucleótido hasta la secuencia iniciadora donde rio arriba (-25 a -35) este la caja TATA. Los datos fueron guardados en el diccionario `pos_tata_iniciador`. El código usado fue el siguiente:

```

pos_tata_iniciador={}
for i in codificantes:
    pos_tata_iniciador[i]={'TATA':[],'Inc':[],'Bre':[],'dpe':[]}

for i in codificantes:
    inicio=genes_p14.chr1_p14[i]['Start']
    final=genes_p14.chr1_p14[i]['Stop']
    gen=SEQ_c1[inicio:final]
    for k in tata:
        if k in gen:
            num_tatas=gen.count(k)
            posiciones=[gen.find(k)]
            while len(posiciones)<num_tatas:
                d=gen.find(k,posiciones[-1]+1)
                posiciones.append(d)
            pos_tata_iniciador[i]['TATA'].append(d)
    for j in iniciador:
        if j in gen:
            num_ini=gen.count(j)
            posicionesi=[gen.find(j)]
            while len(posicionesi)<num_ini:
                e=gen.find(j,posicionesi[-1]+1)
                posicionesi.append(e)
            pos_tata_iniciador[i]['Inc'].append(e)
    for l in bre:
        if l in gen:
            num_bre=gen.count(l)
            posicionesb=[gen.find(l)]
            while len(posicionesb)<num_bre:
                f=gen.find(l,posicionesb[-1]+1)
                posicionesb.append(f)
            pos_tata_iniciador[i]['Bre'].append(f)
    for m in dpe:
        if m in gen:
            num_dpe=gen.count(m)
            posicionesd=[gen.find(m)]
            while len(posicionesd)<num_dpe:
                g=gen.find(m,posicionesd[-1]+1)
                posicionesd.append(g)
            pos_tata_iniciador[i]['dpe'].append(g)

```

La elección de la región promotora fue realizada desde el inicio de la secuencia del gen hasta el valor mínimo de alguno de los componentes de la región promotora, esto fue realizado debido a que muy pocos genes cumplen con la regla de la existencia del promotor general. Los genes que no cumplieron con alguno de los criterios para la selección de la posición del promotor central, fueron evaluados de la siguiente manera:

- Primero determinamos si fue encontrada por lo menos un componente de la región promotora, si no existiera ninguno, el gen fue eliminado del diccionario de region\_promotora y colocado en la lista de los genes “no\_codificantes”.
- Los genes a los que se les detecto por lo menos uno de los componentes del promotor central, fueron asignados con el valor de la posición mínima.

```

region_promotora={}
for i in codificantes:
    region_promotora[i]=[]

for i in pos_tata_iniciador:
    lt=len(pos_tata_iniciador[i]['TATA'])
    li=len(pos_tata_iniciador[i]['Inc'])
    if lt>0:
        if li>0:
            for k in pos_tata_iniciador[i]['TATA']:
                for l in pos_tata_iniciador[i]['Inc']:
                    if l-k>0:
                        if l-k<100:
                            region_promotora[i].append(k)

for i in pos_tata_iniciador:
    lt=len(pos_tata_iniciador[i]['Bre'])
    li=len(pos_tata_iniciador[i]['Inc'])
    if lt>0:
        if li>0:
            for k in pos_tata_iniciador[i]['Bre']:
                for l in pos_tata_iniciador[i]['Inc']:
                    if l-k>0:
                        if l-k<100:
                            region_promotora[i].append(k)

for i in pos_tata_iniciador:
    lt=len(pos_tata_iniciador[i]['Inc'])
    li=len(pos_tata_iniciador[i]['dpe'])
    if lt>0:
        if li>0:
            for k in pos_tata_iniciador[i]['Inc']:
                for l in pos_tata_iniciador[i]['dpe']:
                    if l-k>0:
                        if l-k<100:
                            region_promotora[i].append(k)

for i in region_promotora:
    if len(region_promotora[i])==0:

suma=len(pos_tata_iniciador[i]['TATA'])+len(pos_tata_iniciador[i]['Bre'])+len(p
os_tata_iniciador[i]['dpe'])+len(pos_tata_iniciador[i]['Inc'])
    if suma==0:
        codificantes.remove(i)
        no_codificantes.append(i)

for i in no_codificantes:
    if i in region_promotora:
        del region_promotora[i]

```

```

for i in region_promotora:
    if len(region_promotora[i])==0:

region_promotora[i].append(min(pos_tata_iniciador[i]['TATA']+pos_tata_iniciador
[i]['Bre']+pos_tata_iniciador[i]['dpe']+pos_tata_iniciador[i]['Inc']))

```

Una vez definida la región del promotor central, entonces la secuencia de promotora fue definida desde el inicio del gen hasta el promotor central mínimo.

```

sec_promotor={}
for i in region_promotora:
    prom_central=min(region_promotora[i])
    inicio=genes_p14.chr1_p14[i]['Start']
    sec_promotor[i]={'inicio':inicio,'final':inicio+prom_central}

```

Una vez establecidas las regiones promotoras de cada uno de los genes codificantes, entonces procedimos a buscar los elementos de respuesta del ácido retinoico (RAREs) de acuerdo con lo establecido en di Masi et al. (2015)<sup>9</sup>

```

PU=['A','G']
f=['G','T']

rare_seq=[]
for i in PU:
    for j in f:
        Sequ=str(i+'G'+j+'TCA')
        rare_seq.append(Sequ)

rare_promotor={}
for i in sec_promotor:
    rare_promotor[i]=[]

for i in rare_seq:
    for k in sec_promotor:
        inicio=sec_promotor[k]['inicio']
        final=sec_promotor[k]['final']
        promotor=SEQ_c1[inicio:final]
        if i in promotor:
            num_rep=promotor.count(i)
            posiciones=[promotor.find(i)]
            while len(posiciones)<num_rep:
                w=promotor.find(i,posiciones[-1]+1)
                posiciones.append(w)
                rare_promotor[k].append(w)

genes_calculados={}
for i in rare_promotor:
    genes_calculados[i]=[]

for i in rare_promotor:
    total=len(rare_promotor[i])
    if total>1:
        for j in rare_promotor[i]:
            for k in rare_promotor[i]:
                if j!=k:
                    if j-k<16:
                        if j-k>-1:
                            genes_calculados[i].append(min(j,k))

sin_RARE=[]

```



```

for i in genes_calculados:
    if len(genes_calculados[i])==0:
        sin_RARE.append(i)

for i in sin_RARE:
    del genes_calculados[i]

for i in genes_calculados:
    sec_RARE_gen=min(genes_calculados[i])
    print(i, sec_RARE_gen, """"...5'-
""",SEQ_cl[genes_p14.chr1_p14[i]['Start']+sec_RARE_gen:genes_p14.chr1_p14[i]['S
tart']+sec_RARE_gen+25],"""-3'...""")
    
```

## RESULTADOS

Después de la aplicación del algoritmo, encontramos que 354 genes del cromosoma 1 pudieran ser regulados por los receptores RAR/RXR estos genes se enlistan en la tabla 1. En la tabla 2 mostramos 30 ejemplos de genes donde se muestra las posiciones y secuencias de reconocimiento por los RAR/RXR.

'RBM34', 'BCAR3', 'TM2D1', 'TLCD4', 'MRPS21', 'CLIC4', 'NOC2L', 'LOC100996442', 'RIMKLA', 'GNB1', 'SLC35F3', 'MYOC', 'SF3A3', 'PPFIA4', 'LRIG2-DT', 'CAPN2', 'TMEM82', 'CAPZA1', 'SDHC', 'AK4', 'TMEM51', 'PLPPR5', 'AIDA', 'ZNF670-ZNF695', 'LCK', 'NADK', 'TNN', 'RHO', 'TMEM69', 'SPOCD1', 'TCHH', 'H3-3A-DT', 'CELA2A', 'PADI2', 'ARHGAP30', 'TLCD4-RWDD3', 'WNT9A', 'CACYPB', 'ZBTB8A', 'SZRD1', 'RGS7', 'CNIH4', 'SDE2', 'PCSK9', 'ITPKB', 'LRRC38', 'AKR7A2', 'DEGS1', 'SELENBP1', 'UBXN11', 'CAPN9', 'BTF3L4', 'MICOS10-NBL1', 'SHCBP1L', 'CLSTN1', 'TNFRSF1B', 'GPBP1L1', 'CCDC163', 'CYB5RL', 'RAB13', 'SYT2', 'KCNK1', 'LEMD1-DT', 'RWDD3', 'GLIS1', 'MIR34AHG', 'MICOS10', 'SLC1A7', 'NEK2-DT', 'HTR6', 'RXRG', 'NBPF20', 'CDCA8', 'OTUD7B', 'RAB7B', 'ZP4', 'HHAT', 'TGFB3', 'FMO2', 'DNAI3', 'DRAXIN', 'SLC16A1', 'FCRL3', 'KIF26B', 'PIK3C2B', 'COPA', 'TLR5', 'ZMYM6', 'UBQLN4', 'NSUN4', 'ABCA4', 'PLPP3', 'PRPF38A', 'WNT2B', 'TBX15', 'UBE2T', 'LYSMD1', 'SHISAL2A', 'COQ8A', 'SLC2A1-DT', 'CNST', 'IL19', 'AKR1A1', 'LOC107984956', 'SMG5', 'ACP6', 'ZBTB8B', 'NIBAN1', 'DNAJC8', 'HMGC5', 'ADAR', 'CSMD2', 'ADCY10', 'ERICH3', 'TP53BP2', 'RAD54L', 'MROH7', 'SYF2', 'NOL9', 'GNL2', 'IFNL1', 'C1orf127', 'SZT2', 'ZMPSTE24', 'CHD5', 'ALDH4A1', 'PFDN2', 'SSU72', 'SNIP1', 'DHRS3', 'AXDND1', 'AKR7A3', 'HHLA3', 'IGSF3', 'PODN', 'CDK18', 'ESPN', 'PPP1R15B', 'KCND3', 'ODR4', 'HSPG2', 'LOC100996737', 'PSMB2', 'YIPF1', 'TBX19', 'TUFT1', 'PTPRF', 'GALNT2', 'TMEM9', 'BRDT', 'SAMD11', 'AUNIP', 'NFASC', 'NGF', 'DMBX1', 'PTPRU', 'RASAL2', 'ANXA9', 'CENPL', 'RCOR3', 'SFT2D2', 'SKI', 'IPO9', 'CDC7', 'FAM163A', 'PI4KB', 'RGS1', 'ZYG11B', 'UCK2', 'E2F2', 'SPATA45', 'NBPF15', 'HDGF', 'USP24', 'NDUFS5', 'TSPAN1', 'PHGDH', 'PRSS38', 'KIF2C', 'EPA10', 'EMC1', 'RHD', 'RCAN3', 'PMVK', 'LEFTY2', 'NOS1AP', 'DISC1', 'EIF2D', 'LRRC47', 'SLC45A1', 'PIAS3', 'SLAMF9', 'BLACAT1', 'FCGR2A', 'ATF6', 'HSD11B1', 'SLC5A9', 'SLC26A9', 'TTLL10', 'NBPF11', 'CEP350', 'CAMK1G', 'SWT1', 'SSBP3', 'GMEB1', 'GABPB2', 'DDR2', 'CFAP74', 'C8B', 'IL23R', 'GPN2', 'RHCE', 'KHDRBS1', 'POMGNT1', 'SPRR2B', 'PTPN14', 'ZNF362', 'RBBP4', 'HIVEP3', 'ARHGEF16', 'ZNF695', 'KHDC4', 'AJAP1', 'PSEN2', 'CEP104', 'TMEM50A', 'QSOX1', 'BCAS2', 'SLC2A1', 'DPT', 'MROH7-TTC4', 'ABC10', 'KCNA2', 'PLEKHA6', 'AADA3L3', 'NBPF9', 'ECHDC2', 'CNIH3', 'YBX1', 'MECR', 'MAP3K21', 'MACF1', 'NDUFS2', 'ELOVL1', 'SERBP1', 'TAS1R1', 'KIAA1522', 'VPS13D', 'AHCTF1', 'CAPZB', 'GNG4', 'PAPPA2', 'RIT1', 'FOXJ3', 'OBSCN', 'LMO1', 'MKNK1', 'NSL1', 'HYI', 'C1orf21', 'TMEM63A', 'RNF187', 'RGS21', 'ST6GALNAC3', 'PLEKHG5', 'SRGAP2B', 'AK5', 'PLCH2', 'CYP4B1', 'DISP1', 'CCDC27', 'VANGL1', 'PUM1', 'ANP32E', 'ZNF124', 'GRHL3', 'SMAP2', 'SLC45A3', 'FBXO28', 'KIF21B', 'RPS6KA1', 'NBPF1', 'CTTNBP2NL', 'YTHDF2', 'EPA8', 'TRAF3IP3', 'EFCAB14', 'ARV1', 'PHC2', 'NASP', 'TMCC2', 'PPP1R8', 'CNR2', 'LUZP1', 'SCMH1', 'GOLPH3L', 'IGFN1', 'KLHL21', 'GPR137B',

'ALG14', 'TRABD2B', 'PPT1', 'MYOM3', 'KCNAB2', 'AKNAD1', 'PAFAH2', 'ETNK2', 'CD58', 'MEAF6', 'AGBL4', 'LRR42', 'HDAC1', 'NME7', 'PRUNE1', 'TMEM39B', 'SDC3', 'PGD', 'CRYBG2', 'ERRFI1-DT', 'INPP5B', 'TMCO4', 'EPHB2', 'CD247', 'LGALS8', 'MMACHC', 'SOX13', 'USP1', 'GATAD2B', 'PTPN22', 'AKT3', 'LIX1L', 'TRIM62', 'COL8A2', 'THRAP3', 'PTAFR', 'AKIRIN1', 'SLC9A1', 'GNAI3', 'MSTO1', 'RIMS3', 'ATP1A4', 'PGBD5', 'CLSPN', 'NBPF4', 'POU2F1', 'KDM5B', 'UBE4B', 'CTNNBIP1', 'CADM3', 'OSCP1', 'HENMT1', 'IQGAP3', 'YY1AP1', 'SHE'

Gen	posición RARE	Secuencia
RBM34	2342	...5'- AGTTCACAGAGACAAGTTCAACTAT -3'...
BCAR3	20962	...5'- GGTTCAGTTCACAGTAGTTGGCCTC -3'...
TM2D1	9212	...5'- AGGTCAGGAGTTCAAGACCAGCCTG -3'...
TLCD4	6349	...5'- AGGTCAGGAGTTCAAGACCAGCCTG -3'...
MRPS21	3612	...5'- AGGTCAGGAGTTCAATACCAGCCTG -3'...
CLIC4	9426	...5'- AGGTCAGGAGTTCAAGGCCAGCCTG -3'...
NOC2L	2115	...5'- AGTTCAGGGTCATGCCTCACCTGG -3'...
LOC100996442	10759	...5'- GGGTCAATGGAGGAGTTCAGAGAAG -3'...
RIMKLA	5885	...5'- AGGTCAGGAGTTCAAGATCAGCCTG -3'...
GNB1	7571	...5'- AGGTCACCTGAGGTCAGGAGTTCAG -3'...
SLC35F3	6627	...5'- AGGTCAGGTCAGCAATTCAAAAATG -3'...
MYOC	12563	...5'- AGGTCAGGAGTTCAAGACCAGCCTG -3'...
SF3A3	9763	...5'- AGGTCAGGAGTTCAAGACCAGCCTG -3'...
PPFIA4	14902	...5'- AGGTCAGAAGTTCAAGATCAGCCTG -3'...
LRIG2-DT	1957	...5'- AGGTCAGGAGTTCAAGACCAGCCTG -3'...
CAPN2	630	...5'- AGGTCAGGAGTTCAAGACCAGCCTG -3'...
TMEM82	3786	...5'- AGGTCAGGAGTTCAAAAACCAGCCTG -3'...
CAPZA1	21858	...5'- AGGTCAGGAGTTCAAGACGAGCCTA -3'...
SDHC	4454	...5'- AGGTCAGGAGTTCAAGACCAGCCTG -3'...
AK4	6402	...5'- AGGTCAGGTCAGAGAGACGAGCAGG -3'...
TMEM51	8742	...5'- AGGTCAGGAGTTCACGACTAGCCTG -3'...
PLPPR5	13734	...5'- AGTTCAATTCCTTGGGTACCATGA -3'...
AIDA	5872	...5'- AGGTCAGGAGTTCAAGACTAGCCTG -3'...
ZNF670-ZNF695	7342	...5'- AGTTCAAGAGTTCAAGACCAGCCTG -3'...
LCK	13743	...5'- AGGTCAGGAGTTCAAGACCAGCTTG -3'...
NADK	6264	...5'- GGGTCAGGGGTCAGTAGGGTCCGGA -3'...
TNN	8963	...5'- GGGTCAGATTGCCTGGGTTCAAATC -3'...
RHOH	12430	...5'- AGGTCAGGAGTTCAAGACCAGCCTG -3'...
TMEM69	2122	...5'- AGGTCAGGAGTTCAGGACCAGCCTG -3'...
SPOCD1	8534	...5'- GGGTCAGGTCAGAGTAAGGCAGGAG -3'...

### CONCLUSIONES

El algoritmo propuestos en este trabajo lo consideramos universal para la detección de los elementos de respuesta del ácido retinoico (RARE) ya que solo basta con cambiar la secuencia del cromosoma que deseamos analizar. Es importante aclarar que para la construcción del algoritmo solo se

consideró la información general sobre las regiones y componentes promotores; sin embargo, si se deseara analizar otros promotores, este algoritmo puede ser guía.

Basados en la aplicación de este algoritmo en el cromosoma humano 1 (versión GRCh 38.p14), encontramos que 354 genes tienen por lo menos una secuencia de unión RARE, lo que nos sugiere que esos genes podrían estar regulados por los receptores de ácido retinoico, sin embargo, consideramos en lo sucesivo validar los resultados realizando los ensayos experimentales..

## BIBLIOGRAFÍA

1. Orfanos, C. C. Z., Constantin E. Retinoids. In *Drug Therapy in Dermatology*; CRC Press, 2000.
2. PubChem. Retinol. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/445354> (accessed 2023-05-29).
3. Chung, S.; Wolgemuth, D. Role of Retinoid Signaling in the Regulation of Spermatogenesis. *Cytogenet. Genome Res.* 2004, 105 (2–4), 189–202.
4. Takahashi, N. Inhibitory Effects of Vitamin A and Its Derivatives on Cancer Cell Growth Not Mediated by Retinoic Acid Receptors. *Biol. Pharm. Bull.* 2022, 45 (9), 1213–1224.
5. Gronemeyer, H.; Gustafsson, J.-Å.; Laudet, V. Principles for Modulation of the Nuclear Receptor Superfamily. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004, 3 (11), 950–964.
6. Dilworth, F. J.; Chambon, P. Nuclear Receptors Coordinate the Activities of Chromatin Remodeling Complexes and Coactivators to Facilitate Initiation of Transcription. *Oncogene* 2001, 20 (24), 3047–3054.
7. Sharma, S.; Shen, T.; Chitranshi, N.; Gupta, V.; Basavarajappa, D.; Sarkar, S.; Mirzaei, M.; You, Y.; Krezel, W.; Graham, S. L. Retinoid X Receptor: Cellular and Biochemical Roles of Nuclear Receptor with a Focus on Neuropathological Involvement. *Mol. Neurobiol.* 2022, 59 (4), 2027–2050.
8. Berenguer, M.; Duester, G. Retinoic Acid, RARs and Early Development. *J. Mol. Endocrinol.* 2022, 69 (4), T59–T67.
9. Di Masi, A.; Leboffe, L.; De Marinis, E.; Pagano, F.; Cicconi, L.; Rochette-Egly, C.; Lo-Coco, F.; Ascenzi, P.; Nervi, C. Retinoic Acid Receptors: From Molecular Mechanisms to Cancer Therapy. *Mol. Aspects Med.* 2015, 41, 1–115.
10. Mader, S.; Leroy, P.; Chen, J.-Y.; Chambon, P. Multiple Parameters Control the Selectivity of Nuclear Receptors for Their Response Elements. Selectivity and Promiscuity in Response Element Recognition by Retinoic Acid Receptors and Retinoid X Receptors. *J. Biol. Chem.* 1993, 268 (1), 591–600.
11. RARA Gene Expression - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5914/?report=expression> (accessed 2023-05-30).
12. Homo Sapiens Chromosome 1, GRCh38.P14 Primary Assembly, 2023. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC\\_000001.11](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC_000001.11) (accessed 2023-05-25).
13. cis-regulatory element / cis regulatory element | Learn Science at Scitable. <https://www.nature.com/scitable/definition/cis-regulatory-element-cis-regulatory-element-75/> (accessed 2023-05-27).
14. Watson, J. D.; Baker, T. A.; Bell, S. P.; Gann, A.; Levine, M.; Losick, R. *Biología Molecular Del Gen*; Ed. Médica Panamericana, 2005.

## SÍNTESIS BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA UTILIZANDO LA FLOR DE CEMPASÚCHIL (*TAGETES ERECTA*) PARA EL ESTUDIO DE SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Britany Yaret Espinosa De La Luz<sup>1</sup>, Karelía Liliana Rangel Ruiz<sup>1</sup>, Jorge Alberto Granados Olvera<sup>1,2</sup>, Zaira Vargas Solano<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Politécnica de Cuautitlán Izcalli, <sup>2</sup>Universidad Tecnológica Fidel Velázquez.

[jorgealberto.go@upci.edu.mx](mailto:jorgealberto.go@upci.edu.mx)

### RESUMEN

La aplicación de nanomateriales puede aportar soluciones a los desafíos tecnológicos y ambientales, en las áreas de conversión de energía solar, catálisis, medicina y tratamiento de agua. Por ello es de gran importancia tener una síntesis amigable con nuestro ambiente en la cual sean aprovechadas las propiedades que nos brinda la naturaleza para minimizar la generación de residuos peligrosos. Las nanopartículas de plata destacan por su potencial y versatilidad, debido a sus propiedades ópticas, eléctricas, mecánicas y estructurales. Su fotoactividad las promueve como agente antimicrobiano (bactericida-fungicida). El efecto que provoca los iones Ag en los microorganismos es conocido, sin embargo, el mecanismo de acción aún no está del todo claro. El presente estudio se realizó con el objetivo de evaluar las propiedades antibacterianas en de las NP's de plata obtenidas mediante una síntesis biológica en la cual se usó como precursor el AgNO<sub>3</sub> y como agente reductor el extracto de la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) por sus propiedades que permiten estabilizar el tamaño de las nanopartículas. La formación de nanopartículas de plata monitoreada mediante el análisis por espectroscopia UV-visible donde se registró una banda de absorción simétrica con pico entre los 340 nm a 420 nm, indicando la presencia de nanoestructuras de plata debido a la excitación de los plasmones de superficie típicos de las nanopartículas de plata. Las Np's fueron probadas con *E. coli* comprobando así su actividad antimicrobiana. En conclusión, usando la síntesis biológica se obtienen partículas de un tamaño nanométrico en la plata, las cuales pueden ser usadas para fines medicinales o en la industria alimenticia gracias a su capacidad como agente bactericida, contra los microbios como son las bacterias.

### INTRODUCCIÓN

La biotecnología y nanotecnología implican la "fabricación de partículas a nanoescala y también crea nuevos productos que mejoran una amplia gama de propiedades, entre estas las fisicoquímicas que incluyen la durabilidad, la resistencia, la reactividad y la conductividad (Baishya,2012).

Las nanopartículas (Np's) han atraído mucha atención debido a sus aplicaciones potenciales en catálisis, biología, informática, células solares y dispositivos optoelectrónicos que incluyen cosmética, mecánica, ciencia de la energía, ciencia biomédica, industrias espaciales, transistores de un solo electrón, dispositivos ópticos no lineales, emisores de luz, genes de fármacos y aplicaciones fotoquímicas (Manesh,2010).

En la síntesis de nanopartículas por síntesis biológica se utiliza un extracto vegetal como agente reductor y este método toma ventaja sobre los métodos de reducción fotoquímica, evaporación de calor, electroquímica, reducción química debido a su sencillez, menor toxicidad y respeto al medio ambiente. Las nanopartículas por el método verde se pueden llevar a cabo mediante el uso de varios sistemas biológicos que incluyen bacterias, hongos y levaduras.

Los extractos de plantas son fuentes ricas en metabolitos secundarios que reducen fácilmente el nitrato de plata a nanopartículas de plata. El tamaño y la morfología de la nanopartícula de plata pueden ser controlados y fuertemente influenciados por las condiciones experimentales como la cinética de interacción de iones metálicos con biomoléculas reductoras y productivas, el estabilizador de las nanopartículas metálicas, temperatura y variando el PH (Sengupta,2005).

El presente estudio se realiza con el objetivo de evaluar las propiedades antibacterianas obtenidas mediante la realización de una síntesis biológica en la cual se usó como precursor el AgNO<sub>3</sub> y como agente reductor el extracto de la flor de cempasúchil por sus propiedades que permiten estabilizar el tamaño de partícula.

## TEORÍA

La preparación de nanopartículas metálicas tiene gran interés debido a sus propiedades ópticas, eléctricas, catalíticas, etc. Estas propiedades dependen del tamaño, forma y dispersión de las nanopartículas, que pueden ser controladas a partir del método de síntesis. Dentro de los parámetros que influyen en la morfología de las nanopartículas se encuentran la elección del agente reductor, cantidades relativas y concentraciones de reactivos, temperatura y duración de la reacción.

Las nanopartículas metálicas presentan propiedades diferentes a las de los materiales bulk sintetizados a partir de los mismos átomos. Por ejemplo, el color amarillo de las dispersiones de nanopartículas de plata comparado con la solución incolora de nitrato de plata o la apariencia metálica de la plata bulk.

La interacción entre las nanopartículas de plata y la luz visible es una consecuencia de la gran densidad de electrones de conducción, de las dimensiones de confinamiento menores al camino libre medio, y de la dependencia de la parte real e imaginaria de la función dieléctrica del metal con la frecuencia, resultando en la existencia de la resonancia del plasmón de superficie. En particular, el campo eléctrico oscilante de la luz incidente origina la oscilación coherente de los electrones de conducción, resultando en una oscilación de la nube electrónica que rodea al núcleo metálico. El tamaño y forma de las partículas, como también la función dieléctrica del medio circundante determina la frecuencia y fuerza de dicha resonancia. Los resultados muestran que se forma el típico pico de la resonancia de plasmón superficial a 400 nm, el cual indica la formación de las nanopartículas de plata. La longitud de onda de este máximo en un dado solvente puede ser empleada para estimar el tamaño de partícula. Cuanto mayor es el tamaño de esta, el pico del plasmón se desplaza a longitudes de onda mayores y además se ensancha (Solomon, 2007).

La biosíntesis o síntesis verde de nanopartículas de plata es observada en forma continua, y merece mucha atención debido a una creciente necesidad de métodos de síntesis amigables para el medio ambiente, que utilizan agentes reductores y de terminación ecológicos, como son las proteínas, péptidos, carbohidratos, varias especies de bacterias, hongos y levaduras, algas y plantas. Las sales de plata y las nanopartículas de plata se utilizan en variadas aplicaciones para el control de infecciones, en forma de apósitos y compresas, que contienen superficies "antimicrobianas" con las nanopartículas. Algunas de las bases genéticas para la resistencia bacteriana a iones de plata se encuentran bien documentadas, principalmente la expresión de los sistemas de eflujo, bien caracterizados (Esquivel, 2021).

## PARTE EXPERIMENTAL

### Materiales y Método

La síntesis de nanopartículas plata se realiza por síntesis biológica tomando como base nitrato de plata como material de partida y el extracto de la flor de Cempasúchil (*Tagetes erecta*) como agente reductor, de esta manera se obtienen dispersiones coloidales de plata en tonos marrones, estables y transparentes.

### Preparación del extracto de la flor de Cempasúchil (*T. erecta*)

Se recolectaron hojas frescas de flor de Cempasúchil y se realizó un secado con ayuda de un foco infrarrojo. Posteriormente las hojas secas de Cempasúchil se llevaron a un proceso de molienda para mejorar nuestro proceso, se pesaron 2 g de la muestra y con ayuda de un equipo soxhlet se generó la extracción del compuesto (Figura 1), hasta que el color de la solución presenta un cambio en su coloración a color naranja, se dejó enfriar el extracto a temperatura ambiente y luego se filtró.



Figura 1. Proceso de extracción.

#### Biosíntesis de nanopartículas de plata

Para la síntesis de nanopartículas de plata se preparó una solución de  $\text{AgNO}_3$  1 Mm (Ahmed,2016), la cual se agregó gota a gota al extracto de la flor de cempasúchil a una temperatura de  $5^\circ\text{C}$ . Al momento de adicionar la sal de plata debe garantizarse una agitación continua pues con este proceso comienza la formación de agregados de partículas, la cual se manifiesta a través de una coloración marrón (Figura 2).



Figura 2. Nanopartículas de Plata.

La presencia del extracto de la flor de cempasúchil provee a la solución una mayor estabilidad superficial evitando una aglomeración de partículas.

#### Actividad antimicrobiaba

Para evaluar la actividad antimicrobiana de las Np's Ag se hizo uso de la técnicas de los antibiogramas en disco por el método de Kirby- Bauer, para el cual se impregnaron sensidiscos con 1, 2 y 3 gotas de las Np's previamente obtenidas, se buscaba probarla con alguna enterobacteria ya que los miembros de este grupo son importantes patógenos de los humanos, finalmente se decidió probarlo con *E. coli*. Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado.

## RESULTADOS

### Espectroscopia UV-Vis

En la Figura 3 se puede observar el espectro UV-Vis de las nanopartículas de plata sintetizados por esta vía, el cual muestra un comportamiento similar de acuerdo con lo reportado por Sally D. Solomon (2007), la absorbancia se encuentra entre 395-430 nm atribuibles a un tamaño de partícula de entre 15-30 nm.



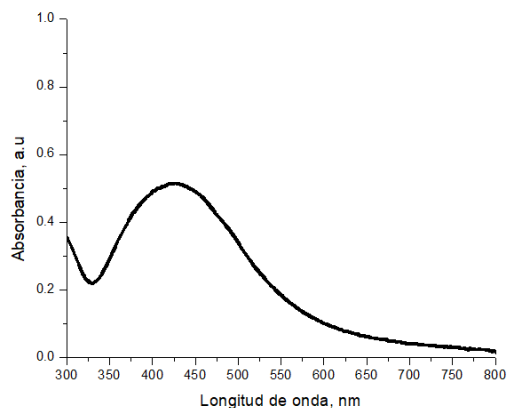


Figura 3. Espectro UV-Vis de la solución de AgNO<sub>3</sub>-Flor de cempasúchil.

La amplitud general de los espectros y el cambio en el pico de absorbancia indica que las nanopartículas de plata requieren mayor de tiempo para estabilizarse, lo que significa que la reacción, aún no ha concluido y puede tardar en completarse. Estas partículas están afectadas, el tamaño crece ligeramente en comparación con la etapa inicial de la reacción durante el proceso de mezclado el extracto, por lo que resulta evidente, que a medida que aumenta el tiempo de reacción, aumenta la concentración y el tamaño de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir del extracto de la flor de cempasúchil.

#### Pruebas microbiológicas

En el caso de los antibiogramas (Figura 4) con *E. coli*, se obtuvieron halos de inhibición de entre 2 a 2.2 cm con cada una de las concentraciones probadas, que de acuerdo a diversos autores (Bernal Rivera y Guzman Urrego, 1986) nos indicarían que *E. coli* presenta sensibilidad a las Np,s de plata obtenidas a partir de *T. erecta*. En la figura 4 se puede observar el crecimiento de *E. coli* en la caja control (lado izquierdo) y la prueba con los sensibilizadores (lado derecho), donde se observan claramente los halos de inhibición.

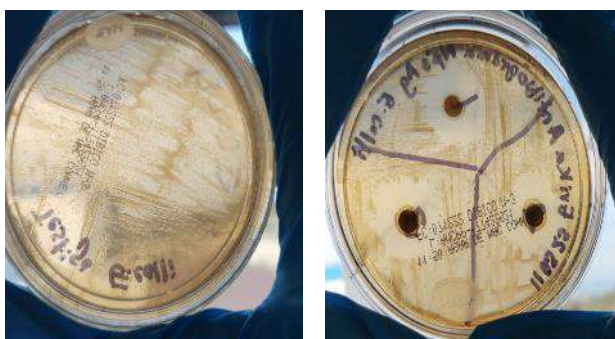


Figura 4. Antibiogramas

#### CONCLUSIONES

La utilización y el potencial impacto en la salud de las nanopartículas de plata deben incluir un abordaje multidisciplinario. Son variados los debates que existen acerca de los efectos adversos ocasionados por especies de Ag-Np's en el medio ambiente. Aunque es generalmente aceptado considerar que la disolución de las Ag-Np's produce por lo menos algún grado de toxicidad bajo la exposición a las mismas, los efectos no pueden ser totalmente atribuidos a la fracción disuelta de plata medida.

Basados en los resultados obtenidos el espectro UV-vis nos confirma la formación de Np's de Ag por la metodología propuesta de síntesis biológica usando el extracto del cempasúchil. De igual forma, de acuerdo a los resultados previamente mostrados se puede observar que las Np's de plata sintetizadas a partir de *T. erecta* si presentan actividad antimicrobiana contra *E.colli*, se requieren estudios posteriores para ampliar el conocimiento acerca de la interacción entre las Np's y *E.colli*.

## BIBLIOGRAFÍA

Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B. L., & Ikram, S. (2016). A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise. *Journal of advanced research*, 7(1), 17-28.

Baishya, D., Sharma, N., & Bora, R. (2012). Green synthesis of silver nanoparticle using *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) and monitoring their antibacterial activities. *Archives of applied science research*, 4(5), 2098-2104.

Bernal Ribera M. y Guzman Urrego M. (1986). El antibiograma de discos. Guía para la normatización de la técnica de Kirby- Bauer. Serie de Notas e informes técnicos No. 9

Esquivel-Figueroa, R. D. L. C., & Mas-Diego, S. M. (2021). Síntesis biológica de nanopartículas de plata: revisión del uso potencial de la especie *Trichoderma*. *Revista Cubana de Química*, 33(2), 23-45.

Manesh, K. M., Gopalan, A. I., Lee, K. P., & Komathi, S. (2010). Silver nanoparticles distributed into polyaniline bridged silica network: A functional nanocatalyst having synergistic influence for catalysis. *Catalysis Communications*, 11(10), 913-918.

Solomon, S. D., Bahadory, M., Jeyarajasingam, A. V., Rutkowsky, S. A., Boritz, C., & Mulfinger, L. (2007). Synthesis and Study of Silver Nanoparticles W. *Journal of Chemical Education*, 84(2).

Sengupta, S., Eavarone, D., Capila, I., Zhao, G., Watson, N., Kiziltepe, T., & Sasisekharan, R. (2005). Temporal targeting of tumour cells and neovasculature with a nanoscale delivery system. *Nature*, 436(7050), 568-572.

## BIOSORCIÓN MEDIANTE EL RESIDUO DEL ESPÁRRAGO PARA LA REMOCIÓN DINÁMICA DEL PLAGUICIDA QUÍMICO (2,4 DICLOROFENOL) PRESENTE EN SOLUCIÓN ACUOSA

Angélica Escobedo Nuncio<sup>1</sup>, Guillermo Andrade Espinosa <sup>2</sup>, Claudia Palomares Rodríguez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Univesidad Autonoma Metropolitana, Unidad Lerma. <sup>2</sup>Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico del Valle de Morelia.  
guillermo.ae@vmorelia.tecnm.mx

### RESUMEN

Una de las grandes problemáticas que enfrenta el medio ambiente es la contaminación del agua debido a los herbicidas químicos utilizados en la agricultura. Estos agroquímicos son un grupo de sustancias sintetizadas artificialmente utilizadas en el control de plagas y maleza para mejorar la producción agrícola. Los herbicidas más peligrosos son los fabricados a base de compuestos organoclorados, por ejemplo, el 2,4-Diclorofenol (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>O). Esta sustancia es un derivado clorado del fenol utilizado principalmente en la preparación del herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético y es altamente contaminante en los cuerpos de agua<sup>1</sup>. En esta investigación se estudiaron las propiedades físico-químicas y la capacidad de remoción de 2,4-Diclorofenol del residuo del espárrago para desarrollarlo como material biosorbente de plaguicidas presentes en solución acuosa. El residuo fue modificado mediante métodos hidrotermales usando tres ácidos orgánicos (cítrico, tartárico y maleico) de manera individual. Los materiales funcionalizados y sin funcionalizar fueron caracterizados mediante microscopía electrónica de barrido, titulaciones ácido-base, determinación de punto de carga cero y distribución de carga superficial. Posteriormente, la capacidad de biosorción del herbicida utilizando el residuo fue evaluada mediante isotermas y cinética de adsorción en reactores en lote a diferentes pH's. Los resultados de las micrografías mostraron cambios en la superficie, reflejando cierto grado de desmembramiento de las fibras de los materiales al ser modificados. Lo anterior puede atribuirse a un aumento en la relación de C/O con respecto al espárrago sin modificar. Las titulaciones ácido-base reflejaron un aumento en los sitios ácidos totales, presentes en los materiales modificados, y que dichos sitios varían con respecto al ácido utilizado, resultando el material modificado con ácido maleico con mayor densidad de grupos oxigenados equivalentes a 2.6310 mmol/g. Por otra parte, la densidad de sitios básicos totales de los materiales fue cero. Lo anterior fue corroborado al determinar la distribución de carga y el punto de carga cero de los materiales, observándose una disminución en este de 5.70 a 3.34, 3.35 y 3.12 unidades de pH para el residuo modificado con ácido cítrico, tartárico y maleico, respectivamente. Por otro lado, los resultados de las isotermas de adsorción del herbicida arrojaron que la remoción es altamente dependiente del pH de la solución, es decir la capacidad de biosorción aumenta al disminuir el pH de 9 a 3 obteniendo una capacidad máxima de 158.49 mg/g, a una concentración en el equilibrio de 200 mg/L, pH 3 y 25 °C para el material modificado con ácido tartárico. Finalmente, los experimentos de cinética mostraron una disminución del 50% de la concentración inicial durante las primeras 6 h, teniendo mejor ajuste a modelos matemáticos de cinética de pseudo primer orden. Estos resultados indican que el residuo del espárrago es un buen candidato para ser desarrollado como biosorbente de herbicidas presentes agua.

### INTRODUCCIÓN

Una de las grandes problemáticas que enfrenta el medio ambiente es la contaminación de los cuerpos de agua debido a los plaguicidas químicos utilizados en la agricultura, estos agroquímicos son un grupo de sustancias sintetizadas artificialmente utilizadas en el control de plagas y la mejora de la producción agrícola. Sin embargo, generalmente son tóxicos para los organismos vivos y difíciles de degradar, por lo que sus agentes tóxicos cuentan con persistentes efectos de bioacumulación [2]. El uso de plaguicidas constituye un riesgo para la calidad del agua en áreas agrícolas debido al hecho de que estos componentes pueden atravesar el suelo y el subsuelo y contaminar el agua superficial y subterránea [3]. Entre los plaguicidas más peligrosos se encuentra el 2,4 - Diclorofenol; esta sustancia es altamente contaminante en los cuerpos de agua [1]. Este

plaguicida es un derivado clorado del fenol con la fórmula química  $C_6H_4Cl_2O$  utilizado principalmente en la preparación del herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

Existen varios métodos avanzados para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con agroquímicos. Entre estos métodos se encuentran los procesos físico-químicos tales como radiación UVA, electroquímica, filtración, separación por membranas, el intercambio iónico, precipitación, entre otros. Sin embargo, muchos de estos procesos son costosos y no son eficientes debido a que no se realiza una remoción adecuada; además se requiere un alto grado de especialización en su operación. En este sentido la adsorción es un proceso sumamente eficiente en la remoción de una amplia gama de contaminantes, es económico y de sencilla aplicación. La adsorción es un proceso de transferencia, en la que el contaminante está presente en la fase líquida y se acumula en una fase sólida separándolo de la fase líquida [4]. Durante el proceso de adsorción, los componentes tóxicos disueltos se transportan por difusión al gránulo sólido y poroso del material adsorbente.

Dentro del proceso de adsorción se encuentra la biosorción el cual consiste en la remoción de contaminantes por medio de biomasa y cuyo elemento principal es el material biosorbente, los biosorbentes pueden ser de origen vegetal, microbiano, fúngico, o animales. Prácticamente, cada tipo de biomasa posee propiedades de unión. Esto está determinado por la estructura química de biomoléculas que exponen grupos funcionales similares [5]. Los biosorbentes de bajo costo, incluyen materiales sin uso de origen vegetal y animal, los cuales pueden provenir de biomasa de plantas terrestres que son fáciles de cosechar y abundan en el medio ambiente.

Un material lignocelulósico que puede ser un buen candidato para ser utilizado como precursor en la producción de materiales biosorbentes es el residuo del espárrago. El espárrago pertenece a la especie *Asparagus officinalis* L. Es una planta de la familia de las Liliáceas. Los primeros tallos empiezan a desarrollarse en primavera, cuando alcanzan una altura superior a los 20 cm se ramifican y comienzan a lignificar conformando la parte aérea. La producción comienza al segundo o tercer año después de la plantación, cortando la parte aérea formada por tallos ramificados que alcanzan una altura mayor a 1.5 m y dando pie al nacimiento de brotes de espárrago joven que son los únicos comestibles [6]. Debido a lo anterior, grandes cantidades de tallos de espárrago adulto son generadas como desechos del cultivo previo al rebrote de interés para la producción. Usualmente los desechos de espárrago son incorporados en el suelo para retener sus nutrientes y minerales en la tierra beneficiando a la próxima generación de espárragos. Sin embargo, este tratamiento puede generar enfermedades en el espárrago tales como *Phomopsis asparagi* [7], por lo que no es recomendable. México únicamente produce el 1% de la producción mundial de espárrago, aun así, es el tercer productor después de China (89%), y Perú (5%). La superficie de siembra en México dedicada a este cultivo fue de poco más de 19 mil hectáreas, con un rendimiento de 7 ton/ha, de las cuales se estima que la generación de desechos de espárragos es alrededor de 10 ton/ha [8]. Estos desechos generalmente son quemados teniendo un impacto en el medio ambiente. Por lo que es urgente el desarrollo de nuevas tecnologías más efectivas y económicas para la disposición y utilización de los residuos de espárrago. Siendo estos residuos una fuente de biomasa lignocelulosa, que se puede implementar en la elaboración de materiales biosorbentes. El objetivo de esta investigación fue Desarrollar y aplicar un material biosorbente mediante métodos ácido termales a partir de los residuos agrícolas del espárrago para la remoción de plaguicidas organoclorados presentes en solución acuosa.

## TEORÍA

En un estudio se analizaron diferentes tipos de materiales adsorbentes que presentan un bajo costo y por lo general los adsorbentes son obtenidos a partir de cualquier material orgánico. Se sabe que estos materiales naturales pueden provenir de residuos industriales y del área agrícola, estos residuos representan una problemática para su deposición y que no representan ningún valor económico, como lo son las mazorcas de maíz, las cascarillas de arroz, corteza de árboles, paja, aserrín, cáscaras de naranja, cáscaras de plátano, cáscaras de huevo, plumas de gallina, etc. Los estudios hasta ahora realizados muestran que la capacidad de adsorción de estos materiales no solo depende del área superficial, sino que también depende de su química superficial debido a la presencia de grupos químicos activos en sus estructuras [9].

Tomando en referencia los materiales biosorbentes de origen agrícola, Se llevó a cabo un estudio utilizando la cáscara de naranja como biosorbente para la remoción de compuestos orgánicos en el cual de primera instancia hizo un pretratamiento de la cáscara para así poderlo modificar con NaOH (OP-DIC-Na) y tratamiento DIC con posterior modificación con NaOH – Ácido cítrico (OP-DIC-Ác). Los materiales biosorbentes que prepararon se caracterizaron mediante pruebas fisicoquímicas, los resultados arrojados de estas pruebas indicaron la presencia de grupos R-OH, R-COOH y R-COOCH<sub>3</sub> que se encuentran disponibles en la superficie de los biosorbentes [10]. Por lo cual las capacidades de adsorción para estos biosorbentes se estudiaron en compuestos orgánicos, empleando como compuestos modelo el colorante Rojo Reactivo 272 y fenol. Las isotermas de adsorción obtenidas para los dos compuestos modelo se consideran favorables y efectivas.

En el trabajo de Martínez-Nodal analizan la utilidad del bagazo de caña natural utilizándolo como biosorbente en la remoción de hidrocarburos disueltos en agua. Ellos describen que se le hicieron pruebas al bagazo de caracterización físico químicas, en el cual consistió en análisis elemental y microscopía electrónica de barrido. Posteriormente hicieron estudios de equilibrio de sorción que estos a su vez fueron ajustados a los modelos de isotermas de sorción Langmuir y Freundlich a dos temperaturas diferentes (25 °C y 30 °C). En sus resultados encuentran que el bagazo de caña de azúcar natural es un excelente material biosorbente ya que se encontró en la caracterización fisicoquímica y en su capacidad de sorción 1,77g hidrocarburo/g de BN (dinámica) y 1,81g hidrocarburo/g de BN (estática) [11]. Como resultados en el modelo de isotermas de sorción que se obtuvo experimentalmente la curva de ruptura, donde el punto se alcanza a las 6 horas de operación.

Se ha investigado la adsorción de 2,4-diclorofenol (2, 4-DCP) de una solución acuosa sobre óxido férrico fue llevado a cabo en un proceso por lotes [12]. Los experimentos se hicieron en función para determinar el tiempo de equilibrio de adsorción, efecto de la temperatura, pH, electrolitos y grupos sustituidos de adsorbato para elucidar el mecanismo de la adsorción El tiempo de equilibrio estimado fue de tres horas. La adsorción se encontró que aumentaba al elevar la temperatura de 30 a 50°C. Los valores numéricos del calor diferencial de adsorción aumentaron con el aumento de la cobertura superficial que sugiere que la adsorción en óxido férrico puede ser de naturaleza química. La adsorción de 2,4-DCP en óxido férrico se encontró que aumentaba con el aumento del pH de la solución de 3.0 a 5.0, pero el aumento adicional del pH de la solución de 5.0 -8.0 disminuyó la adsorción. El efecto electrolítico mostró que la adsorción fue favorable en presencia de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ion en comparación con Cl<sup>-</sup> ion. Los efectos de los grupos sustituidos demostraron que la cantidad de 2,4-DCP adsorbida en óxido férrico era menor que la de 2,5-DCP. Tales observaciones sugieren que la adsorción de 2,4-DCP en Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> está dominado por la fuerza electrostática de atracción entre iones DPC y superficie de óxido de hierro en medios acuosos.

En las últimas décadas se ha visto un incremento de manera excesiva en la utilización de agroquímicos para los cultivos, esto con la finalidad de garantizar y optimizar la producción agrícola. Situación que conlleva una serie de problemas para el medio ambiente. Una de las grandes preocupaciones que nos enfrentamos es la contaminación de aguas subterráneas y los mantos acuíferos por los productos y residuos de plaguicidas, derivando en una constante problemática en gran parte de casi todos los países desarrollados y, cada vez más, en muchos países en desarrollo. Los plaguicidas organoclorados tienen la capacidad de permanecer en un sustrato particular del ambiente, después de haber cumplido el objetivo por el cual se aplicó. Los compuestos organoclorados se encuentran en la categoría de persistentes, ya que su promedio de degradación media ocurre en aproximadamente 5 años [13]. Los cultivos de espárrago generan muchos residuos de la misma planta que no son necesarios para la venta del agricultor por lo que, generalmente, es quemado y esparcido en suelo provocando infecciones a los posteriores cultivos y daños al medio ambiente. Una de las opciones de aprovechamiento es la producción de materiales biosorbentes a partir de los residuos del espárrago, probarlo como un material biosorbente para el tratamiento de remoción de plaguicidas organoclorados presentes en el agua. Es innovador experimentar con este residuo; además de que su tratamiento involucrará actividades de recuperación y reutilización de desechos agrícolas, las cuales son congruentes con la tendencia filosófica de la economía circular hacia la sostenibilidad.



## PARTE EXPERIMENTAL

Pretratamiento del residuo de espárrago.

El tratamiento previo se realizó en base al siguiente procedimiento... Se empleó el residuo de espárrago deshidratado, el cual, se cortó en fracciones de 0.5 cm aproximadamente. Se enjuagó con agua destilada en repetidas ocasiones y se introdujo en una estufa de secado a 60°C hasta que el peso permanezca constante.

Modificación del residuo de espárrago.

Para la funcionalización del material se montó un reactor en un sistema de Baño María utilizando un recirculador de agua. Se introdujo 200mL de ácido cítrico, maleico y tartárico, según sea el caso a una concentración 1 N con 15 g de material biosorbente. La mezcla se mantuvo a una temperatura constante durante 3h a temperatura entre 70 y 80°C. Posteriormente, se decantó el ácido de cada uno de los matraces y el material resultante y enjuagó con agua des ionizada en repetidas ocasiones hasta alcanzar un pH de 4 y 5. Finalmente, el biosorbente se puso en una estufa a 60°C durante 48 horas para así poder secar.

Caracterización fisicoquímica del biosorbente.

Espectroscopia de infrarrojo FTIR

Los materiales fueron analizados por un espectrómetro de absorción en el infrarrojo, este experimento tiene la finalidad de determinar grupos funcionales en la estructura del esparrago, a través de transiciones de los estados de energía por medio de vibraciones y rotaciones de las moléculas. Por cada muestra se realizó 32 barridos en el intervalo espectral de 500 a 4000 cm<sup>-1</sup> utilizando la técnica de reflectancia total atenuada (ATR), las señales emitidas por el equipo se detectan en forma de absorbancia, para la cual corresponde una longitud de onda y de las cuales se determinan los grupos funcionales de acuerdo con el espectro conocido.

Determinación de grupos funcionales. Los grupos funcionales presentes en la superficie del material se neutralizaron con soluciones de NaOH, HCl,

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y NaHCO<sub>3</sub> a 0.1 N poniendo en contacto 0.1g de residuo con 35 ml de solución. La mezcla se mantuvo en agitación durante 48 horas y posteriormente el sobrenadante se tituló utilizando una tituladora automática. La densidad de grupos funcionales se obtuvo mediante un balance de masas.

$$C_{SAT} = \frac{V_i(C_i - C_f) * 1000}{m}$$

CSAT: Concentración de sitios ácidos totales, mmol/g.

CSC: Concentración de sitios carboxílicos, mmol/g.

CSF: Concentración de sitios fenólicos, mmol/g.

CSL: Concentración de sitios lactónicos, mmol/g.

Para la determinación del PCC y distribución de carga se utilizó la siguiente metodología: En un tubo de polipropileno de 15mL se colocó 10mL de agua destilada previamente hervida y 0.5 g de cada uno de los 4 tipos de materiales de estudio, posteriormente se cerró el tubo de polipropileno y se dejó en agitación con la finalidad de que todo el material se impregnara de la solución. Después de 24 horas se midió el valor de pH el cual corresponde al PCC. Para la determinación de la distribución se carga, en matraces Erlenmeyer de 100mL se introdujo 80mL de NaCl 0.1 N, cada uno y se ajustó a diferente pH desde 3 hasta 11 con soluciones de HCl 0.1 N y NaOH 0.1 N. Posteriormente, se aforó cada una a 100mL con NaCl 0.1N y se midió el pH inicial. Después, los tubos se mantuvieron en agitación por 24 horas y se midió el pH final. Microscopía electrónica de barrido (MEB). El biosorbente fue caracterizado mediante microscopía electrónica de barrido con un Microscopio electrónico (Philips FEG-XL30 MEB) en donde se determinó su morfología y estructura superficial. El microscopio está equipado con un sistema de microanálisis de Energía Dispersa de Rayos-X (EDX) con el cual se determinó de manera puntual la composición química de los materiales.



Obtención de los datos experimentales de las isothermas de adsorción.

Para cada material se obtuvo los datos experimentales de las isothermas de adsorción del plaguicida utilizando el residuo del espárrago modificado. Se colocaron en tubos de polipropileno 30mL soluciones de 2,4 -diclorofenol una concentración de 100ppm y a diferentes pH's (3, 5, 7 Y 9). Después se colocaron 0.07 g de material a cada uno de los tubos y se ajustó el pH diariamente durante 5 días en agitación. Las concentraciones iniciales y finales fueron determinadas por espectroscopia de UV- visible. La máxima capacidad de remoción se determinó con un balance de masas.

$$q_e = (V_i C_i - V_f C_f) / m$$

Donde:

$q_e$ : Masa de contaminante adsorbido, mg/g.

$V_i$ : Volumen inicial, L.

$C_i$ : Concentración inicial del adsorbato, mg/L.

$V_f$ : Volumen final, L.

$C_f$ : Concentración final del adsorbato, mg/L.

$m$ : Masa de material adsorbente, g.

Determinación de los datos experimentales de la cinética de adsorción. Para determinar los datos de la cinética de adsorción se pondrá en contacto 1.0140 g de material modificado con ácido tartárico previamente triturado a gránulos de 0.5mm -1mm ya que fue el que se consideró el más óptimo con 200mL de solución de 2,4- diclorofenol a 200 ppm en un vaso de precipitado. Se mantendrá en agitación a 250 rpm y se ajustará constantemente el pH a 3. Se tomarán muestras de forma periódica hasta llegar al equilibrio. La concentración de cada muestra será determinada por UV-visible para determinar el decaimiento de concentración con respecto del tiempo.

## RESULTADOS

Caracterización de los materiales.

Modificación del residuo de espárrago. La Figura 1 muestra las características visuales del material sin funcionalizar (espárrago en blanco) y aquellos que se funcionalizaron mediante la técnica ácido-termal (ácido cítrico, tartárico y maleico) descrita en la sección.

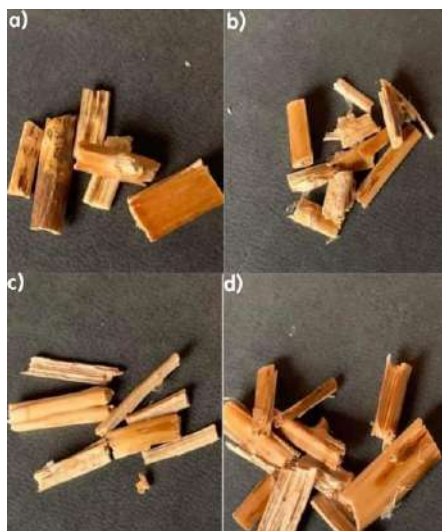


Figura 1. Fotografías de los 4 tipos de materiales del residuo del espárrago a) Sin modificar, b) Modificado con ácido cítrico, c) Modificado con ácido tartárico y d) Modificado con ácido maleico.

De acuerdo a esta figura y un análisis visual se puede mencionar que los materiales no cambiaron sus propiedades físicas externas como consecuencia a la modificación, ya que no hubo una

degradación y conservaron sus propiedades mecánicas. Por lo que se puede decir que la modificación no fue agresiva.

*Caracterización de los materiales.*

Microscopía electrónica de barrido

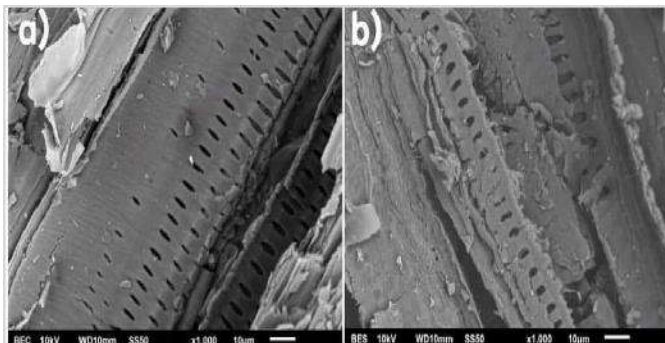


Figura 2. Micrografías de materiales a x1000 de SM (a) y MAC(b).

Las micrografías de los dos materiales (SM y MAC 1.5), se puede apreciar una diferencia en la integración del espárrago sin modificar (a) muestra una composición más homogénea a diferencia del espárrago modificado con ácido cítrico (b) que muestran claras diferencias en su composición física ya que se observa un desmembramiento superficial con relación a la textura, la propiedad más significativa que puede observarse en una primera instancia es la integridad en cuanto a su estructura ya que fue sometido a un grado de desintegración, debido a dos causas fundamentales que actúan simultáneamente: una por hinchamiento y la otra por disolución de la glucosa presente en los haces que conforman la estructura del MAC.

*Espectrometría de absorción de infrarrojo (FTIR)*

La espectrometría infrarroja de Fourier es un proceso que arroja de manera cuantitativa y cualitativa los grupos funcionales existentes en la superficie del material orgánico y la estructura química de materiales inorgánicos que poseen solamente pocos micrómetros de diámetro.

De acuerdo con la longitud de onda a la que las moléculas vibran se determina el tipo posible de compuestos encontrados. En la siguiente grafica de la Figura 2, se puede observar los diferentes espectros de infrarrojo de los 3 materiales modificados en el cual se comparan con el material sin modificar, En donde principalmente se detectan la presencia de enlaces de carbono oxígeno (1000-1500  $cm^{-1}$ ), grupos carbonilo de doble enlace C=O que absorben la luz infrarroja de las longitudes de onda aproximadamente entre (1600–2000)  $cm^{-1}$ , carbono hidrogeno en la longitud de 2700-2900  $cm^{-1}$  y grupos O-H en la zona final. El material modificado muestra una absorbancia considerablemente más alta en sus enlaces carbono oxígeno, mientras que a mayor oxidación se nota un decaimiento en todos los grupos.

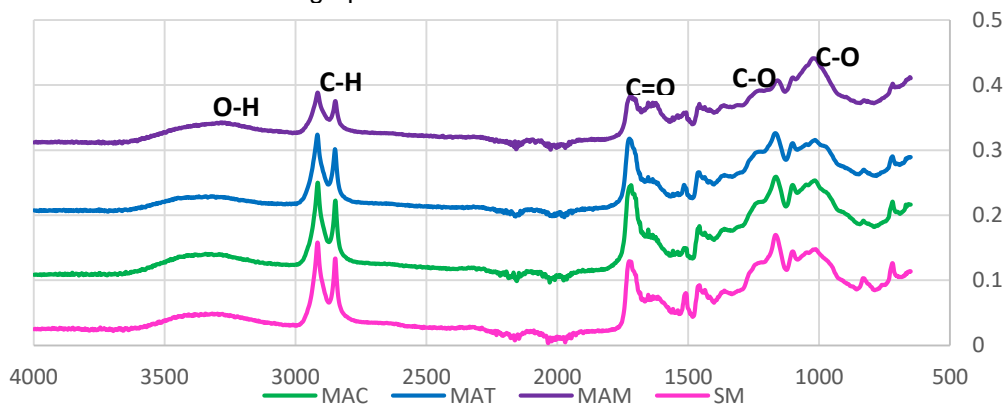


Figura 3 comparación de FITIR de los materiales modificados (MAC, MAT Y MAM) contrastando a la materia sin modificar (SM).

Determinación de sitios activos.

La Tabla 1 muestra la densidad de sitios activos del material de referencia y de aquellos que fueron modificados, obtenido mediante titulación ácido-base.

Tabla 1 de sitios activos de los materiales.

Materiales	Sitios ácidos totales	Sitios básicos totales	Sitios lactónicos	Sitios carboxílicos
SM	2.66	0	0.7453	1.836
MAC	2.303	0	2.7109	2.724
MAT	2.3149	0	0.1096	2.6994
MAM	2.6310	0	2.514	2.7158

Los resultados de la tabla anterior indican que la cantidad de sitios ácidos aumenta con la funcionalización y que esta varía con respecto al ácido utilizado, siendo el material MAC y el MAM son los que cuentan con mayor el número de grupos oxigenados. Esto se puede atribuir a las características químicas del ácido, las cuales favorecen mayormente la formación de complejos oxigenados en la superficie del biosorbente [8]. Para los sitios básicos totales, se encontró un valor de cero en los 4 materiales. Por otra parte, también fueron calculadas las concentraciones de los sitios lactónicos, carboxílicos, en el cuales se puede apreciar que el proceso de oxidación favorece la formación de sitios lactónicos y carboxílicos que son unos de los principales componentes del espárrago. Los sitios activos tienen la propiedad de ceder o aceptar protones y se les conoce como sitios ácidos y básicos de Bronsted-Lowry, respectivamente. La importancia de los sitios ácidos radica en que, al estar en solución acuosa, y en cierto rango de pH, estos grupos funcionales llevan a cabo reacciones de donación de protones proporcionando una carga negativa a la superficie de los biosorbentes [14], lo cual es favorable para la captación de cationes en la solución.

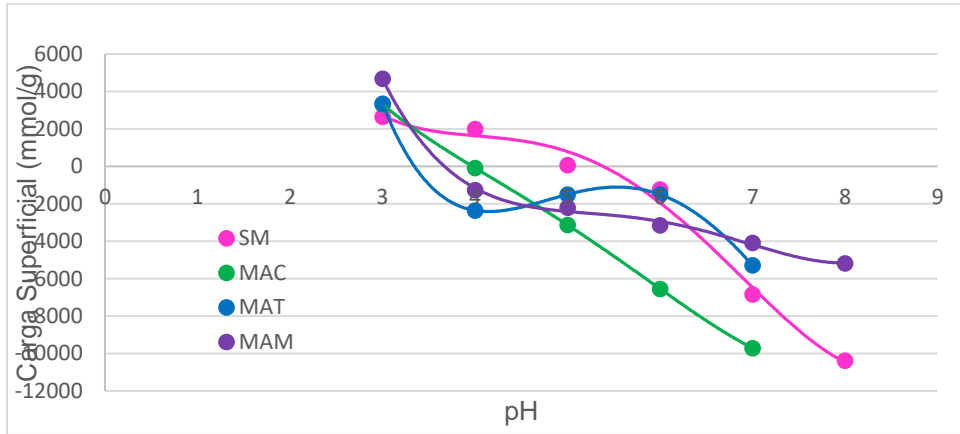
Punto de Carga Cero (PCC) y distribución de carga superficial.

El punto de carga se define como el valor de pH en que la densidad de la carga superficial del biosorbente es neutral [15]. Para establecer el PCC obtenido de carga mediante la distribución de carga se utilizó otra técnica, en la que se puede apreciar que el punto de carga aumentó con la funcionalización. Se observa que los valores se encuentran por debajo de 5.4. Cuando el  $pH < PCC$  la carga superficial del material es positiva, por lo que se espera que se inhiba la aproximación de los cationes del AM y del  $Cd^{2+}$ ; por el contrario, si el  $pH > PCC$  la superficie del material es negativa, por tanto, los grupos que representan a los SAT son libres y favorecen la adsorción

Tabla 2 de datos de puntos de carga cero de los diferentes materiales.

MATERIALES	PCC
SM	5.70
MAC	3.34
MAT	3.35
MAM	3.12

Los valores arrojados del PCC indican que la superficie adsorbente está dominada por la carga aniónica cuando el pH de la solución está por encima del valor del PCC con esto nos da una pauta para saber que si se encuentra listo para adsorber fácilmente especies catiónicas [16].



La Figura 4. Muestra la distribución de carga superficial en los cuatro materiales, obtenida mediante la técnica descrita para la distribución de carga.

En esta figura se puede apreciar que de sitios el material sin modificar tiene un PCC alrededor de 5.4 y los materiales modificados con ácido cítrico, ácido tartárico y ácido maleico tienen valores alrededor de 4, 3.3 y 3.4, respectivamente. Lo anterior, puede ser relacionado con la densidad de la Concentración ácidos totales, (CSAT), donde aquel material con mayor densidad de grupos oxigenados es aquel con menor PCC. Siendo 0 la neutralidad se demuestra que la carga superficial de los materiales tiende hacia la negatividad cuando el pH es mayor a su punto de carga cero. Lo que produce una atracción de iones positivos favoreciendo la capacidad de adsorción del material para la remoción de 2,4 diclorofenol.

*Experimentos de remoción de 2,4 diclorofenol.*

Se llevaron a cabo pruebas de remoción de 2,4 diclorofenol, con lo que se determinó la máxima capacidad de adsorción con efecto de pH de los cuatro materiales.

Efecto del pH.

Puntos de isoterma e isothermas

La Figura 5. Muestra la capacidad puntual de adsorción con respecto a los materiales MAC, MAT, MAM y SM, a diferentes pH's de 3, 5, 7 y 9, siguiendo la metodología descrita en la sección.

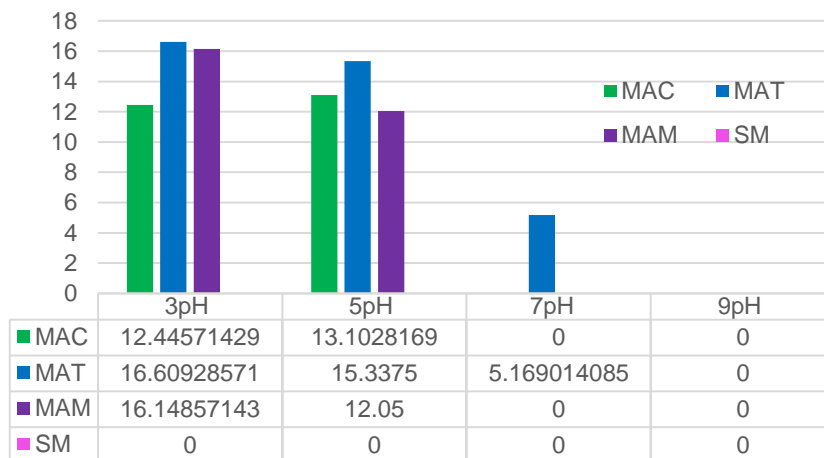


Figura 5. Capacidad de adsorción puntual de los biosorbentes con efecto de pH, concentración inicial 100 ppm y 25 °C.

En esta figura se puede observar que existe una diferencia significativa entre la capacidad puntual de adsorción de 2,4 diclorofenol mediante los tres materiales modificados y el sin modificar, lo

anterior favorecido por la modificación ácido tartálico a la que se sometió. El comportamiento anterior y la diferencia entre la cantidad de sitios oxigenados indican que la adsorción se debe a interacciones químicas principalmente por los grupos oxigenados. Además, se observa que a menor pH mayor es la capacidad de adsorción para todos los materiales. Los valores de la capacidad puntual de adsorción serán corroborados con las isothermas de adsorción. Dichos comportamientos se relacionan con los valores obtenidos en la determinación del PCC y la distribución de carga, los cuales especificaron que por encima del pH 5 en general se tendrá una remoción menor, en cambio, a pH igual o mayor a 3 (según corresponda el PCC de los materiales) la capacidad remoción es mucho mayor. Este efecto puede explicarse por el aumento de las repulsiones electrostáticas existentes entre el 2,4 diclorofenol y cada material.

A partir de la capacidad puntual de la remoción que presentaron los tres materiales, se dictaminó que el Material modificado con ácido tartálico (MAT) presentó la máxima capacidad de remoción a pH 5, y a pH de 3 tiene capacidades de remoción altas comparadas a los materiales MAC Y MAM como fundamento en ello y pensando en futuras aplicaciones a escala industrial, se eligió a MAT como el material apropiado para efectuar los experimentos de adsorción correspondientes a las isothermas de Langmuir y Freundlich. A partir del material seleccionado, en la siguiente sección se mostrarán los valores de la capacidad de adsorción, asimismo, para corroborar datos se muestran las isothermas obtenidas de los materiales MAT a pH 3 y 5, los cuales figuran a continuación.

Las isothermas de adsorción representan la relación entre las concentraciones en la fase líquida en el equilibrio y las concentraciones de adsorbato en la fase adsorbente sólida a una temperatura y presión constantes [17]. Las Figura 5 y 6 muestra las isothermas de adsorción de 2, 4 diclorofenol con efecto de pH's (3 y 5) a una masa de 5mg y en condiciones normales de presión y temperatura (25 °C y presión atmosférica), con el material más óptimo para el experimento MAT.

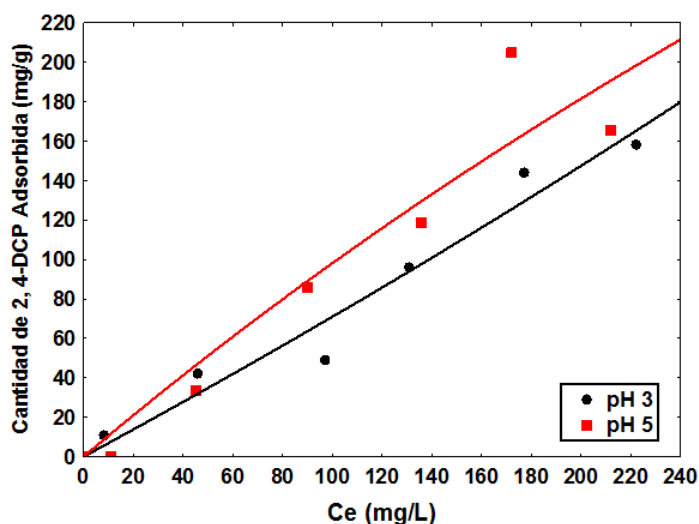


Figura 6. Isothermas de adsorción del material MAT a pH 3 y 5 ajustadas al modelo de Langmuir.

El modelo Langmuir se basa en la suposición que existe un número finito de sitios activos los cuales están homogéneamente distribuidos en la superficie del material adsorbente las cuales tienen la misma afinidad para adsorber moléculas en la monocapa y no presentan interacción entre ellas. Los números obtenidos en los experimentos de adsorción ajustaron perfectamente al modelo de Langmuir, el cual es visible en la Figura 6, en la cual se muestran las concentraciones en el equilibrio con respecto a la concentración de 2,4 diclorofenol adsorbido del MAT 3, en dicha gráfica es posible observar, la concentración en el equilibrio de 0.5 mg/L, la capacidad de adsorción del material es de 60 mg/g. Por otro lado, en lo que respecta a la muestra impregnada con MAT pH de 5, se nota que existe una alta afinidad a concentraciones en el equilibrio relativamente. Dichos resultados denotan que los materiales con MAT a pH'S 3 Y 5 podrían tener un gran potencial para tratar agua potable contaminada con 2,4 diclorofenol a bajas concentraciones (partes por billón).

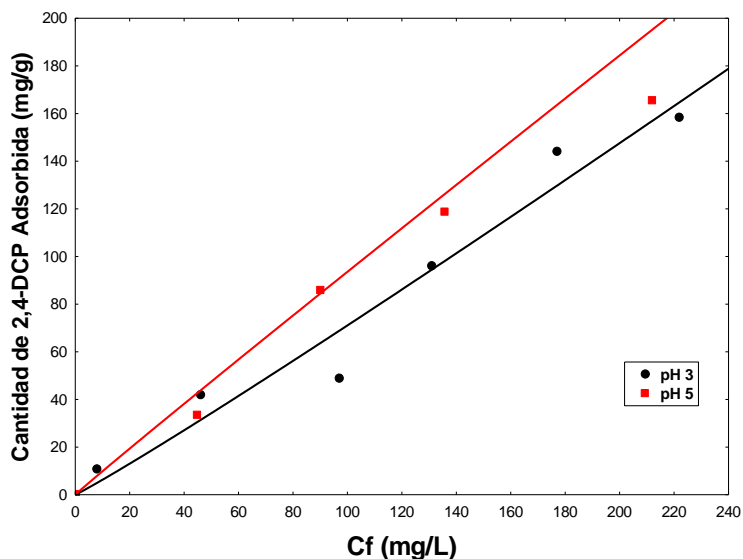


Figura 7. Isotermas de adsorción del material MAT a pH 3 y 5 ajustadas al modelo de Freundlich.

En la Figura 7 los datos experimentales también se ajustaron al modelo de Freundlich, cuyo modelo de isoterma asume que el adsorbente tiene una superficie heterogénea, sugiriendo que los sitios activos son diferentes o no equivalentes, además la distribución de cargas de adsorción se da de manera exponencial en los sitios activos del adsorbente. La isoterma presentada en la Figura 7 se presenta a condiciones de pH 3 y pH 5, a diferentes concentraciones de 10, 50, 100, 150, 200 y 250 ppm y agitación constante, observando que hubo un buen ajuste al modelo.

Los datos experimentales de la adsorción en el equilibrio del material MAT fue ajustado idóneamente a los modelos de isoterma de Langmuir y Freundlich cuyos parámetros y valores del coeficiente de correlación (R) se presentan en la tabla 4. El modelo de isoterma de Freundlich proporciona un mejor ajuste para los datos de adsorción en el equilibrio, indicando una adsorción homogénea y sugiere una cobertura monocapa de moléculas de 2, 4 diclorofenol sobre la superficie del material.

La Tabla 4 enlista los parámetros de los modelos de isoterma a los cuales fueron ajustados los datos en el equilibrio de adsorción de 2, 4 diclorofenol del material MAT a Ph's 3 y 5.

Tabla 4. Parámetros de los modelos de isoterma de Langmuir y Freundlich de adsorción de 2,4 diclorofenol con el material MAT.

		Langmuir			Freundlich		
MATERIAL	pH	Parámetro qA (mg/g)	Parámetro bA (L/mg)	Parámetro R	Parámetro KA (L/g)	Parámetro 1/n	Parámetro R
MAT	3	.6828	.37	0.9832	.55441	1.05395	.9852
MAT	5	1.0671	.878	0.9196	1.03332	.9785	.9563

De acuerdo al modelo de isoterma de Langmuir, qm se refiere a la capacidad máxima de biosorción (mg/g), b es la constante de adsorción de Langmuir (L/mg). Para Freundlich, KF es la constante de la capacidad relativa de biosorción (L/g), n se refiere a la constante de intensidad de sorción y R es el valor de correlación para ambos modelos.

Como se mencionó con anterioridad y reafirmando, al comparar los coeficientes de correlación para MAT de ambos modelos se puede decir que el ajuste más favorable al modelo de isoterma de Freundlich en comparación con el modelo de Langmuir, con valores de correlación de 0.98 y valores



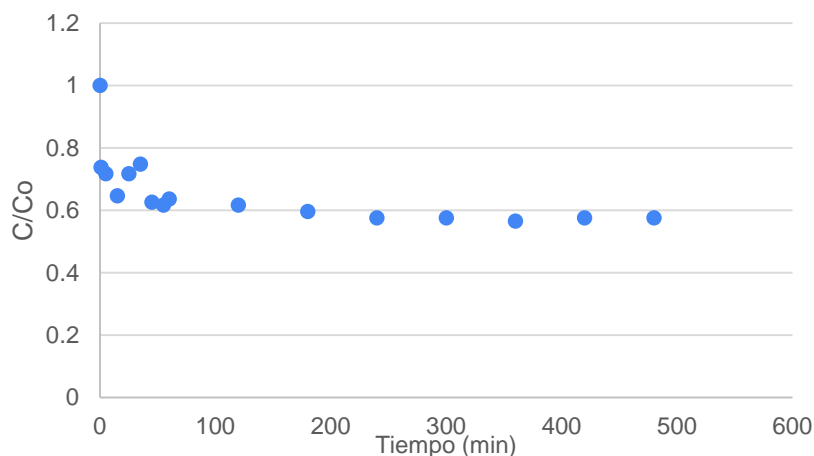
bajos en los parámetros  $bA$  ( $<1$ ) y  $n$  ( $<2$ ) denotando su alta afinidad del 2,4 diclorofenol por el adsorbente. Lo cual nos indica el comportamiento de la adsorción según la teoría que supone que todos los puntos de adsorción en un adsorbente estructuralmente homogéneo son idénticos y energéticamente equivalentes. La adsorción se realiza en una capa monomolecular sin interacciones laterales entre moléculas de adsorbato sobre una superficie energéticamente homogénea [18].

#### Cinética de adsorción de 2,4 diclorofenol.

La cinética describe la velocidad de adsorción del adsorbato en el adsorbente y determina el tiempo en que se alcanza el equilibrio [19]. Durante el proceso de adsorción se presentan tres fases, la primera de ellas consiste en el transporte de las especies disueltas desde el seno de la solución hacia la superficie del material, posteriormente de éstas son transportadas por difusión a los poros y finalmente hacia los sitios activos.

El estudio de la cinética de adsorción se realizó con la finalidad de evaluar la velocidad de adsorción de 2,4 diclorofenol, así como el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio. Para la determinación de los datos experimentales se empleó solamente el material con mayor capacidad de adsorción, el cual fue MAT pH 3. Los estudios cinéticos en procesos de sorción permiten determinar la velocidad con la que los contaminantes son retirados del medio acuoso. En la sorción la mayor parte del tiempo, en mecanismo es complejo y puede involucrar reacciones químicas entre los grupos funcionales del sorbente y los iones presentes en la solución, reacciones de intercambio iónico y formaciones complejas; además, se debe de tomar en cuenta los procesos de transferencia de materia tales como el transporte de especies al seno de la fase líquida, difusión desde la fase líquida hasta la superficie del adsorbente y difusión en el interior de los poros [20].

La Figura 8 muestra la cinética de adsorción de 2,4 diclorofenol sobre material MAT, en ella se presenta el decaimiento de concentración con respecto al tiempo para la adsorción de los iones de arsénico presentes en solución acuosa, y la Figura 9, presenta la capacidad de adsorción con respecto al tiempo.



La Figura 8. Muestra los datos obtenidos en el experimento de cinética, es decir, el decaimiento de la concentración con respecto al tiempo, para la biosorción del material MAT A pH 3.

Para interpretar el mecanismo de adsorción, es indispensable identificar cual etapa domina en el proceso de cinética, es decir, el proceso de adsorción consiste en tres etapas/ fases, las cuales residen en el transporte de especies hacia la superficie, transporte por difusión y adsorción del soluto en la superficie interna del adsorbente dependiendo del tamaño de los poros del adsorbente o del tamaño del adsorbato [20]. La etapa 1 surge en un tiempo de 1 a 45 min dónde se da el transporte de las especies disueltas hacia la superficie del material MAT, subsecuentemente, la etapa 2 sucede entre los 50 min donde ocurre el transporte por difusión hacia los poros y eventualmente a los 120 min las especies son conducidas hacia los sitios activos del adsorbente. Al hacer el análisis detallado en la Figura 8 se puede observar que la cinética presentó una velocidad de remoción

considerablemente buena, ya que se necesitaron entre 7 h para que el material alcanzará el equilibrio.

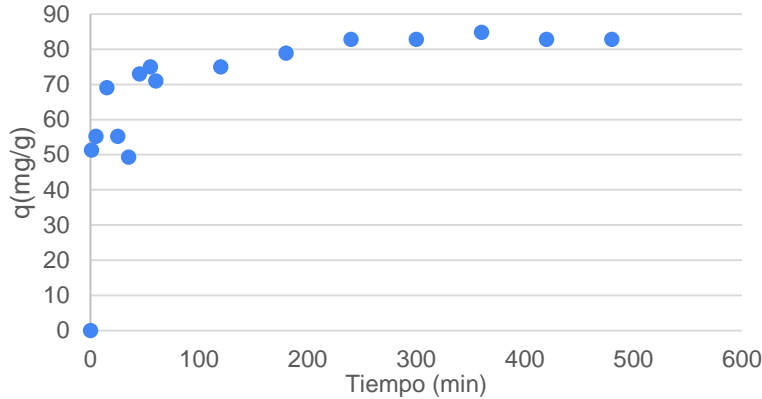


Figura 9. Concentración respecto al tiempo; concentración inicial de 200 ppm, pH 3 y agitación constante de 250 rpm.

Por su parte, la Figura 9 representa la capacidad de adsorción con respecto el tiempo, en dicha figura se observó un aumento rápido de retención en los primeros 50 minutos de contacto, alcanzando el equilibrio alrededor de los 300 minutos de estar en contacto el material MAT con la solución de 2,4 diclorofenol. Apreciando los datos proporcionados por las Figura 8 y Figura 9, es posible dictaminar que hubo un porcentaje alto de remoción en los primeros 90 min, ya que dentro de este rango fue visible un decaimiento drástico de concentración del 2,4 diclorofenol con fundamento en ello, se establece que hubo una remoción de 2,4 DCP aproximada del 43% en las primeras horas. Este comportamiento de dependencia sugiere que el proceso de adsorción sigue el mecanismo de intercambio de iones [21]. Además, el pH influye en la adsorción de 2,4 DCP afectando tanto a la carga superficial del adsorbente como al grado de ionización del contaminante en solución [22]. Sin embargo, es necesario realizar más estudios de cinética que corroboren la información obtenida en las tablas anteriores, por lo que, es necesario la aplicación de modelos cinéticos a los datos experimentales de la adsorción de 2,4 Diclorofenol en función del tiempo. A continuación, las Figuras 10y 11 muestran los modelos aplicados para evaluar cuál es el que mejor describe la cinética y el paso limitante en la adsorción del ion 2,4 DCP en el adsorbente.

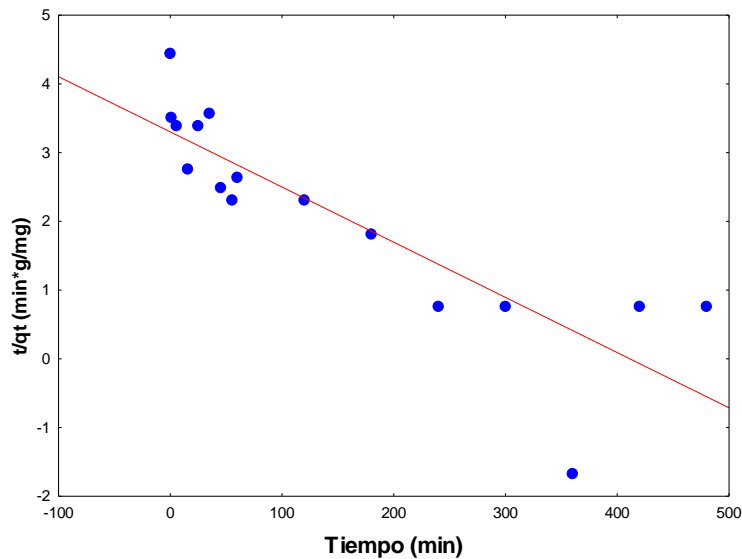


Figura 10. Cinética de adsorción del material MAT pH 3, ajustada al modelo de pseudo primer orden.

La Figura 10 y 11 muestran la aplicación de los modelos de pseudo – primer orden y pseudo – segundo orden a los datos experimentales de la cinética de adsorción de 2,4 DCP en el MAT a un pH 3. En el gráfico de la Figura 10 se puede observar el modelo de Lagergren, el cual presentó una velocidad de adsorción rápida en los primeros 20 minutos aproximadamente y comienza a alentarse el proceso en el minuto 100, posterior a ello, se consigue el equilibrio a partir del minuto 220. El modelo de pseudo-primer orden o modelo de Lagergren asume que la etapa limitante en un proceso de adsorción es la transferencia de masa del iónes del 2,4 DCP del seno de la solución hacia la superficie del adsorbente. En cambio, la Figura 11, muestra el ajuste de los datos experimentales al modelo de pseudo-segundo orden de la adsorción de 2,4 DCP sobre el material MAT, observando además de su velocidad de remoción alta, también se observó que al aumentar el tiempo de contacto entre la fase sólida (adsorbente) y la líquida (2,4 DCP) alcanzó el equilibrio rápidamente. La Tabla 5 muestra los parámetros de los modelos de pseudo-primer orden y pseudo-segundo orden, de 2,4 Diclorofenol a concentración de 200 ppm, una masa de 1.05 g/L y a pH 3. Observándose los siguientes resultados con respecto a la correlación y la velocidad de adsorción.

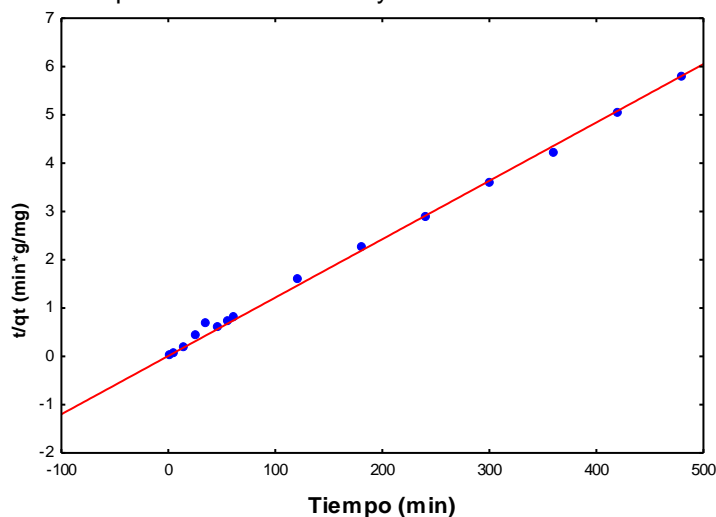


Figura 11. Cinética de adsorción del material MAT pH 3, ajustada al modelo de pseudo segundo orden.

El modelo de pseudo- segundo orden explica la difusión de la película líquida externa, la adsorción de la superficie y los procesos de difusión intraparticular [21], esto representa la quimiosorción debida a la formación de enlaces químicos entre adsorbente y adsorbato en una monocapa en la superficie.

Tabla 5. Parámetros de los modelos de pseudo primer y pseudo segundo orden del material MAT con pH 3.

		Lagergren Pseudo primer orden $\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - K_1 t$			Blanchard Pseudo segundo orden $t/q_t = 1/K_2 q_e^2 + 1/q_e t$		
MATERIAL	pH	Parámetro K1 (1/m)	Parámetro qe (mg/g)	Parámetro R	Parámetro K2 (g/mg*min)	Parámetro h (g/mg*min)	Parámetro R
MAT	3	.00803	27.1893	0.8525	87.588	61.947	.9984

Los resultados de la Tabla 5 correspondiente al modelo de Lagergren, muestra una correlación de  $R= 0.8525$ , una  $q_e= 27.1893$  mg/g y una  $K_1= 0.00803$  (1/min). Mientras que para el modelo cinético de Blanchard presentó un coeficiente de correlación  $R= 0.9984$ , la capacidad de adsorción fue  $q_m= 61.947$  mg/g y la constante de velocidad  $K_2= 87.588 \times 10^4$  (g/mg\*min).

Conforme a los resultados, la mejor correlación (R) fue obtenida para el modelo pseudo – segundo orden, indicando que el modelo de Blanchard tiene la mejor aplicabilidad para describir la cinética de adsorción de 2,4 DCP en el material MAT. Dicho modelo, de forma más específica asume que la capacidad de sorción es proporcional al número de sitios activos ocupados en el adsorbente. Basándose en la capacidad de sorción en el equilibrio, cuyo mecanismo se le atribuye al fenómeno de quimisorción debido a las interacciones que se establecen entre el adsorbente y adsorbato formando una monocapa en la superficie del mismo.

Los datos obtenidos a partir del estudio del equilibrio y la cinética de adsorción de 2,4 DCP, podrán ser empleados para el diseño de columnas empacadas para la remoción de este contaminante, y posteriormente poder escalarlo a efluentes industriales.

## CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos en esta investigación se puede concluir lo siguiente: La técnica ácido-termal no fue agresiva con el material, ya que éste conservó sus propiedades mecánicas y no hubo degradación superficial. En la caracterización fisicoquímica de los materiales modificados se encontró que la concentración de sitios ácidos totales aumentó con la funcionalización, y está fue diferente respecto al ácido utilizado, siendo el material modificado con ácido tartárico con mayor densidad de grupos oxigenados, alcanzando un valor de 2.63 mmol/g. Los grupos fenólicos dominaron en concentración en todos los materiales. En cuanto a los grupos lactónicos, la funcionalización favoreció su formación y disminuyó la concentración de los carboxílicos. La concentración de sitios básicos fue nula para los cuatro materiales. Por otra parte, la carga superficial de los cuatro materiales tiende hacia la negatividad en valores de pH más altos al de su PCC además, éste disminuyó después de la oxidación química de los materiales. Y la capacidad de adsorción del residuo de espárrago para la eliminación de 2,4 DCP se incrementó al ser oxidado con el ácido tartárico, cítrico y maleico. Además, incrementa con el deceso de pH. El material MAT fue aquel con mayor capacidad de adsorción de 2,4 DCP equivalentes a 168.21 mg/g y, respectivamente a pH 3 y 25 °C. Los resultados de esta investigación indican que el material MAT podrían tener gran potencial para ser empleadas como materiales adsorbentes de 2,4 Diclorofenol en el tratamiento de agua, para su potabilización y consumo humano.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Karla Rocío Padilla A. / Leonor Ma. Blanco J. / Sylvia Orozco N. / Flavio Jáuregui A. (2004) DEGRADACIÓN OXIDATIVA DEL 2,4-DICLOROFENOL POR VÍA SONOELECTROQUÍMICA Ciencia UANL, enero-marzo, año/vol. VII, número 001. Universidad Autónoma de Nuevo León Monterrey, México
2. Hydrology, 364, 175–18
3. JM Salmán. (2014) Optimización de las condiciones de preparación de carbón activado a partir de hojas de palma de aceite utilizando la metodología de superficie de respuesta en la eliminación de pesticidas de la solución acuosa Arabian Journal of Chemistry 7, 101–108.
4. Crittenden, C., Rhodes, R., Hand, W., Howe, J., Tchobanoglous, G., (2012). MWH's Water Treatment: Principles and Design. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
5. Katarzyna, C., (2009). Biosorption and Bioaccumulation in Practice. New York: Nova Science Publishers, Inc.
6. Z. Serrano Zermeño. (2003). Espárrago: Técnicas de Producción, Impresos Izquierdo, ISBN.
7. Bioresource Technology 100 (2009)
8. SIAP-SAGARPA, Se triplica producción de espárragos en México en sólo una década, (2017) <https://www.gob.mx/agricultura%7Cqueretaro/articulos/se-triplica-produccion-de-esparragos-en-mexico-en-solo-una-decada-141848>
9. Crini, G. (2006). Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: a review. Bioresource technology. Volumen 97(9), pp 1061-1085.

10. L. Romero. (2013). Preparación y uso de cáscara de naranja como biosorbente para la remoción de compuestos orgánicos. CIDETEQ. Volumen 1, pp 4-112.
11. Martínez-Nodal, P. Rosa-Domínguez, E. Rodrigué-Rico, I. LeivaMas. (2017) Caracterización físico química del bagazo de caña natural utilizado como biosorbente en la remoción de hidrocarburos en agua. ICIDCA. Volumen 2, pp 35-39.
12. Islam, T., Begum, H., Hossain, M., Moniruzzaman, M. (2013). Adsorption mechanism of 2, 4-dichlorophenol on ferric Oxide from aqueous solution. Journal of Bangladesh Academy of Sciences. Volumen 37 , pp 1-10.
13. A. Valladares-Carranza, B. Ortega-Santana, C. Zamora-Espinosa, J. Velázquez-Ordoñez, V. Aparicio-Burgos, (2016). Repercusiones del uso de los organoclorados sobre el ambiente y salud pública. Abanico veterinario, ]Zaragoza-Bastida. Volumen 6, pp 43-55.
14. Amézquita, H. J., (2010).Modificación de la capacidad adsorbente de fibras de carbón activado para la eliminación de metales pesados. Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León. Volumen 1, pp 29-39
15. Salazar, J.J., Leyva, R., Rivera, J., Ocampo, R., Cerino, F.J., (2017). Biosorption mechanism of Methylene Blue from aqueous solution onto
16. Ghosh, S.K., Bandyopadhyay, A., (2017). Adsorption of methylene blue onto citric acid treated carbonized bamboo leaves powder: Equilibrium, kinetics, thermodynamics analyses. Journal of Molecular Liquids. Volumen 248, pp 413- 424
17. Song, X., Ping, J., (2009). Biosorption of Congo Red from Aqueous Solution using Wheat Bran and Rice Brand: Batch Studies, Separation Science and Technology. 44, 1452-1466.
18. Chowdhury, D., (2012). Biosorption of methylene blue from aqueous solutions by a waste biomaterial: hen feathers. Appl Water Sci. 212-217.
19. Murillo, Y., Giraldo, L., Morelo, J. C., (2011). Determinación de la cinética de adsorción de 2,4-diclorofenol en carbonizado de hueso bovino por espectrofotometría UV-VIS. Revista Colombiana de Química. 40, 91-103.
20. Peña Carlón F. (2021). Adsorción de fluoruros mediante resinas de intercambio iónico dopadas con lantano molecular para su uso en el tratamiento de plantas de depuración de agua. Tesis licenciatura.
21. Zhang, S., Wang, Z., Zhang, Y., Pan, H., Tao, L., (2016). Adsorption of methylene blue on organosolv lignin from rice Straw. Procedia Environmental Sciences. 31, 3-11.
22. Ruthiraan, M., Abdullah, E.C., Murbarak, N.M., Noraini, M.N., (2017). A promising route of magnetic based materials for removal of Cadmiun and Methylene blue from waste wáter. Journal of Environmental Chemical Engineering.

## PROPIEDADES QUÍMICAS DE SUELOS URBANOS EN AGREGADOS DE DIFERENTE TAMAÑO

María Alcalá De Jesús, Marco Antonio Martínez Cinco, María Guadalupe Acosta Bárcenas, Mariela Casillas Corona, Juan Carlos González Cortés

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

### RESUMEN

El suelo está formado por minerales, materia orgánica (MO), aire y agua. Estos elementos se unen formando agregados, en éstos, las partículas minerales son de diferente tamaño (arenas, 2.0 a 0.05 mm; limos, menores de 0.05 a 0.002 mm y arcillas, menores de 0.002 mm de diámetro) de acuerdo con la Clasificación Americana. Se esperaba que la composición de los agregados del suelo se mantuviera después de pasarlos por mallas de diferente tamaño. El objetivo fue determinar diferencias entre las propiedades químicas de los suelos urbanos al oriente del Lago de Cuitzeo, Michoacán en agregados de diferente tamaño. Se utilizaron muestras de agregados de suelos tamizados con mallas de 0.044 mm y 0.250 mm de abertura, proporcionadas por Grano (2020). Las propiedades químicas determinadas fueron pH, MO y Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) de acuerdo con las técnicas propuestas en la DOF (2002). Se realizó un análisis de varianza para conocer la diferencia de las propiedades químicas con respecto al tamaño de los agregados de los suelos. De acuerdo con el promedio de cada propiedad se obtuvo que para los agregados de 0.044 mm, el pH fue medianamente alcalino (7.5) propio de la zona en donde hay suelos salinos; MO baja (5.8%) y CIC media (15.7 cmol kg<sup>-1</sup>) en comparación con los agregados de 0.250 mm en el cual el pH disminuyó a neutro (7.1), sin embargo, la MO (11.0%) y la CIC (28.5 cmol kg<sup>-1</sup>) resultaron altas, aumentaron al doble sus valores en los agregados de mayor tamaño. Se obtuvieron valores de  $p < 0.05$  (pH, 0.00215; MO,  $1.94e^{-08}$  y CIC,  $4.56e^{-11}$ ) que indican que las propiedades son estadísticamente diferentes en ambos tamaños de agregados. El contenido de MO y de la CIC tienen una estrecha relación con el tamaño de los agregados. Existen diferencias significativas entre las propiedades edáficas de ambos tamaños de agregados.

### INTRODUCCIÓN

En las zonas urbanas es común que los espacios que aún cuentan con suelo estén contaminados por elementos potencialmente tóxicos (EPT) derivado ya sea de forma natural o antropogénica como es el caso de la localidad de Araró, municipio de Zinapécuaro, Mich. En estudios previos (Grano, 2021) reporta para esta zona concentraciones de As y otros EPT en agregados de suelo de 0.044 mm de diámetro, partículas finas que al ser inhaladas ponen en riesgo la salud de los habitantes de la localidad. En otro estudio, para la ciudad de Morelia, Mich., Casillas (2011) obtuvo un índice de capacidad de amortiguamiento a los EPT en partículas de suelo y en polvos urbanos (agregados finos), trabajo en el que se relacionaron las propiedades químicas pH, MO y CIC con la capacidad de amortiguamiento a los EPT. Los principales factores que afectan a la capacidad amortiguadora de los suelos son el tipo y cantidad de arcilla, y cantidad de MO. Los suelos que contienen más arcilla y MO tienen mayor capacidad amortiguadora (Ortiz-Villanueva y Ortiz, 1990).

Con base en esta información se considera importante conocer la relación entre las propiedades químicas como la MO y la CIC con el tamaño de los agregados. Se esperaba que los agregados del suelo mantuvieran sus constituyentes después de ser pasados por mallas de diferente tamaño, en el caso contrario, se les tendría que someter a un proceso químico para separar a las partículas de manera independiente.

Un agregado es el resultado de procesos físicos, químicos y biológicos que ocurren durante la formación del suelo en donde participan factores como la humedad y el secado, la actividad de las raíces y fauna del suelo, y la descomposición de la MO, entre otros (Ortiz, 2010). En el agregado, las partículas minerales (arena, limo y arcillas) varían de tamaño de acuerdo con la clasificación Americana. Las arcillas tienen una superficie activa y capacidad de adsorción más alta que las



arenas por tener cargas eléctricas negativas; la MO (humus) también cuenta con propiedades electroquímicas importantes en la formación y estabilidad de los agregados (Ortiz, 2010). La Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) es una propiedad que se refiere a la suma total de cationes intercambiables que un suelo puede adsorber, propiedad que tienen en común, tanto las arcillas como la MO.

Se han realizado estudios relacionados con el tamaño de los agregados y su relación con la MO, por ejemplo, el tamaño de los agregados en el suelo ocasionados por erosión en donde el porcentaje en peso de estas partículas transportadas y depositadas variaron, y los contenidos de materia orgánica más altos (4.01% - 2.16%) se asociaron con las fracciones más gruesas de arena (2000 - 53  $\mu\text{m}$ ), en cambio la CIC con los valores más altos (56.6  $\text{cmol kg}^{-1}$ ) se obtuvieron en las partículas más finas (< 53  $\mu\text{m}$ ) (González *et al.*, 2022). En otro trabajo, la acumulación de carbono orgánico total, en las partículas asociadas a los minerales de la materia orgánica de un suelo con uso de pastizal y eucaliptus, se presentaron en agregados de mayor tamaño (Daiane Carvalho-dos *et al.*, 2012). De acuerdo con lo antes mencionado, se tiene por objetivo saber si existen diferencias entre las propiedades químicas de suelos urbanos al oriente del Lago de Cuitzeo, Michoacán en agregados de suelos de 0.044 mm y 0.250 mm de diámetro. Las propiedades químicas determinadas en los dos tamaños de agregados fueron pH, MO y capacidad de intercambio catiónico (CIC) de acuerdo con las técnicas propuestas en la DOF (2002).

## PARTE EXPERIMENTAL

El área de trabajo se localiza en la Localidad de Araró, municipio de Zinapécuaro, al este del Lago de Cuitzeo (Figura 1). De acuerdo con Cram *et al.* (2010) e INEGI (2010) el clima es templado subhúmedo con lluvias en verano; la temperaturas varía de 10 °C a 20 °C; mayo y junio son los meses más calientes y de julio a septiembre los más lluviosos con disminución de temperatura. Los suelos son Feozem, Leptosol y Luvisol; el uso de suelo es agrícola, de pastizal y urbano.

Se trabajó con muestras de agregados de suelos tamizados con mallas de 0.044 mm y 0.250 mm de abertura proporcionadas por Grano (2020) en un estudio previo. Las propiedades químicas determinadas en los dos tamaños de agregados fueron pH relación 1:2 en agua, medido con un potenciómetro; MO por el método de combustión húmeda (Wakley and Black) y CIC por extracción con acetato de amonio, técnicas propuestas en la DOF (2002) (Figura 2). Se realizó un análisis de varianza para conocer las diferencias estadísticas de las propiedades de los agregados de diferente tamaño en donde valores de  $p < 0.05$  son significativos para determinar diferencias y,  $p > 0.05$  para definir similitud entre las propiedades y el tamaño de los agregados.

## RESULTADOS

Del promedio de las propiedades químicas del suelo se obtuvo que para los agregados de 0.044 mm, el pH es medianamente alcalino, valor que refleja la propiedad de los suelos salinos de Araró; la MO es baja y la CIC es media, en cambio, en los agregados de 0.250 mm el pH disminuyó a neutro y tanto la MO como la CIC duplicaron sus valores, lo cual tiene una relación directa con el tamaño de los agregados más grande (Cuadro 1 y Figura 3).

De acuerdo con la clasificación del tamaño de partículas del sistema Americano, las arcillas son las partículas más pequeñas y por su naturaleza tienen cargas negativas así como la MO, que influyen en una alta capacidad de adsorción. Si se considera que la CIC es el número de sitios de adsorción, entonces a mayor contenido de MO en un volumen de agregados más grande, la CIC será más alta. De acuerdo con Ortiz (2010), la cantidad de sitios de cargas negativas para atraer cationes, dependerán de la CIC, por lo tanto, en los agregados de mayor tamaño con mayor número de sitios de adsorción, la CIC es más alta.

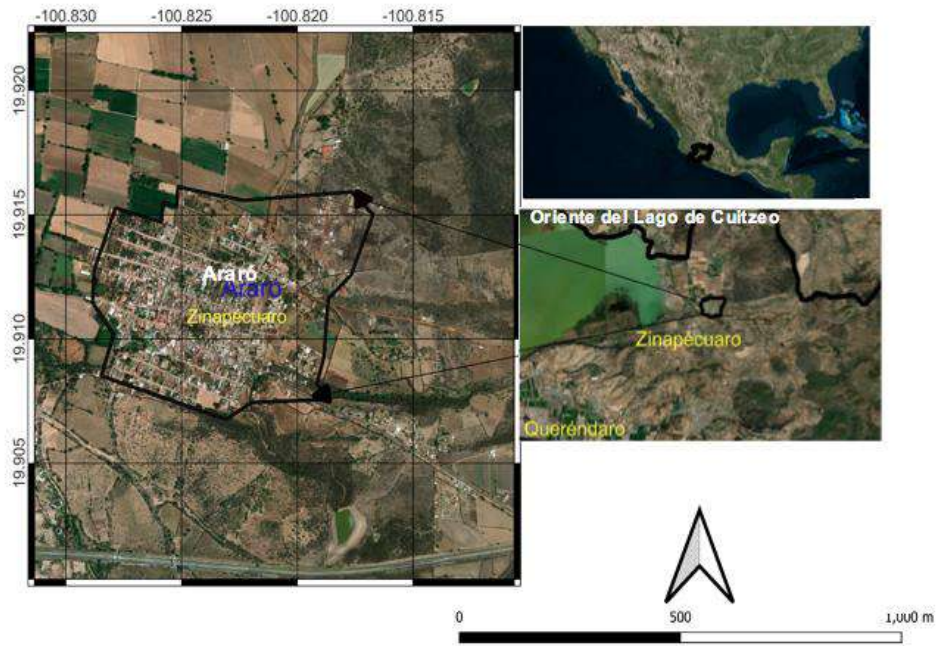
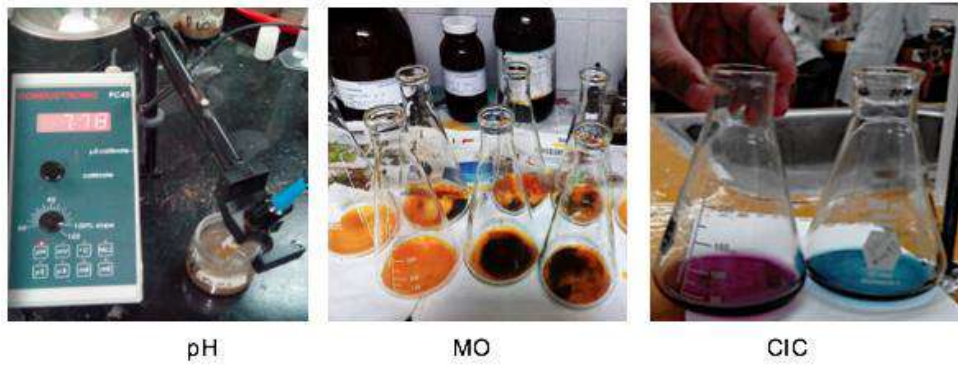


Figura 1. Zona urbana de Araró, Mpio. de Zinapécuaro, Mich.



pH

MO

CIC

Figura 2. Análisis químico de los suelos.

Los resultados encontrados en este trabajo, coinciden con los reportados por carvalho-dos *et al.* (2012) y González *et al.* (2022) quienes mencionan que el tamaño de las partículas de los suelos (agregados) tienen una estrecha relación con la concentración de MO y la CIC.

Del análisis de varianza, los resultado para ambos tamaños de agregados fueron para  $p < 0.05$  (pH de 0.00215; MO de  $1.94e^{-08}$  y CIC de  $4.56e^{-11}$ ), esto significa que dichas propiedades de suelos son estadísticamente diferentes en ambos tamaños de agregados.

Cuadro 1. Valores promedio de las propiedades químicas en función del tamaño de agregados.

	0.044 mm	Clase	0.250 mm	Clase
<b>pH</b>	7.52	Medianamente alcalino	7.11	Neutro
<b>MO (%)</b>	5.83	Baja	11.01%	Alta
<b>CIC cmol kg<sup>-1</sup></b>	15.69	Media	28.53	Alta

0.044 mm (44 µm); 0.250 mm (250 µm)

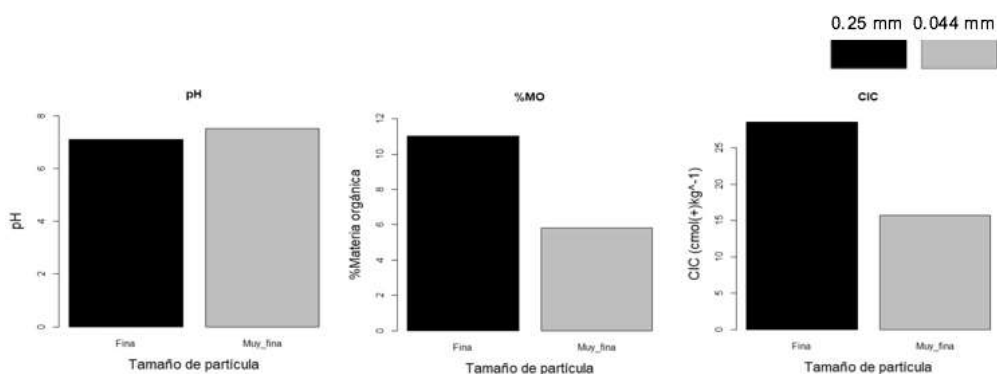


Figura 3. Promedio de las propiedades pH, MO y CIC en dos tamaños de agregados del suelo.

### CONCLUSIONES

A más contenido de materia orgánica (MO), la Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) es más alta. Estas propiedades son de clase alta y tienen una estrecha relación con los agregados de suelo de mayor tamaño (0.250 mm de diámetro). Existen diferencias significativas entre las propiedades edáficas de ambos tamaños de agregados.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Carvalho-dos, D. S., Rodrigues-de-Lima C., Nailto-Pillon, C., Filippini-Alba, J., Machado - da Rosa, C. y Oliveira-Farías, M. 2012. Organic matter distribution in classes of aggregates of a red clay Latosol under forestry and pastures.
2. Cram, S., L. Galicia e I. Israde-Alcántara (compiladores). 2010. Atlas de la Cuenca del Lago de Cuitzeo: Análisis de su Geografía y Entorno Socioambiental. ISBN: 978-607-02-1830-9.
3. Casillas C. M. 2011. Caracterización y análisis espacial de las propiedades de suelos urbanos contaminados por metales pesados. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, México.
4. DOF (Norma Oficial de Suelos). 2001. NOM-023-SEMARNAT-2001. 2003. Norma Oficial Mexicana. Que especifica los lineamientos para análisis con fines de Fertilidad, Salinidad y Clasificación de Suelos. Diario Oficial de la Federación. 23 de abril.
5. González C., J. C., M. E. Granados G. y M. Alcalá de J. 2022. Caracterización preliminar de los sedimentos en una zona de cárcavas en proceso de restauración forestal, pp 185-190 *In: Ayala-Niño F., F. López-Valdés, G. Medina-Pérez, N. A. Sigala-Aguilar y F. Fernández-Luqueño (Editores). Innovación y Suelos Sanos para el Desarrollo Sustentable. 46 Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo. ISBN digital: 978-607-9023-67*
6. Grano D. N., 2020. Análisis de riesgo probabilístico de daño a la salud por ingesta de arsénico en polvos en una población de la Riviera del Lago de Cuitzeo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ingeniería Química.
7. INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2010. Compendio de información geográfica municipal 2010. Zinapécuaro, Mich. de Ocampo. Clave geoestadística 1610. Disponible en: [https://www.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos\\_geograficos/16/16110.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/16/16110.pdf)
8. Ortiz S., C. A. 2010. Edafología. Universidad Autónoma de Chapingo, Departamento de suelos. 8ª ed. 335 p.
9. Ortiz-Villanueva, B., C. A. Ortiz S. 1990. Edafología. Séptima edición en español. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Suelos. México, D. F. Editora: V. A. Gómez Cuevas.

## PRODUCCIÓN DE BACTERIOCLOROFILA A POR CULTIVOS PUROS DE BACTERIAS FOTOSINTÉTICAS ANOXIGÉNICAS (NO SULFUROSAS) EN COMPUESTOS ORGÁNICOS

María Teresa Núñez-Cardona María Teresa, Luis Toledo Téllez Luis, Erick Uriel Quezada Cabrera Erick y Arturo Martínez Santiago Arturo

Departamento El Hombre y su Ambiente, Laboratorio de Ecología Microbiana, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.  
[mtnunez@correo.xoc.uam.mx](mailto:mtnunez@correo.xoc.uam.mx).

### RESUMEN

Las bacterias fotosintéticas rojas no sulfurosas (BRNS) son el grupo más diverso entre los microorganismos fotótrofos anoxigénicos (no producen oxígeno), cuentan con bacterioclorofilas a o b (dependiendo del género); no son patógenas y son muy útiles para proteger al ambiente, especialmente por su capacidad de utilizar compuestos orgánicos (Ej. alcoholes) e inorgánicos (Ej. metales pesados) productos de diversas actividades humanas y que son liberados al ambiente. En este trabajo se aislaron y obtuvieron cultivos puros de BRNS provenientes de muestras del agua del Golfo de México colectadas durante las campañas oceanográficas PROMEBIO. Se determinó la capacidad de 25 cultivos puros para utilizar butanol, metanol, propanol, tolueno y etanol, como fuentes de carbono y/o donadores de electrones. Para ello estos alcoholes (1.0 mL/L), fueron agregados, separadamente, a tubos de ensaye (13.0 mL de capacidad) conteniendo medio de cultivo (10 mL) para BRNS<sup>1</sup> compuesto por:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , solución de van Niel, vitamina B12 (1.0 g/50mL) y 1.0 mL de cloruro férrico (1.2 g/100 mL); se utilizó, como blanco, a medio de cultivo sin sustrato (10 mL y; en todos los casos, fueron inoculados con 2.0 mL de los cultivos bacterianos e incubados a temperatura ambiente y un ciclo de luz/obscuridad (8/16 horas) a 2000 lux. Después de 30 días de incubación fueron analizados los pigmentos fotosintéticos por espectrofotometría (Shimadzu UV 160), previa extracción con una mezcla de acetona:metanol (7:2). La Bchl a fue cuantificada mediante la fórmula:  $\text{Bchl a } \text{gL}^{-1} = (\text{A}/\text{CE}) (\text{VS}/\text{VCC}) * 1000$ , donde A=absorbancia registrada a 770nm, CE=coeficiente de extinción de la Bchl a en acetona:metanol a 770nm=84.1, VS=volumen del solvente, VCC=volumen del cultivo centrifugado<sup>2</sup>. En los 25 cultivos la presencia de bacterioclorofila a fue detectada a 362-365 y 770-772 nm. Con tolueno, todos los cultivos produjeron menos bacterioclorofila a que el blanco (0.011  $\text{gL}^{-1}$ ); la mayor producción fue con etanol (0.039  $\text{gL}^{-1}$ ), tres veces más que el blanco), seguido del butanol (0.012  $\text{gL}^{-1}$ ), metanol (0.021  $\text{gL}^{-1}$ ) y propanol (0.019  $\text{gL}^{-1}$ ). Las BRNS aisladas pueden ser útiles para la remediación de aguas contaminadas por desechos que contienen compuestos como los aquí ensayados.

### INTRODUCCIÓN

Se reconocen alrededor de 28 géneros y 97 especies de bacterias fotosintéticas rojas no sulfurosas (BRNS), como todos los organismos fotótrofos, convierten energía luminosa en energía química, mediante el proceso de fotosíntesis anoxigénica (no hay formación de oxígeno), para ello, dependiendo del grupo, pueden presentar bacterioclorofilas a o b<sup>1</sup>.

Las bacterias rojas no sulfurosas son útiles para proteger al ambiente, para el tratamiento de aguas residuales y suelos contaminados; se pueden encontrar en cuerpos de agua continentales y marinos, en estos ambientes realizan funciones esenciales en los ciclos del carbono y azufre, ofrecen servicios ambientales al acumular metales pesados y otros contaminantes comunes en cuerpos de agua. Por otra parte, al igual que otros productores primarios, sirven de alimento para invertebrados por lo que son de gran utilidad en la acuicultura; su aplicación en la agricultura, el sector de la salud y en procesos biotecnológicos no son de menor importancia.

Aunque las bacterias fotosintéticas se han estudiado desde el siglo XIX en diferentes países, poco se sabe sobre su distribución en ambientes marinos. Se sabe que estos, ofrecen recursos naturales útiles para la medicina humana, ejemplos de ellos son esponjas, corales, moluscos, tunicados, sin embargo, aparentemente, los compuestos que se extraen de estos organismos vivos provienen de la microbiota asociada a ellos y se han identificado bacterias fotosintéticas como parte de su estructura microbiana<sup>2</sup>. El objetivo de esta investigación fue ensayar cinco alcoholes para determinar



la capacidad de cultivos puros de BRNS para utilizarlos como fuente de energía y donadores de electrones.

## TEORÍA

Las bacterias fotosintéticas rojas no sulfurosas (BRNS) forman parte de las bacterias anaerobias, anoxigénicas, esto es, que no producen oxígeno como resultado de la fotosíntesis. Estas bacterias, en lugar de agua, como donador de electrones, utilizan compuestos orgánicos de peso molecular bajo (acetato, propionato, succinato, metionina, cisteína) y algunas pueden utilizar compuestos derivados que contienen azufre (Ej. tiosulfato, sulfuro de hidrógeno, etc.), dependiendo de la especie, pueden presentar bacterioclorofila a o b y carotenos que funcionan como pigmentos accesorios y las protegen del daño fotooxidativo, todos están asociados a sus membranas intracitoplasmáticas las cuales se originan como invaginaciones que ocupan la mayor parte de las células y pueden presentarse como túbulos, vesículas o lamelas<sup>3</sup>.

El análisis *in vivo* de los pigmentos, en las bacterias fotosintéticas han sido de gran utilidad para su caracterización, ya que cada organismo origina espectros de absorción diferentes, así, los máximos de absorción de la bacterioclorofila a, *in vivo* se presentan a: 375, 590, 800-810, 830-890 nm y para la bacterioclorofila b son: 400, 605, 835-850 1015-1135 nm.

Cuando los pigmentos fotosintéticos son extraídos con solventes orgánicos (Ej. acetona, metanol, etanol, etc.) se generan espectros similares para especies diferentes, por lo que no son de utilidad para su caracterización pero sí para cuantificar su biomasa (crecimiento).

Cabe señalar que durante el proceso de extracción los pigmentos pueden experimentar cambios debidos a factores como la luz, temperatura, exposición al aire, pH, etc. y, dependiendo del solvente que se utiliza para su extracción puede variar la longitud de onda a la que absorben, tanto las bacterioclorofilas como los carotenos. En metanol, acetona y la mezcla de acetona metanol (7:2), la bacterioclorofila a absorbe a 770-773 nm y la bacterioclorofila b a 790 nm, en acetona:metanol.

## PARTE EXPERIMENTAL

Se colectaron muestras de agua en diferentes puntos y profundidades del Golfo de México, durante la Campaña Oceanográfica Procesos y Mecanismos Biológicos del Golfo de México VI (PROMEBIO VI), estas se utilizaron para inocular tubos de ensaye conteniendo medio de cultivo líquido (MCL) para bacterias rojas no sulfurosas<sup>1</sup>, cuya composición es la siguiente:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1.0 g),  $\text{NH}_4\text{Cl}_2$  (0.5g),  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.4 g),  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.5 g), solución de oligoelementos de van Niel (1.0 mL), 1.0 mL de vitamina B12 (1.0 g/50mL) y 1.0 mL de cloruro férrico (1.2 g/100 mL agua destilada); 30.0 mL de solución de bicarbonato de sodio (5%/agua destilada), succinato de sodio (1.0 g) y 950 mL de agua destilada. Los cultivos fueron incubados a temperatura ambiente y con un ciclo de luz (incandescente)/oscuridad (8/16 horas) a 2000 lux.

Una vez que se observó la presencia de pigmentos (rojo, rosa, púrpura, marrón) en los cultivos líquidos, se realizaron aislamientos en medio de cultivo sólido, agregando 15 g de agar a 1000 mL del medio de cultivo antes descrito, se hicieron resiembras hasta obtener cultivos puros lo cual se verificó mediante observaciones al microscopio óptico. Se determinó la capacidad de los cultivos para utilizar al butanol, metanol, propanol, tolueno y etanol, como fuentes de carbono y/o donadores de electrones, para ello, se agregó, separadamente, cada uno de estos compuestos al MCL (sin succinato, ni bicarbonato) y se agregó 10.0 mL de los medios a tubos de ensaye (13 mL de capacidad) y fueron inoculados con 2.0 mL de los cultivos puros de BRNS. El MCL, sin alguna fuente de carbono se utilizó como testigo; todos los cultivos fueron incubados a temperatura ambiente e iluminados como se describió previamente.

Después de 30 días de incubación fueron extraídos los pigmentos fotosintéticos así, los cultivos fueron centrifugados a 5,000 rpm, se eliminó el sobrenadante, se agregó la mezcla de acetona:metanol (7:2) y se mantuvieron a 4°C durante 18 horas, evitando su exposición a la luz. Pasado este tiempo, los extractos fueron centrifugados nuevamente y se realizaron las lecturas con el sobrenadante, utilizando como blanco la mezcla de acetona:metanol. El análisis de los extractos se realizó en un espectrofotómetro Shimadzu UV160. Se hicieron registros de la absorbancia a 770 nm para determinar la concentración de bacterioclorofila a mediante el uso de la fórmula:



$$\text{Concentración de } Bchl\ a\ \text{g}L^{-1} = [(A/CE) (VS/VCC) * 1000]^4$$

Donde:

A=absorbancia registrada a 770nm

CE=coeficiente de extinción de la Bchl a en acetona:methanol: a 770 nm=84.1,

VS=volumen del solvente (mezcla acetona:methanol)

VCC=volumen del cultivo centrifugado

**RESULTADOS**

Se obtuvieron 25 cultivos puros de BFRNR, todos presentaron forma de bacilar, en la tabla 1 se presenta el total y promedio de bacterioclorofila producida por los 25 cultivos, en todos los sustratos ensayados. La presencia de *Bchl a* fue registrada a 362-365 y 770-772 nm. Con tolueno, todos los cultivos produjeron menos bacterioclorofila que el blanco (promedio 0.008 gL<sup>-1</sup>) y la mayor producción se detectó con etanol (promedio 0.039 gL<sup>-1</sup>, tres veces más que el blanco), seguido del butanol y propanol (0.019 gL<sup>-1</sup>), metanol (0.021 gL<sup>-1</sup>).

Tabla 1. Producción (total y promedio) de Bchl a producida por 25 cultivos puros de BRNS

	Butanol	Tolueno	Etanol	Propanol	Metanol	Blanco
Total	0.4629	0.1895	0.9777	0.4863	0.5351	0.2965
Promedio	0.019	0.008	0.039	0.019	0.021	0.012

En la tabla 2 se presenta la clave del cultivo de BRNS, su origen (profundidad) así como la capacidad de los cultivos para utilizar a cada uno de los sustratos.

Tabla 2. Utilización de los alcoholes (única fuente de carbono y/o donadores de electrones) por los 25 cultivos puros de BRNS. Concentración de bacterioclorofila a:  menor que el blanco  mayor que el blanco

Clave del cultivo	Profundidad de origen	Butanol	Tolueno	Metanol	Propanol	Etanol
13d	5	darkpink	lightpink	darkpink	lightpink	darkpink
18a	70	lightpink	lightpink	lightpink	lightpink	lightpink
16a	40	lightpink	lightpink	lightpink	lightpink	lightpink
10b	65	lightpink	lightpink	lightpink	lightpink	lightpink
6b	90	darkpink	lightpink	darkpink	lightpink	lightpink
16g	40	lightpink	lightpink	lightpink	lightpink	lightpink
7a	40	darkpink	lightpink	darkpink	lightpink	lightpink
15a	100	lightpink	lightpink	lightpink	lightpink	lightpink
19a	150	darkpink	lightpink	darkpink	lightpink	lightpink
19b	150	lightpink	lightpink	lightpink	lightpink	lightpink
7b	40	lightpink	lightpink	lightpink	lightpink	lightpink
16b	40	darkpink	lightpink	darkpink	lightpink	lightpink
18b	70	lightpink	lightpink	lightpink	lightpink	lightpink
19c	150	darkpink	lightpink	darkpink	lightpink	lightpink
19d	150	lightpink	lightpink	lightpink	lightpink	lightpink
15d	100	darkpink	lightpink	darkpink	lightpink	lightpink
18c	70	darkpink	lightpink	darkpink	lightpink	lightpink
16f	40	darkpink	lightpink	darkpink	lightpink	lightpink
15c	100	lightpink	lightpink	lightpink	lightpink	lightpink
6a	90	lightpink	lightpink	lightpink	lightpink	lightpink
15b	100	darkpink	lightpink	darkpink	lightpink	lightpink
10a	65	darkpink	lightpink	darkpink	lightpink	lightpink
16e	40	darkpink	lightpink	darkpink	lightpink	lightpink
16c	40	lightpink	lightpink	lightpink	lightpink	lightpink
13b	15	darkpink	lightpink	darkpink	lightpink	lightpink

Como puede observarse en la tabla 2, cuatro cultivos de BRNS, obtenidos de muestras colectadas a 40 y 70 y 150 m de profundidad, fueron capaces de utilizar, como donadores de electrones y fuentes de carbono, a todos los sustratos ensayados, lo que hace idóneos a estos microorganismos

para ser utilizados en procesos de remediación de aguas residuales que contienen este tipo de compuestos que generalmente provienen de desechos hospitalarios, farmacéuticos e industriales.

## CONCLUSIONES

Con etanol se obtuvo la mayor producción de *Bchl a*; además de este, la mayoría de cultivos fueron capaces de utilizar como donadores de electrones al metanol y propanol lo que hace que estos sean útiles para obtener crecimientos masivos de BRNS y sean considerados como opción para ser aplicados en procesos de bioremedación de agua residuales que contengan compuestos como los ensayados.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Martha Signoret Poillon (UAMX), al Dr. David Salas de León Responsable del proyecto PROMEBIO financiado por el CONACyT

## BIBLIOGRAFÍA

1. M. T Núñez-Cardona, M. Chávez, M. Signoret-Poillon. Aislamiento y caracterización de bacterias rojas no sulfurosas provenientes del humedal de la Mixtequilla, Veracruz (México). ECIPERÚ. Vol. 8, 2, 2012, pp. 33-38.
2. MTNúñez-Cardona M. 2010. Análisis in vivo de pigmentos en bacterias fotótrofas. En: Signoret M. (Ed). Métodos y técnicas de laboratorio aplicables al estudio de ecosistemas. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. 13-20 p
3. M. T. Núñez-Cardona. 2003. Aislamiento y caracterización pigmentaria de las bacterias rojas del azufre de la laguna de Tampamachoco, Veracruz. Hidrobiológica. Vol. 13, 3, 2003, pp 171-176.
4. L. J. Stal, H. Van Gemerden & W.E. Krumbein W.E. (1984). The simultaneous assay of chlorophyll and bacteriochlorophyll in natural microbial communities. J. Microbiol. Meth. Vol. 2, 6, 1984, pp. 295-306.

## EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA Y ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE LAVANDULA OFFICINALLIS E IPOMOEA STANS

Daniel Paulino Villarreal Lerma<sup>1</sup>, David Gilberto García Hernández<sup>2</sup>, Catalina Leos Rivas<sup>2</sup>, Catalina Rivas Morales<sup>2</sup>, Angela Jaquelin Espinoza Mijangos<sup>2</sup> y Michel Stephane Heya<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Nuevo León, <sup>2</sup>Universidad Autónoma de Nuevo León.  
Dvashe75@gmail.com

### RESUMEN

El amplio uso empírico de las plantas medicinales en México sin respaldo científico deja una gran incógnita sobre los verdaderos efectos que puede tener el uso de los extractos de las plantas utilizadas medicinalmente, aunado a esto el incremento exponencial de las resistencias a antimicrobianos, permite un área de investigación en conjunto, para el análisis de los efectos de extractos naturales. En este caso se presenta la lavanda (*Lavándula officinallis*) y Tumbavaquero (*Ipomoea stans*) como coadyuvante terapéutico contra bacterias de interés nosocomial con multifarmacorresistencia. La evaluación de estos se realizó mediante el ensayo de difusión en placa por disco, en el caso de la evaluación de la actividad hemolítica se realizará mediante un ensayo de hemolisis eritrocitaria. A partir de los estudios se observó la ausencia de halos de inhibición frente a bacterias multifarmacorresistentes como *Acinetobacter baumannii* ATCC 15308, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212 *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas earuginosa* ATCC 27853. Por otra parte en cuanto al ensayo de hemolisis eritrocitaria se encontró un porcentaje de hemolisis menor al 2% para *L. officinallis*, mientras que para *I. stans* se observó un porcentaje de hemolisis de 25% a una concentración de 1000 ppm.

### INTRODUCCIÓN

La sociedad occidental comenzó a interesarse por el estudio de los recursos naturales en el siglo XVIII durante la ilustración. En esta época se embarcaron un sinnúmero de expediciones a las tierras que conformaban al enorme imperio hispano, llegando así hasta Nueva España (Micheli e Izaguirre-Ávila, 2009). Por otra parte, el uso de plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades y dolencias en territorio de lo que hoy se conoce como México en las culturas precolombinas como las náhuatl y maya. Hoy en día su uso sobrevive gracias a la herbolaria mexicana pues tradicionalmente se han empleado como un recurso básico en la lucha contra algunos padecimientos comunes. La herbolaria tiene como base el aprovechamiento de compuestos químicos que las plantas poseen y que cuentan con acciones farmacológicas por lo que para obtenerlos se pueden aplicar diversas técnicas como la infusión, maceración, cataplasma (uso tópico como crema y con consistencia blanda) o ingestión directa. (Sembrando Vida, 2020)

México es una región megadiversa en lo que a flora se refiere, posicionándose como el segundo país con mayor número de plantas medicinales inventariadas; se estima que hay 4500 de las cuales hay reportes de 3000, sin embargo, solamente se ha hecho un análisis farmacológico del 5%. Esto nos abre una ventana de investigación amplia pues se desconoce el mecanismo de acción o los compuestos activos de la mayoría de las plantas registradas en México. (CONABIO, 2020)

Hoy en día, se comercializan numerosas especies vegetales utilizadas para tratamientos de medicina tradicional como la "Tumbavaquero" cuyo nombre proviene de su propiedad de formar amasijos de hierba seca lo que puede hacer tropezar al caballo y tumbar al jinete. La planta es una hierba rígida que puede medir entre 50 y 90 cm de altura, muy ramificada con pelos blandos a lo largo del tallo, sus hojas presentan formas lanceoladas y cuentan con 4-6 venas muy marcadas. La flor tiene tonalidades que van desde el azul hasta el violeta formando una copa con el centro de color blanco; a partir del centro de la flor salen y líneas hacia el interior que transmite la apariencia de una estrella. Su raíz subterránea está caracterizada por un rizoma muy desarrollado de 60 cm de largo por 3 cm de ancho. Algunas de sus aplicaciones van desde calmar la ansiedad, irritación, hiperactividad, alivio del vértigo, mareo y se dice que mejora el sistema inmune. Sus modos de uso son la maceración de

la raíz durante una semana en alcohol isopropílico lo cual se puede aplicar alrededor del cuello y la frente para calmar la alteración de los nervios.

Se pueden preparar infusiones utilizando la raíz seca en trozos, molida o pulverizada en un litro de agua hervida lo que ayuda a la disminución de gases intestinales. (Vázquez, 2023)



Fig. 1: Flor de *Ipomoea stans*.

Por otra parte, una de las plantas aromáticas más famosas y utilizadas en el mundo es la *Lavandula officinallis* o lavanda común. Se presencia como un arbusto leñoso que puede medir hasta 1m de altura, sus hojas son lineales con un tono gris verdoso y las flores se desarrollan en espigas que crecen en la extremidad de tallos no ramificados. Principalmente se produce en Provenza. Antiguamente se utilizaban quemando sus ramas enteras y su fin era purificar y desinfectar las habitaciones. Existen más de 100 especies de lavanda pero *L. officinallis* se antepone como la de mayor importancia por su potente olor y las capacidades terapéuticas de su aceite. Su modo de uso puede ser a través de su aceite esencial que puede ser ingerido junto con miel y azúcar como antiviral en invierno, puede aplicarse como tratamiento en la piel quemada o puede utilizarse en aromaterapia como relajante. (Laboratoire Altho, 2018)



Fig. 2: Campo de lavanda en Provenza.

El empleo de plantas medicinales mantiene su importancia en nuestra época pues aún con la amplia gama de fármacos actuales, nos enfrentamos a afecciones que no sucumben ante su uso como las infecciones causadas por bacterias con múltiples resistencias a fármacos. Palacios y Zuñiga (2022) realizaron un estudio en el que se comprobó el efecto del aceite esencial de lavanda (*Lavandula angustifolia*) contra cepas bacterianas inocuas y se obtuvo actividad antimicrobiana frente a *Salmonella entérica*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Bacillus cereus* ATCC 10876. En lo que respecta al género *Ipomoea* se realizó un estudio en el que evaluaron distintos parámetros entre los que se encontraba la actividad antimicrobiana frente a cepas inocuas de *E. coli*, *S. aureus* y *Aspergillus niger* encontrándose inhibición del crecimiento para *S. aureus* y *A. niger*.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad hemolítica y antimicrobiana de extractos metanólicos de *Lavandula officinallis* e *Ipomoea stans* frente a bacterias con resistencia a fármacos con el fin de realizar un aporte en cuanto al potencial uso que se les pueda dar como agente antimicrobiano, añadiendo un precedente de la hemo toxicidad de estos extractos.

## MATERIALES Y METODOS

La materia vegetal seca y triturada fue obtenida de la herbolaria científica Pacalli. El peso de las muestras utilizadas fue de 100 gr tanto para *Ipomoea stans* y *Lavandula officinallis* y se cometieron a maceración con metanol en un matraz Erlenmeyer durante una semana. Posteriormente se extrajo el solvente mediante presión reducida mediante el uso de un rotavapor. Una vez que la cantidad del solvente fue mínima, el extracto se colocó en un vial y se dejó en un horno de secado a 40 °C durante una semana. Para la utilización del extracto se suspendió en metanol a una concentración de 1000 ppm.

### Evaluación de la actividad antimicrobiana

Se probó la actividad del extracto contra cepas inocuas de bacterias identificadas que pertenecían tanto al grupo de las bacterias Gram positivas como Gram negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Acinetobacter baumannii* ATCC 15308, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Para emplear los extractos se usó la técnica de difusión por disco. Primeramente, se prepararon discos de papel filtro con un diámetro aproximado de 05 mm los cuales se esterilizaron en autoclave a 121 °C con 15 lb de presión durante 15 minutos. Una vez estériles, se les colocó 20 µL de extracto a 1000 ppm en cada lado y se dejaron secar siempre manteniendo condiciones de esterilidad.

Posteriormente se suspendió una colonia bacteriana de cada una de las cepas utilizadas en caldo Mueller-Hinton (M-H), para posteriormente ser utilizadas después de 18 horas de incubación a 37°C, esto con el fin de que el cultivo se encuentre en fase logarítmica. Una vez cumplido el tiempo de incubación, se tomó una alícuota de 100 µL y se pasó a otro tubo de caldo M-H el cual se estandarizó el cultivo al tubo 0.5 de la escala de McFarland midiendo su densidad óptica mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 550 nm, con esto se obtiene un estimado de  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC). Este proceso se realizó con cada una de las bacterias para posteriormente tomar 100 µL del caldo y colocarlo en cajas de Petri con agar M-H para ser distribuido en toda la superficie de la placa mediante el uso de un asa digralsky esteril y después se dejaron reposar 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se aplicaron los discos impregnados con el extracto con el uso de pinzas flameadas. Finalmente se incubaron durante 24 horas a 37°C.

### Evaluación de la actividad hemolítica

Para la preparación del paquete globular (PG) se obtuvo una muestra de sangre mediante venopunción la cual se colocó en tubos con un agente anticoagulante (EDTA) para posteriormente ser centrifugada a 5,000 rpm durante 5 minutos. Una vez terminada la centrifugación se extrajo el sobrenadante y se aforó al mismo nivel usando buffer fosfato salino (PBS) a pH 7.4, finalmente se homogenizó. Este proceso se repitió 3 veces para extraer la mayor cantidad de suero posible. Una vez extraído el sobrenadante de la tercera no se aforó con PBS y se traspasaron 5 mL a un matraz de aforación de 100 mL el cual fue aforado con PBS. Con esto se obtiene un concentrado de eritrocitos al 5%. (Hernandez Iglesias, 2020)

En cada repetición se realizaron 6 tratamientos con los extractos a diferentes concentraciones diluyéndolos en PBS. La metodología para cada tratamiento fue la siguiente: En un tubo cónico de 1.5 mL se colocó el PBS, seguido del extracto y finalmente se colocó el paquete globular.

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



<b>µL de PG</b>	200	200	200	200	200	200
-----------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Tab. 1: Tratamientos dados al PG para el ensayo de hemolisis.

Como control positivo se prepararon 6 tubos cónicos que contenían agua destilada y paquete globular. Los 6 tratamientos fueron similares.

<b>Tratamiento</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>µL de agua destilada</b>	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<b>µL de PG</b>	200	200	200	200	200	200

Tab. 2: Control positivo para hemolisis

Para el blanco se colocó PBS y extracto en 6 tubos cónicos de la siguiente manera:

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

Tab. 3: Blancos

Cada tratamiento fue puesto en incubación simultáneamente durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 minutos a 4°C en una microcentrífuga. Finalmente se tomaron 100 µL del sobrenadante y se colocaron en la placa de 96 pocillos para posteriormente ser leídos en un lector de microplaca (ELX 800 BioTek, USA). El ensayo constó de 3 repeticiones.

Para la obtención del porcentaje de hemólisis se utilizó la siguiente formula:

$$(\text{Abs Tx} - \text{Abs bco}) / (\text{Abs control (+)} - \text{Abs bco [De cada Tx]}) * 100$$

## RESULTADOS

Ningún extracto mostró actividad antimicrobiana a la concentración utilizada en ninguna cepa bacteriana.

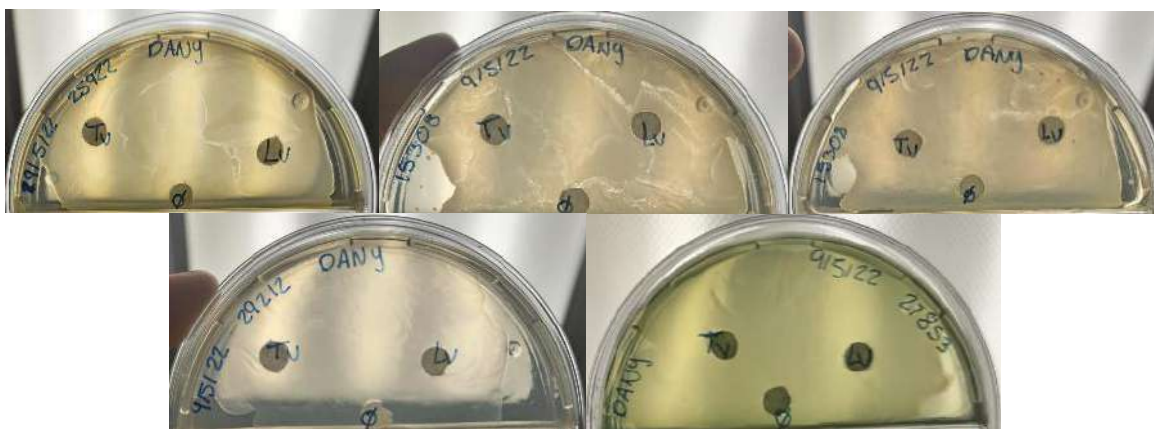


Fig. 3 Cajas de Petri con las pruebas antimicrobianas realizadas. No se observan halos de inhibición en los alrededores de los discos con el extracto.

Para la interpretación del ensayo se sustituyó la formula ya mencionada con las absorbancias promediadas de las 3 repeticiones obtenidas para cada tratamiento. El resultado para el extracto de la *Lavandula officinalis* fue el siguiente:

<b>Tratamiento</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>T6</b>
<b>Hemolisis%</b>	1.40	1.36	0.93	0.65	0.56	0.06



Tab. 3: Porcentaje de Hemólisis de extracto metanólico de *Lavandula officinallis* obtenido apartir de promediar las absorbancias de cada repetición y aplicar la formula para obtener porcentaje de hemólisis.

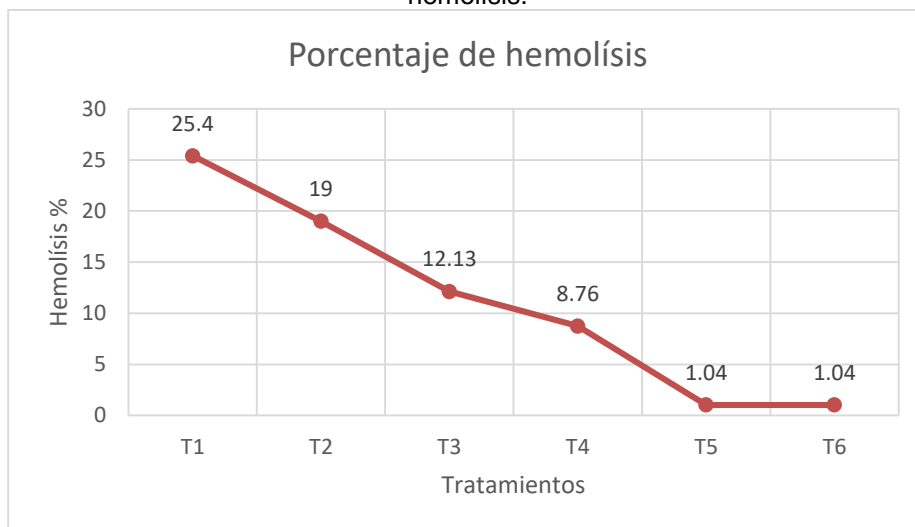


Fig. 3: Grafica del porcentaje de Hemólisis obtenido para el extracto metanólico de *Lavandula officinallis*.

El resultado para la evaluación de la actividad hemolítica de *Ipomoea stans* (Tumbavaquero) fue el siguiente:

Tratamiento	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Hemólisis%	25.40	19	12.13	8.76	1.04	1.04

Tab. 4: Porcentaje de Hemólisis de extracto metanólico de *Ipomoea stans* obtenido apartir de promediar las absorbancias de cada repetición y aplicar la formula para obtener porcentaje de hemólisis.

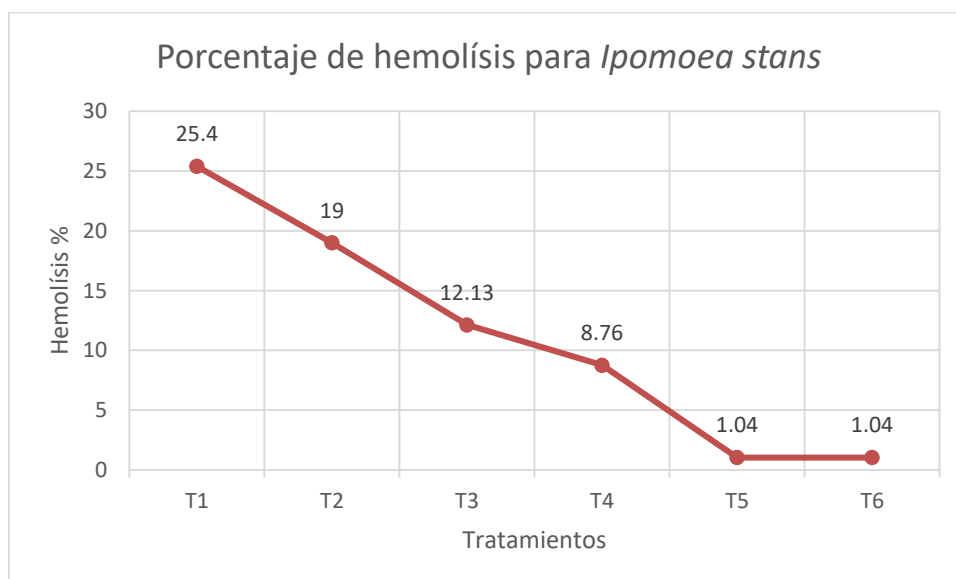


Fig. 3: Grafica del porcentaje de Hemólisis obtenido para el extracto metanólico de *Ipomoea stans*

**CONCLUSIONES**

El uso de plantas medicinales aún cuenta con un largo camino para ser comprendido completamente por la ciencia moderna, sin embargo, con la realización de este tipo de trabajos se busca poco a poco implementar metodologías conocidas con el fin de buscar nuevas plantar capaces de inhibir el

crecimiento bacteriano de organismos que hoy en día son capaces de crecer en presencia de medicamentos que solían usarse en su contra. A pesar de que no se observaron halos de inhibición en las pruebas antimicrobianas, se insta a la comunidad académica a continuar con el estudio de las mismas plantas bajo condiciones diferentes, como diferentes solventes para la realización de su extracto o de utilizarlo en concentraciones mayores. Las pruebas hemolíticas nos dan un precedente para descartar el tumbavaquero en ensayos celulares mientras que el bajo porcentaje hemolítico de la lavanda nos indica que hay una ventana de oportunidad para posteriores pruebas de citotoxicidad.

## BIBLIOGRAFÍA

1. CONABIO. (2020) Plantas medicinales. Biodiversidad mexicana. <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/medicinal/plantas>.
2. de-Micheli, A. & Izaguirre-Ávila, R. (2009). De la herbolaria medicinal novohispana a los inicios de estudios botánico-farmacológicos sistematizados (bosquejo histórico). Archivos de cardiología de México, 79(Supl. 2), 95-101.
3. Henandez Iglesias, C.S., (2020) Actividad antimicrobiana y anti hemolítica del extracto metanólico de *Cymbopogon citratus* sobre bacterias de importancia clínica. [Tesis de licenciatura]. Universidad Autónoma de Nuevo León.
4. Laboratoire Altho. (2018) Lavanda (*Lavandula officinalis*) BIO. Laboratoirealtho. <https://www.laboratoirealtho.fr/es/lavanda-lavandula-officinalis-bio>.
5. Moonjit Das, G.V., Sudhir Babu, R., Vidya & M. Himaja. (2015). GC-MS analysis and insecticidal activity of the leaves of *Ipomoea eriocarpa*. VIT University. J. Indian Chem. Soc, 92, 542-544.
6. Palacios Rosero, O.F. & Zuñiga Altamirano, L.E. (2022) Extracción del aceite esencial de Lavanda (*Lavandula angustifolia*), mediante la metodología de arrastre de vapor. UTC. Latacunga. 87 p.
7. Sembrando vida. (2020) Plantas medicinale: Nuestro patrimonio. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/bienestar/sembrandovida/articulos/plantas-medicinales-nuestro-patrimonio>
8. Vázquez Chacón, J.Y., (2023). Tumba vaquero. Lifeder. <https://www.lifeder.com/tumba-vaquero/>.

## INTERCAMBIO DE PARÁSITOS GASTROINTESTINALES ENTRE POBLACIONES SILVESTRES DE PRIMATES Y COMUNIDADES RURALES

<sup>1</sup>María Fernanda Lopez Flores, <sup>2</sup>Aracely Lopez-Monteón, <sup>2</sup>Angel Ramos-Ligonio, <sup>3</sup>Jaime Morales Romero, <sup>4</sup>Francisco Garcia Orduña, <sup>2</sup>Jesús Torres Montero y <sup>4</sup>Ma de Jesús Rovirosa Hernández

<sup>1</sup>Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, 91190, México.

<sup>2</sup>LADISER Inmunología y Biología Molecular, Universidad Veracruzana, Orizaba, Veracruz, 94340, México

<sup>3</sup>Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, 91190, México

<sup>4</sup>Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, 91190, México

### RESUMEN

Las comunidades rurales dependen mucho de los recursos naturales para obtener alimentos y destinar las áreas a la agricultura o ganadería, sin embargo, la obtención de éstos provoca disturbios antropogénicos en el ambiente, esto incrementa la fragmentación del hábitat, lo que aumenta la probabilidad de contacto con los seres humanos, animales silvestres y domésticos, y por ende una mayor probabilidad de contagios por patógenos como los parásitos. El objetivo del estudio fue determinar la relación del intercambio de parásitos gastrointestinales en comunidades rurales con poblaciones de primates silvestres (*Ateles geoffroyi* y *Alouatta palliata*). El estudio se realizó en dos comunidades rurales: Mirador Pilapa y Magallanes en el estado de Veracruz y en fragmentos de selva tropical donde se distribuye el mono araña y aullador. El estudio se realizó durante 11 meses del 2021 al 2022. Se obtuvo un total de 96 muestras fecales, pertenecientes a 35 participantes y 131 muestras de heces, 107 de *A. palliata* y 24 de *A. geoffroyi*. Con ayuda de un GPS, se registraron las coordenadas donde se encontraron las muestras fecales de los primates y la cercanía con la población humana. Utilizando métodos coproparasitoscópicos y de sedimentación espontánea se identificaron los parásitos gastrointestinales de mayor prevalencia. Se obtuvo una prevalencia del 94.28% en los participantes, los parásitos de mayor prevalencia fueron: *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba coli* y *Balantidium coli*. Mientras que en los primates la prevalencia fue de 41.22%, predominando la presencia de *E. histolytica*, *Blastocystis hominis* y *B. coli*. No se encontró una diferencia significativa entre la prevalencia parasitaria entre los sitios de estudio de los primates ni voluntarios. La cercanía entre las poblaciones de primates y las dos comunidades rurales fue menor a 0.5Km. Se observó que en ambas poblaciones comparten dos especies de parásitos gastrointestinales: *B. coli*, y *E. histolytica*. *E. histolytica* fue el parásito de mayor prevalencia en los participantes y las poblaciones de primates silvestres. El humano es el reservorio de este parásito. Se sugiere que el río es el vehículo para la transmisión del patógeno, puesto que ambas poblaciones comparten ese ecosistema, y la principal vía de transmisión es a través de la ingestión de alimentos y agua contaminados.

### INTRODUCCIÓN

Como consecuencia de la globalización, se genera modificaciones del ambiente por los disturbios antropogénicos, provocando enfermedades emergente, reemergentes así como la aparición de nuevos patógenos (Marcos, 2013). La destrucción del hábitat obliga a poblaciones humanas y animales a cohabitar en el mismo ecosistema, lo cual incrementa las posibilidades de exposición a agentes infecciosos con los que no habían tenido contacto previo (Benavides-Arias y Soler-Tovar, 2017).

Entre los grupos sociales que se ven más afectados por la cercanía con la fauna silvestre se encuentran las comunidades rurales, puesto que dependen mucho del ecosistema para proveer sus alimentos, agua y destinan las áreas naturales a la agricultura o ganadería (Marcelino-Aranda *et al.*, 2017), aunado a esto, son poblaciones que no cuentan con servicios urbanos, sistemas de drenaje, tienen limitaciones para obtener el agua potable y una alta convivencia con animales domésticos, debido a lo anterior, son susceptibles a la presencia de patógenos principalmente los parásitos gastrointestinales (Santos, 2022).

La fauna silvestre juega un papel importante como un factor de riesgo potencial de enfermedades de origen zoonótico, debido a que por la deforestación se da un estrecho contacto con el hombre e

incluso con animales domésticos o con la fauna silvestre, provocando una mayor interacción entre las poblaciones y como consecuencia incrementando la transmisión de patógenos (Zahedi *et al.*, 2016). El sureste de México tiene la tasa más alta de deforestación en el país, entre las especies más afectadas se encuentran los monos aulladores (*Alouatta palliata* y *A. pigra*) (Hidalgo-Mihart *et al.*, 2016), siendo además susceptibles a la presencia de parásitos debido a las condiciones ambientales en las zonas tropicales que benefician su ciclo de vida, sobrevivencia y riqueza de especies (Muñoz-García *et al.*, 2019).

Por anterior, es fundamental entender las consecuencias del intercambio de parásitos gastrointestinales entre poblaciones rurales y primates silvestres que cohabitan en el mismo ecosistema natural, para evaluar el impacto tanto en la salud humana como animal. El objetivo del presente estudio fue determinar la relación del intercambio de parásitos gastrointestinales en comunidades rurales con poblaciones de primates silvestres (*Ateles geoffroyi* y *Alouatta palliata*) en el estado de Veracruz.

## TEORÍA

Los parásitos son organismos que viven y extraen nutrientes de otros organismos (huésped), causando enfermedades y cambios en su comportamiento (Nunn y Altizer, 2006). Cuando ambos organismos interactúan, el parásito logra ampliar su capacidad de supervivencia utilizando a otras especies que cubran sus necesidades básicas y vitales, lo que se conoce como parasitismo (Becerril-Flores, 2014). Los parásitos gastrointestinales tienen una distribución mundial y pueden habitar en casi cualquier organismo vivo (Campillo *et al.*, 1999).

En el caso del ser humano, las poblaciones periurbanas y rurales son susceptibles a enfermedades por la presencia de parásitos (Rodrigo, 1999). Entre los factores asociados a éstos patógenos se encuentran las deficiencias del saneamiento ambiental, consumo de agua no tratada, ausencia de letrinas, pozo séptico, red de saneamiento, falta de asistencia médicas y la interacción constante con la fauna doméstica. De igual manera, los factores ambientales: temperatura ambiente, humedad relativa, precipitación y suelos contaminados, favorecen la sobrevivencia del ciclo de vida de los parásitos (Rodríguez y Vega, 2017; Ramírez-García y Camacho-Bercherlt, 2019).

En algunos casos, los parásitos de los animales silvestres pueden ser patógenos con potencial zoonótico, esto representa un problema epidemiológico tanto para la salud pública como para la conservación de la fauna (Marcos, 2013). De manera particular, la presencia de parásitos gastrointestinales en los primates se ha relacionado con el comportamiento social, densidad poblacional, factores ambientales, edad entre otros, pero principalmente con la fragmentación del hábitat y cercanía con el ser humano (Scott *et al.*, 1998; Stoner, 2005; Altkizer *et al.*, 2006; Martínez-Mota *et al.*, 2015).

Los disturbios antropogénicos obligan a los primates a utilizar áreas compartidas con el hombre, en consecuencia, los primates suelen descender al suelo, lo que aumenta la probabilidad de contacto con los seres humanos y animales domésticos, y por ende a una mayor probabilidad de contagio por parásitos (Valdespino *et al.*, 2010). De acuerdo con Solórzano-García y Pérez Ponce de León (2018), los helmintos son el grupo de taxones más estudiados en los primates mexicanos, sin embargo, entre los protozoarios la información es escasa y se relaciona principalmente con especies de *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* y *Leishmania mexicana*, por lo que es necesario conocer más acerca de la relación entre protozoarios con potencial zoonótico y la fauna silvestre como los primates (Muñoz-García *et al.*, 2019).

## PARTE EXPERIMENTAL

El estudio se realizó en dos comunidades rurales del estado de Veracruz: Mirador Pilapa (18°,37' N, 94°, 78' O, 111 msnm), Magallanes (18°, 37' N, 94°, 78' N, 308 msnm) y en selvas húmedas cercanas

a estos ejidos donde se distribuyen las poblaciones silvestres del mono araña (*Ateles geoffroyi*) y el mono aullador (*Alouatta palliata*). El clima es cálido húmedo, con vegetación de selva alta perennifolia y costera, los ejidos tienen un gran rezago social y alta pobreza, además, no gozan de los servicios básicos de saneamiento ni agua potable (Gaceta Oficial, 2014). El sector se dedica mayoritariamente a actividades primarias como la agricultura y ganadería, por lo que comparte el ecosistema natural con la fauna silvestre (Plan Municipal de Desarrollo, 2011).

El estudio se sometió a la evaluación del comité de bioética en investigación del Instituto de Ciencias de la Salud (ICS) de la Universidad Veracruzana para poder coleccionar las muestras fecales, de los participantes de cada comunidad éste fue aprobado con el número de registro 19CI30087041. Teniendo un total de 35 participantes de las dos comunidades rurales, se les explicó la importancia de su participación en el estudio con los beneficios y riesgos que estos puedan tener, quienes decidieron participar firmaron un consentimiento informado.

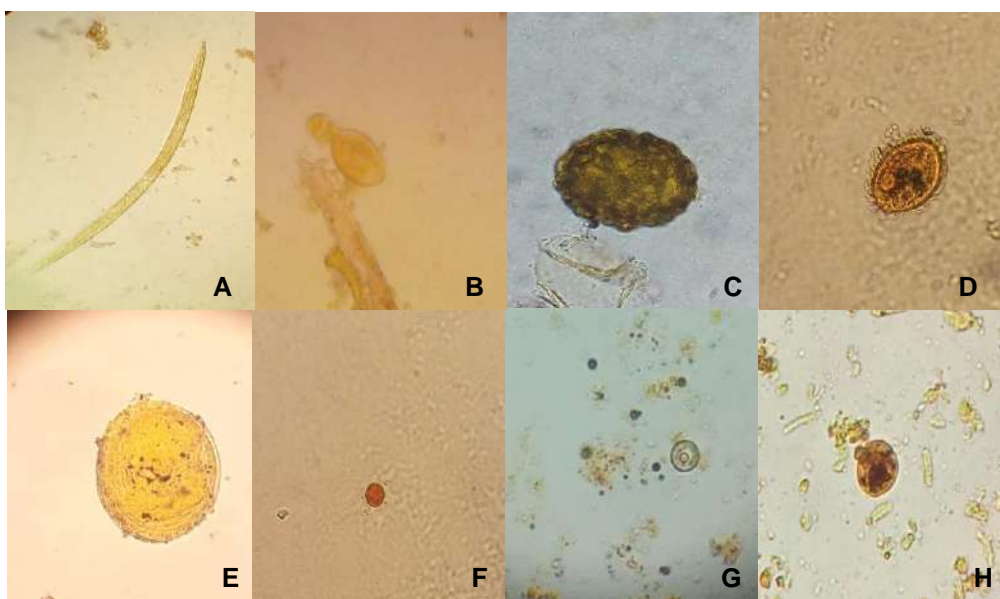
Se les proporcionó un frasco (CoproTrainer® de 300 mL) y se les solicitó muestras fecales durante 3 días consecutivos. Posteriormente, a cada muestra se le agregó formalina al 10 % y se rotularon con el número del participante, localidad, fecha y se sellaron con papel parafilm (Pinilla-Pérez, 2018). Mientras que las muestras de los primates, se observó hasta que defecaron e inmediatamente se coleccionaron las muestras fecales, se recogió la parte superior de éstas, con la finalidad de evitar contaminación por el suelo. Posteriormente, se almacenaron en tubos falcon con formalina al 10%, los tubos se rotularon y se sellaron con papel Parafilm para evitar la contaminación. Las muestras se transportaron en una hielera a temperatura ambiente hasta el posterior análisis en el Laboratorio LADISER Inmunología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas en Orizaba. La colecta de muestras biológicas se realizó durante 5 días al mes por 11 meses de 2021 a 2022.

Siguiendo la técnica de Beltrán *et al.* (2009) mediante el método coproparasitoscópico y de sedimentación espontánea Pajuel-Camacho *et al.* (2006), se buscó la presencia de quistes y trofozoítos de protozoarios o huevos y larvas de helmintos, para finalmente observar con un microscopio óptico con los objetivos 10 y 40 X. Para la identificación de las especies de los parásitos, se consideraron las características morfológicas, comparando con las imágenes de un Atlas de parasitología humana de Ash y Orihel, 2010 y Atlas de parasitología veterinaria de Bowman, 2022.

Se registraron las coordenadas de latitud y altitud donde se coleccionaron las muestras fecales de los primates y la de los participantes de las comunidades rurales con ayuda de un GPS (Garmin gpsmap® 60csx) para realizar mapas geográficos con el programa Google Earth Pro y Qgis versión 3.10. La prevalencia de parásitos en cada especie de primates y de los participantes se obtuvo dividiendo la proporción de la población con la enfermedad sobre el total de la población, Fajardo-Gutiérrez, 2017). Los datos fueron analizados mediante la prueba x-cuadrada para comparar la prevalencia de parásitos gastrointestinales en la población humana y de primates. Todas las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el paquete estadístico IBM® Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versión 25 y Epi info 7™.

## RESULTADOS

De los 35 participantes, se obtuvieron un total de 96 muestras fecales, de las cuales 79 muestras provenían de voluntarios del ejido de Magallanes y 17 del ejido de Mirador Pilapa. Se obtuvo una prevalencia general del 94.28%, de la cual la prevalencia obtenida en las muestras de los participantes de la localidad de Magallanes fue de 92.59% y 100% en Mirador Pilapa. Los parásitos gastrointestinales observados de mayor prevalencia fueron *Entamoeba histolytica* (71.88%) seguido de *Entamoeba coli* (41.67%) y *Balantidium coli* (5.21%, Tabla 1, Figura 1).



**Tabla 1. Prevalencia de parasitosis gastrointestinales en los participantes del estudio.**

Parasitosis gastrointestinales	Positivos	Prevalencia (%)
<b>General del total de participantes</b>	33/35	94.28%
<b>Por localidad</b>		
Magallanes	25/27	92.59%
Mirador Pilapa	8/8	100%
<b>Por taxón de parásito observado en las muestras fecales por triplicado</b>		
<i>Entamoeba histolytica</i>	69/96	71.88%
<i>Entamoeba coli</i>	40/96	41.67%
<i>Balantidium coli</i>	5/96	5.21%
<i>Ascaris</i> spp	4/96	4.17%
<i>Strongyloides</i> sp	1/96	1.04%
<i>Hymenolepis</i> sp	1/96	1.04%
<i>Chonorchis</i> sp	1/96	1.04%
<i>Blastocystis</i> sp	1/96	1.04%
Huevo de helminto no identificado	12/96	12.50%

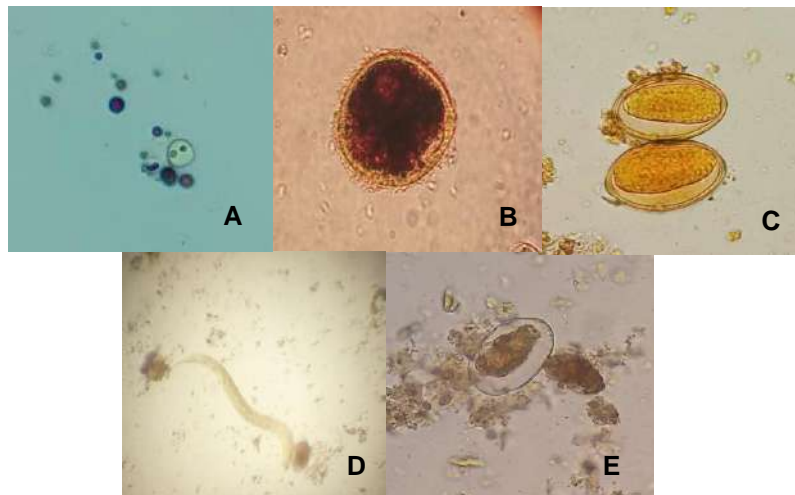
Prevalencia de parásitos gastrointestinales observados en las muestras fecales de los participantes en la localidad de Magallanes y Mirador Pilapa, Veracruz.

No se observó una diferencia significativa al comparar las prevalencias obtenidas en las muestras fecales de los primates en las dos comunidades rurales ( $X^2= 0.5859, p= 1$ ).

**Figura 1. Parásitos observados en participantes del estudio.**

A) Larva de *Strongyloides* sp; B) Huevo de *Chonorchis* sp; C) huevo de *Ascaris* sp; D) Quiste de *Balantidium* sp; E) Huevo de *Hymenolepis*; F) *Entamoeba coli*; G) *Entamoeba histolytica*; H) *Blastocystis* sp. Los parásitos fueron teñidos con lugol y observados a una amplificación de 40 X.





De las muestras de primates se colectaron un total de 131 muestras de heces, 63 muestras provienen de primates que se distribuyen cercanos al ejido de Magallanes y 68 muestras a Mirador Pilapa. Un total de 107 muestras corresponden a el mono aullador (*Alouatta palliata*) y 24 muestras al mono araña (*Ateles geoffroyi*). De un total de 131 muestras fecales en 54 se observó la presencia de algún parásito gastrointestinal, se obtuvo una prevalencia general del 41.22% (52/131) de las muestras fecales, en la comunidad rural de Magallanes la prevalencia fue del 38.08% y en Mirador Pilapa del 44.11%. Los parásitos gastrointestinales observados de mayor prevalencia fueron *Entamoeba histolytica* (29.77%), *Blastocystis hominis* (21.37%) y *Balantidium coli* (12.98%, Tabla 2, Figura 2A y 2B).

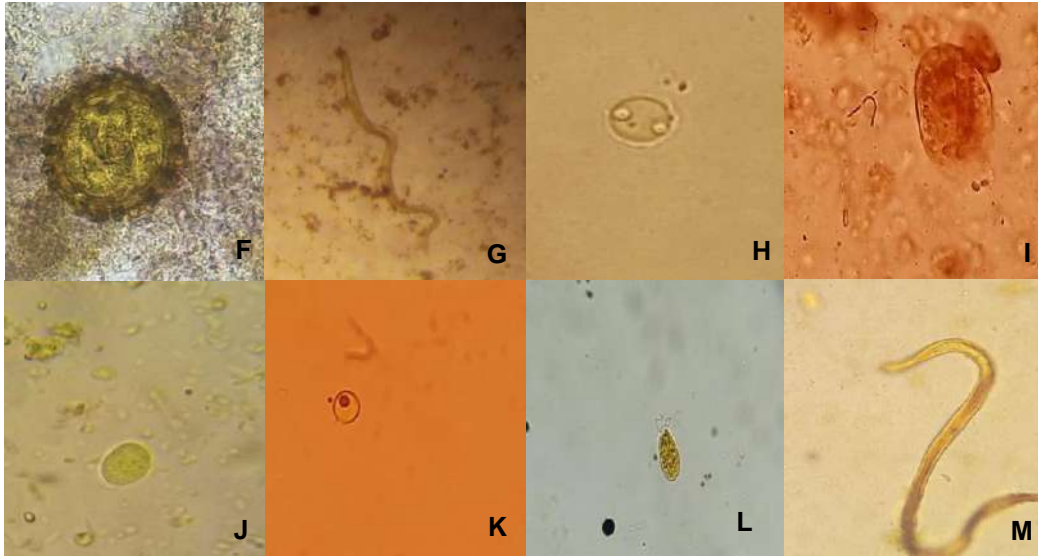
**Tabla 2. Prevalencia de parásitos en muestras de heces en *A. palliata* y *A. geoffroyi*.**

Parasitosis gastrointestinal	Positivos	Prevalencia (%)
<b>General del total de muestras fecales</b>	54/131	41.22%
<b>Por localidad</b>		
Magallanes	24/63	38.09%
Mirador Pilapa	30/68	44.11%
<b>Por tipo de parásito</b>		
<i>E. histolytica</i>	39/131	29.77%
<i>Blastocystis hominis</i>	28/131	21.37%
<i>Balantidium coli</i>	17/131	12.98%
<i>Enterobius</i> sp	13/131	9.92%
<i>Entamoeba</i> sp	9/131	6.87%
<i>Strongyloides</i> sp	3/131	2.29%
<i>Ascaris</i> sp	2/131	1.53%
<i>Trichostrongylus</i> sp	1/131	0.76%
<i>Capillaria</i> sp	1/131	0.76%
<i>Endolimax</i> sp	1/131	1.53%
No identificado	2/131	

Prevalencia de parásitos gastrointestinales observada en las muestras fecales de los primates silvestres por sitio de estudio y taxón de parásito observado.

**Figura 2A. Parásitos observados en participantes del estudio.**

A) Quiste de *Entamoeba* sp; B) Quiste de *Balantidium coli*; C) Huevos de *Enterobius* sp; D) Larva de *Strongyloides* sp; E) Huevo de *Trichongylus* sp. Los parásitos fueron teñidos con lugol y observados a una ampliificación de 40 X



**Figura 2A. Parásitos observados en participantes del estudio.**

F) Huevo de *Ascaris* spp; G) Larva de *Capillaria* spp; H) Quiste de *Entamoeba* sp; I) Parásito no identificado; J) *Endolimax* sp; K) *Entamoeba* sp; L) *Giardia* sp; M) Larva no identificada. Los parásitos fueron teñidos con lugol y observados a una ampliificación de 40 X

Además, se registraron las coordenadas donde se colectaron las muestras de heces de los primates silvestres y la cercanía con las comunidades rurales: Magallanes (Figura 3) y Mirador Pilapa (Figura 4).

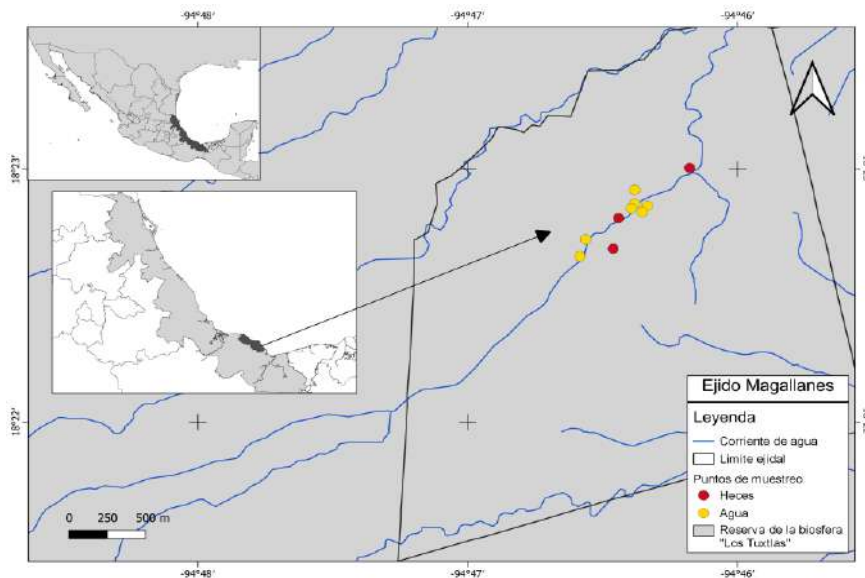


Figura 3. Ubicación geográfica de la comunidad rural Magallanes con relación a la colecta de heces de los primates silvestres y los ejidos.

Distancia entre la localidad y las muestras fecales =0.58K

Elaborado en Qgis 3.10 por Ricardo Rios Rios, 2021.

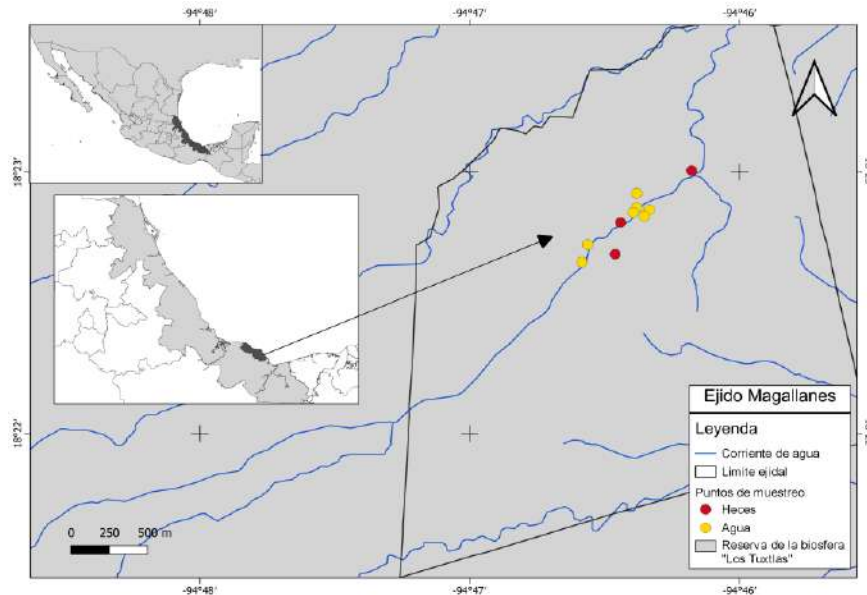


Figura 4. Ubicación geográfica de la comunidad rural Magallanes con relación a la colecta de heces de los primates silvestres y los ejidos.

Distancia entre la localidad y las muestras fecales =0.58K

Elaborado en Qgis 3.10 por Ricardo Rios Rios, 2021

## CONCLUSIONES

El parásito de mayor prevalencia fue *E. histolytica* en los participantes como en las poblaciones de primates silvestres. El humano es el reservorio de este parásito. Se sugiere que el río es el vehículo para la transmisión del patógeno, puesto que ambas poblaciones comparten ese ecosistema, y la principal vía de transmisión es a través de la ingestión de alimentos y agua contaminados. Mientras que la transmisión de *B. coli* es por la cercanía con la fauna doméstica, ya que el cerdo es el principal reservorio del parásito, también se ha reportado que los chimpancés y algunos roedores pueden fungir como reservorio, diseminando quistes en el ambiente.

Por lo anterior, es necesario realizar estudios moleculares con mayor sensibilidad para confirmar la especie del parásito y así comprender mejor la relación entre el huésped-parásito. Además, es necesario realizar estudios epidemiológicos para comprender mejor la relación entre enfermedades infecciosas parasitarias del hombre y la fauna silvestre para evitar enfermedades de origen zoonóticas o antropozoonóticas que afecten la salud pública y conservación de la biodiversidad.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. A. F. “Medición epidemiología: prevalencia, incidencia, riesgo, medidas de impacto”, *Alergia México.*, Vol. 64.1, 2017, pp. 109-120.
2. Becerril. “Historia de la parasitología”, in *Parasitología Medica* (McGRAW-HILL/Interamericana, México, México, 2014). Chapter 1, pp.1-7.
3. Benavides y D. Soler. “Interfaz animales domésticos, silvestres y humanos”, in *Conexiones de la salud global: Ecosistemas, animales y humanos* (Unisalle, Bogotá, Colombia, 2010). Chapter 1, pp.287-296.
4. Bowman. “Helmintos”, in *GEORGI parasitología para veterinarios* (Elsevier Health Sciences ,Brasil, 2022). Chapter 1, pp.135-170.
5. E, Marcos. “El Concepto Una salud Como Integrador de la Interfase Humano-Animal-Ambiental, Frente a las Enfermedades Emergentes, Reemergentes y Transfronterizas”, *Epidemiología y Salud.*, Vol. 1, 13, 2013, pp. 16-20.
6. Gaceta Oficial. “Plan Municipal De Desarrollo Soteapan 2014-2017”. Disponible en: <http://segobver.gob.mx/juridico/pdf/plantomo9.pdf>. 2014, pp.30-31.
7. K. Rodrigo. “Consideraciones sobre el Programa de Control de La Enfermedad Diarreica”, *Fac. Cienc. Salud. Univ Cauca.*, Vol 1,1, 1999, pp. 34-39.
8. K. Stoner; A. González y S. Maldonado. “Infecciones de parásitos intestinales de primates: implicaciones para la conservación”, *Universidad y Ciencia.*, Vol II, 2005, pp.61-72.
9. L.Beltrán; P. Beldomenico y J. González, “Estudio coproparasitológico de mamíferos silvestres en cautiverio con destino a relocalación en Santa Cruz, Bolivia”, *Vetzootec.*, Vol 3,1, 2009, pp. 51-60.
10. M. Campillo; F.Vázquez; A. Fernández; M. Acedo; S. Rodríguez ;I. López; P. Baños; H. Romero y M. Varela. “El parasitismo y otras asociaciones biológicas. Parásitos hospedadores”, In *Parasitología Veterinaria*. (McGraw-Hill-Interamericana Madrid, España, 1999). Chapter 2, pp. 22-24.
11. M. Hidalgo; F. Contreras; A. de la Cruz; D. Jiménez; R. Juárez; R. Oporto y R. Ávila. “Mammals of Tabasco, Mexico”, In *Riqueza y Conservación de los Mamíferos mexicanos con una visión estatal* (Instituto de Biología-UNAM, Asociación Mexicana de Mastozoología and Universidad de Guanajuato, México, México, 2016). pp.441-472.
12. M. Marcelino; M Sánchez y A. “Camacho.Bases teórico-prácticas de un modelo de desarrollo sustentable para comunidades rurales con actividades agropecuarias”, *Agricultura, sociedad y desarrollo.*, Vol. 14, 1, 2017, pp. 47-59.
13. M. Pinilla. “Guía de laboratorio correlación clínica”, Corporación Universitaria Rafael Núñez. Disponible en <http://site.curn.edu.co:8080/jspui/bitstream/123456789/27/1/Guia%20de%20laboratorio%20de%20Correlación%20Clinica.pdf>, pp. 10-13.
14. M. Scott. “The impact of the infection and disease on animal populations: implications for conservation biology”, *Conservation Biology.*, Vol, 2,1 1998, pp. 40-56.
15. Muñoz; E. Berriatua y C. Martínez. “What do we know about parasites of wildlife in high biodiversity areas with anthropogenic disturbance? The special case of Mexico”, *Animal health research reviews.*, Vol. 19, 2, 2018, pp. 155-161.
16. Nunn y S. Altizer. “Primates sociocology and disease risk: predictions and rationale”, In *Infectious Diseases in Primates*. (Oxford University Press, New York, NY. 2006) pp. 74-75.
17. Pajuelo; D. Luján; B. Paredes y R. Tello R. “Aplicación de la técnica de sedimentación espontánea en tubo en el diagnóstico de parásitos intestinales”, *Revista Biomédica.*, Vol. 17, 2, 2006, pp. 96-101.
18. Plan Municipal De Desarrollo. “Circunstancia Municipal”. Disponible en: <http://tatahuicapandējuarez.emunicipios.gob.mx/wp-content/uploads/sites/196/2015/09/02-Capitulo-2.pdf>
19. R. Ash y T. “Protozoos”, in *Atlas de parasitología humana (Médica, Buenos Aires, Argentina, 2013)*. Chapter 2, 34.50.

20. R. Martínez, M. Kowalewski y T. Gillespie. "Ecological Determinants of Parasitism in Howler Monkeys", in (Springer, New York, NY, 2015), Chapter 3, pp. 259-287.
21. Ramírez y M. Camacho. "Diagnóstico participativo para determinar problemas ambientales en comunidades rurales", *Telos.*, Vol. 21, 1, 2019, pp. 86-113.
22. S. Alkitizer; C.L. Nunn; P.H. Thrall; J.L. Gittleman; J. Antonovics; A.A. Cunningham
23. Santos. "Parasitosis intestinales, patología de la pobreza", *Enfermedades Infecciosas y Microbiología.*, Vol 42,1,2022, pp. 5-6.
24. Solórzano y G. de León. "Parasites of neotropical primates: a review", *International Journal of Primatology.*, Vol 39, 2018, pp.155-182.
25. Valdespino; G. Rico y S. Mandujano, S. "Gastrointestinal Parasites of Howler Monkeys (*Alouatta palliata*) Inhabiting the Fragmented Landscape of the Santa Marta Mountain Range, Veracruz, Mexico", *American Journal of Primatology.*, Vol. 72, 6, 2010, pp. 539-548.
26. y M. Poss. "Social organization and parasite risk in mammals: integrating theory and empirical studies", *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics.*, Vol. 34,1, 2006, pp.517-547.
27. Zahedi; A. Papparini; F. Jian; I. Robertson; y U. Ryan. "Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: critical insights into better drinking water management", *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife.*, Vol. 5,1 2016, pp. 88-109.



## COMPUESTOS ORGANOMETÁLICOS DE MANGANESO(I) CON BASES DE SCHIFF BASADAS EN SISTEMAS AROMÁTICOS: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

Adrián Beltrán Monribot,<sup>1</sup> Ulises Cerna Medel,<sup>1</sup> Armando Cortés-Lozada,<sup>1</sup> José Luis Gárate-Morales,<sup>1</sup> Noé Zúñiga-Villarreal,<sup>2</sup> María Obdulia Sánchez-Guadarrama,<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

<sup>2</sup> Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

e-mail: [obdulia.sanchez@correo.buap.mx](mailto:obdulia.sanchez@correo.buap.mx)

### RESUMEN

En esta investigación presentamos la síntesis y caracterización de ligantes tipo bases de Schiff basadas en sistemas aromáticos y sus compuestos organometálicos con Mn(I). Los ligantes se obtuvieron a través de una reacción de condensación entre etilendiamina y dos diferentes aldehídos: 4-dimetilaminobenzaldehído y 2-naftaldehído. Se exploró la reactividad de los ligantes sintetizados frente a  $[\text{MnBr}(\text{CO})_5]$  obteniéndose compuestos organometálicos de fórmula general  $[\text{MnBr}(\text{CO})_3\text{L}]$ , donde L = el correspondiente ligante bidentado tipo base de Schiff o su análogo reducido. Los estudios espectroscópicos sugieren la formación de complejos mononucleares de geometría octaédrica tanto en estado sólido como en disolución, una estereoquímica facial de los grupos carbonilo, así como la formación de un manganaciclo de cinco miembros.

### INTRODUCCIÓN

Las bases de Schiff son una clase de compuestos formados por condensación entre grupos amino y carbonilo. En los últimos años ha aumentado considerablemente el interés en la investigación de las bases de Schiff y sus complejos metálicos principalmente en química bioinorgánica y medicinal, debido a sus potenciales aplicaciones en estas áreas. Por ejemplo, Lumme *et al.* Llevaron a cabo un estudio sobre bases de Schiff y sus complejos metálicos, encontrando que varios de ellos muestran bioactividades antibacterianas o antitumorales.[1] Algunos complejos de cobre de la base de Schiff formada entre benzaldehído y alanina han mostrado capacidad en suprimir los radicales libres de anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ),[2] que pueden causar inflamación o cáncer en humanos. Algunos complejos de vanadio con bases de Schiff se han usado como catalizadores eficientes en la oxidación de tioéteres a sulfóxidos.[3] Las bases de Schiff también pueden usarse como reactivos fluorescentes para la determinación de iones metálicos traza, esto debido a que los iones metálicos pueden mejorar o apagar la fluorescencia del ligante base de Schiff.[4].

Por otro lado, los compuestos organometálicos han atraído mucho la atención en los últimos años debido a las aplicaciones biológicas que han mostrado, particularmente los llamados compuestos carbonílicos o carbonilos metálicos ya que éstos ofrecen algunas bondades con respecto a otro tipo de compuestos. En estos compuestos el metal de transición está unido directamente al ligante CO. Su fórmula general es  $[\text{M}(\text{CO})_n]$  para complejos homolépticos (aquellos que contienen solamente ligantes CO), aunque también existen complejos que poseen, además de grupos CO, una mezcla de ligantes.[5] En su mayoría, son compuestos no-polares y eléctricamente neutros que expresan propiedades físicas semejantes a los compuestos orgánicos.

Dentro de los diversos compuestos carbonílicos con metales de transición, hoy en día existe un especial interés en la química del grupo 7 y en especial en los compuestos de fórmula general  $[\text{M}(\text{CO})_3(\text{L})_n\text{X}]$  (M = Mn, Tc y Re).[6] Estos compuestos contienen el fragmento tricarbonilado  $\{\text{M}(\text{CO})_3\}$  y el centro metálico se encuentra en estado de oxidación 1+; los tres ligantes carbonilos se encuentran dispuestos en un arreglo facial sobre una de las caras del octaedro por lo que más puntualmente se indica como fac- $\{\text{M}(\text{CO})_3\}^{1+}$ . Esta disposición de los grupos CO le confieren al fragmento una estabilidad química importante contra la oxidación del centro metálico, además de hacerlo compacto y permitir la modulación de la esfera de coordinación restante con la modificación de X y de L, donde L puede ser una amplia variedad de ligantes que contengan átomos con propiedades electrónicas y/o estéricas diferentes,[7] mientras que X puede ser un halógeno.



## PARTE EXPERIMENTAL

Todas las reacciones y manipulaciones para la obtención de los compuestos organometálicos se llevaron a cabo bajo atmósfera inerte de nitrógeno y utilizando las técnicas convencionales de Schlenk; los disolventes fueron secados y desoxigenados antes de usarlos. Para la obtención de los ligantes no se requirió atmósfera inerte, ni tampoco desoxigenación de disolventes.

### Obtención de ligantes tipo base de Schiff *bdhen*(L1) y *naftalen*(L2).

Se colocó en un matraz bola de 100 mL con salida lateral, 5 mmol del aldehído correspondiente en una mezcla cloroformo/metanol (15:35 mL, v/v). Posteriormente, a esta disolución se le adicionaron lentamente 2.5 mmol de etilendiamina con una agitación constante. Esta mezcla de reacción se llevó a reflujo y se mantuvo así durante 4 h, observándose la formación de un precipitado. Una vez transcurrido este tiempo, el calentamiento se detuvo y la mezcla de reacción se dejó en agitación por 12 h. El precipitado se filtró al vacío y se lavó con cloroformo y metanol.

### Obtención de ligantes reducidos *bdhan*(L3) y *naftalen*(L4).

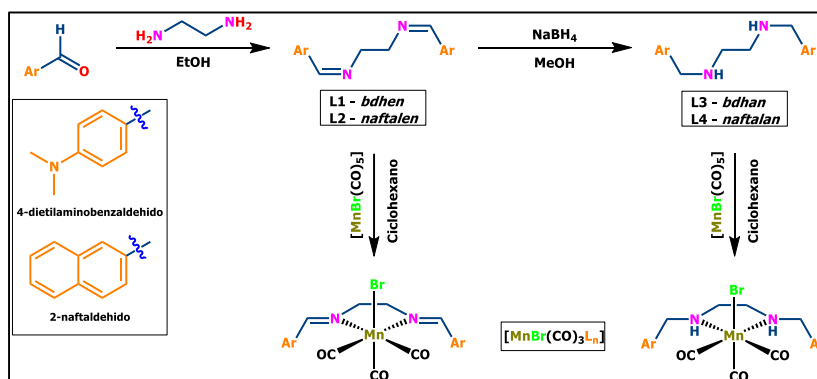
En un matraz bola de 100 mL, se colocó 1 mmol de la base de Schiff correspondiente, en una mezcla de diclorometano/metanol (10:40 mL, v/v) y se adicionaron lentamente 4 mmol de NaBH<sub>4</sub> a temperatura ambiente y agitación constante. Se observó que al cabo de 4 h, la disolución se tornó a un color más pálido que el inicial. La disolución se mantuvo en agitación durante 8 h más. La eliminación del disolvente se realizó en rotavapor y posteriormente se eliminaron las sales generadas adicionando 50 mL de H<sub>2</sub>O al matraz, manteniéndose en agitación durante 2 h. Pasado ese tiempo, el producto se filtró al vacío y se lavó con más agua destilada, obteniendo un sólido.

### Obtención de compuestos organometálicos [MnBr(CO)<sub>3</sub>L].

La síntesis de los complejos de fórmula general fac-[MnBr(CO)<sub>3</sub>L] se llevó a cabo a partir de una mezcla equimolar entre [MnBr(CO)<sub>5</sub>] y los correspondientes ligantes en un matraz bola de 50 ml con salida lateral que contenían 0.1 mmol de ligante y 0.1 mmol de precursor organometálico. La mezcla de reacción se llevó a reflujo con atmósfera de nitrógeno y agitación constante durante 60 minutos en todos los casos. El tiempo de reacción fue definido al monitorear la reacción por cromatografía de capa fina. Posteriormente las reacciones se dejaron enfriar a temperatura ambiente observándose la precipitación de un sólido. El disolvente se transfirió a un matraz Schlenk con la ayuda de una cánula para obtener el sólido del matraz de reacción. Los sólidos se lavaron por triplicado con hexano frío.

## RESULTADOS

Se diseñaron, sintetizaron y caracterizaron espectroscópicamente una nueva serie de compuestos organometálicos a partir de bromopentacarbonilmanganeso(I), [MnBr(CO)<sub>5</sub>] con ligantes bidentados derivados del 4-dimetilaminobenzaldehído y 2-antracenaldehído como (Esquema 1).



Esquema 1. Síntesis de compuestos organometálicos de Mn(I) con ligantes bidentados.

Los compuestos obtenidos fueron caracterizados mediante las técnicas espectroscópicas de UV-vis, IR y RMN, así como por espectrometría de masas. Es importante el estudio de las evidencias

espectroscópicas de IR y RMN para los complejos organometálicos, ya que por medio de estas técnicas se puede comenzar a elucidar la posible geometría molecular de estos.

#### Espectroscopía de Infrarrojo.

Los compuestos organometálicos se caracterizaron por medio de espectroscopía IR y se observó que en los espectros de los complejos se puede apreciar que las bandas de los complejos con respecto a su precursor aparecen a menor número de onda debido al mayor efecto de retrocoordinación entre los grupos CO y el Mn. Por otro lado, se observan solo tres bandas intensas y una banda no-intensa en la región de 2200 a 1700  $\text{cm}^{-1}$ , pudiendo asignar este grupo de bandas a un complejo con tres grupos carbonilo terminales de isomería *fac*; en comparación con el precursor  $[\text{MnBr}(\text{CO})_5]$  el cual muestra cuatro bandas en la misma región pero ligeramente desplazadas a mayores números de onda (Figura 1). En la Tabla 1 se resumen las frecuencias a las que aparecen las bandas de los grupos carbonílicos de los complejos y su comparación con el precursor.

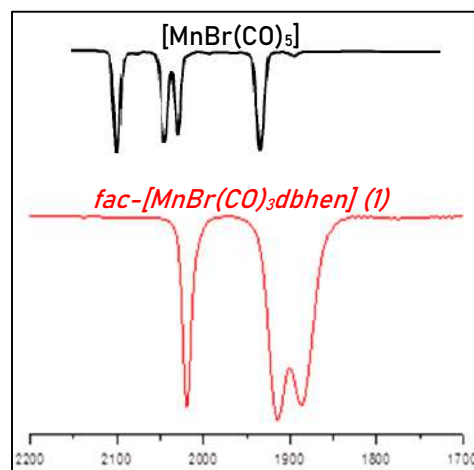


Figura 1. Espectros de IR y del compuesto  $[\text{MnBr}(\text{CO})_5]$  y del complejo *fac*- $[\text{MnBr}(\text{CO})_3\text{dbhen}]$  (1) (región de 2200 a 1700  $\text{cm}^{-1}$ )

Tabla 1. Datos espectroscópicos de IR de los complejos de Manganeso(I)

Complejo	$\nu_{\text{CO}}$ ( $\text{cm}^{-1}$ ) KBr			
$[\text{MnBr}(\text{CO})_5]$	2138(f)	2088(f)	2074(f)	1989(f)
<i>fac</i> - $[\text{MnBr}(\text{CO})_3\text{bdhen}]$ (1)	2012(f)	1908(f)	1873(f)	1863(h)
<i>fac</i> - $[\text{MnBr}(\text{CO})_3\text{nafalen}]$ (2)	2013(f)	1905(f)	1878(f)	1853(h)
<i>fac</i> - $[\text{MnBr}(\text{CO})_3\text{bdhan}]$ (3)	2019(f)	1910(f)	1891(f)	1863(h)
<i>fac</i> - $[\text{MnBr}(\text{CO})_3\text{naftalan}]$ (4)	2021(f)	1911(f)	1874(f)	1853(h)

#### Resonancia Magnética Nuclear.

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para la caracterización de los compuestos organometálicos mostraron un conjunto de señales interesantes para los hidrógenos alifáticos de los ligantes. Para el complejo  $[\text{MnBr}(\text{CO})_3\text{bdhen}]$ , se observó para los hidrógenos del fragmento etilénico (H-7) un sistema de acoplamiento AA'BB'; este sistema es generado por la inequivalencia magnética que genera la presencia y orientación del átomo de bromo en la estructura del compuesto (Figura 2). Esto también es un indicio de que la isomería de los grupos carbonilo en el complejo es de tipo *fac*. Por otro lado, para los compuestos derivados de ligante bdhan, se observa el mismo patrón de acoplamiento, es decir, la presencia de un sistema AA'BB' para el fragmento etilénico del ligante (H-7), pero además, pudieron observarse dos señales correspondientes a los hidrógenos H-11, mostrando nuevamente la inequivalencia de estos hidrógenos debidas a la orientación y efecto electrónico que tienen el halógeno en el sistema. En los complejos también se observa otro sistema AA'BB', pero en este caso para los hidrógenos aromáticos H-3 y H-4. Al caracterizar los complejos por RMN de  $^{13}\text{C}$  (DEPT-Q) observamos las señales esperadas para cada sistema (Figura 3). La asignación inequívoca de las señales se realizó con experimentos HSQC para cada uno de los complejos de esta investigación (Figura 4).

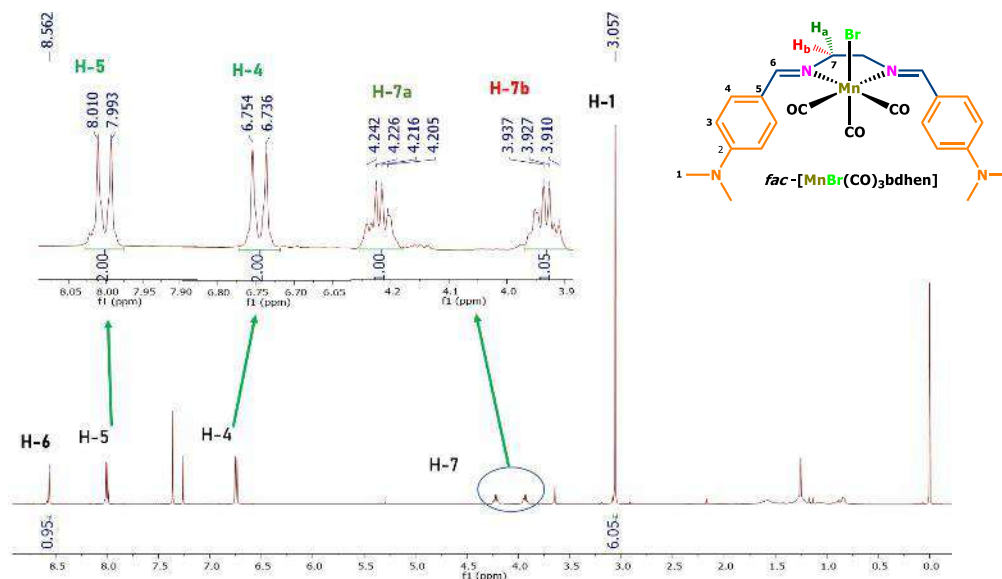


Figura 2. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del complejo  $\text{fac-}[\text{MnBr}(\text{CO})_3\text{bdhen}]$

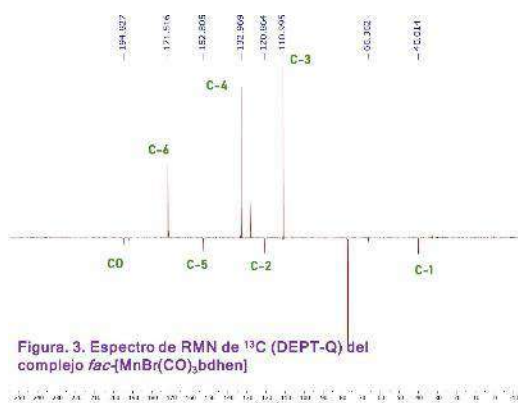


Figura 3. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DEPT-Q) del complejo  $\text{fac-}[\text{MnBr}(\text{CO})_3\text{bdhen}]$

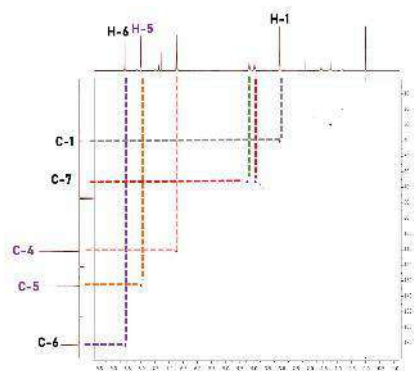


Figura 4. Espectro de RMN-HSQC del complejo  $\text{fac-}[\text{MnBr}(\text{CO})_3\text{bdhen}]$

## CONCLUSIONES

Se obtuvieron cuatro complejos organometálicos de manganeso(I) a partir de la reacción con ligantes de tipo base de Schiff y amina derivados del 4-dietilaminobenzaldehído y 2-antracenaldehído al coordinarlo con el bromopentacarbonilmanganeso(I). Los complejos se caracterizaron por espectrometría de masas, espectroscopía de IR y RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , UV-Vis. Los compuestos organometálicos, así como los ligantes libres (ligante imínico y reducido), son compuestos candidatos para el estudio de sus propiedades bactericidas y citotóxicas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. P. Lumme, E. Honnu, J. Juhani *J. Inorg. Chim. Acta*, **1984**, 92, 241.
2. X. Y. He, J. M. Wu, Z. H. Yan *Chinese J. Inorg. Chem.*, **1995**, 11, 302.
3. S. Colons, A. Manfredi, M. Spaoni *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1987**, 71, 895.
4. M. Ueda, T. Saito, K. Fujimori, T. Moriuchi, Y. Shibutani *Anal. Sci.*, **2004**, 20, 1649.
5. Elschenbroich, C. *Organometallics*. 3ª ed. Wiley-VCH: E.U.A., 2005, pp. 11-19, 275-284, 356-371.
6. Lazarova, N.; James, S.; Babich, J.; Zubieta, *J. Inorg. Chem. Comm.*, **2004**, 7, 1023.
7. Abram, U.; Alberto, R., *J. Braz. Chem. Soc.*, **2006**, 17, 1486.

## DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE FORMACIÓN DE [AUNP(N-ACETILCISTEÍNA)<sub>x</sub>] A ÁCIDO GLUTÁMICO Y ASPARAGINA POR MEDIO DE ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS

Celine Olivares Ramírez<sup>1</sup>, Lissette Abril Gómez Bautista<sup>2</sup>, Alejandro Núñez Vilchis<sup>2</sup>

Universidad Autónoma de Querétaro  
colivares25@alumnos.uaq.mx

### RESUMEN

Este proyecto tiene como objetivo determinar las constantes de formación de la síntesis de un complejo [AuNP(N-acetilcisteína)<sub>x</sub>] y su aplicación como biosensor para la detección de los aminoácidos (Glu y Asn). Para ello, se sintetizaron nanopartículas de oro y se funcionalizaron con el ligando N-acetilcisteína, siendo caracterizadas por medio de espectrofotometría UV-Vis. Para el cálculo de la concentración del complejo, se realizó el método de las tangentes a partir de una gráfica realizada con diferentes concentraciones de N-acetilcisteína. Posteriormente se varió el pH como parámetro para el cálculo de la constante de formación, siendo este neutro y básico. Finalmente se añadieron aminoácidos (Glu y Asn) para determinar las constantes de formación variando el pH. Como conclusión, cualitativa y cuantitativamente se sabe que el complejo se forma y es capaz de ofrecer valores de absorción de luz en la región visible.

### INTRODUCCIÓN

Las nanopartículas de oro (AuNPs) han sido particularmente estudiadas debido a sus propiedades peculiares que surgen principalmente de su gran relación superficie-volumen y el confinamiento espacial de los electrones y los campos eléctricos dentro y alrededor de estas partículas (Sau et al., 2010) demostrando ser herramientas muy poderosas y versátiles. En este contexto, se ha demostrado que tienen la capacidad de unirse a otras moléculas como péptidos, aminoácidos, carbohidratos, entre otros, formando una sola identidad (un complejo) (Compostella, Pitirollo, Silvestri y Polito, 2017) que puede fungir como biosensor ya que dispone de propiedades ópticas y químicas superficiales únicas (Busch, Karim, Weis, Sun, Zhao y Vasquez, 2019) lo que lo convierte en una prometedora herramienta para la biomedicina.

Por otra parte, se observó en estudios anteriores que las características químicas de las moléculas orgánicas de recubrimiento dictan la afinidad con los receptores biológicos. Por ejemplo, se encontró que recubrir el núcleo de oro con ácidos carboxílicos, grupos amino, y residuos de aminoácidos aumenta la afinidad con las proteínas (Ma, Hong y Ding, 2021, como se citó en Castillo, 2021).

No obstante, a pesar del trabajo experimental reciente, todavía hay un conocimiento cuantitativo limitado sobre sus interacciones, particularmente sobre sus mecanismos microscópicos de asociación (Lira, Ferreira, Torquato, Zhao, Oliva, , Hassan, Schuck y Sousa, 2018). Una caracterización cuantitativa de las interacciones NP-aminoácido normalmente incluye la determinación de la afinidad de unión (KD) que puede ser de ayuda para proporcionar información única sobre los mecanismos de interacción (Lira, Ferreira, Torquato, Zhao, Oliva, , Hassan, Schuck y Sousa, 2018).

En este sentido, se consideraron las propiedades tanto del ligando (N-acetilcisteína) como de aminoácidos no esenciales (Glu y Asn) para la determinación de la constante de formación ( $K_f$ ) a partir de la constante de disociación (KD) a diferentes condiciones de pH y concentración por medio de espectrofotometría UV/Vis con el fin de proporcionar mayor información acerca de las propiedades de las AuNPs, así como del complejo [AuNP(N-acetilcisteína)<sub>x</sub>] con respecto a aminoácidos no esenciales, siendo que ello puede contribuir a la investigación de la afinidad entre la unidad sintetizada en el laboratorio y receptores biológicos, además de poder elucidar las interacciones y versatilidad del [AuNP(N-acetilcisteína)<sub>x</sub>].

## TEORÍA

### Nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro (AuNPs) son una clase de material muy atractiva y versátil que tiene una dimensión de partícula inferior a 100 nm como mínimo, la cual tiene un peculiar número de propiedades ópticas que dependen fuertemente del tamaño y la morfología de la núcleo metálico, como: biosensores colorimétricos, fotoluminiscencia, capacidad de absorber y dispersar la luz, convertir la energía óptica en calor a través de la dinámica de relajación de electrones no radiactivos, entre otras (Saha, Agasti, Kim, Li, y Rotello, 2012).

En el método de Turkevich, el cambio de color indica la formación de NPs sintéticas y es debido a que no todos los electrones son libres y aquellos que se encuentran ligados a los átomos son los responsables de la tonalidad dorada de este elemento. Al reducir el tamaño de las partículas a escala nanométrica, la luz ya es capaz de penetrar el metal. La pequeña penetración de la luz en los metales es suficiente para que llegue a toda la nanopartícula y todos los electrones empiezan a moverse colectivamente por efecto de esta luz. Se desplazan juntos de un lado a otro de la nanopartícula de forma oscilatoria al ritmo que les marque la onda de la luz. Por esa razón, las nanopartículas de oro, cuanto más pequeñas presentarán un color más rojizo (Antón, 2016). Cuando las AuNPs se cubren con citrato adquieren una carga negativa, lo que puede aprovecharse para interacciones electrostáticas con algunas biomoléculas cargadas positivamente (Verma, 2014).

Las AuNPs se caracterizan por su naturaleza inerte, capaces de resistir a la oxidación del aire y corrosión, que por la cualidad de su núcleo metálico puede formar enlaces estables con compuestos que contengan azufre (es decir, tioles o disulfuros) y es posible funcionalizar AuNP de manera fácil y sólida con moléculas orgánicas. Las propiedades sobresalientes de las AuNP están relacionadas con su fácil estabilización y manejo a través de ligandos de tiolato (Compostella, Pitirollo, Silvestri y Polito, 2017). Además, no afectan la actividad funcional incluso después de la inmovilización, haciendo útil para la detección de analitos específicamente. Cada uno de estos atributos de las AuNP ha permitido a los investigadores desarrollar nuevas estrategias de detección con sensibilidad, estabilidad y selectividad mejoradas. En la última década de investigación, el advenimiento de AuNP como elemento sensorial nos proporcionó un amplio espectro de enfoques innovadores para la detección de iones metálicos, moléculas pequeñas, proteínas, ácidos nucleicos, células malignas, etc. de manera rápida y eficiente (Saha, Agasti, Kim, Li, y Rotello, 2012).

Las nanopartículas de oro (AuNPs) son usadas en el área médica y biológica, por ejemplo: en distribución de medicamentos, sensores, diagnóstico y como identificadores debido a su increíble biocompatibilidad y sus propiedades ópticas; estas últimas permitiendo que tengan una banda intensa de absorción en la región visible, provocando una alta sensibilidad y selectividad (Shao y Hall, 2017). Por su versatilidad, las AuNPs pueden unirse a diversos ligandos, entre ellos: cadenas de polietileno, péptidos, lípidos, DNA, RNA, tintes fluorescentes, entre otros (Compostella, Pitirollo, Silvestri y Polito, 2017). La formación de estos complejos ha sido de gran utilidad en diversas áreas, por lo que determinar sus parámetros tanto fisicoquímicos como analíticos es de gran importancia para el avance de estas tecnologías.

Los aminoácidos son componentes básicos de los péptidos y las proteínas, para comprender la interacción con las nanopartículas de oro, en un artículo se ayudan de estos para diseñar materiales de péptidos y proteínas que promuevan la producción de nanopartículas de oro con diámetros y formas deseadas. Además, se ha investigado la preferencia de unión respecto al diámetro de las nanopartículas (Qing, 2017). También se ha investigado la absorción de aminoácidos individuales en la superficie de oro y se argumentó que la naturaleza química de los aminoácidos determina su capacidad de unión.

Debido a que experimentos realizados a partir de nanotecnología han hecho un gran avance en el área de investigación (Wang, Nap, Lagzi, Kowalczyk, Han, Grzybowski y Szeifer, 2011), se decidió introducir un ligando que sea capaz de reaccionar con ambas estructuras (AuNP y AA) para hacer funcional el complejo [AuNP(N-acetilcisteína)<sub>x</sub>] unido a aminoácidos. Como ligando, se eligió a la N-acetilcisteína debido a que tiene en su estructura el aminoácido cisteína, y este aminoácido contiene



un grupo tiol en su cadena lateral, el acetil, que puede reaccionar con otro aminoácido, enlazando el azufre del ligando a la nanopartícula de oro y, posteriormente, añadiendo a su estructura el aminoácido elegido: Glu y Asn. Esto así por su similitud en estructuras y por los grupos carbonilos que se encuentran en su cadena lateral, promoviendo aún más su reactividad.

#### Espectroscopía UV/Vis

La obtención de las AuNPs se comprueba en primera instancia de manera visual con los cambios en la coloración del extracto al adicionar el agente precursor, y se corrobora mediante espectroscopia de UV Visible. En esta técnica una especie química absorbe radiación UV-Vis, y la energía adquirida por el sistema causa la transición de un electrón de un estado basal o fundamental (EF) a uno excitado (EE). En el caso de las nanopartículas se presenta el fenómeno de la banda del plasmón de superficie producido debido a que las nanopartículas metálicas cuentan con un número determinado de electrones libres confinados en un espacio muy pequeño y sus electrones superficiales son capaces de interactuar con la radiación electromagnética. En las nanopartículas metálicas manifiestan una resonancia plasmónica localizada ya que la nanopartícula es mucho menor que la longitud de la onda de luz incidente (García, Ramírez, Aguilar, Ortega, Flores y Arenas, 2017). Este fenómeno en nanopartículas de plata y oro produce una respuesta en el UV, por lo que reflejan longitudes de onda en el visible, por ejemplo, para las nanopartículas de oro, soluciones de distintos tamaños presentan colores que van desde el púrpura hasta el marrón. Este suceso es altamente dependiente de la forma, tamaño, cristalinidad y naturaleza de las nanopartículas, así como de las condiciones físicas y químicas de su medio circundante. Las nanoesferas de oro presentan una banda de absorbancia en el rango de 510-550 nm. El desplazamiento de dicho pico hacia longitudes de onda mayores se asocia a un incremento en el tamaño de las nanopartículas mientras que el ensanchamiento de la banda de absorción indica una mayor distribución de dichos tamaños y formas (García, Ramírez, Aguilar, Ortega, Flores y Arenas, 2017).

Se ha encontrado que el Au puede formar enlaces estables con compuestos que contienen azufre, como los tioles, por lo que las AuNPs tienen la capacidad de unirse a aminoácidos por medio de enlaces con un ligando específico para dicha molécula (Compostella, Pitirollo, Silvestri y Polito, 2017). Este ligando debe ser capaz de unirse tanto a la nanopartícula de Au como al aminoácido con una alta selectividad dada por la afinidad que pueda existir entre sus propiedades. Este criterio se puede evaluar mediante la determinación de las constantes de formación mediante métodos espectrofotométricos como UV-Vis, Infrarrojo, Raman, etc. Por lo tanto, podemos decir que cuando formemos el complejo, gracias a la afinidad del grupo tiol con las AuNPs, habrá una disminución en la longitud de onda máxima.

#### Constante de formación

La constante de formación (Kf) o también llamada constante de estabilidad de complejos, nos indica el equilibrio de la reacción de formación del complejo. Es el inverso de la constante de disociación, de esta manera también nos dice qué tan propenso es el complejo para unirse y pueda ser formado (Skoog, West, Holler, y Crouch, 2015).

Todo ello con el propósito de poder obtener las constantes de formación a través de las absorbancias obtenidas con ayuda del espectrofotómetro UV/Vis. De este modo se determinará la selectividad y funcionalidad del ligando con respecto a las AuNPs y los AA, además de que será útil para cuantificar la concentración del aminoácido (Asp, Glu y Asn) de manera rápida y efectiva.

Hay factores que modifican los valores de las constantes de formación, como lo es el pH, concentración, temperatura, etc. Para este proyecto, además de evaluar la unión del complejo a los aminoácidos por medio de la Kf, debemos determinarla también variando la concentración de las soluciones y el pH de la solución.

El pH influye directamente en el equilibrio de formación de un complejo, porque el catión metálico o el ligando son capaces de reaccionar con los protones o grupos hidroxilo del medio. Según Sangwan & Seth, en un estudio de la estabilidad de AuNP en sistemas buffer realizado en el presente año (2022), se obtuvo que las nanopartículas de oro son estables en un buffer de boratos (con un pH de



7.5 a 9.3). Además del uso de un buffer de fosfato para una respuesta colorimétrica frente al espectrofotómetro UV/Vis. De esta manera, es posible evaluar la efectividad de la unión del complejo con los aminoácidos frente a la respuesta influenciada por el pH del medio, y de la misma manera, algo similar con la concentración. Logrando así, un estudio que indique las condiciones óptimas para obtener una  $K_f$  más alta, y que, por lo tanto, haya una unión más fuerte entre la NAC con las AuNPs y los aminoácidos (Glu y Asn).

## PARTE EXPERIMENTAL

### V.1 Síntesis de nanopartículas de oro por el método de Turkevich.

1. Se preparó cada una de las soluciones a utilizar.
2. Se agregaron 90 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 200 mL y se mantuvo en agitación constante (450 rpm) hasta alcanzar los 320 °C.
3. Se agregaron 10 mL de solución stock de oro con agitación y calentamiento continuo por 5 minutos.
4. Se agregaron 18 mL de citrato de sodio y se disminuyó la temperatura a 200°C por 15 min.
5. Se dejó enfriar 1 hr a temperatura ambiente.
6. Se caracterizaron las AuNPs obtenidas por medio de espectrometría UV-Vis con un rango de 300-700 nm.
7. Se lavaron las AuNPs para eliminar residuos del citrato de sodio que no reaccionó. Para ello se centrifugó en un tubo falcon a 4 °C y 9000 rpm durante 12 minutos.
8. Se extrajo el precipitado y se desechó el sobrenadante.
9. Se repitió 2 veces más el lavado de AuNPs.
10. Se obtuvieron las AuNPs y se agregó agua destilada hasta alcanzar 50 mL en el tubo falcon. Se agitó para homogenizar.
11. Nuevamente se caracterizaron las AuNPs por medio de espectrometría UV-Vis con las mismas condiciones que la 1era vez.

### V.2 Unión de la AuNP con el ligando (N-acetilcisteína)

1. Se añadieron 12.5 mg de PEG en 50 mL de AuNP's (0.5 mg PEG x 1 mL AuNP's).
2. Se dejaron en agitación por 2 horas a 300 rpm en ausencia de luz.
3. Se hicieron lavados en la centrífuga a 9000 rpm por 10 minutos a 4°C.
4. Se recuperó el pellet que se formó en el fondo y se diluyó en agua destilada para medir la absorbancia.
5. Para preparar la NAC, se pesaron 0.75 g de NAC (fórmula: 1.5 gr x 100 mL) y se disolvieron en 50 mL de agua destilada.
6. Se mezcló con la solución de AuNP's-PEG en relación 1:1. Por lo tanto, se añadieron 10 mL de AuNPs-PEG y 10 mL de solución de NAC.
7. Se mantuvo en agitación toda la noche (5:00 pm-11:30 am) a 300 rpm.

### V.3 Obtención de las absorbancias del complejo $[AuNP(N\text{-acetilcisteína})_x]$ modificando las concentraciones de NAC.

1. Se prepararon 5 concentraciones diferentes de NAC (41, 68, 92, 123 y 150 mM) y se añadieron en tubos Eppendorf de 1.5 mL.
2. Se dejó interaccionar toda la noche con agitación continua y en ausencia de luz.
3. Se hicieron lavados en la centrífuga a 9000 rpm por 10 min.
4. Se recuperó el pellet de la parte inferior y se diluyó con agua destilada para poder medir la absorbancia.
5. Se graficaron las absorbancias para calcular la constante de formación.

### V.4 Obtención de las absorbancias del complejo $[AuNP(N\text{-acetilcisteína})_x]$ modificando el pH de cada solución utilizando amortiguadores.

1. Se preparó un buffer de boratos como medio básico.
2. Se preparó un buffer neutro de fosfatos a pH 7 en el laboratorio.
3. Se midieron las absorbancias para calcular las constantes de formación del complejo  $[AuNP(N\text{-acetilcisteína})_x]$ .

V.5 Obtención de las absorbancias de los dos aminoácidos (Glu y Asn) unidos al complejo [AuNP(N-acetilcisteína)<sub>x</sub>] modificando las concentraciones de cada aminoácido.

1. Se prepararon soluciones de 0.1 M de aminoácidos (Glu y Asn).
2. Se añadió al complejo [AuNP(N-acetilcisteína)<sub>x</sub>].
3. Se dejaron interaccionar por 2 horas con agitación continua.
4. Se lavaron por medio de centrifugaciones a 9000 rpm por 10 min.
5. Se colectó el pellet y se diluyó en agua destilada.
6. Se midió la absorbancia de cada disolución.

V.6 Cálculo de la constante de formación a diferentes condiciones.

1. A partir de los gráficos obtenidos en el espectrofotómetro UV-Vis de absorbancia, se graficó por medio la *absorbancia vs n<sub>x</sub>/n<sub>A</sub>*, donde a partir del punto de inflexión (n) y la absorbancia real de luz, se obtienen las concentraciones de la unión de los aminoácidos con [AuNP(N-acetilcisteína)<sub>x</sub>].

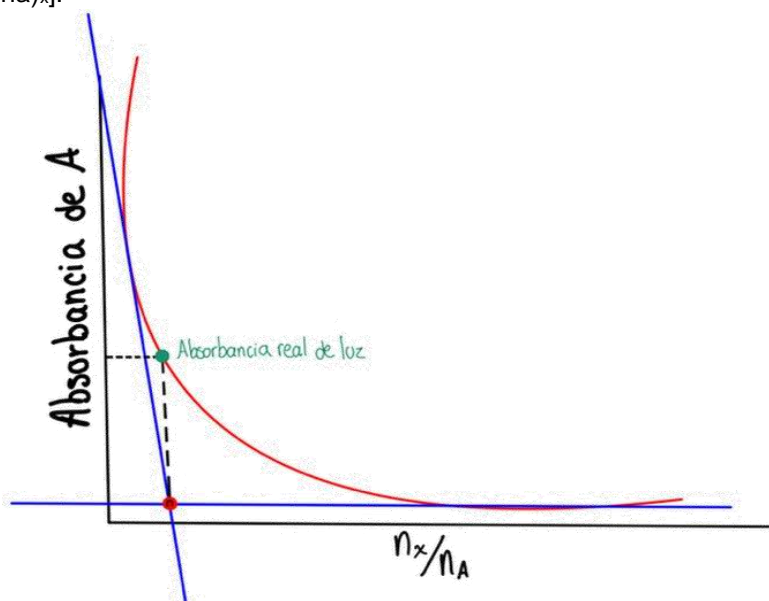
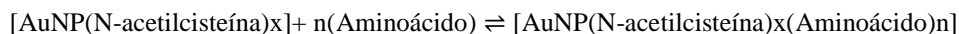
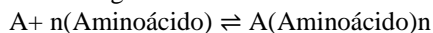


Figura 5.1. Gráfica representativa del punto de inflexión y absorbancia real de la luz para obtener las concentraciones de la unión de los aminoácidos con [AuNP(N-acetilcisteína)<sub>x</sub>].

Dada la reacción global:



Para simplificar el cálculo, se plantea de la siguiente forma:



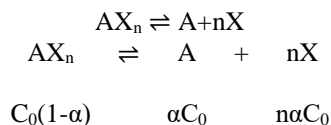
Donde:

A = [AuNP(N-acetilcisteína)<sub>x</sub>]

n= número de moles de X que se van a combinar con A

Gráfica Absorbancia vs n<sub>x</sub>/n<sub>A</sub>

En el punto de equilibrio:



$$A_{real} = k[A]eq = k(\alpha C_0)$$

$$KD = \frac{\alpha C_0 (n\alpha C_0)^n}{C_0(1-\alpha)} \quad K_f = \frac{1}{K_d}$$

Tomando en cuenta la variación del pH:

$$K'_D = K_D(\beta^H)^n \beta = 1 + 10^{(pka-pH)}$$

**RESULTADOS**

Espectros obtenidos en el espectrofotómetro UV-Vis GE de las nanopartículas de oro y del complejo [AuNP(N-acetilcisteína)<sub>x</sub>]



Figura 1. Gráfica del barrido obtenido de las nanopartículas de oro puras, con una λ máxima a 525 nm y absorbancia de 0.578 UA.

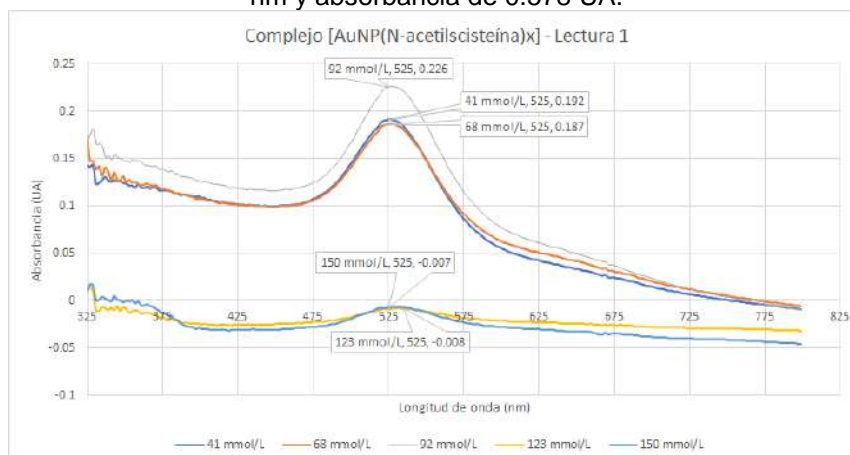


Figura 2. Gráfica de las absorbancias del complejo [AuNP(N-acetilcisteína)<sub>x</sub>] a diferentes concentraciones de NAC (primera lectura en el espectrofotómetro UV/Vis GE), se muestra la etiqueta del dato de la absorbancia a 525 nm.

Espectros obtenidos en el espectrofotómetro UV-Vis GE del [AuNP(N-acetilcisteína)<sub>x</sub>] unido a los aminoácidos y con variación del pH.

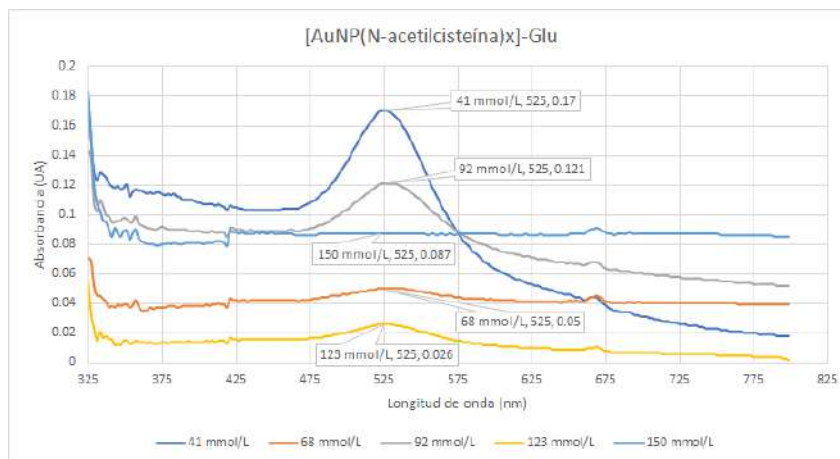


Figura 3. Gráfica de las absorbancias del complejo [AuNP(N-acetilcisteína)<sub>x</sub>] a diferentes concentraciones unido al ácido glutámico (lectura en el espectrofotómetro UV/Vis GE).

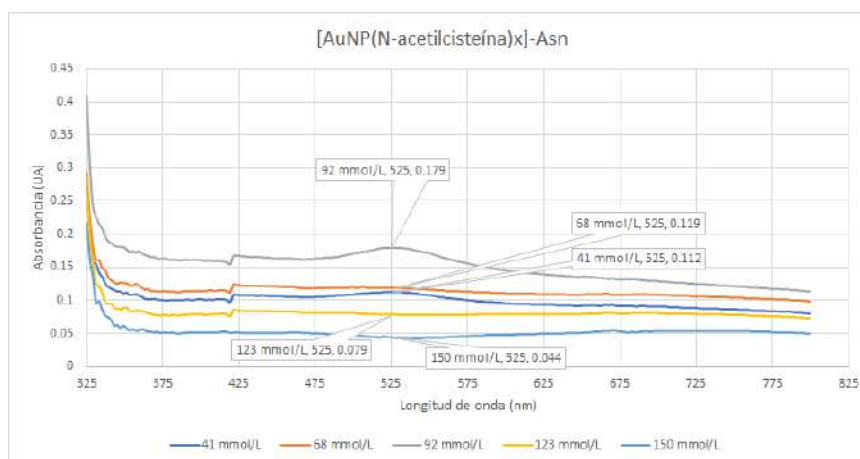


Figura 4. Gráfica de las absorbancias del complejo [AuNP(N-acetilcisteína)<sub>x</sub>] a diferentes concentraciones unido a la asparagina (lectura en el espectrofotómetro UV/Vis GE).

**Cálculos para las constantes de formación del complejo y con variación del pH.**

Posteriormente, se utilizaron las absorbancias (figura 6.1) en el punto donde absorben las AuNPs, a 525 nm, para poder calcular los puntos de unión de absorbancia y coordinación del complejo. Utilizando la ley de Beer, podemos calcular la concentración de las nanopartículas de oro sintetizadas.

Coefficiente de absorptividad molar de las nanopartículas de oro: 107 M/cm

Longitud de celda: 1 cm

Absorbancia registrada a 525 nm: 0.578

Entonces, la concentración se calcula:

$$\text{Concentración} = 0.578(107 \text{ M/cm})(1 \text{ cm})=0.0054 \text{ mol/L}$$

Por lo tanto, la concentración de las nanopartículas es de 5.40 mmol/L.

De las mediciones que se le hicieron al complejo de [AuNP(N-acetilcisteína)<sub>x</sub>], se realizó el promedio de las absorbancias, y para obtener el número de moles se dividió la concentración en cada punto de N-acetilcisteína sobre la concentración obtenida de nanopartículas de oro, y esto es lo que se va a graficar.

Cuadro 1. Resultados de la relación del número de moles de las diferentes concentraciones de N-acetilcisteína respecto a los moles de las nanopartículas de oro, con el promedio de las absorbancias obtenidas.

Número de moles xn/An	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Promedio Absorbancias
0	0.578	0.578	0.578	0.578
7.589	0.191	0.172	0.469	0.277
12.587	0.187	0.226	0.92	0.444
17.030	0.226	0.106	1.145	0.492
22.769	-0.007	0.002	-0.001	-0.002
27.767	-0.009	0.027	0	0.006

Cuadro 2. Resultados de la relación del número de moles de las diferentes concentraciones de N-acetilcisteína respecto a los moles de AuNPs, con las absorbancias obtenidas a las diferentes condiciones (variando pH).

Número de moles xn/An	Absorbancia	Absorbancia (pH 7)	Absorbancia (pH 9)
0.000	0.578	0.578	0.578
7.589	0.277	0.469	0.061
12.587	0.444	0.920	0.066
17.030	0.492	1.145	0.002
22.769	-0.002	-0.001	0.002
27.767	0.006	0.000	-0.017

Para obtener información de las gráficas obtenidas del complejo vs la relación moles de ligando entre mol de nanopartícula, considerando un comportamiento teórico ideal, son dos líneas rectas que se intersecan en el punto de equivalencia. Siendo así, la desviación de linealidad provocada por la disociación del complejo, incrementando en cada mezcla el valor de absorción de luz, trazamos dos tangentes (una utilizando el punto inicial y los cercanos a él y otra de forma horizontal en cero).

Para la primera mezcla, se ubican las tangentes en color naranja y con estas se trazó un segmento de línea vertical (color negro) hasta la curva obtenida (azul), para identificar la ordenada correspondiente (línea horizontal en negro).

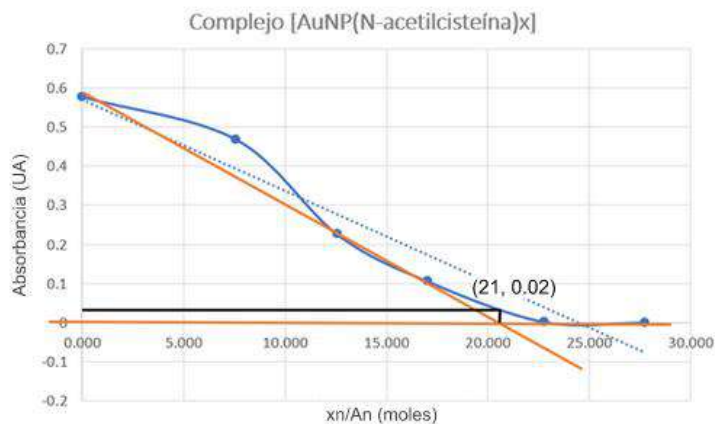


Figura 5. Gráfica de la relación de moles contra las absorbancias promedio del complejo [AuNP(N-acetilcisteína)<sub>x</sub>].

\*Las líneas negras representan los puntos de unión entre las líneas tangentes que se cruzaron (color naranja).

En este caso, la intersección de ambas líneas negras, nos llevan a valores aproximados de (21 y 0.02). En este caso, el valor 21 nos indicaría la coordinación de ligandos con la nanopartícula de oro y 0.02 la absorción de la mezcla en el punto de equivalencia.

Entonces, cómo se obtuvo anteriormente, la concentración del complejo es correspondiente a la concentración inicial de la nanopartícula de oro.

Por lo tanto,  $C_0 = 0.0054 \text{ mol/L}$

De ahí, podemos simbolizar como  $AL_x$  al complejo, siendo "A" la nanopartícula y "L" el ligando (N-acetilcisteína).

De la ecuación de absorción para la nanopartícula de oro:

$$A = K[\text{Nanopartícula}]$$

Por lo tanto, en el punto inicial donde no se ha adicionado ligando (absorbancia a 0 concentración):

$$0.578 = K(0.0054)$$

Y para el punto de equivalencia, considerando la disociación:

$$0.02 = K(0.0054\alpha)$$

Así que, es posible calcular  $\alpha$ , que sería:

$$0.020.578 = 0.0054\alpha \cdot 0.0054 = \alpha$$

$$\alpha = 0.0346$$

	AL <sub>x</sub>	<==>	A	+	xL
Eq)	0.0054(1- $\alpha$ )		0.0054 $\alpha$		21(0.0054 $\alpha$ )
Final)	0.005213		0.000187		0.003924

De esta forma, ahora podemos calcular la constante de formación:

$$K_f = \frac{1}{K_d} = \frac{1}{\frac{[A][L]^x}{[AL_x]}} = \frac{[AL_x]}{[A][L]^x} = \frac{0.0054(1-\alpha)}{0.0054\alpha (21 \times 0.0054\alpha)^{21}} = \frac{1-\alpha}{\alpha (0.1134\alpha)^{21}} = \frac{7.13 \times 10^{19}(1-\alpha)}{\alpha^{22}}$$

$$K_f = 9.51 \times 10^{51}$$

Se realizó, lo mismo de la gráfica anterior, pero variando los pH, para este caso, se realiza el cálculo de la siguiente manera:

En este caso, la intersección de ambas líneas negras, nos llevan a valores aproximados de (22 y 0.066).

$C_0 = 0.0054 \text{ mol/L}$

Por lo tanto, en el punto inicial donde no se ha adicionado ligando (absorbancia a 0 concentración):

$$0.578 = K(0.0054)$$

Y para el punto de equivalencia, considerando la disociación:

$$0.066 = K(0.0054\alpha)$$

Así que, es posible calcular  $\alpha$ , que sería:

$$0.0660.578 = 0.0054\alpha \cdot 0.0054 = \alpha$$

$$\alpha = 0.1141$$

	AL <sub>x</sub>	<==>	A	+	xL
Eq)	0.0054(1- $\alpha$ )		0.0054 $\alpha$		22(0.0054 $\alpha$ )
Final)	0.0047		0.0006		0.0135

De esta forma, ahora podemos calcular la constante de formación:



$$K_f = \frac{1}{K_d} = \frac{1}{\frac{[A][L]^x}{[AL_x]}} = \frac{[AL_x]}{[A][L]^x} = \frac{0.0054(1-\alpha)}{0.0054 \alpha (22x0.0054 \alpha)^{22}} = \frac{1-\alpha}{\alpha (0.1188 \alpha)^{22}}$$

$$= \frac{2.25x10^{20}(1-\alpha)}{\alpha^{23}} = 9.426 \times 10^{41}$$

Y ahora, considerando el pH de 7:

$$K_f = \frac{K_f}{\beta} = \frac{9.426 \times 10^{41}}{(1 + 10^{(9.52-7)} + 10^{((9.52+3.24)-(2 \times 7))})} = 3.190 \times 10^{-14}$$

Se realiza lo mismo, pero considerando el pH de 9, lo que nos da un resultado de:  $6.45 \times 10^{33}$

Cálculos para las constantes de formación del complejo unido a los aminoácidos y con variación del pH.

Posteriormente, al ya haber obtenido la concentración del complejo a las diferentes condiciones, se utilizó para determinar las constantes de formación del complejo unido a los aminoácidos (glutamato y asparagina). Se realizó el mismo procedimiento de hacer el gráfico de relación de moles del complejo y de la unión del complejo a los aminoácidos.

Cuadro 3. Resultados de la relación del número de moles de las diferentes concentraciones de NAC respecto a los moles de complejo con ácido glutámico, con las absorbancias obtenidas a las diferentes condiciones.

Número de moles xn/An	Absorbancia	Absorbancia (pH 7)	Absorbancia (pH 9)
0.000	0.578	0.578	0.578
7.589	0.170	0.159	0.136
12.587	0.050	0.126	0.164
17.030	0.121	0.092	0.126
22.769	0.026	0.067	0.097
27.767	0.087	0.064	0.059

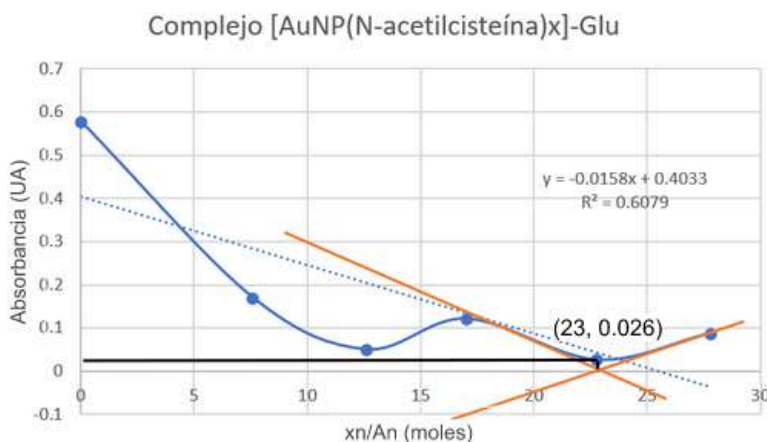


Figura 6. Gráfica de la relación de moles del complejo unido a ácido glutámico contra las absorbancias a condiciones normales.

De acuerdo con lo obtenido del complejo a condiciones normales, tenemos una concentración:  $C_0 = 0.0052 \text{ mol/L}$

Se obtuvieron los puntos de unión (absorbancia y de coordinación) de 0.026 y 23, respectivamente.

De ahí, simbolizamos como ALx-Glu al complejo unido al ácido glutámico.

De la ecuación de absorción para la nanopartícula de oro:

$$ALx = K[\text{Complejo}]$$

Por lo tanto, en el punto inicial donde no se ha adicionado nada (absorbancia a 0 concentración):

$$0.578 = K(0.0052)$$

Y para el punto de equivalencia, considerando la disociación:

$$0.026 = K(0.0052\alpha)$$

Así que, es posible calcular  $\alpha$ , que sería:

$$0.026 \cdot 0.578 = 0.0052\alpha \cdot 0.0052 = \alpha$$

$$\alpha = 0.0449$$

	ALx-Glu	<==>	ALx	+	Glu
Eq)	0.0052(1- $\alpha$ )		0.0052 $\alpha$		23(0.0052 $\alpha$ )
Final)	0.0049		0.0002		0.0053

De esta forma, ahora podemos calcular la constante de formación:

$$K_f = \frac{1}{K_d} = \frac{1}{\frac{[AL_x][Glu]^x}{[AL_x - Glu]}} = \frac{[AL_x - Glu]}{[AL_x][Glu]^x} = \frac{0.0052(1-\alpha)}{0.0052 \alpha (23 \times 0.0052 \alpha)^{23}} = \frac{1-\alpha}{\alpha (0.1196 \alpha)^{23}}$$

$$= \frac{1.62 \times 10^{21} (1-\alpha)}{\alpha^{24}} = 3.28 \times 10^{53}$$

Lo mismo, que, con el complejo a diferentes pH, se hace de la misma manera, con la misma ecuación, obteniendo para [AuNP(N-acetilcisteína)<sub>x</sub>]-Glu, para un pH de 7 se obtiene una K<sub>f</sub> de: 2x10<sup>-3</sup>, y para un pH de 9, una K<sub>f</sub> de: 7.77x10<sup>16</sup>

Cuadro 4. Resultados de la relación del número de moles de las diferentes concentraciones de N-acetilcisteína respecto a los moles de complejo con asparagina, con las absorbancias obtenidas a las diferentes condiciones.

Número de moles xn/An	Absorbancia	Absorbancia (pH 7)	Absorbancia (pH 9)
<b>0.000</b>	0.578	0.578	0.578
<b>7.589</b>	0.112	0.104	0.114
<b>12.587</b>	0.119	0.093	0.086
<b>17.030</b>	0.179	0.034	0.037
<b>22.769</b>	0.079	0.072	0.028
<b>27.767</b>	0.044	0.072	-0.021

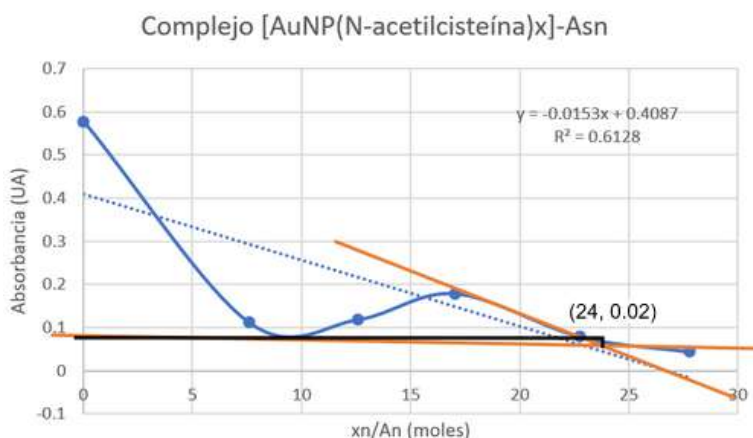


Figura 7. Gráfica de la relación de moles del complejo unido a asparagina contra las absorbancias a condiciones normales.

De acuerdo con lo obtenido del complejo a condiciones normales, tenemos una concentración:  $C_0 = 0.0052 \text{ mol/L}$

Se obtuvieron los puntos de unión (absorbancia y de coordinación) de 0.02 y 24, respectivamente.

De ahí, simbolizamos como ALx-Asn al complejo unido a asparagina.

De la ecuación de absorción para la nanopartícula de oro:

$$ALx = K[\text{Complejo}]$$

Por lo tanto, en el punto inicial donde no se ha adicionado nada (absorbancia a 0 concentración):

$$0.578 = K(0.0052)$$

Y para el punto de equivalencia, considerando la disociación:

$$0.02 = K(0.0052\alpha)$$

Así que, es posible calcular  $\alpha$ , que sería:

$$0.020.578=0.0052\alpha \cdot 0.0052=\alpha$$

$$\alpha = 0.0346$$

	ALx-Asn	<==>	ALx	+	Asn
Eq)	0.0052(1- $\alpha$ )		0.0052 $\alpha$		24(0.0052 $\alpha$ )
Final)	0.0050		0.0001		0.0043

De esta forma, ahora podemos calcular la constante de formación:

$$K_f = \frac{1}{K_d} = \frac{1}{\frac{[AL_x][Asn]^x}{[AL_x - Asn]}} = \frac{[AL_x - Asn]}{[AL_x][Asn]^x} = \frac{0.0052(1-\alpha)}{0.0052 \alpha (24 \times 0.0052 \alpha)^{24}} = \frac{1-\alpha}{\alpha (0.1248 \alpha)^{24}}$$

$$= \frac{4.90 \times 10^{21} (1-\alpha)}{\alpha^{25}} = 1.57 \times 10^{58}$$

Nuevamente, lo mismo, que, con el complejo a diferentes pH, se hace de la misma manera, con la misma ecuación, obteniendo para  $[AuNP(N\text{-acetilcisteína})_x]\text{-Asn}$ , para un pH de 7 se obtiene una  $K_f$  de:  $-3.73 \times 10^{-21}$ , y para un pH de 9, una  $K_f$  de:  $1.79 \times 10^{36}$ .

Cuadro 5. Constantes de formación obtenidas para el complejo y para el complejo unido a los aminoácidos.

Compuesto	Constantes de formación		
	Condiciones normales (pH 2.4)	pH 7	pH 9
$[AuNP(N\text{-acetilcisteína})_x]$	$9.51 \times 10^{51}$	$3.19 \times 10^{-14}$	$6.45 \times 10^{33}$
$[AuNP(N\text{-acetilcisteína})_x]\text{-Glu}$	$3.28 \times 10^{53}$	$2 \times 10^{-3}$	$7.77 \times 10^{16}$
$[AuNP(N\text{-acetilcisteína})_x]\text{-Asn}$	$1.57 \times 10^{58}$	$-3.73 \times 10^{-21}$	$1.79 \times 10^{36}$

Después de la síntesis de las nanopartículas por el método de Turkevich, se realizó un barrido para asegurar que tuvieran una  $\lambda$  máxima alrededor de 525 nm, para corroborar que realmente hay una unión (mostrando un cambio en el valor de la absorbancia). Al ser así, se siguió trabajando con los reactivos, de igual manera se funcionalizó una parte con polietilenglicol, que es una molécula que tiende a estabilizar todo tipo de nanopartículas porque se une en mayor proporción con los grupos tioles del ligando.

El grupo tiol de la N-acetilcisteína, de acuerdo con experimentos realizados, tiende a unirse de manera espontánea con las AuNPs porque el grupo tiol es reactivo. Por lo que el ligando usado tiene

una actividad apta para funcionar en conjunto como un biosensor porque al unirse el grupo tiol, provoca que la nanopartícula posea una carga superficial positiva, lo que nos ayuda a funcionalizar el complejo con moléculas de carga negativa (aminoácidos no esenciales con carga negativa: Glu y Asn), dando origen a compuestos con enlaces peptídicos, ya que el amino y carboxilo están susceptibles a formar enlaces covalentes. Podemos saber la funcionalidad del complejo debido a que hay una disminución de las absorbancias conforme más N-acetilcisteína se añade a las nanopartículas de oro, por lo tanto, en el punto donde la absorbancia sea 0, nos indica que ya no hay nanopartículas de oro en el medio.

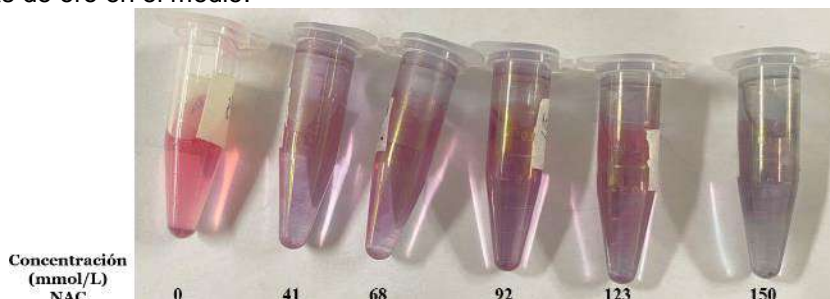


Figura 8. Fotografía del complejo a diferentes concentraciones de N-acetilcisteína (41, 68, 92, 123 y 150 mmol/L).

Se puede observar que sin nada de NAC está el color rosa/rojizo de la nanopartícula de oro, y conforme se añade más concentración, se vuelve más opaco y con una coloración más tenue.

En principio se quería variar pH ácido y básico para evaluar cómo influyen en la constante de formación, pero la disolución del complejo tuvo un valor ácido (pH de 2.4), por lo que se decidió variar a neutro y básico, de esta forma es que se utilizaron buffers de acuerdo con el  $pK_a$  de los aminoácidos y del ligando.

Cuando se adicionó el buffer de fosfatos (a pH 7), en las gráficas se ve una tendencia lineal (no recta), pero no varía mucho conforme se hace el barrido. Esto se debe a que los componentes del buffer (fosfato de sodio monobásico y fosfato de potasio dibásico) tienden a ser acomplejantes, por lo que es muy probable que haya habido una interacción entre estos y las nanopartículas de oro, además que compitió con el ligando, ya que, al igual que el grupo tiol, los fosfatos también suelen usarse como estabilizadores por medio de enlaces covalentes con el oro (Blas Aguerri, 2020).

En cambio, con el buffer de boratos (pH 9), en las gráficas, vemos una tendencia similar a la gráfica sin adición de buffers, nuevamente, entre mayor concentración de N-acetilcisteína, disminuye más considerablemente la absorbancia a 525 nm. Por lo que, en este caso, el buffer no desestabilizó al complejo y si hubo una formación de este.

Los aminoácidos reaccionaron de manera muy eficiente con el complejo. Debido a que tienen el grupo carbonilo ( $C=O$ ), posiblemente la alta reactividad de este grupo hace que interaccionen con el NAC, además que estos aminoácidos en específico se caracterizan por tener una carga negativa, y como ya se mencionó, el  $(AuNP[N\text{-acetilcisteína}]_x)$  tiene una carga superficial positiva, por lo que puede interaccionar, los carbonilos o grupos amino del aminoácido con el complejo.

Para las gráficas con la adición de ácido glutámico se observan tendencias similares que, con el complejo, mayores valores para la absorbancia cuando no se adiciona buffer. Y con la adición de asparagina podemos ver en los gráficos que tienden a seguir el mismo patrón, sin bandas tan prominentes, esto se puede atribuir a la temperatura (ya que requieren de refrigeración), pero principalmente a la disociación de la molécula en cada medio, por lo que se ha visto hasta este punto, al disminuir más rápidamente la absorbancia con la adición de la asparagina, que, con el ácido glutámico, podemos decir que el complejo tiene más afinidad con la asparagina. Sin embargo, para confirmar esto, fue útil calcular las constantes de formación.

Como ya se mencionó, el método usado para calcular las constantes de formación se basó primeramente en graficar la relación de moles (obteniendo la concentración de las AuNPs por medio de la ley de Lambert Beer, y diferentes concentraciones del ligando), esto en el eje de las "x" y en el de las "y" las absorbancias, donde consideramos un comportamiento teórico ideal, por lo que las líneas rectas que se trazan entre las primeras concentraciones del ligando contra la que tiene tendencia a 0 nos va a dar la intersección en el punto de equivalencia. Por lo que, la disociación es

la desviación de linealidad del complejo, incrementando en cada concentración. Y en donde se varió el pH se toma en cuenta para el cálculo de beta.

Y bien, para la unión de los aminoácidos, se realizó el mismo método, con las gráficas, trazar las tangentes, solo que considerando la concentración que se obtuvo anteriormente del complejo y los  $pK_a$  de los aminoácidos. Para el ácido glutámico, se aprecia un comportamiento similar, a condiciones normales alcanza valores más cercanos a cero, a comparación de con pH 7 y 9, esto influye para la constante de formación, ya que, el hecho de que llegue a cero, quiere decir que más cantidad de Glu se unieron al complejo. Para la asparagina, se realizaron las gráficas correspondientes para determinar el punto de equivalencia y se ven tendencias similares, sin embargo, esta unión tuvo una constante de formación a pH ácido de  $1.57 \times 10^{53}$ , lo que nos indica que está todavía más favorecida esta unión, esto puede ser porque en ese medio, se favorece la disociación del grupo carboxilo, lo que hace que interactúen más fácilmente entre sí, a que si tuviéramos un pH básico, también se forma el complejo, solo que nuevamente en menor proporción que a pH ácido. Y a pH neutro vemos una nula interacción, con una  $K_f$  negativa, lo cual desfavorece totalmente la unión.

De acuerdo con todos los resultados obtenidos, las condiciones óptimas para hacer esta reacción son las de pH ácido debido a que hay un mejor rendimiento porque los aminoácidos son más estables. Sin embargo, con respecto al pH neutro no se observa formación del complejo porque los aminoácidos no se disocian. Y finalmente, a pH básico el rendimiento fue modesto debido a que los  $pK_a$ s son cercanos a este pH de 9, donde los aminoácidos tienen el  $pK_a$  de su grupo amino muy cercano, lo que provoca que se disocie y se una esta parte de la molécula con el complejo, pero a pH ácido, hay una mayor constante de formación ya que se disocian los grupos carboxilos y logran interactuar con más fuerza entre sí por medio de la formación de enlaces covalentes (peptídicos). Por lo visto en resultados, podemos decir que la asparagina tiende a unirse todavía más fuerte con el complejo, que el mismo ácido glutámico, esto se debe a las diferencias en sus estructuras, ya que la asparagina contiene un grupo carboxilo, amino y amida, el ácido glutámico contiene un 2 grupo carboxilo y una amina, lo que nos indica que la presencia de la amida logra estabilizar las moléculas del complejo y hace que se vuelvan más afín con el aminoácido.

## CONCLUSIONES

- La adición de otras especies provoca una modificación en la estequiometría con el ligando, pero de igual forma existe complejo que se forma.
- Aunque en algunas muestras se encontraron variaciones en las mediciones, la tendencia en general en todas las curvas es la misma, inicia descendiendo la absorción y se estabiliza en un valor cercano a cero conformes se incrementa la concentración de ligando.
- Cualitativa y cuantitativamente se sabe que el complejo se forma y es capaz de ofrecer valores de absorción de luz en la región visible.
- Además, podemos concluir que el pH influye significativamente en la constante de formación, siendo el pH ácido, el más adecuado para hacer esta reacción, y como aminoácido más afín, la asparagina, sin embargo, no descarta su utilidad para cualquier otro aminoácido o biomolécula afín.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Antón, R. G. (2016). *Síntesis de nanopartículas de oro funcionalizadas con 1-dodecanotiol en un sistema bifásico*. (tesis). Valladolid. <https://core.ac.uk/download/pdf/211102175.pdf>
2. Blas Aguerri, L. (2020). "In situ" generation of gold nanoparticles as the base of colorimetric nanobiosensors for biogenic amines determination. Universidad de Zaragoza.
3. Boden, S., Wagner, K., Karg, M., & Hartmann, L. (2017). Presenting precision glycomacromolecules on gold nanoparticles for increased lectin binding. *Polymers*, 9(12), 716. <https://doi.org/10.3390/polym9120716>
4. Compostella, F., Pitirollo, O., Silvestri, A., & Polito, L. (2017). Glyco-gold nanoparticles: Synthesis and applications. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 13, 1008–1021. <https://doi.org/10.3762/bjoc.13.100>

5. Corzo Lucioni, Alberto (2012). SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO OBTENIDAS POR REDUCCIÓN DE H[AuCl<sub>4</sub>]. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 78(2), 79-90. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=371937627003>
6. Dawei Wang, Nap J., István Lagzi, Bartłomiej Kowalczyk, Shuangbing Han, Grzybowski, B. A., & Igal Szeleifer. (2011). *How and Why Nanoparticle's Curvature Regulates the Apparent pKa of the Coating Ligands*. ACS Publications, Journal of the American Chemical Society, 133, 7, 2192-2197. <https://doi.org/10.1021/ja108154a>
7. García-Hernández, L., Ramírez-Castro, B., Aguilar-Pérez, P., Ramírez-Ortega, A., Flores-Guerrero, M. U., & Arenas-Islas, D. (2017) Síntesis y estabilización de nanopartículas de oro (AuNPs) mediante técnicas de química verde. Tópicos de investigación en ciencias de la tierra y materiales. Volumen 4. ISSN: 2395-8405. Pag: 171.
8. Guerrero, H. A. R. (2008). Explorando la estructura de péptidos conjugados a nanopartículas metálicas (tesis). Universidad de Chile. [https://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2008/qf-guerrero\\_a/pdfAmont/qf-guerrero\\_a.pdf](https://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2008/qf-guerrero_a/pdfAmont/qf-guerrero_a.pdf)
9. Hühn, J., Fedeli, C., Zhang, Q., Masood, A., del Pino, P., Khashab, N. M., Papini, E., & Parak, W. J. (2016). Dissociation coefficients of protein adsorption to nanoparticles as quantitative metrics for description of the protein Corona: A comparison of experimental techniques and methodological relevance. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 75, 148–161. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.12.015>
10. Lira, A. L., Ferreira, R. S., Torquato, R. J., Zhao, H., Oliva, M. L., Hassan, S. A., Schuck, P., & Sousa, A. A. (2018). Binding kinetics of ultrasmall gold nanoparticles with proteins. *Nanoscale*, 10(7), 3235–3244. <https://doi.org/10.1039/c7nr06810g>
11. Locarno, S., Bucci, R., Impresari, E., Gelmi, M. L., Pellegrino, S., y Clerici, F. (2021). Ultrashort peptides and gold nanoparticles: Influence of constrained amino acids on colloidal stability. *Frontiers in Chemistry*, 9. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.736519>
12. Páramo, L. A., Feregrino-Pérez, A. A., Guevara, R., Mendoza, S., y Esquivel, K. (2020). Nanoparticles in agroindustry: Applications, toxicity, challenges, and trends. *Nanomaterials*, 10(9), 1654. <https://doi.org/10.3390/nano10091654>
13. Qing S., & Carol K. Hi. (2017). *Binding Preferences of Amino Acids for Gold Nanoparticles: A Molecular Simulation Study*. 32(31): 7888-7896. North Carolina. Langmuir. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5538574/pdf/nihms854512.pdf>.
14. Saha, K., Agasti, S. S., Kim, C., Li, X., y Rotello, V. M. (2012). *Gold nanoparticles in chemical and biological sensing*. Chemical reviews. Retrieved August 23, 2022, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4102386/>
15. Sangwan, S. y Seth, R. (2022). Synthesis, Characterization and Stability of Gold Nanoparticles (AuNPs) in Different Buffer Systems. *J Clust Sci* 33, 749–764. <https://doi.org/10.1007/s10876-020-01956-8>
16. Skoog, D., West, D., Holler, J., & Crouch, S. (2015). *Fundamentos de Química Analítica*. (9ª ed.). México: Cengage Learning Editores.
17. Ma, Y., Hong, J. y Ding, Y. (2020). Biological behavior regulation of gold nanoparticles via the protein corona. *Adv. Healthc. Mater.*, 9(2), 1901448.
18. Verma, H. N., Singh, P., & Chavan, R. M. (2014). Gold nanoparticle: Synthesis and characterization. *Veterinary World*, 7(2), 72–77. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2014.72-77>
19. Wu, G. (2009). Amino acids: Metabolism, functions, and Nutrition. *Amino Acids*, 37(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0269-0>



## FABRICACIÓN Y EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FOTOFÍSICAS DE NANOMATERIALES ORGÁNICOS

Luis Ángel Rodríguez Flores<sup>1</sup>, Mayra Lucila Melgoza Ramírez<sup>2</sup>, Mario Alejandro Rodríguez Rivera<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Tecnológica de Salamanca, <sup>2</sup>Centro de Investigaciones en Óptica A.C.

[luis\\_rodriguezfa@hotmail.com](mailto:luis_rodriguezfa@hotmail.com), [mrodri@cio.mx](mailto:mrodri@cio.mx)

### RESUMEN

Los polímeros orgánicos son importantes moléculas debido a sus propiedades químicas, mecánicas y ópticas que son de utilidad en un gran número de aplicaciones en áreas como la optoelectrónica, ciencias de la salud entre otros.<sup>1</sup> En particular, propiedades ópticas como la luminiscencia resulta de interés en nanotecnología para fabricar materiales fluorescentes con posibles aplicaciones biomédicas. La terapia fotodinámica es un método no invasivo empleado para la degradación de tejido enfermo, este método requiere de la presencia de un fotosensibilizador, luz de una longitud de onda específica y oxígeno molecular. En el presente trabajo se fabricaron nanopartículas de silicio con morfología semiesférica dopadas con un fluoróforo orgánico y cuya superficie se decoró con un fotosensibilizador. Estos materiales se fabricaron usando una variación del método de microemulsión, obteniendo partículas con diámetros cercanos a 100 nm que se estableció por análisis de distribución de tamaño (Dynamic light scattering, DLS) y corroborado usando micrografías generadas por microscopía electrónica de barrido (SEM). Las propiedades luminiscentes se evaluaron en suspensión usando espectroscopia de emisión, una banda de emisión a 525 nm fue registrada la cual confirma la fotoluminiscencia de los nanomateriales. La fotogeneración de oxígeno singulete se determinó mediante un método indirecto, midiendo la degradación química de ácido úrico. Los materiales mostraron las propiedades químicas, morfológicas y fotofísicas para funcionar como un posible nanofotosensibilizador en terapia fotodinámica.

### INTRODUCCIÓN

La biomedicina se encarga del estudio profundo de las metodologías que incluyen procesos fotofísicos, biológicos, bioquímicos, celulares y genéticos, destinadas al tratamiento de enfermedades. Dentro de dichas metodologías, la terapia fotodinámica es un tratamiento que consiste en aplicar un medicamento llamado fotosensibilizador que al ser irradiado con luz genera una especie química reactiva de oxígeno que degrada las moléculas presentes en las células. Los nanomateriales orgánicos recubiertos de sílice resultan ser excelentes candidatos para ser empleados como fotosensibilizadores. En particular, debido a la compatibilidad en medio acuosos, la baja toxicidad, además de conservar las propiedades fotofísicas como luminiscencia y la fotogeneración de oxígeno singulete. Por lo tanto, en este trabajo se busca establecer la posibilidad de mantener las propiedades fotofísicas del polímero POH-300 después de ser procesados como nanomateriales recubiertos de silicio. Para posteriormente bioconjuguar la superficie de las partículas con moléculas de fotosensibilizador con la finalidad de generar un nanomaterial que conjunte la luminiscencia y la fotogeneración de especies reactivas de oxígeno.

### TEORÍA

A través de varias décadas el interés e investigación sobre los nanomateriales orgánicos ha ido en aumento, específicamente en áreas del conocimiento como la biomedicina debido a que al procesar como nanopartículas poseen propiedades ópticas superiores con respecto a sus contrapartes inorgánicas. Lo cual convierte a estos materiales en candidatos para la fabricación de sensores químicos, biomarcaje y funcionalización de materiales fotosensibilizadores, entre otros. La terapia fotodinámica consiste en tratamientos con medicamentos llamados agentes fotosensibilizadores que se activan con la luz de cierta longitud de onda para generar especies reactivas de oxígeno (oxígeno singulete, iones oxidrilos e hidroxilos) que promueven la degradación de las células o tejido.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Metodología para la fabricación de nanopartículas orgánicas

Para fabricar las nanopartículas (NP's) se empleó una variación del método descrito en la literatura (Sheng Zhao, y otros, 2008). La mezcla de AOT, 1-butanol, NMP y agua Milli-Q se mantuvo en agitación mecánica para formar adecuadamente las micelas, cuando se solubilizó por completo se adicionó una solución de fluoróforo orgánico POH-300 en NMP (5 mg/mL). Tras inyectar el fluoróforo orgánico se mantuvo por una hora más, después se añadieron los reactivos de silicio trietoxivinilsilano (VTES) y al final (3-Aminopropil)tri-etoxisilano (APTES) como agente precipitador, la mezcla se mantuvo en agitación durante 20 horas. Una vez terminado el proceso de fabricación de nanopartículas, se purificaron mediante una centrifuga a la velocidad de 13000 rpm por 30 min. Para lograr una redispersión exitosa de los materiales purificados se colocaron los tubos Eppendorf conteniendo las nanopartículas de sílice en baño ultrasónico por dos horas.

### Metodología para la bioconjugación de la superficie de los nanomateriales

El proceso se realizó preparando una solución Rosa de bengala/MOPS y manteniendo con agitación constante a una velocidad de 6000 rpm, posteriormente, se adicionó una solución de EDC; se dejó en agitación durante 20 minutos. Se adicionó la suspensión de las nanopartículas de sílice y se mantuvo en agitación constante durante 22 horas. Finalmente, las nanopartículas fueron purificadas usando una centrifuga a 14000 rpm.

### Metodología para la fotogeneración de oxígeno singulete de las nanopartículas bioconjugadas

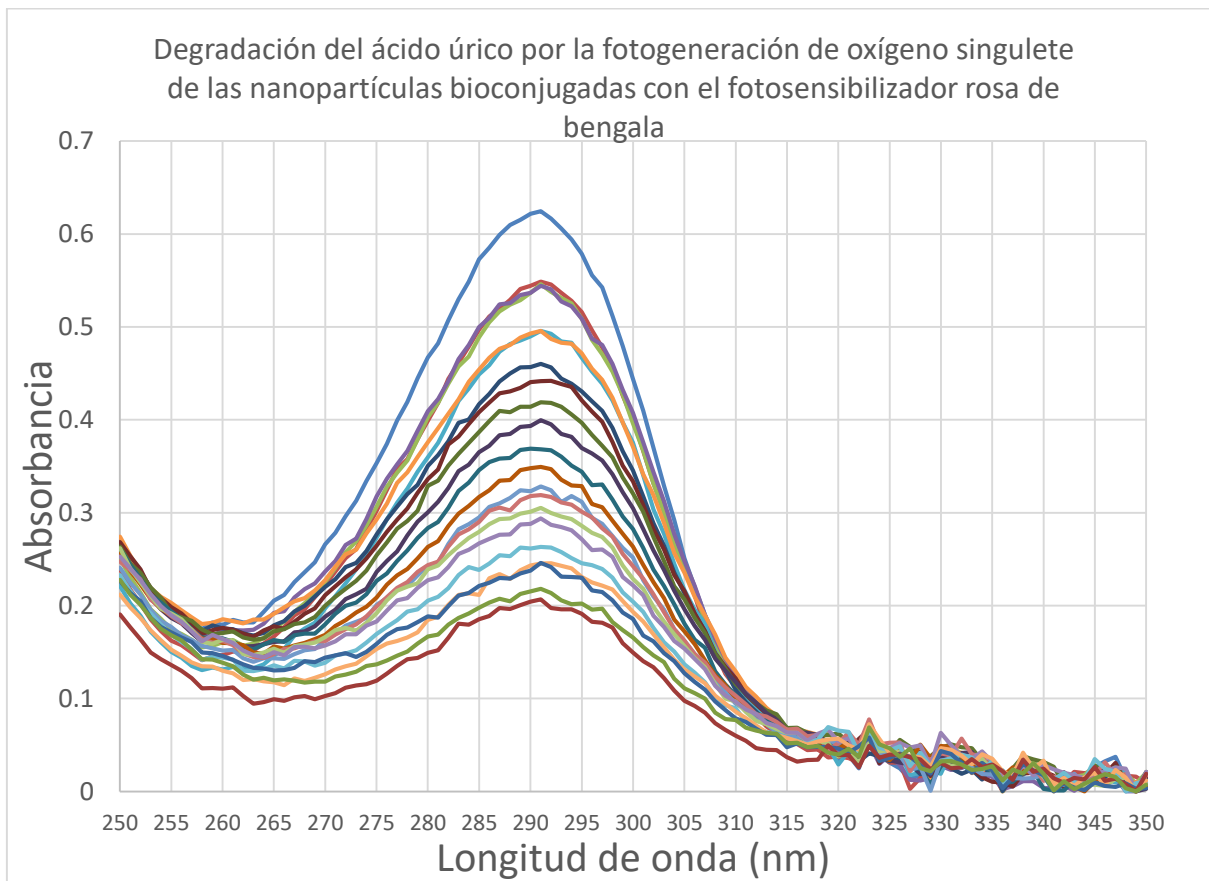
La evaluación de la fotogeneración de oxígeno singulete se realizó en solución dentro de una celda de cuarzo de 1 cm provista de un agitador magnético. Se colocaron volúmenes iguales de la solución de ácido úrico (100  $\mu$ M) y de la suspensión de nanomateriales, la mezcla se mantuvo en agitación a 10000 rpm por 4 minutos; posteriormente se oxigenó la muestra por 10 minutos. Se adquirieron los espectros de absorción desde 0 a 60 min cada 4 min en la ventana de 350 a 250 nm, se tomaron 15 iteraciones consecutivas irradiando con luz de 532 nm para cada experimento.

## RESULTADOS

### Resultados de la fabricación por el método de microemulsión de NP's, caracterización óptica y morfológica

La suspensión con los mejores resultados de distribuciones de tamaños de nanopartículas de silicio dopadas con el fluoróforo POH-300 fue obtenida usando 22 horas de agitación en el proceso de fabricación y además 0.45 gr de surfactante. La caracterización de la distribución de tamaño para la suspensión por DLS indica que el diámetro promedio registrado es de 191.5 nm, los diámetros registrados más frecuentes son de 218.9 nm con una desviación estándar de 58.8 nm y una intensidad del 86.9%. También se registró un pico en 76.4 nm con una desviación estándar de 12.7 nm y una intensidad de 13.1%. La caracterización morfológica de las nanopartículas se completó mediante SEM, la micrografía muestra nanopartículas de morfología semiesférica que presentan diámetros por debajo de los 100 nm.

Las nanopartículas bioconjugadas con el fotosensibilizador fueron caracterizados usando espectroscopia de absorción y emisión. La presencia de dos bandas de absorción ubicadas en 520 y 560 nm aproximadamente corresponde a las del rosa de bengala. La banda de emisión de las nanopartículas bioconjugadas coincide significativamente con la banda de emisión generada por la solución en etanol del rosa de bengala. Para confirmar la fotogeneración de oxígeno singulete por las nanopartículas bioconjugadas se muestra en la gráfica de disminución en la absorbancia del ácido úrico (Figura 1), lo cual corrobora la degradación oxidativa del ácido úrico por el oxígeno singulete generado por las nanopartículas bioconjugadas cuando son irradiadas con luz de 532 nm (color verde).



**Figura 1. Gráfica de absorción del ácido úrico en solución como efecto de la degradación oxidativa provocada por el oxígeno generado por el nanofotosensibilizador**

## CONCLUSIONES

Se fabricaron nanopartículas de sílice dopadas con el fluoróforo POH-300 utilizando una variación del método de microemulsión, las condiciones experimentales evaluadas generaron materiales con morfología semiesférica con diámetros cercanos a 100 nm (63-124 nm). Se determinó que la velocidad de agitación tiene una importante trascendencia, así como el proceso de purificación para la obtención de nanopartículas. Se conservaron las propiedades ópticas del fluoróforo después de procesarse como nanomateriales que se corroboró por los espectros de absorción y emisión.

Se bioconjugó la superficie de las nanopartículas de sílice fotoluminiscentes con el fotosensibilizador rosa de bengala (fotosensibilizador). Los espectros de absorción y emisión de las suspensiones confirmaron la obtención de los nanomateriales que contiene la combinación del fluoróforo y el fotosensibilizador. Usando un diodo láser de 532 nm se observó el comportamiento de fotosensibilización para las nanopartículas bioconjugadas al degradar ácido úrico en solución, lo cual, coloca dichos materiales como candidatos para emplearse como nanofotosensibilizadores.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Otero, F. (2012). Caracterización de sistemas de partículas por dispersión de luz. estimación de parámetros. Universidad Nacional de Mar del Plata Facultad de Ingeniería.

2. Alba-Rosales, J. E., Aparicio-Ixta, L., Ramos-Ortiz, G. R., Maldonado, J. L., & Gutiérrez-Juarez, G. (2014). A comparative study of the optical properties exhibited by organic nanoparticles synthesized by reprecipitation and laser ablation methods. *Latin America Optics and Photonics Conferencia*.
3. Camacho López, M. A., Reyes Contreras, D., Mayorga Rojas, M., Díaz Sánchez, L. E., Reyes Contreras, A., Arrieta Castañeda, R., . . . Camacho López, S. (2014). Síntesis de puntos cuánticos de CdTe mediante la técnica de ablación láser de sólidos en líquidos. *Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales*, 93-97.
4. Camarillo Abad, E., Blome Fernández, R., Castellanos Andrade, P. I., & Campos Delgado, J. (2019). Mitos y realidades de la nanotecnología en México. *Mundo Nano*, 12(22) 73-88.
5. Cuadros-Moreno, A., Csañas Pimentel, R., & San Martín-Martínez, E. (2014). Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. Centro de investigación Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional.
6. Espinosa Vincens, M. E., Esteves Cano, C., Cuadros Bustos, M. C., & Olivera Ocegüera, A. Y. (2018). El mundo de la nanotecnología Situación y prospectiva para México. Unidad de Inteligencia de Negocios.
7. García Fresnadillo, D. (2010). Generación fotosensibilizada de oxígeno singlete. *TECNIA* 20.
8. Garín, P. B. (2020). Desarrollo de nanoartículas de silicio poroso para aplicaciones de carga-liberación de medicamentos. Universidad Politécnica de Valencia: Escuela Técnica Superior Ingeniería Industrial Valencia.
9. Lillo, C. R. (2016). Desarrollo de nanopartículas de silicio como potenciales agentes luminiscentes y agentes terapéuticos contra el cáncer. Argentina: Universidad Nacional de La Plata.
10. M. Arole, V., & V. Munde, S. (2014). Fabrication of nanomaterials by top-down and bottom-up approaches - an overview. *Journal of Advances in Applied Sciences and Technology*, 89-93.
11. Ríos, E. A., Vega-Baudrit, J. R., Villegas, J. G., & Sánchez, J. A. (2020). Nanoestructuras de silicio en biomedicina y biotecnología. *Revista de física*, No. 60, 18-34.
12. Sheng Zhao, Y., Fu, H., Peng, A., Ma, Y., Xiao, D., & Yao, J. (2008). Low-Dimensional Nanomaterials Based on Small Organic Molecules: Preparation and Optoelectronic Properties. *Advanced Materials*, 2859-2876.
13. Valero, N. G. (2011). Preparación de Nanomateriales Orgánicos Fluorescentes. Universidad Veracruzana Facultad de Ciencias Químicas.
14. Wang, J., Dai-Xin, Y., Guo-Hai, L., Jian, C., Kong, J. L., & Chen, J. Y. (s.f.). One-step synthesis of water-dispersible silicon nanoparticles and their use in Fluorescence Lifetime Imaging of living cells. *Journal of Material Chemistry B*, 2-4.

## DESARROLLO DE UN MODELO QUIMIOMÉTRICO POR PLS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO PALMÍTICO EN UNA MEZCLA DE ÁCIDOS GRASOS MEDIANTE FTIR-ATR

Romero-Tovar Juan José, Cortés-Pérez María del Carmen, García-Montes Kimberlin Denice, Núñez-Vilchis Alejandro

Laboratorio de Instrumentación Analítica, Parque Biotecnológico UAQ, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas S/N Querétaro, Qro. C. P. 76010.  
[jromero40@alumnos.uaq.mx](mailto:jromero40@alumnos.uaq.mx)

### RESUMEN

Los ácidos grasos (AG) desempeñan un papel fundamental en los sistemas biológicos y son macronutrientes esenciales de la dieta humana, algunos de ellos son el ácido palmítico (AP), el ácido esteárico (AE) y el ácido oleico (AO)<sup>1</sup>. El AP tiene una presencia considerable en productos de origen natural, industrial y en sistemas biológicos, ejemplo de ello, el cuerpo humano donde representa entre el 20-30% de los AG totales<sup>2</sup>. Dada su importancia biológica y aunado a las matrices analíticas en las que usualmente se encuentra este compuesto, actualmente se emplea la cromatografía de gases con distintos detectores para su determinación, la cual, aun siendo una poderosa técnica de análisis, presenta ciertas desventajas como la exhaustiva preparación de muestra y la necesidad de derivatización de los AG para su detección<sup>3</sup>. En este sentido, se presenta un campo de estudio relacionado con el desarrollo de metodologías enfocadas en el uso de herramientas matemáticas e instrumentación sencilla para el análisis de AP en mezclas complejas. Considerando esto, optamos por utilizar espectroscopía de infrarrojo medio como técnica instrumental, por la simplicidad del análisis, mínimo tamaño de muestra y la gran cantidad de información obtenida de una medición, combinada con regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) para obtener un modelo matemático capaz de estimar la concentración de AP en presencia de otros AG. Utilizando la absorbancia a  $1740\text{ cm}^{-1}$  de número de onda como variable predictora en la regresión por PLS y analizando una serie de mezclas de AP, AE y AO en un espectrómetro infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), se llegó a una función que pudo explicar arriba del 99 % ( $R^2 = 0.997$ ) de la dispersión de la variable de respuesta (definida como 'g/L de AP') y por tanto capaz de estimarla con precisión, superando a un análisis de correlación lineal simple por estándar externo cuyo  $R^2$  fue de 0.918. Se observó una posible limitante en el modelo relacionado con las proporciones de los AG por lo que se requiere continuar con los estudios para encontrar nuevas funciones que complementen al actual o, en su defecto, corregirlo, sin embargo, este trabajo aporta una alternativa metodológica rápida, simple y precisa para la determinación de AP en matrices complejas que pudiera extrapolarse a otros compuestos biológicos similares.

### INTRODUCCIÓN

La grasa es un macronutriente esencial de la dieta humana y los aceites vegetales representan una de las más consumidas (Mancini *et al.*, 2015), así pues, el ácido palmítico (16:0, AP) que es un componente principal del aceite de palma (44 % de las grasas totales), pero que también se puede encontrar en cantidades significativas en la carne y los productos lácteos (50–60 % de las grasas totales), así como en la manteca de cacao y aceite de oliva, es el ácido graso (AG) saturado más común que se encuentra en el cuerpo humano y puede proporcionarse en la dieta o sintetizarse endógenamente a partir de otros ácidos grasos, carbohidratos y aminoácidos. El AP representa del 20 al 30 % de los ácidos grasos totales (FA) en los fosfolípidos de membrana (PL) y los triacilglicérols adiposos (TAG) (Carta *et al.*, 2017). Así mismo, otros ácidos grasos como el esteárico (C18:0) también está íntimamente involucrado en la producción de grasa láctea, mientras que el ácido oleico es el segundo AG más abundante en la grasa de la leche y probablemente el principal AG insaturado involucrado en la regulación de la fluidez de la leche (Loften *et al.*, 2014), en ese sentido, los ácidos grasos ejercen múltiples funciones biológicas fundamentales a nivel celular y tisular, por lo que se necesitan métodos analíticos fiables para la cuantificación del contenido y la composición de ácidos grasos.

Se han utilizado herramientas analíticas, que incluyen espectrometría de masas por cromatografía de gases (GC-MS), cromatografía de gases con detección de ionización de llama (GC-FID) y espectrometría de masas por cromatografía líquida (LC-MS), para realizar análisis de ácidos grasos. Los métodos de LC-MS para el análisis de ácidos grasos mostraron algunas desventajas, como un mayor consumo de solvente y una menor selectividad (Chiu & Kuo, 2020).

Actualmente el análisis de GC de los ácidos grasos con FID sigue siendo el método más utilizado. La cuantificación de AG en grasas y aceites por GC implica la transformación de los analitos en derivados más volátiles y no polares después de extraer los lípidos del producto alimenticio antes del análisis GC. La etapa más importante para la determinación de AG por GC-FID es la preparación de la muestra, que generalmente requiere la derivatización de los AG para aumentar la volatilidad de las sustancias para mejorar la separación. Además, la velocidad de análisis, la sensibilidad y la precisión son parámetros importantes que considerar en GC (Salimon *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta lo anterior, en el presente proyecto se propone el empleo de la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier con el accesorio de reflectancia total atenuada (FTIR-ATR), que tiene la capacidad de servir como una "técnica de huellas dactilares", lo que significa que no hay dos muestras que tengan los mismos espectros infrarrojos (IR) ni en el número de picos ni en las intensidades máximas, como método instrumental cuantitativo que en conjunto con la quimiometría serán empleados para el desarrollo de un modelo matemático a través de la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) para la cuantificación de ácido palmítico en una matriz de ácidos grasos.

## TEORÍA

### 1. Ácido palmítico y otros ácidos grasos

El ácido palmítico es un ácido graso saturado de cadena media, formado por dieciséis átomos de carbono, el principal ácido graso saturado presente en el cuerpo del ser humano, así como en su dieta, constituyendo aproximadamente un 60 % de la misma. El estricto control homeostático de su concentración tisular está relacionado con su papel fisiológico fundamental en varias funciones biológicas. La alteración del equilibrio homeostático del ácido palmítico, implicada en diferentes condiciones fisiopatológicas como la aterosclerosis, las enfermedades neurodegenerativas y el cáncer, a menudo se relaciona con una biosíntesis endógena descontrolada, independientemente de su aporte dietético (Carta *et al.*, 2017).

Pertenciente a la familia de los omega 9, el ácido oleico (AO) es un ácido graso monoinsaturado que se encuentra de manera natural en diversos alimentos de origen animal y vegetal. Para caracterizar el papel del ácido oleico en la salud y la enfermedad, se han realizado numerosos estudios y ensayos clínicos. El peculiar papel beneficioso del ácido oleico se ha observado en varias enfermedades, incluidas las enfermedades cardiovasculares; su consumo se ha asociado con una disminución de las lipoproteínas de baja densidad y el colesterol. (Piccinin *et al.*, 2019).

El ácido esteárico (AE) es un ácido graso saturado que se encuentra en altas concentraciones en las grasas animales y el cacao. Este ácido graso saturado en particular se ha estudiado mucho durante la última década porque parece tener propiedades bioquímicas únicas de tipos similares de ácidos grasos. Se ha demostrado que la suplementación con ácido esteárico en humanos estimula un proceso llamado fusión mitocondrial; proceso importante para la reparación de las mitocondrias dañadas. (Eudy, 2021).

### 2. FTIR-ATR como técnica cuantitativa

La eficacia de los métodos analíticos basados en espectroscopia vibracional ha sido ampliamente comprobada en un elevado número de publicaciones (Mas *et al.*, 2021). En el estudio "Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier combinada con calibraciones multivariadas para la autenticación de aceite de aguacate" por Abdul Rohman y colaboradores, se implementa la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier usando reflectancia total atenuada en combinación con técnicas quimiométricas de mínimos cuadrados parciales y regresión de componentes principales para construir los modelos de cuantificación de aceite de palma y aceite de canola en aceite de aguacate. Los mínimos cuadrados parciales en la región de números de onda



de 1260–900  $\text{cm}^{-1}$  revelaron los mejores modelos de calibración, con el coeficiente de determinación más alto ( $R^2 = 0.999$ ) y el error cuadrático medio de calibración más bajo, 0.80 %, para el análisis de aceite de aguacate en la mezcla con aceite de palma. Mientras tanto, los valores más altos de  $R^2$ , error cuadrático medio de calibración y error cuadrático medio de predicción más altos obtenidos para el aceite de aguacate en la mezcla con aceite de canola en la región de frecuencia de 3025–2850 y 1260–900  $\text{cm}^{-1}$  fueron 0.9995, 0.83, y 0.64%, respectivamente (Rohman *et al.*, 2016). De igual forma, el estudio “Aplicación de la espectroscopia infrarroja transformada de Fourier de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) combinada con quimiometría para la detección y cuantificación de formalina en la leche de vaca” por Biji Balan y colaboradores, evalúa esta técnica como un método rápido de control de calidad para el análisis cualitativo y cuantitativo de formalina en la leche de vaca. Los modelos de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) y regresión de componentes principales (PCR) establecidos, permitieron cuantificar el nivel de formalina en la leche utilizando espectros normales, de la primera derivada y de segunda derivada. El modelo PLS para espectros normales mostró la mejor predicción en comparación con PCR con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.977 para calibración y 0.985 para validación (Balan *et al.*, 2020). La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) tiene la capacidad de servir como una "técnica de huellas dactilares", lo que significa que no hay dos muestras que tengan los mismos espectros infrarrojos (IR), ya sea en el número de picos o en las intensidades de los picos (Rohman *et al.*, 2015). Por estas razones, la espectroscopia FTIR se puede tener en cuenta como un método instrumental ideal para la cuantificación de ácido palmítico (Rohman *et al.*, 2015).

### 3. Software FTIR

Los programas de software FTIR modernos contienen potentes algoritmos para el procesamiento de espectros. Si se usan correctamente, estos algoritmos pueden mejorar el contenido de información de un espectro, acelerar el análisis de mezclas y facilitar la interpretación espectral.

Para evitar posibles problemas en el uso de algoritmos de procesamiento espectral, se recomiendan seguir ciertas reglas:

1. Siempre examinar de cerca el espectro original antes de decidir si procesarlo o no. En caso de continuar, siempre tener una buena razón para hacerlo.
2. Tener una idea clara de cómo funciona el algoritmo de procesamiento que se propone utilizar, los problemas que puede causar y cómo evitarlos.
3. Conservar siempre los datos originales para que, si algo sale mal, tener el original al que recurrir.
4. Registrar siempre cómo, cuándo, por qué y quién realizó el procesamiento.

### 4. Sustracción espectral

La sustracción espectral es una técnica de procesamiento espectral utilizada para simplificar los espectros de mezclas mediante la eliminación de contribuciones no deseadas a un espectro, como vapor de agua,  $\text{CO}_2$ , solventes, impurezas, interferencias y componentes conocidos. Idealmente, eliminando estas contribuciones no deseadas, los picos de interés se observarán más fácilmente. El algoritmo matemático detrás de la resta espectral es relativamente simple y está dado por la ecuación:

$$(\text{Absorción de muestra}) - (\text{Absorción de referencia}) = \text{Absorbancia de resultado}$$

La mayoría de los programas de software FTIR permiten multiplicar las absorbancias en el espectro de referencia por un factor de sustracción (a veces llamado "factor de escala"), que se utiliza para escalar las absorbancias del espectro de referencia para que coincidan con las absorbancias del espectro de la muestra para que los picos no deseados se resten limpiamente. El algoritmo de sustracción entonces se convierte en:

$$(\text{Absorción de muestra}) - (\text{Factor de sustracción}) (\text{Absorción de referencia}) = \text{Resultado} \\ \text{Absorbancia}$$

#### 5. Corrección de línea base

Preferentemente, un espectro infrarrojo medido debería tener una línea de base plana que cae en cero absorbancias o 100% de transmitancia. En realidad, habrá momentos en los que se midan espectros que no tengan líneas de base ideales. Estos pueden caer en tres categorías; desplazamiento, pendiente y curvatura. Dado que con el desplazamiento todo el espectro aumenta o disminuye según una constante a lo largo del eje y, corregirlo implica sumar o restar una constante adecuada del espectro para que la línea base llegue a cero. Tomar la absorbancia mínima en el espectro y restarla de todas las demás absorbancias en el espectro puede corregir el desplazamiento, de la siguiente manera:

$$A_c = (A_i - A_{\min})$$

Donde:

$A_c$  = Absorbancia en el espectro corregido de referencia

$A_i$  = Absorbancia en cualquier número de onda  $i$  en el espectro no corregido

$A_{\min}$  = Absorbancia mínima en el espectro no corregido.

#### 6. Suavizado espectral

Si un espectro tiene una resolución deficiente, primero se deben probar todos los métodos experimentales para mejorarlo, incluido el aumento del número de exploraciones y la elección de un método de muestreo adecuado. Sin embargo, si esto no tiene éxito, se debe considerar una técnica de procesamiento espectral llamada suavizado, que se utiliza para reducir el nivel de ruido en un espectro y, por lo tanto, aumentar su relación señal-ruido.

#### 7. Derivados espectrales

El cálculo menciona que la pendiente de cualquier función matemática se puede determinar calculando su primera derivada. Dado que un espectro infrarrojo es una función matemática, se pueden calcular las derivadas de los espectros infrarrojos. Los algoritmos de la primera derivada se pueden usar para elegir picos calculando la derivada de un espectro y encontrando dónde es igual a cero.

#### 8. Deconvolución

En los espectros infrarrojos, dos o más picos pueden caer uno encima del otro. Se puede usar una técnica de procesamiento espectral llamada deconvolución (a veces llamada autodesconvolución de Fourier o FSD) para mejorar matemáticamente la resolución de un espectro, permitiendo separar los picos superpuestos para analizar detalladamente y concluir que sucede en un espectro saturado (Smith *et al.*, 2011).

#### 9. Regresión PLS

Los mínimos cuadrados parciales (PLS) son un método para modelar las relaciones entre una variable  $Y$ , y otras variables explicativas. Puede usarse con cualquier número de variables explicativas, incluso mucho más que el número de observaciones. Se da una interpretación simple que muestra que el método es una forma sencilla y razonable de formar ecuaciones de predicción. Las combinaciones lineales de las variables explicativas se forman secuencialmente y se relacionan con  $Y$  por regresión de mínimos cuadrados ordinarios. Se muestra que estas combinaciones lineales, aquí denominadas componentes, pueden verse como promedios ponderados de predictores, donde cada predictor contiene la información residual en una variable explicativa que no está contenida en

los componentes anteriores, y la cantidad a predecir es el vector de residuos de la regresión de Y contra componentes anteriores (Garthwaite *et al.*, 2013).

#### 10. Comparación de métodos

Entre las técnicas instrumentales analíticas, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas es probablemente la técnica de más amplia utilización, son técnicas que constituye una herramienta potente para separar, identificar y cuantificar los componentes volátiles y semivolátiles de mezclas complejas, no obstante, la influencia de la temperatura sobre la distribución del equilibrio es considerable, presentando limitaciones en el análisis de compuestos poco volátiles, generalmente los de peso molecular superior a 300 u.m.a., compuestos sensibles a una elevación de la temperatura incluso moderada. Por otro lado, una de las grandes ventajas de la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es su versatilidad, ya que permite estudiar prácticamente cualquier muestra con independencia del estado en que se encuentre, así mismo, permite un análisis cuantitativo rápido con una preparación mínima de la muestra y es económico (Fong y Jeffrey, 2019), la instrumentación requerida es mucho más sencilla en comparación con cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, la cual requiere de una gran cantidad de reactivo y es de alto coste.

### PARTE EXPERIMENTAL

#### 1. Preparación de la mezcla de ácidos grasos

La mezcla de ácidos grasos estará compuesta por: ácido palmítico (proporcionado por el LIB, UAQ), ácido esteárico y ácido oleico (proporcionados por el almacén de la facultad de química, UAQ), utilizando cloroformo como disolvente (CNIB, 2022) en una proporción 1:1:1 con una variación en la concentración del ácido palmítico (2, 4, 6 y 8 g/L) y del ácido oleico (3, 5, 7, y 8 g/L), mientras que la concentración del ácido esteárico permanecerá constante (8.00 g/L), según el cuadro V.2.1; donde M# es el número de la mezcla empleada en el desarrollo del modelo y MP# es el número de la mezcla problema.

Cuadro V.2.1. Mezclas de los ácidos grasos.

Nomenclatura	Mezclas		Concentración en g/L	500 $\mu$ L c/u
	AP	AO	AE	
M1	5	5	5	
M2	5	5		
M3	5		5	
M4		5	5	
M5	8	8	8	
M6	8	8		
M7	8		8	
M8		8	8	
MP1	6	5	5	
MP2	6	8	8	
MP3	7	5	5	
MP4	7	8	8	

2. Cuantificación de ácido palmítico mediante FTIR-ATR

V.2.1 Muestras de calibración

Se prepararon dieciséis muestras de calibración que consisten en disoluciones del estándar de ácido palmítico con una concentración de 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50, 3.00, 3.50, 4.00, 4.50, 5.00, 5.50, 6.00, 6.50, 7.00, 7.50, 8.00 g/L, preparadas a partir de una solución stock con una concentración de 10 g/L en cloroformo (Sim & Jeffrey, 2019).

Cuadro V.2.2. Muestras de calibración para el ácido palmítico.

Ácido Palmítico	Solución stock	10000 mg/L	Concentración			
	0.5g	50 ml	volumen			
Estándar	Concentración requerida (mg/L ó ppm)	Concentración requerida (g/L)	V solución stock (ml)	V solución stock (µL)	V disolvente (mL)	V total de la disolución (mL)
1	500.00	0.50	0.25	250	4.75	5.00
2	1000.00	1.00	0.50	500	4.50	5.00
3	1500.00	1.50	0.75	750	4.25	5.00
4	2000.00	2.00	1.00	1000	4.00	5.00
5	2500.00	2.50	1.25	1250	3.75	5.00
6	3000.00	3.00	1.50	1500	3.50	5.00
7	3500.00	3.50	1.75	1750	3.25	5.00
8	4000.00	4.00	2.00	2000	3.00	5.00
9	4500.00	4.50	2.25	2250	2.75	5.00
10	5000.00	5.00	2.50	2500	2.50	5.00
11	5500.00	5.50	2.75	2750	2.25	5.00
12	6000.00	6.00	3.00	3000	2.00	5.00
13	6500.00	6.50	3.25	3250	1.75	5.00
14	7000.00	7.00	3.50	3500	1.50	5.00
15	7500.00	7.50	3.75	3750	1.25	5.00
16	8000.00	8.00	4.00	4000	1.00	5.00
	<b>SUMA</b>		<b>34</b>		<b>46.00</b>	<b>80.00</b>

V.2.2 Obtención de espectros FTIR-ATR

Los espectros se obtuvieron con el espectrofotómetro de infrarrojo de la marca Perkin Elmer (FTIR-PE). Antes de adquirir cada espectro FTIR, el cristal ATR se limpió cuidadosamente con un paño suave humedecido con hexano dos veces seguido de acetona. Se restó la absorbancia del fondo obtenido con el ATR seco y vacío. Se colocó una gota de ácidos grasos (mezcla, estándar y ácidos grasos puros por separado) sobre el ATR compuesto de ZnSe, los espectros FTIR se escanearon en la región del infrarrojo medio (4000–650 cm<sup>-1</sup>), realizando 16 escaneos con resolución de 4 cm<sup>-1</sup>, estos espectros se registraron como valores de absorbancia en cada punto de datos (Rohman *et al.*, 2015).

3. Desarrollo del modelo por PLS

V.3.1 Tratamiento matemático espectral

Los espectros fueron sometidos a una sustracción espectral que realiza de forma automática el software “Spectrum 6.3.4” empleado por el instrumento. Posteriormente mediante el software “OriginPro 9.8.0.2.” se realizó la corrección de línea base, el suavizado matemático del espectro, así como la obtención de la primera y segunda derivada del espectro, y su deconvolución para el caso de los espectros de mezclas (Smith *et al.*, 2011).

V.3.2 Modelado quimiométrico por PLS

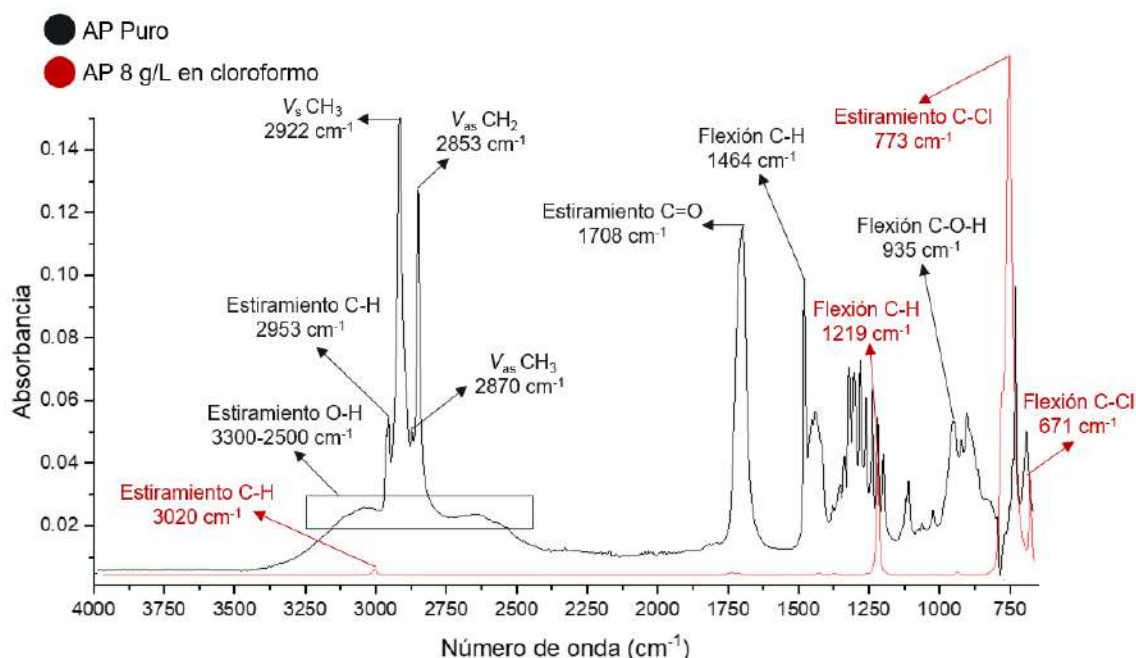
El modelo matemático fue planteado a partir de distintos parámetros y evaluando picos máximos de absorbancia para una longitud de onda específica, así como el área de integración de los mismos. Se enfocó el análisis en los picos que se encuentran aproximadamente en 1720-1706 cm<sup>-1</sup> correspondientes al estiramiento del enlace C=O, al igual que el pico en 3300-2500 cm<sup>-1</sup>

correspondiente al estiramiento del enlace O-H del grupo carboxilo en el ácido graso, así como del estiramiento C-H (NIST, 2018). La señal del ácido palmítico se identificó a través de la diferencia en la altura del pico entre su espectro puro y el correspondiente a la mezcla. La señal empleada solo fue la del estiramiento C=O en  $1740\text{ cm}^{-1}$  debido a que el cloroformo fue una interferencia en el uso del resto de las señales abundantes del AP. Otros factores que se consideraron en el modelado son los espectros derivados, la deconvolución gaussiana (para el traslapamiento de señales o picos) y una regresión PLS (Tasumi & Sakamoto, 2015).

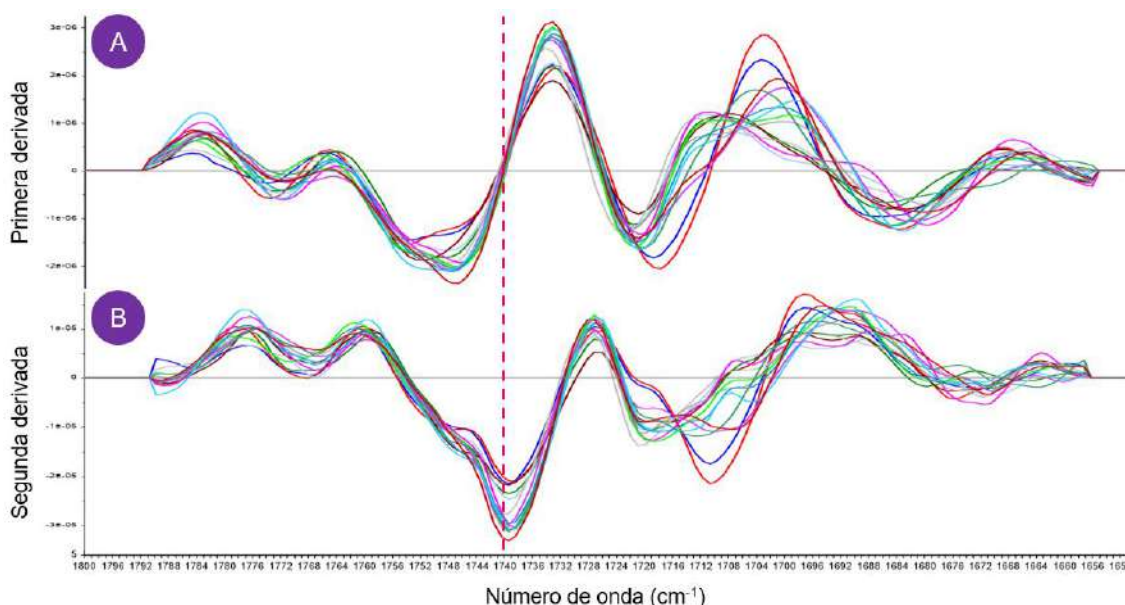
### V.3.3 Evaluación estadística del modelo quimiométrico

La validación del modelo se realizó con una prueba training/test set con el porcentaje de error cuadrático medio (%RMSE) y graficando la concentración real en el eje de las abscisas, y la concentración calculada con el modelo en el eje de las ordenadas (Sim & Jeffrey, 2019).

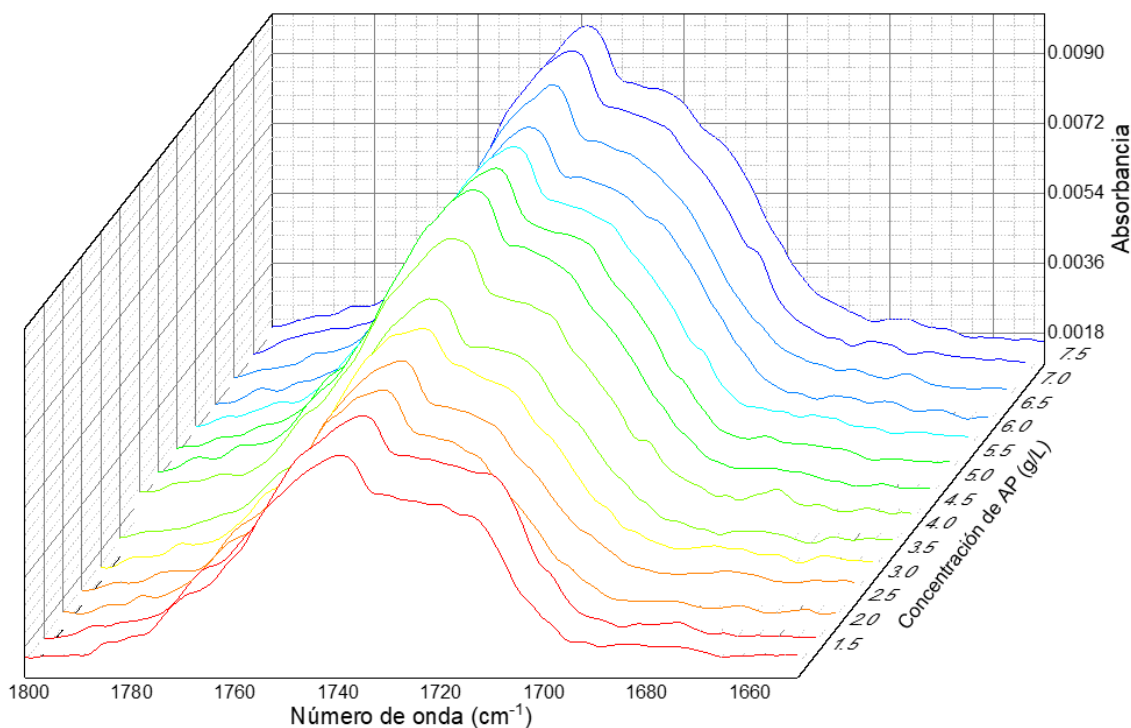
## RESULTADOS



**Figura VI.1.** Asignación de las bandas características en los espectros FTIR del AP puro y en solución.

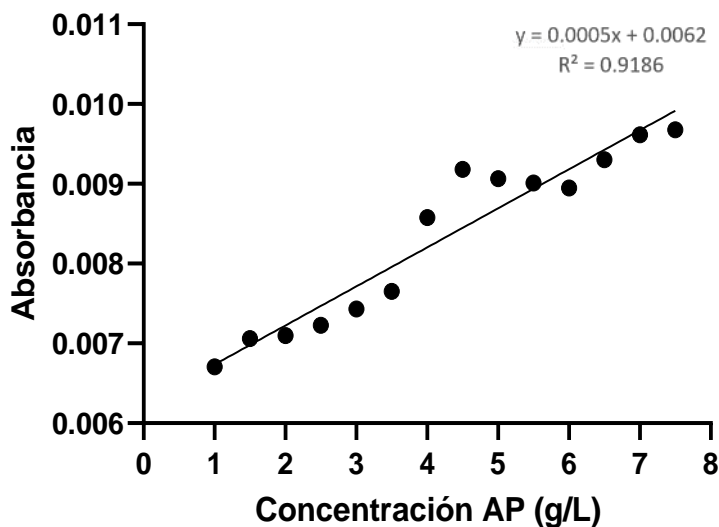


**Figura VI.2.** Derivadas de los espectros FTIR de la curva del AP obtenido con el método Savitzky-Golay con 20 puntos de suavizado, a) primera b) segunda.



**Figura VI.3.** Espectros FTIR sobre la banda del estiramiento C=O en el AP.

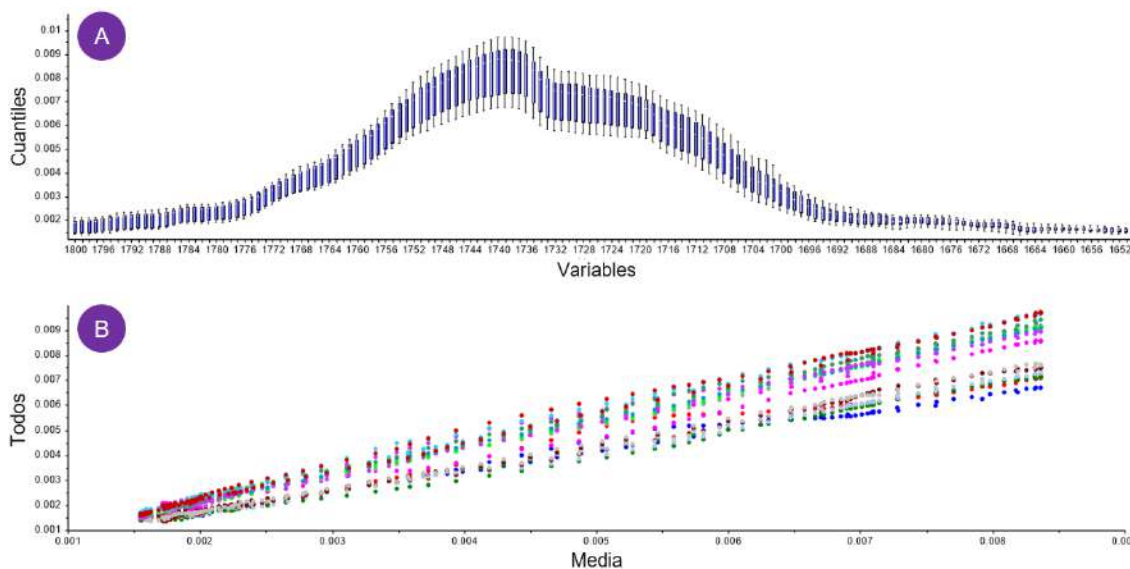




**Cuadro VI.1.** Parámetros de la curva de calibración.

$y = 0.0005x + 0.0062$		
Variable	Valor	Unidades
n	14	
a	0.0062	Abs
b	0.0005	Abs/gL <sup>-1</sup>
r	0.9584	Adimensional
LoD	1.1125	g/L
LoQ	1.8541	g/L
LL	8	g/L

**Figura VI.4.** Curva de calibración para el AP.



**Figura VI.5.** Análisis descriptivo de los espectros FTIR de la curva de calibración del AP, a) diagramas de caja y bigote b) efectos de la dispersión.

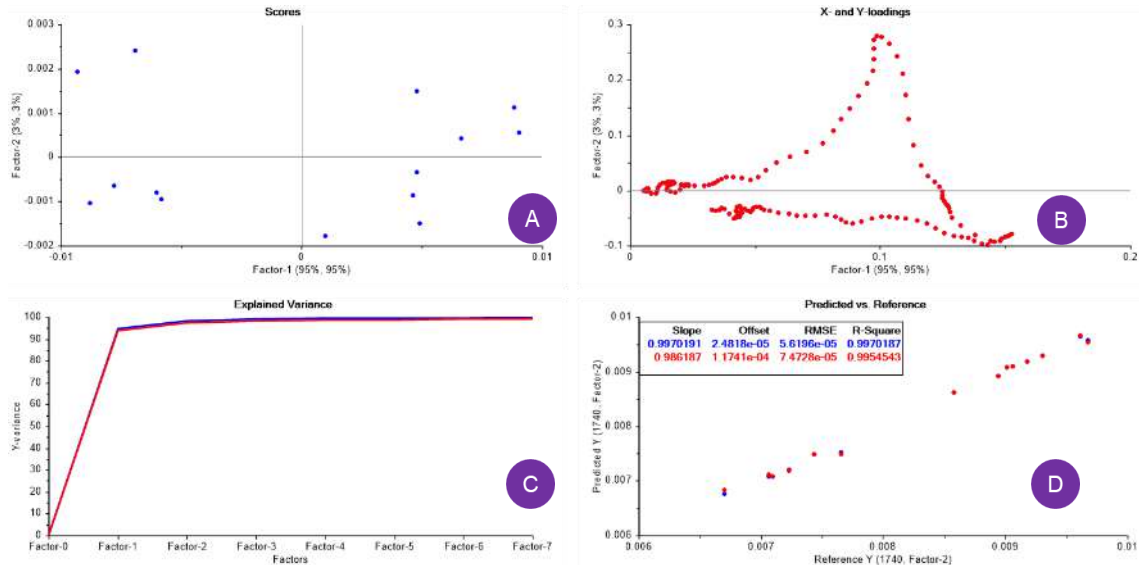


Figura VI.6. Representación general de los componentes del PLS. a) scores, b) loadings, c) varianza y d) prueba training/test set.

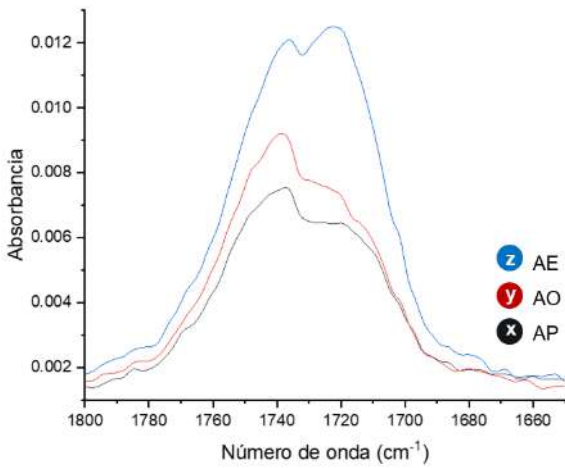


Figura VI.7. Espectros de los ácidos grasos a 8 g/L para el estudio de las proporciones.

A

$$\begin{cases} 0.26x + 0.32y + 0.42z = 0.010828 \\ z - x = 0.00429 \\ y - x = 0.00172 \end{cases}$$

Absorbancia de la mezcla de los 3 ácidos a 5 g/L 1:1:1

Sustitución

$$0.26x + 0.32(x + 0.00172) + 0.42(x + 0.00429) = 0.010828$$

Despeje Valor esperado

$$x = 0.008476 \quad x = 0.0084$$

$F_c =$  Factor de corrección

$$F_c = -7.6 \times 10^{-5}$$

B

$$AP_{Abs} = M_{Abs} - 2.428 \times 10^{-3}$$

$$y = 0.0005x + 0.0059$$

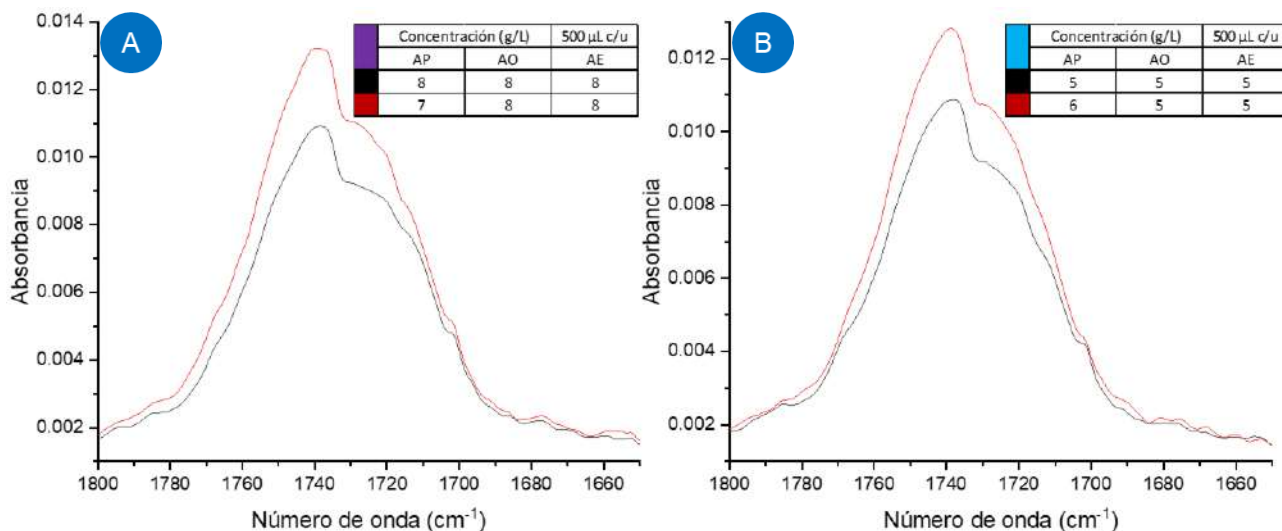
Sustitución

$$M_{Abs} - 2.428 \times 10^{-3} = 0.0005[AP] + 0.0059$$

C

$$[AP] = \frac{M_{Abs} - 8.328 \times 10^{-3}}{5 \times 10^{-4}}$$

Figura VI.8. Desarrollo del modelo. a) sistema de ecuaciones de 3x3, b) ecuación de la absorbancia de la AP, c) modelo para la cuantificación del AP.



**Figura VI.9.** Comparación de los espectros de mezclas ternarias cuando solo varía la concentración de AP y se mantiene constante AO y AE a) 8 g/L y b) 5 g/L.

## CONCLUSIONES

El ajuste a un modelo quimiométrico por PLS permitió la cuantificación de AP mediante FTIR-ATR obteniéndose una baja dispersión y, por tanto, siendo un método alternativo para la cuantificación de AP, sin embargo, su análisis cuantitativo en mezcla se ve limitado de manera dependiente de la concentración y proporción de cada ácido graso en la mezcla.

## BIBLIOGRAFÍA

- Balan, B., Dhaulaniya, A. S., Jamwal, R., Amit, Sodhi, K. K., Kelly, S., Cannavan, A., & Singh, D. K. (2020). Application of attenuated total reflectance-fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy coupled with chemometrics for detection and quantification of formalin in Cow Milk. *Vibrational Spectroscopy*, 107, 103033. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2020.103033>
- Calder, P. C. (2015). Functional roles of fatty acids and their effects on human health. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 39(1\_suppl). <https://doi.org/10.1177/0148607115595980>
- Carta, G., Murru, E., Banni, S., & Manca, C. (2017). Palmitic acid: Physiological role, metabolism and nutritional implications. *Frontiers in Physiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00902>
- Centro Nacional de Información Biotecnológica (2022). Resumen de compuestos de PubChem para CID 985, ácido palmítico. Recuperado el 16 de marzo de 2022 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Palmitic-acid>
- Chiu, H.-H., & Kuo, C.-H. (2020). Gas chromatography-mass spectrometry-based analytical strategies for fatty acid analysis in biological samples. *Journal of Food and Drug Analysis*, 28(1), 60–73. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.10.003>
- Du, L., Lu, W., Gao, B., Wang, J., & Yu, L. (L. (2019). Authenticating raw from reconstituted milk using Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. *Journal of Food Quality*, 2019, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2019/5487890>
- Ferreira, I. C., Aguiar, E. M., Silva, A. T., Santos, L. L., Cardoso-Sousa, L., Araújo, T. G., Santos, D. W., Goulart, L. R., Sabino-Silva, R., & Maia, Y. C. (2020). Attenuated total

- reflection-fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy analysis of saliva for breast cancer diagnosis. *Journal of Oncology*, 2020, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2020/4343590>
8. Loften, J. R., Linn, J. G., Drackley, J. K., Jenkins, T. C., Soderholm, C. G., & Kertz, A. F. (2014). Invited review: Palmitic and stearic acid metabolism in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97(8), 4661–4674. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7919>
  9. Mancini, A., Imperlini, E., Nigro, E., Montagnese, C., Daniele, A., Orrù, S., & Buono, P. (2015). Biological and nutritional properties of palm oil and palmitic acid: Effects on health. *Molecules*, 20(9), 17339–17361. <https://doi.org/10.3390/molecules200917339>
  10. Mas, C., Rubio, L., Valverde-Som, L., Sarabia, L. A., & Ortiz, M. C. (2020). Impact of the pretreatment of ATR-FTIR signals on the figures of merit when PLS is used. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 201, 104006. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2020.104006>
  11. NIST Standard Reference Data Program Collection (C) (2018) copyright by the U.S. Secretary of Commerce on behalf of the United States of America. All rights reserved.
  12. Piccinin, E., Cariello, M., De Santis, S., Ducheix, S., Sabbà, C., Ntambi, J. M., & Moschetta, A. (2019). *Role of oleic acid in the gut-liver axis: From diet to the regulation of its synthesis via stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1)*. MDPI. <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/10/2283/html>
  13. Rohman, A., Che Man, Y. B., & Nurrulhidayah, A. F. (2015). Fourier-transform infrared spectra combined with chemometrics and fatty acid composition for analysis of pumpkin seed oil blended into olive oil. *International Journal of Food Properties*, 18(5), 1086–1096. <https://doi.org/10.1080/10942912.2012.654564>
  14. Rohman, A., Windarsih, A., Riyanto, S., Sudjadi, Shuhel Ahmad, S. A., Rosman, A. S., & Yusoff, F. M. (2015). Fourier transform infrared spectroscopy combined with multivariate calibrations for the authentication of Avocado Oil. *International Journal of Food Properties*, 19(3), 680–687. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1039029>
  15. Salimon, J., Omar, T. A., & Salih, N. (2014). Comparison of two derivatization methods for the analysis of fatty acids and trans fatty acids in bakery products using Gas Chromatography. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/906407>
  16. Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J., & Silverstein. (2005). Infrared spectrometry. In *Spectrometric identification of Organic Compounds* (pp. 72–100). essay, John Wiley & Sons.
  17. Sim, S. F., & Jeffrey Kimura, A. L. (2019). Partial least squares (PLS) integrated Fourier transform infrared (FTIR) approach for prediction of moisture in transformer oil and lubricating oil. *Journal of Spectroscopy*, 2019, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2019/5916506>
  18. Smith, B. (2011). Proper use of spectral processing. In *Fundamentals of fourier transform infrared spectroscopy* (2nd ed., pp. 55–85). essay, CRC Press.
  19. Tasumi, M., & Sakamoto, A. (2015). Introduction to Experimental Infrared Spectroscopy. In *Introduction to experimental infrared spectroscopy* (2nd ed., pp. 110–112). essay, Wiley.

## EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD GASTROPROTECTORA DE LAS SEMILLAS DE *SCHINUS MOLLE* EN RATAS WISTAR

Cinthia Berenice González Cruz<sup>1</sup>, Yaraset López Lorenzo<sup>2</sup>, Jesús Arrieta Valencia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis y Díaz Mirón, Colonia Casco de Santo Tomás, Miguel Hidalgo, México City 11340, México, <sup>2</sup>Ingeniería en Tecnología Ambiental, Universidad Politécnica de Chiapas, Campus Suchiapa, Carretera Tuxtla Gutiérrez—Portillo Zaragoza km 21+500, Colonia Las Brisas, Suchiapa 29150, México.  
cinthiagc0315@gmail.com

### RESUMEN

*Schinus molle*, es una planta conocida en México como pirul, y es ampliamente utilizada en la terapéutica de padecimientos de índole cultural como son: el susto, mal de ojo, malos aires, etc. Destacando su empleo en la realización de limpiezas para tratar los padecimientos antes mencionados<sup>1</sup>, sin embargo, también se reporta que en algunos países de América Latina se utiliza para tratar infecciones del tracto urinario, trastornos gastroduodenales, infecciones de las vías respiratorias, y úlceras, entre otras<sup>2</sup>. Las úlceras gástricas son una de las enfermedades gastrointestinales más frecuentes con un elevado índice de morbilidad a nivel mundial, a pesar de la existencia de diversos tipos de fármacos para su tratamiento<sup>3</sup>. En la terapéutica se incluyen fármacos antiácidos, citoprotectores, análogos de prostaglandinas, antagonistas de los receptores para histamina H<sub>2</sub> e inhibidores de la bomba de protones. Siendo estos últimos los más utilizados, no obstante, estudios recientes han demostrado que su uso prolongado conlleva efectos adversos irreversibles como daño neurológico, y cáncer de páncreas. Por lo anterior, es evidente la necesidad de búsqueda de alternativas farmacológicas. Considerando que no se había reportado evidencia del efecto gastroprotector de *Schinus molle*, el objetivo del presente trabajo fue determinar si las semillas de *Schinus molle* ejercían actividad gastroprotectora en un modelo de ratas Wistar. Para inducir las lesiones gástricas los animales recibieron etanol (0.5mL/100g) por vía oral. A partir de las semillas de *Schinus molle* se prepararon tres extractos utilizando los disolventes de hexano, diclorometano y metanol. Del extracto de metanol se obtuvo muy poca cantidad por lo que no fue evaluado. Mientras que los extractos de hexano y diclorometano fueron evaluados a las dosis de 30 y 100 mg/kg, y alcanzaron un 99% de gastroprotección a la dosis de 100 mg/kg, siendo igual de activos que el fármaco de referencia, carbenoxolona, a la misma dosis. Considerando que se tenía mayor rendimiento del extracto hexánico, este se separó por cromatografía en columna obteniendo tres fracciones (F1, F2 y F3), dos de las tres fracciones (F1 y F2) proporcionaron más del 99% de gastroprotección. Se concluye que las semillas de *Schinus molle* ejercen actividad gastroprotectora, lo que sustenta su uso tradicional con este propósito y contiene más un compuesto activo.

### INTRODUCCIÓN

Las úlceras pépticas son lesiones en el tracto gastrointestinal que atraviesan la mucosa gástrica hasta alcanzar la muscular de la mucosa o partes más profundas como la serosa<sup>4</sup> desencadenando complicaciones graves como sangrado o perforación, con un alto riesgo de mortalidad<sup>5</sup>. Este padecimiento se desarrolla cuando existe un desequilibrio entre los factores protectores (capa de moco-bicarbonato, prostaglandinas, flujo sanguíneo, óxido nítrico, etc.) y agresores (jugo gástrico, consumo de alcohol, tabaco y algunos medicamentos tales como los AINE's, entre otros) de la mucosa gástrica<sup>6</sup>. Se estima que esta enfermedad se presenta del 5 al 10% de la población en algún periodo de su vida<sup>7</sup>.

Actualmente existen fármacos para tratar la úlcera péptica; sin embargo, estos no han sido del todo eficaces y se han asociados a muchos efectos adversos en el organismo; tal es el caso del omeprazol (inhibidor de la bomba de protones), el cual es uno de los más prometedores para el tratamiento de las úlceras pépticas, sin embargo, estudios recientes han demostrado que su uso prolongado puede causar efectos adversos irreversibles. Por ejemplo, disminuyen la absorción de vitamina B<sub>12</sub> y de esta forma generar demencia, daño neurológico, anemia, además de hipergastrinemia<sup>8</sup>, infarto agudo de miocardio y cáncer de páncreas<sup>9</sup>. Por lo anterior, se tiene la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas para su tratamiento con menos efectos adversos, siendo esta el uso de



plantas medicinales y considerando que a lo largo de la historia han constituido una base importante para el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos<sup>10</sup>. Ejemplo de ellos está la planta de *Schinus molle*, que se utiliza en la medicina tradicional mexicana para tratar infecciones del tracto urinario y de los sistemas respiratorio, digestivo y genitourinario, y para tratar úlceras cutáneas (como agente diurético y tónico) y trastornos gastroduodenales<sup>2</sup>, sin embargo, no existe ninguna evidencia científica de la actividad gastroprotectora que compruebe su uso tradicional que se le da a esta planta, es por ello que el objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio biodirigido de *S. molle* para comprobar la actividad gastroprotectora de sus extractos y ciertas fracciones en un modelo de lesiones gástricas.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Animales

La evaluación de los extractos y fracciones obtenidos de las hojas de *Schinus molle* fue realizada en ratas Wistar macho (180 y 220 g) adquiridas del Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana campus Xochimilco, Ciudad de México. De acuerdo a los protocolos experimentales, las ratas se colocaron en ayuno durante 24 horas previo a la experimentación en cajas individuales de acero inoxidable con piso de malla de alambre para evitar la coprofagia, pero con libre acceso al agua. El presente estudio fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, con número de registro ESM.CICUAL-01/14-03- 2018. El cuidado y manejo de los animales se realizó en conformidad con la norma oficial mexicana para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Todas las evaluaciones se llevaron a cabo con 7 animales por grupo.

### Material vegetal

Las semillas de *Schinus molle* se recolectaron en Xochitenco Chimalhuacán, en el Estado de México, México durante el mes de marzo de 2022. La planta fue identificada y registrada por el Biol. Manuel de Jesús Gutiérrez Morales del Departamento de Flora del Herbario Chip, del Jardín Botánico de la Secretaría de Protección Ambiental, Vivienda e Historia Natural del Estado de Chiapas, México. Un ejemplar de la colección original se puede encontrar con el número de registro 50327.

### Obtención de los extractos y fracciones de *Schinus molle*

Las semillas de *S. molle* se secaron a temperatura ambiente bajo la sombra y posteriormente fueron trituradas. 9.5 kg de las semillas, se extrajeron mediante un proceso de maceración a temperatura ambiente ( $22 \pm 2$  °C). Para ello las semillas primero se pusieron en contacto con hexano (14 L) durante tres días, pasado este tiempo se filtró y el filtrado fue concentrado con la ayuda de un rota evaporador a presión reducida, esta operación se repitió dos veces más, posteriormente las semillas fueron extraídas con diclorometano (14 L), siguiendo la metodología antes descrita, obteniéndose 529 y 332 g de extracto de hexano y diclorometano, respectivamente. Cada uno de estos extractos se evaluaron en el modelo de lesiones gástricas inducidas con etanol en ratas a dosis de 30 y 100 mg/kg vía oral. Dado que los extractos de hexano y diclorometano mostraron una actividad gastroprotectora muy similar en ambas dosis (Tabla 1), se decidió continuar el estudio biodirigido con el extracto de hexano debido a un mayor rendimiento. Este extracto fue separado por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando un sistema de elución con hexano y mezclas de hexano-acetato de etilo con cambios grandes de polaridad (9:1, 7:3, 5:5, respectivamente), obteniéndose 3 fracciones, las cuales se evaluaron en el modelo de lesiones gástricas.

### Modelo de lesiones gástricas inducidas con etanol

Los extractos (30 y 100 mg/kg), fracciones (100 mg/kg), carbenoxolona (100 mg/kg, fármaco de referencia) ó el vehículo (Tween 80 al 0.5%) se administraron por vía oral (0.5 mL/100 g) a los diferentes grupos de animales de acuerdo a la evaluación correspondiente, previo ayuno de 18-24 hrs. Treinta minutos después, a cada uno de los animales se les administró 1 mL de etanol para provocar lesiones gástricas en el estómago. Dos horas después los animales se sacrificaron en una cámara de CO<sub>2</sub> e inmediatamente se realizó la disección de los estómagos, los cuales se llenaron con formaldehído al 2% y posteriormente colocados en un recipiente con la misma solución durante



5 minutos con el fin de fijar la capa interna y externa del estómago, cinco minutos después los estómagos se abrieron a lo largo de la curvatura mayor para posteriormente medir el área de las lesiones con la ayuda de un microscopio estereoscópico (x 10) provisto de un micrómetro ocular. La suma total del área de las lesiones de cada estómago representa el índice de úlcera, a partir de este resultado se calculó el porcentaje de gastroprotección siguiendo la siguiente fórmula:

$$\% \text{ gastroprotección} = \left( \frac{\overline{IUC} - \overline{IUT}}{\overline{IUC}} \right) \times 100$$

Donde:

$\overline{IUC}$  es el promedio del índice de úlcera control

$\overline{IUT}$  es el promedio índice de úlcera de los animales tratados

Análisis estadístico

Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  error estándar de la media (EEM) de 7 animales por grupo. Las diferencias entre los grupos de tratamiento fueron analizadas utilizando la prueba de Kruskal-Wallis seguida por la prueba de Dunn. Para comparar dos grupos se empleó la prueba U de Mann Whitney, considerando una diferencia significativa con un valor de  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

Actividad gastroprotectora de los extractos de hexano y diclorometano de *Schinus molle*

El tratamiento oral con el extracto de hexano y diclorometano de las semillas *S. molle* a las dosis de 30 y 100 mg/kg demostraron actividad gastroprotectora al inhibir el daño gástrico provocado por etanol (Tabla 1). El máximo efecto de ambos extractos se observó a la dosis de 100 mg/kg (99.03  $\pm$  0.28% y 99.32  $\pm$  0.28% de gastroprotección, respectivamente). La diferencia entre estos extractos no fue estadísticamente significativa a ninguna de las dosis evaluadas.

Por otro lado, al comparar los resultados de la dosis de 100 mg/kg de los extractos de hexano y diclorometano con el fármaco de referencia no hubo diferencia significativa (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto gastroprotector del extracto de hexano y diclorometano

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	n	Gastroprotección (%)	Rendimiento (%)
Control de vehículos	0.00	7	0	
Extracto de hexano	30	7	75.57 $\pm$ 3.65 *	5.56
	100	7	99.03 $\pm$ 0.28	
Extracto de diclorometano	30	7	76.91 $\pm$ 1.44 #	3.49
	100	7	99.32 $\pm$ 0.28	
Carbenoxolona	100	7	94.90 $\pm$ 0.41	

Los datos representan el promedio  $\pm$  E.E.M. (n = 7). \* $p < 0.05$  prueba U de Mann-Whitney para el extracto de hexano, # para el extracto de diclorometano.

Actividad gastroprotectora de las fracciones del extracto de diclorometano

Del fraccionamiento por cromatografía en columna del extracto de hexano se obtuvieron un total de 3 fracciones de diferentes polaridades (F1, F2 y F3), dichas fracciones fueron evaluadas en el modelo de lesiones gástricas antes mencionado. Las fracciones F1 y F2 presentaron actividad gastroprotectora a 100 mg/kg (99.37  $\pm$  0.44% y 99.62  $\pm$  0.25% de gastroprotección, respectivamente). El porcentaje de gastroprotección de cada una de estas fracciones fue el mismo que la del fármaco de referencia (Tabla 2). Por tanto, F1 y F2 son aparentemente tan eficaces como la carbenoxolona. por otro lado, la F3 no presentó actividad gastroprotectora.

Tabla 2. Efecto gastroprotector de las fracciones del extracto de hexano

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	n	Gastroprotección (%)
F1	100	7	99.37 ± 0.44
F2	100	7	99.62 ± 0.25
F3	100	7	37.24 ± 4.13 *
Carbenoxolona	100	7	99.67 ± 0.21

Los datos representan el promedio ± E.E.M (n = 7). Prueba de comparación múltiple de Dunn seguida de la prueba de Kruskal-Wallis.

## CONCLUSIONES

Las semillas de *S. molle* inhibe las lesiones gástricas inducidas por etanol, demostrando por primera vez una evidencia científica de su actividad gastroprotectora. Los extractos de hexano y diclorometano mostraron un efecto gastroprotector de casi el 100 % en el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol, por lo que tiene más de un compuesto activo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx> (Acceso 15 de febrero de 202
2. O. Belhoussaine, C. El Kourchi, H. Harhar, A. Bouyahya, A. El Yadini, F. Fozia, A. Alotaibi, R. Ullah, M. Tabyaoui, "Chemical Composition, Antioxidant, Insecticidal Activity, and Comparative Analysis of Essential Oils of Leaves and Fruits of *Schinus molle* and *Schinus terebinthifolius*". *Evid. Based Complement. Altern. Med.*, Vol. 30, 2022, pp. 4288890.
3. O. Guzmán-Gómez, R. V. García-Rodríguez, L. Quevedo-Corona, R. Pérez-Pastén, N. L. Rivero-Ramírez, E. RíosCastro, S. Pérez-Gutiérrez, J. Pérez-Ramos, G. A Chamarro-Cevallos. "Amelioration of etanolinduced gastric ulcers in rats pretreated with phycobiliproteins of *Arthrospira (Spirulina)Maxima*", *Nutrients.*, Vol. 10,6, 2018, pp. E763.
4. M. Y. George, A. Esmat, M. G. Tadros, E. El-Demerdash. "In vivo cellular and molecular gastroprotective mechanisms of chrysin; Emphasis on oxidative stress, inflammation and angiogenesis". *Eur. J. Pharmacol.*, Vol. 818, 2018, pp. 486-498.
5. E. Sverdén, L. Agréus, J. M. Dunn, J. Lagergren. "Peptic ulcer disease". *BMJ (Clinical research ed.)*, Vol. 367, 2019, pp. I5495.
6. M. E. Sánchez-Mendoza, Y. López-Lorenzo, L. Cruz-Antonio, D. Arrieta-Baez, M. C. Pérez-González, J. Arrieta. "First Evidence of Gastroprotection by *Schinus molle*: Roles of Nitric Oxide, Prostaglandins, and Sulfhydryls Groups in Its Mechanism of Action". *Molecules (Basel, Switzerland)*, Vol. 27, 21, 2022, pp. 7321.
7. M. E. Lauret, M. Rodriguez-Pelaez, I. Perez, L. Rodrigo. "Peptic Ulcer Disease. J. Gastroenterol". *Hepatol. Dis.*, Vol. 1, 2015, pp. 2–8.
8. M. Abreu Miranda, M. Lemos, K. Alves Cowart, D. Rodenburg, J. D. McChesney, M. M. Radwan, N. A. Furtado, J. Kenupp Bastos. "Gastroprotective activity of the hydroethanolic extract and isolated compounds from the leaves of *Solanum cernuum* Vell". *J. Ethnopharmacol.*, Vol. 72, 2015, pp. 421–429.
9. T. Hari Babu, K. Manjulatha, G. Suresh Kumar, A. Hymavathi, A. K. Tiwari, M. Purohit, J. Madhusudana Rao, K. Suresh Babu. "Gastroprotective flavonoid constituents from *Oroxylum indicum* Vent". *Bioorg Med Chem Lett.*, Vol. 120, 2010, pp. 117-120.
10. Y. C. Peng, C. L. Lin, W. Y. Hsu, I. T. Lu, H. Z. Yeh, C. S. Chang, C. H. Kao. "Proton Pump Inhibitor Use is Associated With Risk of Pancreatic Cancer: A Nested Case-Control Study". *Dose. Response.*, Vol. 16, 4, 2018, pp. 1559325818803283.

Agradecimiento: Secretaría de Investigación y Posgrado, SIP 20230361

## PRODUCCIÓN DE BIOSÍLICE AMORFA DE CÁSCARA DE ARROZ PARA SU EMPLEO COMO REFUERZO EN COMPÓSITOS

Erica Arreola-García, Salomón R. Vásquez-García, Nelly Flores-Ramírez, Diana S. Ocegueda Vega, Raúl Espinoza-Herrera

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich., 58060, México.  
1051569k@umich.mx; [salomon.vasquez@umich.mx](mailto:salomon.vasquez@umich.mx)

### RESUMEN

La cáscara de arroz (CA) que es la cubierta protectora dura del grano de arroz es considerada un material de desecho, con abundante disponibilidad en México, siendo el estado de Michoacán el tercer lugar en producción de arroz, del cual aproximadamente el 20% del peso del arroz es CA, en la cual la celulosa, lignina y biosílice representan el 50, 30 y 20 % en peso respectivamente. La biosílice es utilizada como agente reforzante en polímeros naturales como la colofonia que se obtiene de los pinos, para obtener materiales verdes. Así, este proyecto se enfoca a la obtención de un compósito donde la biosílice amorfa a partir de la CA se integra como refuerzo a la colofonia. Para esto, la biosílice se extrae de la CA al tratarla con una solución de HCl al 0.5 M y después eliminar los restos orgánicos al someterla a descomposición térmica en una mufla a 600°C durante 2 horas, siendo los compósitos de colofonia-biosílice obtenidos al mezclar y enseguida hacer vaciados variando de la biosílice de 5 a 20% la concentración en peso. Los análisis de los componentes y compósitos se realizaron por FTIR, DRX, MEB-EDS, Dureza (SHD) y TGA; obteniendo las señales características de la sílice a 1040 y 800  $\text{cm}^{-1}$  derivado de las tensiones de los grupos Si-O-Si y Si-O respectivamente, teniendo la biosílice amorfa con un pico ancho centrado en  $2\theta=22^\circ$ , donde se determinó que las partículas de biosílice poseían una geometría irregular de un tamaño de 1-50  $\mu\text{m}$ . El compósito al 20% de biosílice aumentó su dureza en 1.5%, con un incrementó en su resistencia térmica de 15°C respecto a colofonia pura. Así, basado en los resultados de esta investigación, la CA a través de su biosílice amorfa posee un alto potencial como material de refuerzo en polímeros naturales, al actuar como tal en la colofonia.

### INTRODUCCIÓN

Actualmente se produce una gran cantidad de residuos agrícolas, como la cáscara de arroz (CA), que no tiene ningún valor comercial y su eliminación es un gran desafío económico y ambiental. En su mayoría estos residuos se dejan en los campos después de las cosechas y se utilizan como forraje o se incineran para su eliminación. Sin embargo, estos procesos tienen impactos significativos en el medio ambiente, debido a que la combustión genera una gran cantidad de gases de efecto invernadero y cenizas<sup>1</sup>. Sin embargo, en condiciones de combustión controlada, la materia orgánica volátil en la cáscara de arroz que consiste en celulosa y lignina se elimina, mientras se mantiene la ceniza residual predominantemente compuesta de sílice amorfa (biosílice) con un tamaño de partícula muy fina con alta pureza y de estructura celular microporosa<sup>2</sup>. Esta biosílice se ha empleado como agente de refuerzo en polímeros como el caucho natural<sup>3</sup>, alcohol de polivinilo<sup>4</sup> y compuestos de poliuretano/quitina/colofonia dando excelentes resultados<sup>5</sup>.

La colofonia, también conocido como brea, es un exudado natural de los árboles de pino, es un recurso natural renovable, abundante y de bajo costo, que se obtiene del proceso de destilación fraccionada de la resina de pino, la cual se ha utilizado ampliamente para fabricar compuestos de alto rendimiento como adhesivos<sup>6</sup>, revestimientos<sup>7</sup> y plásticos de base biológica<sup>8</sup>. Por lo anterior, este trabajo se enfoca a la obtención y estudio físico de biosílice amorfa, a partir de la cáscara de arroz y la aplicación de esta como refuerzo en la colofonia, para conseguir compósitos colofonia-biosílice (CB).

## PARTE EXPERIMENTAL

### Materiales

La cáscara de arroz fue donada por la organización “Arroceros del Valle del Márquez” S.P.R. de R.L. ubicada en el municipio de Lombardía, Michoacán. La colofonia se obtuvo de la procesadora de resinas “La Soledad” S.A. de C.V. ubicada en ciudad industrial, Morelia, Michoacán. El HCl se adquirió de Sigma Aldrich y se preparó una solución de HCl 0.5M.

### Obtención de Biosílice a partir de la cáscara de arroz

La CA se lavó con agua destilada y se secó a temperatura ambiente, se molió y tamizó, utilizando las partículas con un tamaño menor a 250  $\mu\text{m}$ . La harina de cáscara de arroz (HCA) se trató con HCl 0.5 M a 60 °C por 30 min y se lavó con agua destilada hasta neutralizar. La HCA pretratada se colocó en un horno a 105 °C por 4 h, obteniendo una HCA anhidra. La HCA anhidra se colocó en un crisol de porcelana y se introdujo en una mufla a 600°C durante 2 horas. La biosílice obtenida bajo estas condiciones tiene una aplicación potencial como relleno en plásticos y compuestos de caucho<sup>9</sup>.

### Elaboración de los compósitos

Los compósitos se obtuvieron mezclando colofonia con biosílice. Para esto, se colocó una charola de aluminio con la muestra de colofonia sobre una placa de calentamiento a 90 °C. Se agregó la biosílice utilizando 5, 10, 15 y 20 % en peso, la mezcla se homogenizó con agitación y se vertió en los moldes. Obteniendo CB0, CB5, CB10, CB15 y CB20.

### Caracterización

La Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se realizó directamente por reflectancia total atenuada (ATR) en un equipo Tensor 27 Bruker, con una lectura del número de onda de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . La difracción de rayos X (DRX) se realizó en un equipo Advance Davinci modelo D8, en el rango de  $2\theta=5-50^\circ$  en pasos de  $2^\circ/\text{min}$ . El análisis morfológico se realizó en un Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) JSM-6400, a 15 KeV, a 23°C. El análisis térmico de los compósitos se llevó a cabo por DSC-TGA simultáneo utilizando un equipo Netzsch STA 449-F3 Jupiter, con una rampa de calentamiento de 10°C/min de 30 hasta 600°C a flujo de 20 ml/min de  $\text{N}_2$ . La dureza se midió usando un Durómetro de Escala Shore (SHD) PosiTector, a 23 °C y alrededor del 50% de humedad relativa.

## RESULTADOS

### Obtención de biosílice a partir de la cáscara de arroz

La Tabla 1 indica los valores estadísticos de la obtención de biosílice a partir de la cáscara de arroz empleando 6 muestras, las cuales dan una media aritmética de 20.82 % del porcentaje de peso en peso (%p/p) de biosílice. Al comparar este resultado de biosílice con lo reportado por otros autores como Bakar, Requena y Xue (16, 17 y 20 %p/p)<sup>9-11</sup>, se establece que la cantidad de biosílice obtenida en el presente trabajo es ligeramente superior 4 %p/p, lo que indica que hubo una buena reproducibilidad del método empleado.

Tabla 1. Datos estadísticos de la obtención de biosílice.

Muestra	CA (g)	Biosílice (g)	Biosílice (%p/p)
1	3.62	0.73	20.23
2	3.61	0.75	20.89
3	3.69	0.78	21.08
4	3.68	0.75	20.40
5	3.69	0.78	21.18
6	3.54	0.75	21.12
<b>Estadística descriptiva</b>			
<b>Media aritmética:</b>			20.82
<b>Desviación estándar:</b>			00.40
<b>Varianza:</b>			00.16

### FTIR de la cáscara de arroz y su biosílice

En la Figura 1a, 1b y 1c se exponen los espectros IR de la cáscara de arroz, cáscara de arroz pretratada y biosílice, respectivamente. En la Figura 1a se observa una señal ancha a 3336  $\text{cm}^{-1}$  que

corresponde a las tensiones de vibración de los grupos -OH aportados por la fracción orgánica y que corresponden a las vibraciones de estiramiento en la molécula de celulosa. Se aprecia otra señal a  $1590\text{ cm}^{-1}$  del grupo acetilo ( $\text{C-O-CH}_3$ ), relacionado a la lignina<sup>10</sup>, adicionalmente existe un diplete a  $1040$  y  $800\text{ cm}^{-1}$  de mayor y menor intensidad debido a O-Si-O por sus estiramientos de enlaces asimétrico y simétrico respectivamente. En la Figura 1b se observan las señales a  $3336$  y a  $1590\text{ cm}^{-1}$  por -OH y C-O-CH<sub>3</sub> de menor intensidad respecto a la CA natural, ya que el pretratamiento con HCl ayuda a romper la estructura del tejido y a liberar los diferentes componentes amorfos<sup>10</sup>, las señales a  $1040$  y  $800\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a Si-O-Si presentan una intensidad media. En la Figura 1c no se observan las señales a  $3336\text{ cm}^{-1}$  y a  $1590\text{ cm}^{-1}$  (-OH, C-O-CH<sub>3</sub>), en contraste se observan las señales a  $1040$  y  $800\text{ cm}^{-1}$  intensificadas, con lo anterior se evidencia la eliminación de la mayor cantidad del material orgánico y la presencia de biosilíce.

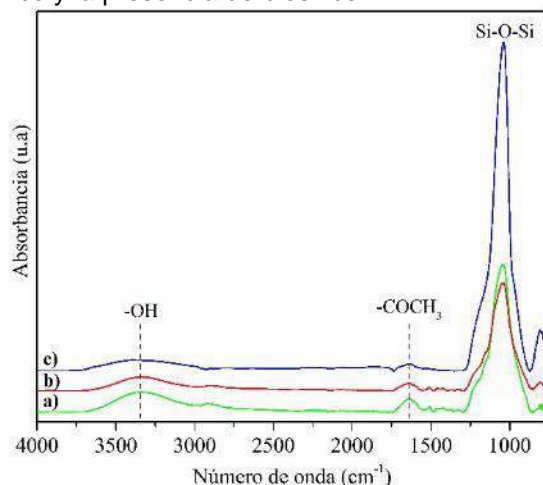


Figura 1. Espectro infrarrojo comparativo de a) CA, b) CA pretratada y c) biosilíce.

#### DRX de la cáscara de arroz y su biosilíce

En la Figura 2a y 2b se muestran los patrones de difracción de rayos X de polvo de biosilíce y CA respectivamente. En la Figura 2a se observa un pico ancho difuso que oscila entre  $15$  y  $30^\circ$  indicando una estructura desordenada, con intensidad máxima en  $2\theta = 22^\circ$ , lo que confirma la naturaleza amorfa de la biosilíce<sup>9</sup>. En la Figura 2b se observan los picos cristalinos típicos de la celulosa ( $2\theta$ :  $15$ – $16^\circ$ ,  $22^\circ$  y  $34^\circ$ ) según lo informado por Collazo<sup>12</sup>, la celulosa representa el mayor porcentaje de la composición de la cáscara de arroz.

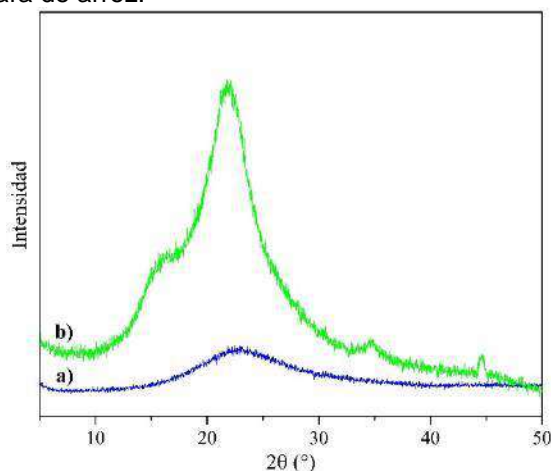


Figura 2. Patrones de difracción de rayos X de a) biosilíce y b) CA.

#### MEB de la biosilíce

En la Figura 3a se observa que la morfología de la biosilíce obtenida de la CA es irregular con un tamaño de la partícula de  $1$  a  $50\text{ }\mu\text{m}$ . La Figura 3b muestra que a su vez las partículas de la biosilíce están conformadas de nanopartículas esféricas, formando aglomerados<sup>13</sup>. La presencia de estas



partículas esféricas de tamaño nanométrico conduce a una estructura altamente porosa con una distribución de partículas homogénea. La Figura 3c a través del perfil del espectro de dispersión de energía indican la presencia predominantemente elementos como el Si en las partículas de biosílice.

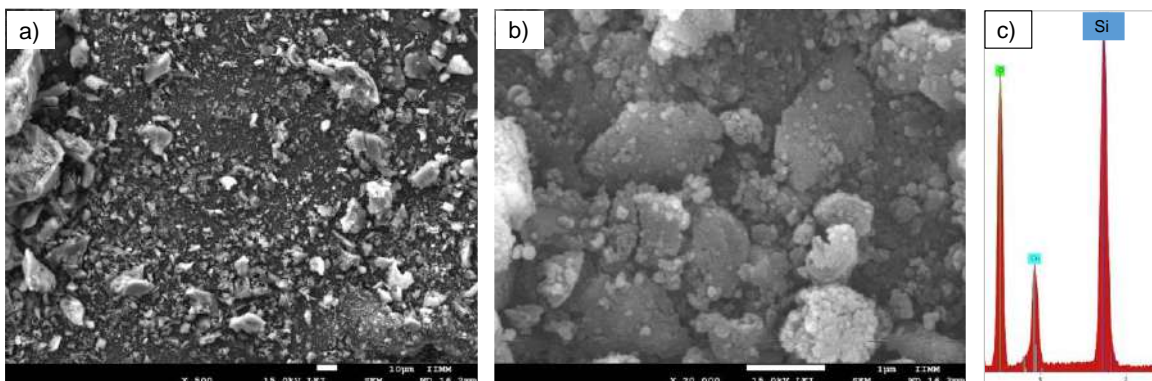


Figura 3. Micrografías de biosílice a) 500x, b) 20 000x y c) EDS de las superficies.

### Caracterización de los compósitos

La Figura 4 muestra los compósitos a base de colofonia-biosílice. Estos compósitos son homogéneos, presentan brillo y sin grietas. Esta misma situación la reporta Zhu y colaboradores al emplear colofonia-polvo de bambú<sup>16</sup>. La transparencia disminuye al incrementarse la concentración de la biosílice; así la muestra CB0, con mayor concentración de colofonia (100%) es más transparente que la CB20, que contiene el menor contenido de colofonia (80%). Esto coincide con otros trabajos como el de Aldas<sup>14</sup>.



Figura 4. Compósitos colofonia-biosílice CB0-CB20.

### Análisis térmico

La estabilidad térmica de los compósitos se analiza por medio de las curvas termogravimétricas de TGA presentes en la Figura 5, que están relacionadas con su primera derivada DTG que se muestra en la Figura 6. Algunos datos selectos de estas Figuras se resumen en la Tabla 2, en esta tabla  $T_{5\%}$  indica la temperatura a la cual se pierde 5% en peso de muestra,  $T_{max}$  indica la temperatura de pérdida máxima de peso, mientras  $R_{T_{max}}$  denota la tasa de pérdida de peso en la  $T_{max}$ .



Tabla 2. Datos relevantes de TGA para los compósitos CB0-CB20.

Muestra	T <sub>5%</sub> [°C]	T <sub>max</sub> [°C]	R <sub>Tmax</sub> [% min <sup>-1</sup> ]	Masa residual a 600 °C [%]
CB0	235.0	330	16.0	1.6
CB5	193.3	288	7.2	4.9
CB10	193.5	321	6.9	10.4
CB15	203.1	334	7.5	14.6
CB20	200.8	327	7.0	20.0

En la Figura 5 se observa la muestra CB0, donde la temperatura de inicio de degradación se sitúa en 200 °C, la temperatura de degradación máxima está en 330 °C y la temperatura de finalización de la degradación se encuentra en 450 °C. En el rango de 200 a 450 °C ocurre la descomposición térmica de la colofonia, y en este rango hay una pérdida de masa del 98.19%, que se atribuye a los ácidos abiético y pimárico de acuerdo a lo reportado por Pietrzak y Fink<sup>15,16</sup> quienes también encontraron una descomposición de la colofonia entre 200 a 450°C. Comparado con CB0, después de la incorporación de biosílice, T<sub>5%</sub> disminuye al aumentar el contenido de biosílice, lo que indica que la temperatura de descomposición inicial disminuye en CB5, CB10, CB15 y CB20. Esto se debe a la baja temperatura de descomposición de biosílice. Además, el rendimiento residual aumentó del 1.6 % (CB0) al 20.0 % (CB20), y la R<sub>Tmax</sub> disminuyó del 16.0 % min<sup>-1</sup> (CB0) a 7.0 % min<sup>-1</sup> (CB20). Lo anterior sugiere una interacción sinérgica entre la biosílice y la colofonia. Lo que indica una mejora en la degradación térmica de los compósitos.

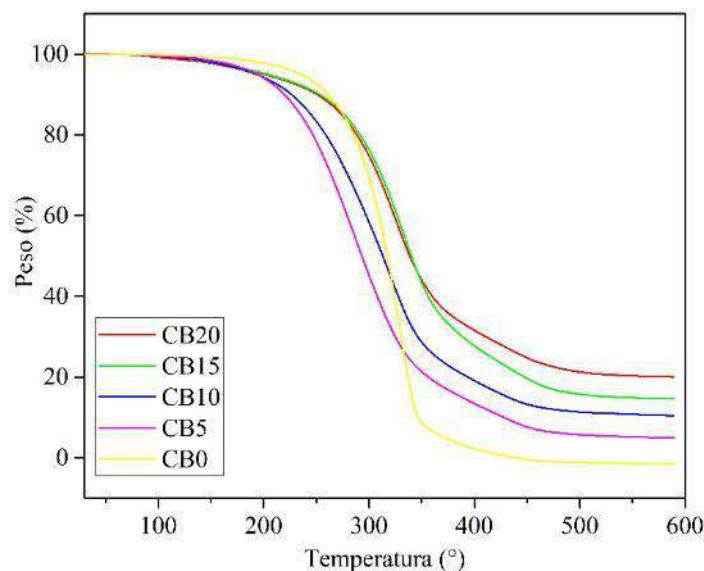


Figura 5. Curvas TGA de CB0-CB20.

Para conocer con detalle los comportamientos térmicos indicados en la Figura 5, se anexa la Figura 6 con los comportamientos térmicos correspondientes a la primera derivada de las curvas termogravimétricas CB0, CB5, CB10, CB15 y CB20. En estas derivadas provenientes de los termogramas se aprecian dos importantes corrimientos en la temperatura de degradación, uno posee la degradación máxima para CB0 y CB15 de 330 a 334 °C respectivamente, y otro, con el cual se aprecia la degradación para CB0 y CB20 se ubica en el rango de 450 a 500°C respectivamente, lo que muestra un aumento en la resistencia térmica de CB15 y CB20 respecto a CB0. Este resultado se debe a la positiva interacción colofonia-biosílice mejorando la estabilidad térmica de los compósitos. Al mismo tiempo, también indica que la estructura y la capacidad de respuesta de colofonia mejoran al agregar biosílice. Estos resultados son similares en lo reportado por Zhu<sup>17</sup>. Así se determina que existe una mejora en el comportamiento térmico con el incremento de la biosílice

en la matriz de colofonia, lo cual se intensifica para cada una de las muestras a mayores concentraciones de biosílice.

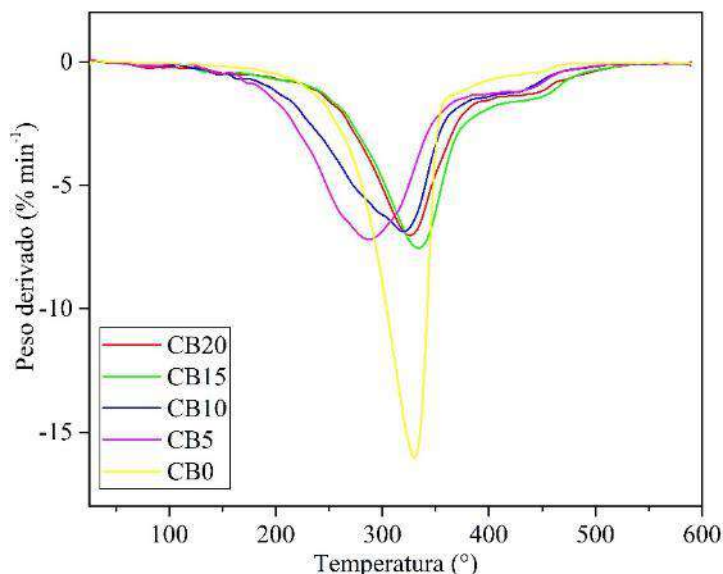


Figura 6. Curvas DTG de CB0-CB20.

**Dureza shore**

La Figura 7 muestra los valores de dureza shore A para los compósitos CB0-CB20. Esta dureza aumentó en CB0 a CB20 de 96.8 a 98.3, y se mantuvo constante al aproximarse a 15 %p/p (entre CB10 y CB15), alcanzando su máximo CB20. Otros trabajos reportan que las interacciones matriz-relleno mejoran, cuando las partículas de relleno se humedecen, ya que la mayoría de los polímeros son hidrófobos, muy viscosos y no humedecen eficazmente al relleno<sup>18</sup>.

En este caso, el incremento de la dureza de la colofonia indica que existe una asociación importante colofonia-biosílice debido a que los enlaces de la colofonia CO-O, OH, COOH interaccionan con la fracción de la biosílice, Si-O-Si, a través de sus secciones polares.

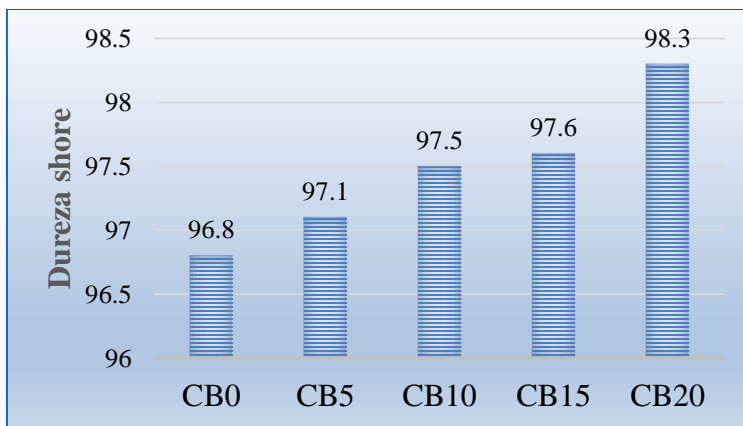


Figura 7. Dureza shore de los compósitos.

**CONCLUSIONES**

El análisis por FTIR determinó que mediante el proceso químico-térmico la cáscara de arroz generó biosílice, que presenta una estructura amorfa establecido mediante DRX y de morfología irregular. Los compósitos presentan un aumento en su resistencia térmica y en la dureza a medida que se incrementa el contenido de biosílice. Por lo anterior, se puede indicar que la colofonia mejora sus propiedades al serle integrada la biosílice, así, la cáscara de arroz es una fuente renovable de biosílice amorfa con alto potencial como material de refuerzo en polímeros naturales.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. S. Adhikari, H. Nam, & J. P. Chakraborty, "Conversion of solid wastes to fuels and chemicals through pyrolysis", *Waste Biorefinery*, 2018, pp. 239-263.
2. B. Singh, "Rice husk ash. In Waste and supplementary cementitious materials in concrete", Woodhead Publishing, 2018, pp. 417-460.
3. T. Susanto, "Impacts of rice husk ash filler loading on curing, morphological characteristics and tensile properties of natural rubber/ethylene propylene rubber blends", *Mater. Sci. Eng.*, Vol. 509, 1, 2019, pp. 012116.
4. B. Karthikeyan, S. Hariharan, A. Sasidharan, V. Gayathri, T. Arun, A. Akbari-Fakhrabadi, & C. Madhumitha, "Optical, vibrational and fluorescence recombination pathway properties of nano SiO<sub>2</sub>-PVA composite films", *Opt. Mater.*, Vol. 90, 2019, pp. 139-144.
5. H. Moustafa, N. A. Darwish, & A. M. Youssef, "Rational formulations of sustainable polyurethane/chitin/rosin composites reinforced with ZnO-doped-SiO<sub>2</sub> nanoparticles for green packaging applications", *Food Chem.*, Vol. 371, 2022, pp. 131193.
6. S. Lee, K. Lee, Y. W. Kim, & J. Shin, "Preparation and characterization of a renewable pressure-sensitive adhesive system derived from  $\epsilon$ -decalactone, L-lactide, epoxidized soybean oil, and rosin ester", *ACS Sustainable Chem. & Eng.*, Vol. 3, 9, 2015, pp. 2309-2320.
7. M. S. Ganewatta, K. P. Miller, S. P. Singleton, P. Mehrpouya-Bahrami, Y. P. Chen, Y. Yan, ... & C. Tang, "Antibacterial and biofilm-disrupting coatings from resin acid-derived materials", *Biomacromolecules*, Vol. 16, 10, 2015, pp. 3336-3344.
8. M. A. Rahman, H. N. Lokupitiya, M. S. Ganewatta, L. Yuan, M. Stefik, & C. Tang, "Designing block copolymer architectures toward tough bioplastics from natural rosin", *Macromolecules*, Vol. 50, 5, 2017, pp. 2069-2077.
9. R. A. Bakar, R. Yahya, & S. N. Gan, "Production of High Purity Amorphous Silica from Rice Husk", *Procedia Chem.*, Vol. 19, 2016, pp. 189-195.
10. R. Requena, A. Jiménez-Quero, M. Vargas, R. Moriana, A. Chiralt, & F. Vilaplana, "Integral Fractionation of Rice Husks into Bioactive Arabinoxylans, Cellulose Nanocrystals, and Silica Particles", *ACS Sustainable Chem. & Eng.*, Vol. 7, 6, 2019, pp. 6275-6286.
11. B. Xue, L. Jin, Z. Chen, Y. Zhu, Z. Wang, X. Liu, & X. Wang, "The template effect of silica in rice husk for efficient synthesis of the activated carbon based electrode material", *J. Alloys Compd.*, Vol. 789, 2019 pp. 777-784.
12. S. Collazo-Bigliardi, R. Ortega-Toro, & A. C. "Boix, Isolation and characterisation of microcrystalline cellulose and cellulose nanocrystals from coffee husk and comparative study with rice husk", *Carbohydr. polym.*, Vol. 191, 2018, pp. 205-215.
13. K. Amutha, R. Ravibaskar, & G. Sivakumar, "Extraction, synthesis and characterization of nanosilica from rice husk ash<sub>2</sub>", *Int. J. of Nanotechnol.*, Vol. 4, 1, 2010, pp. 61-66.
14. M. Aldas, J. M. Ferri, D. L. Motoc, L. Peponi, M. P. Arrieta, & J. López-Martínez, "Gum Rosin as a Size Control Agent of Poly (Butylene Adipate-Co-Terephthalate) (PBAT) Domains to Increase the Toughness of Packaging Formulations Based on Polylactic Acid (PLA)", *Polymers*, Vol.13, 12, 2021, pp. 1913.
15. K. Pietrzak, M. Kirpluks, U. Cabulis, & J. Ryszkowska, "Effect of the addition of tall oil-based polyols on the thermal and mechanical properties of ureaurethane elastomers", *Polym. Degrad. Stab.*, Vol. 108, 2014, pp. 201-211.
16. J. K. Fink, "Reactive polymers: fundamentals and applications: a concise guide to industrial polymers", William Andrew, 2017.
17. E. Q. Zhu, G. F. Xu, S. F. Sun, J. Yang, H. Y. Yang, D. W. Wang, ... & J. Deng, "Rosin acid modification of bamboo powder and thermoplasticity of its products based on hydrothermal pretreatment", *Adv. Compos. Hybrid Mater.*, Vol. 4, 3, 2021, pp. 584-590.
18. E. P. Ayswarya, K. V. Francis, V. S. Renju, & E. T. Thachil, "Rice husk ash—A valuable reinforcement for high density polyethylene", *Materials & Design*, Vol. 41, 2012 pp. 1-7.

## PREVALENCIA Y RIQUEZA DE PARÁSITOS GASTROINTESTINALES EN *ATELES GEOFFROYI* EN RELACIÓN A LA CERCANÍA CON EL HOMBRE: UN ESTUDIO PRELIMINAR

<sup>1</sup>Karen Yetlanezi Juans-Cárdenas, <sup>2</sup>Francisco García-Orduña, <sup>1</sup>Christian A. Delfín-Alfonso, <sup>3</sup>Aracely López-Monteon, <sup>4</sup>Rossana C Zepeda-Hernández, <sup>4</sup>Claudia J Juárez-Portilla y <sup>2</sup>Ma. de Jesús Roviroso-Hernández

<sup>1</sup> Maestría en Biología Integrativa, Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Veracruzana, Xalapa 91000, México

<sup>2</sup>Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa 91000, México

<sup>3</sup>LADISER Inmunología y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana, Orizaba, 94340, México

<sup>4</sup>Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Veracruzana, Xalapa 91000, México  
karenyzjic@gmail.com

### RESUMEN

Las infecciones por parásitos tienen un papel importante en la capacidad de supervivencia de los primates, considerando que cada día hay mayor contacto entre primates y humanos, lo que puede provocar un riesgo de zoonosis o antropozoonosis poniendo en riesgo la salud de éstos. Razón por la cual, el objetivo del presente estudio fue determinar la prevalencia y riqueza de parásitos gastrointestinales de *Ateles geoffroyi* que habitan cerca de asentamientos humanos. Se han colectado un total de 133 muestras de *Ateles geoffroyi* (68 bajo cuidado humano, 40 en semilibertad y 25 en vida libre). Las muestras han sido analizadas por frotis directo y se ha observado los siguientes resultados. Se encontró una prevalencia de 45.58% en individuos bajo cuidado humano, 37.50% en semi-libertad, y 32.0% en vida libre. Identificándose 3 taxones de parásitos: dos protozoarios *Balantidium coli* y *Entamoeba histolytica*, y un helminto *Ascaris lumbricoides*. Este último es un parásito cosmopolita, particularmente con distribución en países tropicales y subtropicales, la presencia de éste es una referencia sobre la condición de vida (como hacinamiento, malas condiciones de higiene, ausencia de agua potable y/o contaminada, y falta de educación sanitaria) que llevan los individuos. Su presencia ya se ha registrado en diferentes especies de primates. *Balantidium coli*, es un protozoario que parasita al humano (siendo su reservorio el cerdo), su transmisión se da por alimentos u objetos contaminados con heces, o en el caso de los primates por algún otro vector intermediarios como los artrópodos y *Entamoeba histolytica*, la cual tiene una distribución en zonas tropicales, subtropicales, y en climas templados, particularmente está presente en zonas con pobreza, alimentos y agua contaminada. Ha sido identificado de forma habitual en las heces de primates u otros organismos de fauna domestica como perros, gatos, cerdos y ratas, siendo su reservorio el hombre. Estos resultados sugieren que la cercanía del humano a los primates les está provocando una antropozoonosis lo que pone en riesgo su salud y conservación de éstos, independientemente de en donde se localicen.

### INTRODUCCIÓN

La fauna silvestre por naturaleza es portadora de parásitos internos y externos, los cuales pueden provocar infecciones e infestaciones en su vida. El parasitismo es la asociación biológica entre dos organismos de diferente especie en donde uno se beneficia -parásito- y otro resulta perjudicado -hospedero- (Cordero y Rojo, 2007). Esta asociación es a causa de una variedad de metazoarios (platelmintos y nematelmintos) y protozoarios (Guerreo *et al.*, 2012), y puede involucrar infecciones parasitarias e influir en el comportamiento, densidad, alimentación del hospedero, entre otras (Stoner *et al.*, 2005).

Además, es bien sabido que el parasitismo intestinal puede poner en riesgo la conservación de la fauna silvestre como es el caso de los primates, siempre y cuando el equilibrio se rompa, y puede causar daños que afecten la salud del hospedero (Zapata-Valencia *et al.*, 2021). Por tal motivo la infección de parásitos en primates del Nuevo Mundo es una de las causas de morbilidad y mortalidad (Pérez *et al.*, 2007). Ya que estos grupos de primates en su totalidad son arborícolas, por lo cual, son menos susceptibles de infectarse con parásitos, en comparación con aquellos que tienen mayor

cercanía con el suelo, teniendo más probabilidad de infectarse y asociarse con formas infecciosas presentes en el suelo (Stoner *et al.*, 2005).

Hoy en día la huella antrópica esta impactando a escala mundial, y a consecuencia de ello han surgido modificaciones en el ambiente haciendo factible la propagación de enfermedades (Monsalve-Buriticá, 2019), dado que ocurren cambios demográficos, sociales y económicos sumado con la falta de atención a la salud; por ende el hombre ha irrumpido o se ha introducido en ecosistemas naturales e interactúan con la fauna silvestre, lo que puede generar focos de infección ya sean naturales o provocados por las actividades antrópicas, aumentando la exposición y grado de transmisión de infecciones (Monsalve *et al.*, 2009), dando surgimiento a las zoonosis, que hoy en día representan más del 70% de las enfermedades zoonóticas a nivel mundial causando daños a la salud (Vega, 2009).

El mono araña *Ateles geoffroyi* es una de las tres especies de primates que habitan en México, y sus principales amenazas son de carácter antropogénico como la caza clandestina, el tráfico ilegal de la especie y la destrucción del hábitat. Asimismo, la infección por parásitos tiene un papel importante en la capacidad de supervivencia, considerando que cada día hay mayor contacto entre primates y humanos, provocando el riesgo de transmisión de parásitos de humanos hacia los primates no humanos o viceversa provocando una antropozoonosis o una zoonosis (Guerrero *et al.*, 2012).

El que los primates vivan en grupos o sitios como zoológicos, zocriaderos, santuarios, UMA'S (Unidades de Manejo Ambiental), centros de rescate o centros de conservación, los hace tener mayor contacto, facilitando su transmisión e infección de parásitos, por las condiciones que se presentan en los recintos como el estrés que es causado por estar permanentemente en espacios restringidos, y el contacto con humanos.

Al igual que aquellos primates que viven libres, y se ven afectados por la transformación del hábitat, los cambios en el uso del suelo primordialmente por la ganadería extensiva o plantaciones de cultivos de diferentes tipos (Link *et al.*, 2013), lo cual favorece el contacto entre primates no humanos y humanos (Trejo-Macias *et al.*, 2007).

La importancia de realizar estudios de parasitosis en monos araña bajo diferentes condiciones, permite obtener información sobre los géneros de parásitos que albergan los primates, y aquellos que podrían estar compartiendo con los humanos, debido a que pueden representar problemas para la salud pública, y estar mediados por la ubicación geográfica, es decir la disponibilidad de recursos que tengan, su distribución, proximidad con otras especies y la productividad de actividades agrícolas, ganaderas o madereras que concurren cerca.

Por tal razón, el objetivo del presente estudio fue determinar la prevalencia y riqueza de parásitos gastrointestinales en individuos de *Ateles geoffroyi* que habitan cerca de grupos humanos y si esta cercanía pudiera presentar un caso de riesgo de zoonosis parasitaria.

## TEORÍA

La Organización Panamericana de la salud (OPS) reporta que, de los 1415 patógenos de humanos conocidos en el mundo, el 61% son zoonóticos, y la interfaz animal-hombre ha propiciado al origen de enfermedades emergentes en un 75% proviniendo principalmente de animales silvestres. Debido al interés del hombre por adquirir fauna silvestre ya sea como compañía, obtención de productos o ecoturismo, puede ocasionar desequilibrios en el ambiente, extinción de ciertas especies y conllevar a un riesgo para la salud tanto humana como animal por un inadecuado control sanitario, (Acero-Aguilar, 2016) como es el caso de los primates.

Se ha estimado que las zoonosis afectan al ser humano, y casi tres cuartas partes, tienen como fuente de reservorio un organismo silvestre. Aparte están reguladas por factores clave como: la diversidad de organismos que hay en un área determinada, y la interacción de contacto estrecho entre fauna silvestre, animales domésticos y seres humanos (Osburnn *et al.*, 2009), como es la transmisión directa que se da cuando hay convivencia sistemáticamente, voluntario/involuntario (como efecto de la interacción con animales por la vecindad y uso de áreas comunes) y circunstancial con la fauna (Dabanch, 2003).

Cabe señalar que los primates no humanos por su estructura y organización genómica son los mamíferos más cercanos al ser humano, y forman parte de un reservorio para enfermedades zoonóticas entre las que se encuentran las parasitosis gastrointestinales (Ludwing *et al.*, 2003). Entre las vías de transmisión de parásitos gastrointestinales se encuentran la aérea y fecal-oral, esta transmisión surge y aumenta principalmente por el acercamiento entre individuos, provocando altas



tasas de morbilidad y mortalidad, tanto de animales como de humanos, generando perjuicios en la economía de un lugar y provocando un impacto negativo en la salud de las poblaciones de los diferentes organismos (Hotez *et al.*, 2009). Entre los síntomas que se presentan son: diarrea, desnutrición, susceptibilidad e inmunosupresión, poniendo en riesgo su salud (Monsalve *et al.*, 2009).

Mediante una variedad de estudios parasitológicos realizados en primates no humanos mexicanos (*Alouatta palliata*, *Alouatta pigra* y *Ateles geoffroyi*), se ha reportado la presencia de protozoarios y helmintos gastrointestinales (Tabla 1) que se encuentran en estos individuos (Stoner *et al.*, 2005; Guerrero *et al.*, 2012; González *et al.*, 2014).

**Tabla 1.** Parásitos gastrointestinales reportados en primates mexicanos, género *Alouatta* y *Ateles*.

Género <i>Alouatta</i>		Género <i>Ateles</i>	
<b>Protozoarios</b>			
<i>Balantidium coli</i>	<i>Entamoeba poleki</i>	<i>Balantidium coli</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>Bartonella (Bacteria)</i>	<i>Eimeria</i> spp.	<i>Chilomastix mesnili</i>	<i>Entamoeba poleki</i>
<i>Blastocystis</i> spp.	<i>Endolimax nana</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Eimeria</i> spp.
<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Entamoeba coli</i>	<i>Cyclospora</i> spp.	<i>Endolimax nana</i>
<i>Cyclospora</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.	<i>Escherichia coli</i> (Bacteria)	<i>Entamoeba</i> spp.
<i>Entamoeba hartmanni</i>		<i>Entamoeba hartmanni</i>	<i>Giardia</i> spp.
<i>Entamoeba histolytica</i>			
<b>Nemátodos o Helmintos</b>			
<i>Ascaris lumbricoides</i>	<i>Prosthenorchis elegans</i>	<i>Ancylostoma</i> spp.	
<i>Controrchis biliophilus</i>	<i>Strongyloides stercoralis</i>	<i>Ascaris lumbricoides</i>	
<i>Enterobius</i> spp.	<i>Trypanoxyuris minutus</i>	<i>Controrchis biliophilus</i>	
<i>Oxyuroidea</i>	<i>Trichostrongylus</i> spp.	<i>Enterobius vermicularis</i>	
		<i>Strongyloides stercoralis</i>	
		<i>Trichuris trichiura</i>	
		<i>Trypanoxyuris</i> sp.	

Tomado de Chinchilla *et al.* (2005); González *et al.* (2014); Guerrero *et al.* (2012); Stoner *et al.* (2005); Vásquez-Aguilar *et al.* (2020).

Además, entre las enfermedades reportadas en primates no humanos destacan: la Amebiasis, ocasionada por el protozoario *Entamoeba histolytica* (Janovy y Roberts, 2004), siendo *Ateles geoffroyi*, particularmente susceptible a este protozoario. Ascariasis, producida por *Ascaris lumbricoides/suum*, es el nematodo que más población humana infecta, y ha sido registrado en diferentes especies de primates (Mul *et al.*, 2007). Criptosporidiosis, siendo *Cryptosporidium parvum* la única especie que afecta al hombre además de otros mamíferos incluidos los bovinos, primates, equinos, carnívoros y roedores (Barriga, 1997).

Giardiasis, que ocurre por especies del género *Giardia*, se ha reportado en fauna silvestre en los primates no humanos en vida libre; sin embargo, cuando estos se encuentran cautivos presentan altas prevalencias de *Giardia* sp. (Levecke *et al.*, 2007) Por otro lado, es considerada de importancia ya que afecta a los humanos o contamina los cultivos. Este parásito es común en animales domésticos y silvestres, teniendo un potencial zoonótico importante (Erickson y Ortega, 2006). Isosporosis donde el agente causal es *Isospora belli*, se ha encontrado en individuos como primates no humanos, y vertebrados (cerdos, zorros, gatos y perros), la infección por éste amenaza con la supervivencia del organismo (Bogitsh *et al.*, 2013). Oesofagostomiasis, la cual ha sido descrita en varios primates (babuinos, samangos, macacos japoneses, mono vervet y chimpancés) y es provocada por *Oesophagostomum bifurcum* (Krief *et al.*, 2005).

Con base a las enfermedades gastrointestinales que presentan los primates no humanos, y los parásitos que las originan, la mayoría es ocasionada por las actividades antrópicas y la cercanía de estos individuos con poblaciones humanas, por lo que se ha reportado que pueden tener uno o varios



reservorios proviniendo de fauna silvestre, doméstica, y los humanos, y así mismo tener uno o diferentes huéspedes ya sean accidentales y/o definitivos (Tabla 2).

**Tabla 2.** Reservorios de los parásitos de las enfermedades gastrointestinales que presentan primates humanos y no humanos por la cercanía y contacto.

Parásito	Reservorio	
	Animal	Humano
<i>E. histolytica</i>		✓
<i>A. lumbricoides/ sunn</i>		✓
<i>B. coli</i>	✓ (cerdo)	✓ (accidental)
<i>C. parvum</i>	✓ (ganado bovino y fauna domésticos)	✓ (accidental)
<i>Strongyloides</i>	✓ perros y primates	✓ (accidental)
<i>Giardia</i>	✓ fauna domésticos, mamíferos silvestres y aves)	✓
<i>Isospora</i>		✓
<i>Oesophagostomum</i>	✓ (ovejas, cabras y primates no humanos)	✓ (accidental)

Tomado de Alegre *et al.* (2018); Barriga (1997); Bogitsh *et al.* (2013); Erickson y Ortega (2006); Flynn (2007); Jackson-Akers *et al.* (2022); Janovy y Roberts (2004); Krief *et al.* (2005); Levecke *et al.* (2007); Mul *et al.* (2007); Schuster y Ramírez-Ávila (2008).

Por otro lado, se ha registrado que las altas prevalencias de parásitos se mantienen y afectan particularmente a países en vías de desarrollo, debido a causas como la deficiencia en el saneamiento ambiental, falta de control, prevención, educación sanitaria, cercanía o contacto con otras especies de fauna silvestre o doméstica, entre otros. Así también, la contaminación del agua o alimentos con heces se consideran fuentes de infección o reinfección, sumando la escasez o falta de educación sanitaria, y sin olvidar que las formas de parásitos como quistes, ooquistes, y huevos no pueden multiplicarse en el ambiente, pero si en formas de vida libre (Juárez y Rajala, 2013).

Además, estudios muestran que las áreas compartidas donde habitan los primates no humanos, y la cercanía con el hombre muestran diferencias significativas en la población de parásitos, compartiendo nematodos como: *Trichostrongylus*, *Strongylus*, *Ancylostoma*, *Ascaris* y *Trichuris* y protozoarios como *Plasmodium*, *Leishmania* y *Trypanosoma* donde la transmisión puede ser de animales a humanos o viceversa a través de un vector infectado con estos protozoarios (Gillespie y Chapman, 2008; Castañeda *et al.*, 2010).

Por otro lado, es de gran preocupación la presencia de parásitos como *Strongyloides fuelleborni*, aunque su reservorio son los primates en África, se ha transmitido a poblaciones de áreas suburbanas y urbanas, y *Ascaris lumbricoides* cuyo reservorio son los humanos, ya que ambos tienen la capacidad de causar enfermedades graves para la conservación de poblaciones de primates en libertad (Solórzano-García y Pérez-Ponce De León, 2008).

Debido a lo anterior es importante realizar estudios sobre el parasitismo gastrointestinal entre los primates no humanos y su cercanía con el hombre, para comprender mejor los procesos relacionados con las infecciones parasitarias desde la perspectiva de riesgo zoonótico, dando pautas para el cuidado preventivo de la salud. Además, que, al convivir diferentes especies en un área determinada, puede influir en el desarrollo de ciertos géneros de parásitos. Por tal motivo es fundamental desarrollar este tipo de estudios para tomar medidas provisorias referentes a la infección y transmisión hacia fauna silvestre o doméstica, y también hacia los humanos, logrando una mejor calidad de vida para todas las poblaciones.

## PARTE EXPERIMENTAL

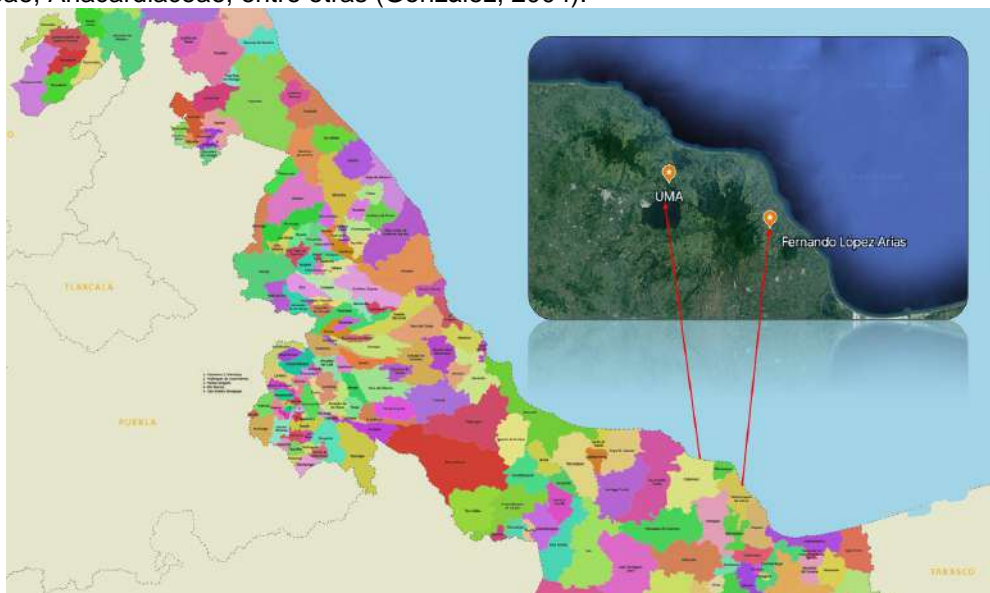
### Área y sujetos de estudio

Se estudiaron en dos áreas donde habitan monos araña (*Ateles geoffroyi*), localizadas en el estado de Veracruz (Figura 1).

La primera es la Unidad de Manejo Ambiental (UMA) “Doña Hilda Ávila de O’Farrill, ubicada en el municipio de Catemaco, y cuenta con una extensión de 220 ha, con vegetación predominante de selva alta y mediana perennifolia, y también cuenta con áreas de pastizales, y acahual o vegetación secundaria. El clima que presenta es de tipo cálido húmedo con lluvias casi todo el año (Sandoval, 2013).

La unidad cuenta con tres encierros, una bodega/cocina, un aula y un área con 12 jaulas de 3 m de largo por 3 m de ancho y 4 m de altura, donde se alojan individualmente los monos araña. Las jaulas están construidas con malla ciclónica, material de cemento y techo de lámina, éstas no poseen sistema de drenaje.

En esta área los monos se encuentran en dos condiciones: 9 individuos bajo cuidado humano, (4 machos adultos, 4 hembras adultas y 1 infante), y 7 en semi-libertad (1 macho adulto, 3 hembras adultas, 1 macho juvenil, y 2 infantes). En ambas condiciones los monos tienen una dieta diaria compuesta por frutos y legumbres cultivados de temporada (acelga, plátano, manzana, piña, tomate rojo, apio, brócoli, aguacate, betabel, papaya, entre otros). Los de semi-libertad, además de esta dieta complementan su ingesta con hojas y frutos de especies silvestres de las familias Moraceae, Fabaceae, Anacardiaceae, entre otras (González, 2004).



**Figura 1.** Área de estudio, UMA Doña Hilda Ávila de O'Farrill y localidad de Fernando López Arias, ubicadas en el estado de Veracruz, zona de los Tuxtlas.

El segundo sitio es el ejido de Fernando López Arias (Fig. 1), que está situado en el municipio de Tatahuicapan de Juárez y se encuentra a 364 m de altitud. El clima que presenta es cálido húmedo con lluvias todo el año. Constituida por selva alta perennifolia, pastizales y vegetación secundaria (Primo-Castro, 2003).

Esta localidad se encuentra localizada en las coordenadas de 18°20'35.3'' latitud norte y 0.94°46'35.3'' longitud oeste. Este sitio cuenta con un fragmento de selva conservado con una extensión aproximada de 40 hectáreas. En el que habita un grupo de monos araña constituido por 7 individuos (3 machos adultos, 2 hembras adultas, 1 juvenil y 1 infante). *Ateles geoffroyi* son individuos frugívoros, pero llegan a complementar su dieta con hojas jóvenes y flores en ausencia de frutos, entre los que se encuentran el jobo (*Spondias mombin*), zapote (*Manilkara zapota*), amate (*Ficus* spp.), y sande o lechero (*Brosimum* spp.), reportado por Campell (2018).

#### **Colecta de muestras**

##### **Primates no humanos**

Se tomaron las muestras fecales inmediatamente después de que los individuos defecaron, (que ocurre regularmente por la mañana después de ingerir los alimentos). Se colectaron de 2-3 gramos de materia fecal de cada uno de los individuos en las tres condiciones. Cada muestra fue rotulada con fecha, hora, nombre/identificación del individuo, sexo y condición. Asimismo, se considera una breve descripción referente a la consistencia que presente, color, olor, presencia de sangre, moco, semillas o materia vegetal (Helenbrook *et al.*, 2015).

Las muestras fueron colectadas en tubos Falcon con solución de formalina al 10% (inactiva la parte infecciosa de los parásitos), y Buffer de fosfatos (amortiguador para mantener la muestra lo más parecido al ambiente biológico natural), para preservarlas (Kowalzik *et al.*, 2010), mantenidas a temperatura ambiente, y transportadas al laboratorio para su análisis.

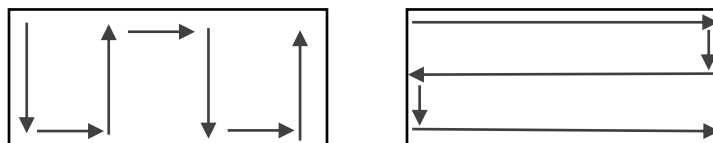
##### **Humanos**

Bajo consentimiento acordado, se solicitaron muestras fecales seriadas (2 a 3). Cada muestra fue rotulada con fecha, hora, nombre/identificación del individuo, y una breve descripción referente a la consistencia que presente, color, olor y presencia de sangre, moco, etc. De la misma manera, las muestras fueron colectadas en tubos Falcon con formalina al 10% y Buffer de fosfatos, y transportadas al laboratorio.

**Análisis de muestras**

El total de muestras colectadas fueron procesadas en el Instituto de Neuroetología UV, Xalapa, y analizadas en el Laboratorio de Docencia, Investigación y de Servicios (LADISER) de Inmunología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Veracruzana en Orizaba, Ver. Cada una de las muestras fue procesada por método de frotis directo (Rodríguez-Vivas y Cob-Galera, 2005). En el cual:

1. Se toma 1g de la excreta y se mezcla en 10ml de agua destilada en un tubo de ensayo, posteriormente se agitan hasta obtener una suspensión homogénea.
2. Si hay la presencia de fragmentos gruesos o fibras se retiran con un aplicador de madera.
3. Se coloca en un portaobjetos una gota de la mezcla obtenida y posteriormente una gota de Lugol, para teñir quistes, huevos y larvas.
4. Finalmente se coloca un cubreobjetos y se lleva al microscopio para su observación, la cual se realiza en forma de S.



Las muestras fueron analizadas en un microscopio óptico, bajo los objetivos de 10x y 40x. Para la identificación de los parásitos gastrointestinales se considera la morfología que presentan, y se identifican con ayuda de Atlas de Parasitología Veterinaria y Humana. Considerando como positivas las muestras en donde se visualizaron morfología de ooquistes, quistes, huevos o larvas de algún género de parásito.

**Análisis de datos**

La prevalencia de parásitos gastrointestinales fue calculada, dividiendo el número de muestras positivas, multiplicadas por 100 entre el número total de muestras analizadas (Guyatt y Bundy, 1993).

$$\text{Prevalencia} = \frac{NP}{NA} (100)$$

Donde: NP = Número de muestras positivas y NA = Número de muestras analizadas.

En cuanto a la riqueza, se estimó respecto al total de géneros identificados del total de muestras analizadas de los huéspedes.

**RESULTADOS**

Los resultados que se muestran corresponden a un período de 6 meses entre los años 2022-2023. Se colectaron un total de 155 muestras fecales, [133 de *A. geoffroyi*, [68 bajo cuidado humano (BCH), 40 en semilibertad (SL) y 25 para vida libre (VL)]. Y 22 muestras que se han obtenido de manera voluntaria de las personas. Muestras que corresponden a 23 monos araña (9 bajo cuidado humano, 7 en semilibertad y 7 en vida libre), y 11 personas (voluntarias), obteniendo una prevalencia total de parásitos gastrointestinales de 42.58% (66/155).

**Primates**

En cuanto a la prevalencia de *A. geoffroyi* en las tres condiciones se muestra en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Prevalencia de *A. geoffroyi* en tres condiciones distintas

<i>Individuos</i>	<i>Condición</i>	<i>Muestras Positivas/Totales</i>	<i>Prevalencia</i>
<i>A. geoffroyi</i>	Bajo cuidado humano	31/68	45.58%

Semilibertad	15/40	<b>37.50%</b>
Vida libre	8/25	<b>32%</b>

De un total de 133 muestras fecales de *A. geoffroyi* 54 resultaron positivas y se encontraron 8 taxones en las tres condiciones (BCH, SL y VL), y se tuvo la prevalencia para cada taxón identificado (Tabla 4). Siendo más representativo *Ascaris lumbricoides* con una prevalencia del 15.75% (15/54), seguido de *Uncinaria* con 8.27% (11/54) y finalmente *Entamoeba histolytica* con 6.01% (8/54).

**Tabla 4.** Prevalencia según el taxon identificado en muestras de *A. geoffroyi* en las tres condiciones (BCH, SL y VL).

Parásito	Positivas	Prevalencia total
<i>Ascaris lumbricoides</i>	15	15.75%
<i>Balantidium coli</i>	7	5.26%
<i>Entamoeba histolytica</i>	8	6.01%
<i>Enterobius vermicularis</i>	3	2.25%
<i>Gongylonema</i>	7	5.26%
<i>Strongyloides stercoralis</i>	2	1.50%
<i>Trichostrongylus</i> spp	1	0.75%
<i>Uncinaria</i>	11	8.27%

Por otro lado, el parásito gastrointestinal que tuvo mayor presencia en *A. geoffroyi* en la condición de BCH fue *Ascaris lumbricoides* (Figura 2), en SL el género *Uncinarias* (Figura 3) y en VL *A. lumbricoides*, los tres observados a 10x y 40x objetivos.



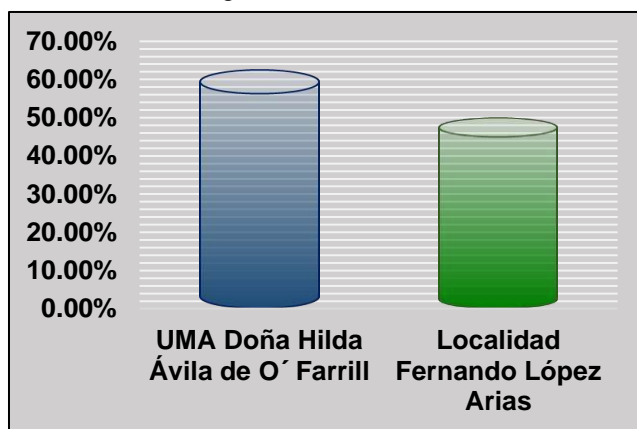
**Figura 2.** Huevo de *Ascaris lumbricoides*



**Figura 3.** Huevo del género *Uncinaria*

**Humanos**

Se analizaron un total de 22 muestras de las 11 personas voluntarias y se obtuvo en general una prevalencia del 54.54% (12/22). Para aquellas personas que laboran en la zona de estudio 1 (UMA), se tuvo una prevalencia de 62.50% (5/8), mientras que en localidad Fernando López Arias fue del 50% (7/14), como se muestra en la Figura 4.



**Figura 4.** Prevalencia de las personas respecto a cada sitio de estudio

Por otra parte, de las 22 muestras analizadas en las personas, se logró identificar tres taxones con mayor prevalencia, el protozooario *Entamoeba histolytica* y el helminto *Ascaris lumbricoides* para los individuos que convergen en la UMA, y el protozooario *Balantidium coli* y *A. lumbricoides* para aquellos que se encuentran en la localidad de Fernando López Arias. Así mismo se obtuvo la prevalencia de cada parásito respecto a la condición y en total (Tabla 5).

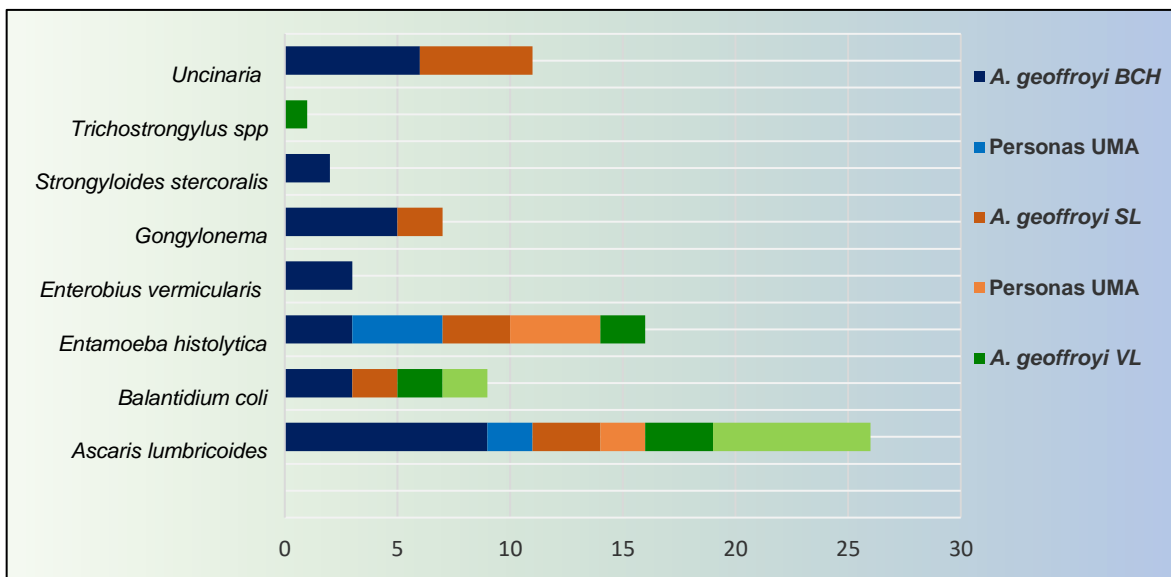
**Tabla 5.** Prevalencia de taxones identificados en personas, para cada sitio de estudio.

Parásito	Sitio de estudio				Prevalencia total
	UMA Doña Hilda Ávila de O' Farrill		Localidad de Fernando López Arias		
	Positivas	Prevalencia	Positivas	Prevalencia	
<i>A. lumbricoides</i>	2	25%	7	50%	40.90% (9/22)
<i>B. coli</i>	-	-	2	14.28%	9.09% (2/22)
<i>E. histolytica</i>	4	50%	-	-	18.18% (4/22)

En cuanto a las personas que trabajan en la UMA se obtuvieron un total de 8 muestras, y 5 de estas fueron positivas, siendo *Entamoeba histolytica* el parásito más prevalente. Y para aquellas personas que se encuentran en la localidad de Fernando López Arias se tuvo un total de 14 muestras, de las cuales 7 resultaron positivas, y fue el helminto *Ascaris lumbricoides* el parásito con mayor prevalencia.

**Primates no humanos y humanos**

Del total de muestras analizadas en primates no humanos *A. geoffroyi* y humanos, se identificaron tres taxones de parásitos gastrointestinales que están presentes en ambos (Figura 5), siendo dos protozoarios *B. coli* 5.80% (9/155) y *E. histolytica* 7.74%(12/155), y el helminto *A. lumbricoides* 15.48% (24/155).



**Figura 5.** Parásitos gastrointestinales identificados en individuos de *A. geoffroyi* y personas.

*Balantidium coli* (Figura 6) es un protozooario de importancia zoonótica y su reservorio principal es el cerdo, puede causar la balantidiasis presentando altas prevalencias con distribución cosmopolita. La infección se adquiere por la ingesta de alimentos y agua contaminada con heces que traen el parásito. Aquel individuo infectado puede ser asintomático o desarrollar sintomatología como diarrea, deshidratación, anorexia y retraso en el crecimiento (Arslan *et al.*, 2020). Afectando a una variedad de tipos de ganado (vacas, caballos, ovejas etc.), en escasas ocasiones a gatos y perros, y primates no humanos y humanos (Schuster y Ramírez-Ávila, 2008).

En lo que respecta al protozooario *E. histolytica* que procede del humano (Figura 7) puede causar la infección de amebiasis, que se inicia con la ingesta de quistes que se encuentran en alimentos o



agua contaminados con heces. Se ha comprobado que la mayoría de las infecciones son asintomáticas, sin embargo, también se han descrito otras que si presentan la sintomatología como dolor abdominal, diarrea, abscesos, neumonía entre otros. Se ha estimado que este protozooario afecta a nivel mundial a las personas, principalmente a países en vías de desarrollo con malas condiciones socioeconómicas y sanitarias (Jackson-Akers *et al.*, 2022), además de causar susceptibilidad a primates no humanos como *A. geoffroyi* (Stoner *et al.*, 2005).

*Ascaris lumbricoides* (Figura 8) se distribuye mundialmente y su reservorio es el humano, la parasitosis que provoca es más prevalente en áreas rurales, donde la contaminación del suelo al contacto con las manos o alimentos contaminados favorecen la transmisión, además varía su presencia por el saneamiento ambiental, higiene, contacto, tipo de suelo, etc. Puede o no presentar sintomatología (depende del número de parásitos), en aquellas que se desarrolla comprende fiebre, respiración irregular, molestia abdominal, cólicos, diarrea y vomito (Barros-García *et al.*, 2023), puede infectar a diferentes especies de primates no humanos (Alegre *et al.*, 2018)



Figura 6. *B. coli* a 40x

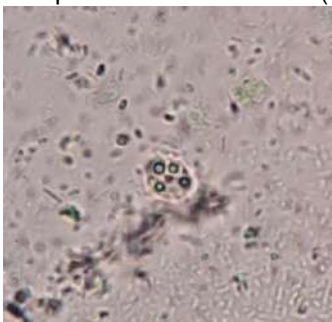


Figura 7. Ameba *E. histolytica* a 40x



Figura 8. Huevo de *A. lumbricoides* a 40x

A lo largo del tiempo se ha visto la reemergencia y emergencia de enfermedades zoonóticas, que han sido relacionadas con los cambios socioculturales, demográficos, ecológicos y del clima, propiciando que diferentes poblaciones de animales silvestres y domésticos compartan un mismo hábitat con el hombre (Acero-Aguilar, 2016). Así mismo, la distribución de parásitos intestinales y las infecciones que pueden generarse, se encuentran regulados por factores ambientales, hábitos y actividades cotidianas, además de la cercanía o relación humanos – animal, con énfasis en las condiciones de vida de cada individuo (Silvia-Bernal y Tagliaferro, 2020).

Por último, la infección parasitaria puede ser un riesgo en la salud de primates humanos y no humanos, ya que ambos organismos viven en grupos o tienen mayor contacto con sus congéneres y eso facilita la transmisión (Acero-Aguilar, 2016). En este estudio notamos que la cercanía del humano con individuos de *A. geoffroyi* en diferente condición, está promoviendo una antropozoonosis, ya que ninguno de los tres parásitos identificados (*B. coli*, *E. histolytica* y *A. lumbricoides*) tienen como reservorio natural a los primates no humanos. Lo que podría estar sugiriendo que a causa de la variedad de actividades antrópicas como la ganadería o mantener convivencia con fauna doméstica, este siendo una fuente de transmisión para los parásitos gastrointestinales.

## CONCLUSIONES

Se sugiere que al estar compartiendo tres taxones de parásitos gastrointestinales (*A. lumbricoides*, *B. coli* y *E. histolytica*), entre primates humanos y no humanos, es debido al contacto directo y/o indirecto que ocurre entre estos.

Las especies de parásitos de mayor prevalencia identificados en *Ateles geoffroyi* fueron *E. histolytica* y *A. lumbricoides*, lo que nos hace sugerir que esté ocurriendo una antropozoonosis. Es por ello que es de importancia realizar estos estudios, para comprender sobre este intercambio de parásitos que podría poner en riesgo la conservación de esta especie de primate y por ende la conservación de las selvas al ser grandes dispersores de semillas.



**BIBLIOGRAFÍA**

1. Acero-Aguilar, M. (2016). Zoonosis y otros problemas de salud pública relacionados con los animales: reflexiones a propósito de sus aproximaciones teóricas y metodológicas. *Rev. Gerenc. Polít. Salud*, 15(31), 232-245.
2. Ajeegah, G.A, y Moussima Yaka, D.A. (2014). Study of the influence of environmental factors on the occurrence of *Balantidium coli* cysts in an urban aquatic system in Cameroon. *J. Ecol. Nat. Environ.*, 6,190-199. Doi:10.5897/jene2014.0451.
3. Alegre, R.E., Milano, A.F., y Kowalewski, M.M. (2018). Protozoos potencialmente zoonóticos en monos aulladores negros y colorados (*Alouatta caraya*) de bosques fragmentados. Libro de resúmenes del II Congreso Internacional de Zoonosis. IX Congreso Argentino de Zoonosis. Disponible en línea: <http://www.congreso-zoonosis.com/libro.pdf>
4. Arslan, A., Muhammad, I., Rana, MA., Awais, G., Hammad, NG., Muhammad, UA., Sadaqat, A., M, A., M, A., Muhammad, N., Yasir, N., y Muhammad, UJ. (2020). *Balantidium coli* in domestic animals: An emerging protozoan pathogen of zoonotic significance. *Acta Tropica* 203. Doi: 10.1016/j.actatropica.2019.105298.
5. Barriga, O.O. (1997). *Veterinary parasitology for practitioners*. 2nd ed. Edina: Burgess International Group.
6. Barros-García, P., Martínez-Escribano, B., y Romero-González, J. (2023). Parasitosis intestinales. *Protoc diagn ter pediatr* 1, 123-137.
7. Bogitsh, B.J., Carter, C.E. y Oeltmann, T.N. (2013). *Human Parasitology*. Elsevier Ed (USA), 53-73, 115-159, 199-211, 292-320, 375. Doi:10.1016/B978-0-12-415915-0.02001-X
8. Campbell, C.J. (2008). *Spider Monkeys: Behavior, Ecology and Evolution of the Genus Ateles*. Cambridge, UK, Cambridge University Press.
9. Chinchilla, M., Guerrero, O., Gutiérrez, GA., y Sánchez R, Rodríguez B. (2005). Parásitos intestinales en monos congo *Alouatta palliata* de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 53: 437-445.
10. Cordero, M., y Rojo, F. (2007). *Parasitología General*. Madrid: McGraw-Hill; 162p.
11. Dabanch, P.J. (2003). Zoonosis. *Revista chilena de infectología*, 20(1), 47-51. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182003020100008>
12. Erickson, M.C., y Ortega, Y.R. (2006). Inactivation of protozoan parasites in food, water, and environmental systems. *Journal of Food Protection*, 69(11), 2786-2808.
13. Flynn, R.J. (2007). *Parasites of laboratory animals*. 2nd Edition. Blackwell Ed (UK), 2-13, 695-714. ISBN 978-0-8138-1202-1.
14. González, I. (2014). Identificación de parásitos intestinales en el primate neotropical *Ateles hybridus* en un centro de paso de fauna en el municipio de Sabana de Torres en Santander. *Revista CITECSA*, 4(7), 13-18.
15. Guerrero, MF., Serrano-Martínez, E., Tantaleán, VM., Quispe HM., y Casas, V. (2012). Identificación de parásitos gastrointestinales en primates no humanos del zoológico parque natural de Pucallpa, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(4), 469-478.
16. Helenbrook, W.D., Wade, S.E., Shields, M.W., Stehman, S.V., y Whipps, M.C. (2015). Gastrointestinal Parasites of Ecuadorian Mantled Howler Monkeys (*Alouatta palliata aequatorialis*) Based on Fecal Analysis. *Journal of Parasitology*, 101(3), 341-350.
17. Hotez, P.J., Fenwick, A., Savioli, L., y Molyneux, D.H. (2009). Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. *The Lancet*, 373(9674), 1570-1575. Doi:10.1016/S0140-6736(09)60233-6.
18. Howells, M.E., Pruetz, J., y Gillespie, T. R. (2011). Patterns of gastro-intestinal parasites and commensals as an index of population and ecosystem health: the case of sympatric western chimpanzees (*Pan troglodytes verus*) and guinea baboons (*Papio hamadryas papio*) at Fongoli. Senegal. *American Journal of Primatology*, 73(2), 173-179. Doi:10.1002/ajp.20884
19. Jackson-Akers, JY., Prakash, V., y Oliver, TI. (8 de Agosto, 2022). Amebic Liver Abscess. *STATPEARLS*, 1-12.
20. Janovy, J., y Roberts, L. (1994). *Foundations of parasitology*. Mc Graw-Hill Ed (USA), 90-94, 107-113.

21. Juárez, M.M., y Rajal, V.B. (2013). Parasitosis intestinales en Argentina: principales agentes causales encontrados en la población y en el ambiente. *Rev Argent Microbiol*, 45(3), 191-204.
22. Kowalzik, B.K., Pavelka, S.M., Kutz, S.J. y Behie, A. (2010). Parasites, Primates, and Ant-Plants: Clues to the Life Cycle of *Controrchis* spp. in Black Howler Monkeys (*Alouatta pigra*) in Southern Belize. *Revista de Enfermedades de la Vida Silvestre*, 46(4), 1330–1334.
23. Krief, S., Huffman, M.A., Sévenet, T., Guillot, J., Bories, C., Hladik, C.M., y Wrangham, R.W. (2005). Noninvasive Monitoring of the Health of *Pan troglodytes schweinfurthii* in the Kibale National Park, Uganda. *International Journal of Primatology*, 26(2), 467-490. Doi:10.1007/s10764-005-2934-9.
24. Levecke, B., Dorny, P., Geurden, T., Vercammen, F., y Vercruyse, J. (2007). Gastrointestinal protozoa in non-human of four zoological gardens in Belgium. *Veterinary Parasitology*, 148(3), 236-246. Doi: 10.1016/j.vetpar.2007.06.020.
25. Link, A., de Luna, y G., Burbano. (2013). Primates Colombianos en peligro de extinción. Asociación Primatología Colombiana, 88-118.
26. Ludwing, B., Kraus, F.B., Allwinn, R., Doerr, H.W., y Preiser, W. (2003). Viral zoonoses – a threat under control? *Intervirology*, 46(2), 71-78. Doi:10.1159/000069749
27. Monsalve, S.B. (2019). Medicina de la conservación y enfermedades de la fauna silvestre 1a. ed. Biogénesis.
28. Monsalve, S.B., Mattar, S.V. y González, M.T. (2009). Zoonosis transmitidas por animales silvestres y su impacto en las enfermedades emergentes y reemergentes. *Rev. MVZ Córdoba*, 14(2), 1762-1773.
29. Mul, I.F., Paembonan, W., Singleton, I., Wich, S.A., y Van Bolhuis, H.G. (2007). Intestinal Parasites of Free-ranging, Semicaptive, and Captive Pongo abelii in Sumatra, Indonesia. *International Journal of Primatology*, 28(2), 407-420. Doi:10.1007/s10764-007-9119-7.
30. Osburn, B., Scott, C., y Gibbs, P., (2009). One Health: emerging veterinary challenges and opportunities. *Rev Sci Tech* 28, 481-486.
31. Pérez, J., Ramírez M., y Hernández, C.A. (2007). *Prosthernorchis* sp. en titíes grises (*Saguinus leucopus*), revisión de tema. *Revista CES, Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 2(1), 51.
32. Primo-Castro, M.E. (2003). *Comparación entre las preferencias alimenticias de dos especies de primates Alouatta palliata y Ateles geoffroyi en un fragmento de selva en el ejido de Magallanes, Veracruz*. [Trabajo recepcional de especialización en métodos estadísticos, Reporte, Universidad Veracruzana].
33. Rodríguez-Vivas, R.I., y Cob-Galera, L.A. (2005). Técnicas Diagnósticas en Parasitología Veterinaria. Segunda edición. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, México.
34. Sandoval, D. (2013). *UV resguarda importantes regiones de Los Tuxtlas*. DGCU Universidad Veracruzana. Recuperado el 22 de mayo del 2022 de <https://www.uv.mx/noticias/2013/10/15/uv-resguarda-importantes-regiones-de-los-tuxtlas/>
35. Silvia Bernal, M.C., y Tagliaferro, Z.A. (2020). Zoonosis como problema de salud pública desde una visión integral. *Revista Venezolana de Salud Pública*, 8 (1), 76-92.
36. Schuster, F.L., y Ramírez-Ávila, L. (2008). Current world status of *Balantidium coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 21(4), 626-638. Doi:10.1128/CMR.00021-08
37. Solorzano-García, B., y Pérez de León, G. (2008). Parasites Neotropical of Primates. A Review. *International Journal of Primatology*, 39(2), 1-28.
38. Stoner, K.E., González-DiPierro A.M., y Maldonado-López, S. (2005). Infecciones de parásitos intestinales de primates: Implicaciones para la conservación. Universidad y Ciencia. Número especial II, 61-72. Mantled Howling Monkeys, *Alouatta palliata palliata*. *Journal of Wildlife diseases* 26, 547-549
39. Trejo-Macías, G., Estrada, A., y Mosqueda, M.A. (2007). Survey of helminth parasites in populations of *Alouatta palliata mexicana* and *A. pigra* in Continuous and un fragmented habitat in Southern Mexico. *Int. J. Primatol.* 28, 931-945.
40. Vásquez-Aguilar, A.A., Toledo-Manuel, F.O., Barbachano-Guerrero, A., y Hernández-Rodríguez, D. (2020). Detection of Antimicrobial Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolated from Black Howler Monkeys (*Alouatta pigra*) and Domestic Animals in Fragmented

Rainforest areas in Tabasco, Mexico. *Journal of wildlife diseases*, 56(4), 922-927. Doi: 10.7589/2019-10-243.

41. Vega, R.L. (2009). Zoonosis emergentes y reemergentes y principios básicos de control de zoonosis. *Revista de Medicina Veterinaria* 17, 85-97.
42. Zapata-Valencia, J.I., Ortega-Valencia, S., Silva-Cuero, Y.K., Castillo-Castillo, L.S., Ortega-Ruíz, L.S., Cardona-Ortíz, A., y Peña-Stadlín, J. (2021). Frecuencia de enteroparásitos en primates Cebidae y Callitrichidae del Zoológico de Cali, Colombia: implicaciones zoonóticas. *Biomédica* 41, 60-81.

## USO DE LA HERBOLARIA PARA EL DISEÑO DE SISTEMA BIOADHESIVO CON ACCIÓN BIOLÓGICA DE IMPORTANCIA EN ODONTOLOGÍA

Osvelia Esmeralda Rodríguez Luis<sup>1</sup>, Ana Karen Saldívar Vázquez<sup>1</sup>, Sonia Martha López Villarreal<sup>1</sup>, Laura Elena Villarreal García<sup>1</sup>, Juan Gabriel Báez González<sup>2</sup>, Mayra Zulema Treviño Garza<sup>2</sup>.

Universidad Autónoma de Nuevo León,  
Facultad de Odontología<sup>1</sup>, Facultad de Ciencias Biológicas<sup>2</sup>.  
[osvelia.rodriguezls@uanl.edu.mx](mailto:osvelia.rodriguezls@uanl.edu.mx)

### RESUMEN

Se ha reportado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) que el 80% de la población mundial emplea la herbolaria en sus necesidades de atención a la salud. En el área de odontología se ha reportado múltiples usos de extractos vegetales con acción biológica, analgésica, antiinflamatoria y antimicrobiana, entre otras. Los sistemas bioadhesivos se desarrollan a base polímero de origen biológico, con propiedades de adhesión y cohesión bajo condiciones de humedad, temperatura en ciertas superficies. OBJETIVO: Diseño de un sistema bioadhesivo a base de *Linum usitatissimum* adicionada con extractos de *Elettaria cardamomum* y *Copaifera officinalis*, para su posible aplicación odontológica. METODOLOGÍA: Obtención de extractos *Elettaria cardamun* y *Linum usitatissimum* mediante por maceración en frío (Sarria-Villa et al., 2017)., posteriormente se realizó caracterización fitoquímica parcial por métodos químicos para ambos extractos, (Domínguez et al, 1973). Se analizaron parámetros para la formulación y diseño de biopelículas, posteriormente se incorporaron extractos, se analizó el color (Fakhouri et al, 2015) y grosor (Imran et al., 2010) y su solubilidad en saliva artificial (Romero Bastida 2005). Por último, se realizó la caracterización mecánica de las películas (Shojaee Aliabadi et al,2014). RESULTADOS: Se logró el desarrollo de un sistema bioadhesivo a base de polímero de linaza incorporando los extractos con acción biológica. Se identificó reacción positiva de *Elettaria cardamomum*, para esteroides, triterpenos, flavonoides, lactonas sesquiterpénicas y taninos, con presencia de Insaturaciones, grupos carbonilo de cetonas y aldehídos, esteroides y metilesteroides, carbohidratos, sesquiterpenlactonas y alcaloides. *Copaifera officinalis* respondió de manera positiva a carbohidratos proteínas, lípidos y minerales; las películas fueron 100% solubles en saliva artificial las películas presentaron buen tiempo de solubilidad con resistencia a condiciones de humedad, parámetros importantes para mantener un efecto prolongado en cavidad oral. Las biopelículas mostraron buen grosor, color y dureza, con bajo porcentaje de deformación y fracturabilidad, incrementando la adhesividad. CONCLUSION: La herbolaria nos brinda una herramienta útil para el desarrollo de sistemas bioadhesivos con acción biológica y con propiedades óptimas para su análisis in vivo, con posibilidades de ser aplicados en mucosa oral.

### INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que el 80% de la población mundial emplea la herbolaria en sus necesidades de atención a la salud con el empleo de múltiples usos de las plantas, mediante el uso de extractos vegetales, los cuales han presentado una importante acción biológica, efecto analgésico, antiinflamatorio y antimicrobiano, entre otras. Los extractos de plantas se han incorporado en una amplia diversidad de medios o agentes que permiten fortalecer o potencializar sus propiedades, una de ellas incluye su incorporación a sistemas adhesivos, que se desarrollan a base de polímero, pueden ser de origen biológico y que le permiten presentar propiedades de adhesión y cohesión que, bajo condiciones de humedad, temperatura en ciertas superficies brindan mejores propiedades en las zonas donde serán aplicados (García Gómez, A., 2023).

La semilla de la planta *E. cardamomum* (cardamomo), también conocido como "cardamomo verde o verdadero", es una planta herbácea, que posee una amplia cantidad de principios activos como, esteroides, flavonoides, terpenos, fenoles, taninos, entre otros, presenta diversas propiedades importantes como, actividad antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena y antimicrobiana, en su uso tradicional se ha indicado su importante aplicación culinaria además para tratar una diversidad de enfermedades y afecciones, que incluye el asma, infecciones bucales, trastornos gastrointestinales, náuseas y diarrea, entre otras (Rajan A.,2017). *Copaifera officinalis*, se distribuyen por todo el mundo, es también conocido como copaiba; considerada una planta rica en

aceites esenciales, los cuáles le confieren sus propiedades biológicas que posee, se ha reportado una potente acción contra microorganismos, como especies de estreptococos, que se localizan en cavidad oral, también se ha identificado una acción, cicatrizante de estas especies de planta (Otaguiri et al, 2017).

*Linum usitatissimum*, es una planta que se cultiva a nivel internacional y se considera entre los cultivos más antiguos del mundo, posee semillas que contienen un aceite que se emplea para tratar diversos padecimientos, como la tos, el resfriado, el acné, las quemaduras y el estreñimiento, entre otros padecimientos.

## TEORÍA

El término bioadhesión incluye la capacidad de macromoléculas, de origen sintético o biológico, para adherirse a los tejidos del organismo, como a mucosas. Se genera por polímeros que, en superficie, se favorece la adhesión y cohesión bajo condiciones de temperatura, y humedad. Son empleados en el campo de la salud, con aplicación en el área odontológica, ortopédica y oftálmica, donde se ha resaltado su función como un mecanismo de liberación controlada y localizada de principios activos sobre las mucosas, estos sistemas deben cumplir con características indispensables como la capacidad para unirse eficazmente a sustancias, aglutinar células, presentar seguridad para los tejidos del ser humano. La formulación de películas está relacionada con los sistemas de administración de fármacos, permiten la sustentividad de los principios activos en el sitio de la aplicación, se han aprovechado en el área de la salud, para aplicaciones odontológicas y ortopédicas y uso quirúrgico, oftalmológico, en cirugía, con una aplicación de liberación controlada y localizada de principios activos, sobre mucosas, se presentan interrelaciones entre agrupaciones químicas (polímeros) y los tejidos naturales (Zhu, et al; 2023). Con estos sistemas se busca la permanencia de principios activos, por más tiempo en el sitio de la aplicación, además aumentar su efectividad y optimizar su absorción a través de la mucosa, como sistema de liberación prolongada o controlada de principios activos. Es importante sean solubles, y capaces de polimerizar en condiciones acuosas (Zhu et al., 2018). Se ha resaltado un tipo de películas o recubrimientos, que son comestibles, son obtenidos a partir de biopolímeros tienen aplicaciones importantes como revestimientos protectores de alimentos y mejoran la calidad de los productos sobre los que son colocados, brindan una extensión de su vida útil y también protegen contra daños mecánicos y efectos adversos de factores físicos, químicos y microbiológicos (Giosafatto et al., 2018). Los biopolímeros más utilizados para su síntesis son proteínas, polisacáridos y lípidos, y también es posible obtener películas compuestas. Los ingredientes utilizados en la película son en su mayoría de origen vegetal, por ejemplo, ceras, aceites, zeína o celulosa (Hassan B. et al, 2018). Los carbohidratos y proteínas se usan en la producción de películas, para mejorar sus propiedades, se incorporan aditivos, por ejemplo, lípidos (Díaz O. et al, 2019).

## PARTE EXPERIMENTAL

**Obtención de extractos.** Adquiridas las muestras de planta, se realizó los extractos con las semillas de *Elettaria cardamomun* (cardamomo) adquiridas en polvo y *Linum usitatissimum* en semilla entera, el aceite esencial de *Copaifera officinalis* (Copaiba) fue adquirido en la compañía Young Living. Se obtuvieron mediante maceración en frío sin agitación (R. A. Sarria-Villa et al., 2017). El material vegetal molido, fue colocado en un matraz y se le adiciono etanol como solvente de extracción. Se dejó en maceración por 24h, pasado el tiempo de extracción se filtró el extracto obtenido, se colocó en un matraz estéril, se obtuvo el rendimiento y se almacenó en refrigeración, para su uso posterior en las siguientes pruebas. (Figura 1).



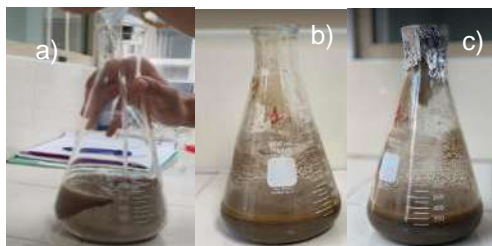


Figura 1. Obtención de extracto *Elettaria cardamomun*

**Obtención de sistema bioadhesivo incorporando extractos *Elettaria cardamun* y *Copaifera officinalis*.** Se estandarizó la técnica para el diseño de la biopelícula mediante el análisis de diversas formulaciones con diferentes concentraciones P/V de linaza y los extractos a estudio, realizándose por triplicado, para estandarizar la relación ideal en el diseño de la película. Posteriormente se formularon las biopelículas a base de mucilago de linaza, considerado las relaciones que permitieron el desarrollo de una película con las características óptimas, se empleó el extracto añadiéndole, agua destilada, 1 ml tween y 0.5 ml de glicerol. Las formulaciones de las biopelículas *M* (Mucilago de linaza) *MCA* (Mucilago de linaza cardamomo) *MCO* (Mucilago de linaza copaiba) *MCACO* (Mucilago de linaza cardamomo copaiba). Se utilizó agitación constante para obtener soluciones homogéneas. Se realizaron diversas formulaciones de cada componente que conforman las biopelículas por triplicado con una relación 1:1. Posteriormente las películas obtenidas fueron colocadas en cajas de Petri para el proceso de secado, se colocaron en un deshidratador a 55°C durante 24h, posteriormente fueron almacenadas en condiciones controladas de humedad, para las determinaciones posteriores.

**Caracterización de las biopelículas.** Una vez obtenidas las biopelículas se procedió a realizar su caracterización, analizando diversos parámetros como solubilidad, color, espesor, textura, análisis microestructural, actividad antioxidante y cuantificación de fenoles totales.

**Determinación de solubilidad.** Se realizó siguiendo el protocolo de Romero Bastida 2005, cortando las biopelículas en discos de forma circular con un diámetro de 2cm, colocándose en un vaso de precipitado con 50 ml de saliva artificial, valorando su disolución completa en base al tiempo.

**Color.** Se determinó el análisis del color para las biopelículas obtenidas, se empleó un colorímetro (modelo Hunterlab, Colorflex® EZ), tomando en cuenta el diagrama de color (Teixeira et al, 2014). Las coordenadas de color  $L^*$  (luminosidad, 0 negro a 100 blanco),  $a^*$  (- verde y + rojo),  $b^*$  (- azul y + amarillo), (Fakhouri et al, 2015).

**Espesor.** Se determinó el espesor y fue medido en tres posiciones aleatorias para cada película utilizando un micrómetro digital (Modelo Quickmike, Mitutoyo), (figura 2). El promedio fue considerado como el espesor final en mm. Se realizó por triplicado cada ensayo, (Imran et al., 2010).



Figura 2. Micrómetro (Mitutoyo Digimatic).

**Caracterización mecánica de las biopelículas.** Se realizó con un analizador de Textura (Brookfield, CT3), las películas se colocaron en el equipo y se determinaron los parámetros de *dureza*, *porcentaje de deformación*, *adhesividad* y *fracturabilidad*, (Shojaee Aliabadi et al, 2014). Se utilizó una sonda TA44 con una carga de activación de 0.070 N a una velocidad de 0.50 mm/s.



## RESULTADOS Y DISCUSION

Se logro obtener películas con propiedades físicas para su manejo. De las formulaciones que se realizaron se eligió la que mostraba mejores características físicas. Cumplieron con las características idóneas para su estudio homogéneas, delgadas, flexibles entre otras. Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por (Rocha Gomez,2015). De tres formulaciones poliméricas se optó por elegir la que mostraba mejores características físicas. En la caracterización de las películas comestibles la solubilidad para las cuatro formulaciones de biopelículas fueron 100% solubles en saliva artificial. Al llevar a cabo el análisis se determinó que las películas (M) mucilago de linaza y (MCA) Mucilago de linaza-cardamomo son más fáciles de solubilizar que las películas MCO, con el aceite de Copaiba tardo 12 minutos por lo que esta última sería más resistente a condiciones de humedad lo cual tendría mejor un efecto más prolongado ya que se requiere que la biopelícula sea más insoluble para mantener un efecto más prolongado en la cavidad oral. (Gráfico 1.)

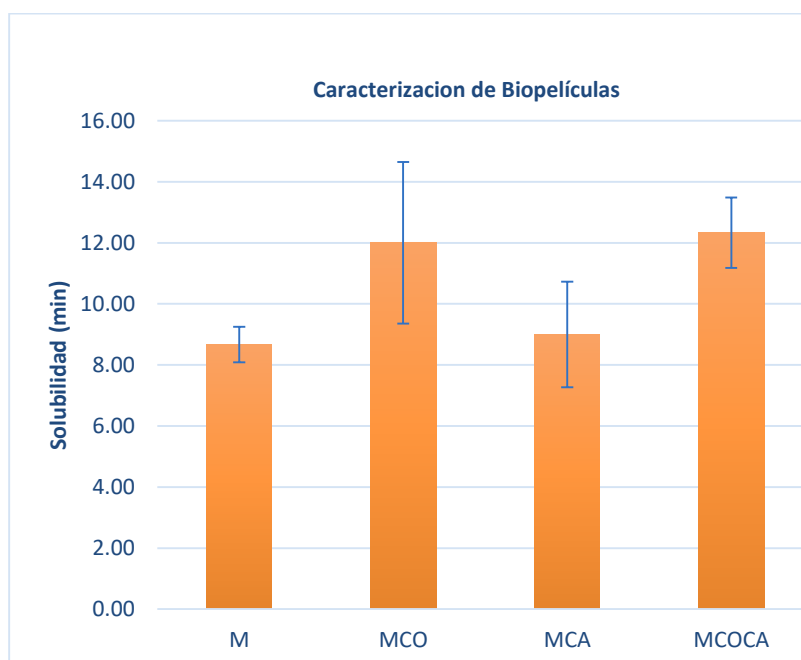


Gráfico 1 Análisis de solubilidad de biopelículas obtenidas

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por (Sepúlveda et al.,2019). La solubilidad en agua es una propiedad importante para las películas comestibles, pues de este valor dependerá su aplicación ya que en la mayoría de los casos se requiere que la película sea totalmente insoluble para mantener la integridad del producto. El color, en el caso de la coordenada L\*La luminosidad presentada en las películas (Gráfico 2), no se vio afectada por la composición de cada formulación, siendo las películas de los 3 compuestos (MCOCA) las de mayor luminosidad y las de menor aquellas con dos (MCO), lo cual indica que la adición de más de un componente y de lípidos principalmente aumenta la luminosidad en la mismas. La opacidad se midió de acuerdo con el método Hunterlab, informó un aumento de películas en la opacidad por la incorporación del extracto.

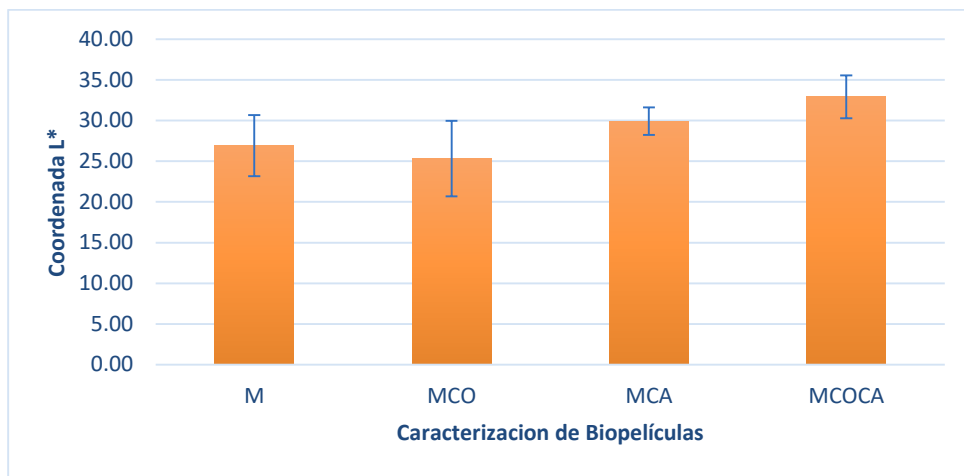


Gráfico 2. Determinación color coordenada L\*

En el caso de la coordenada a\* podemos observar que en el caso de las biopelículas a base de cardamomo MCA aumento significativamente presentando valores positivos a colores rojizos debido a sus compuestos químicos y al añadirle el extracto de copaiba su color bajo MCOCA como se muestra (Gráfico 3).

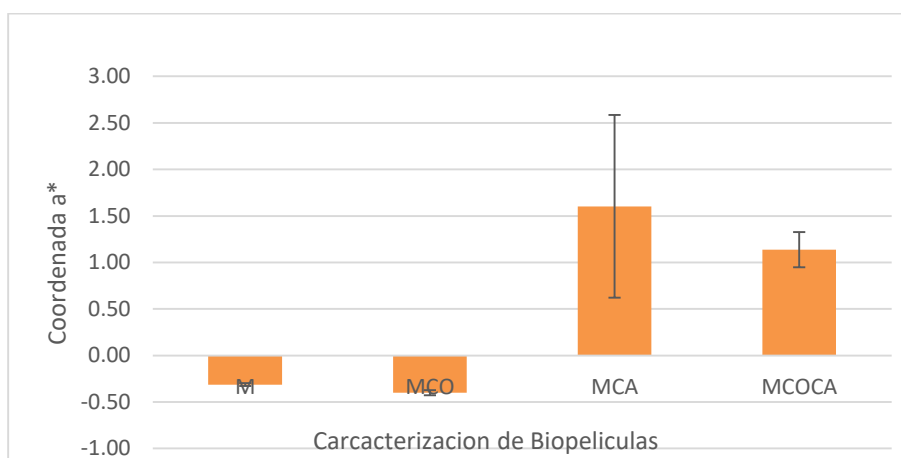


Gráfico 3. Determinación color Coordenada a\*

Para la coordenada b\* nuestras formulaciones presentaron valores positivos sobre todo en la formulación MCA al incorporarle el extracto de copaiba MCOCA su aumento fue poco.

*Espeor*, la determinación del espesor es un parámetro importante y necesario para la elaboración de las biopelículas. No se encontró diferencia significativa entre las variables, pero si se observa que las biopelículas que contienen el aceite de Copaiba tuvieron menor espesor. El añadirle el extracto de cardamomo el espesor quedó igual a la biopelícula control (Gráfico 4).

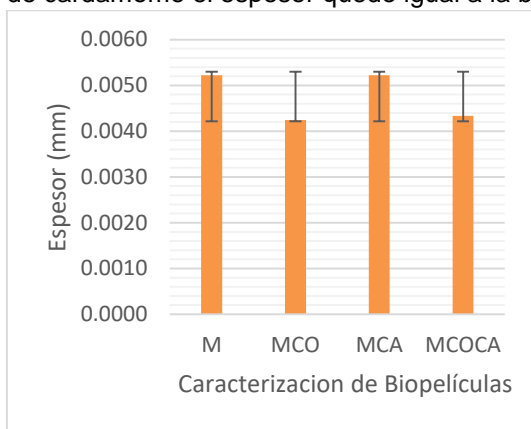


Gráfico 4. Espeor

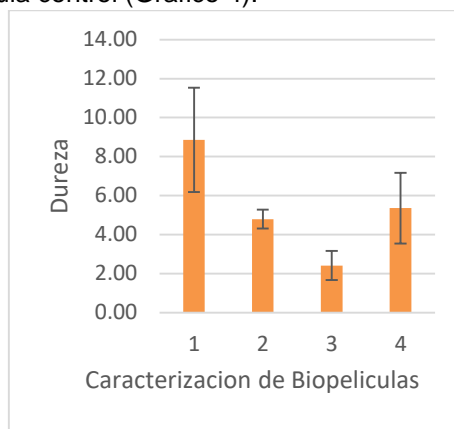


Gráfico 5. Dureza

Las películas también influyen de manera directa en el espesor de las mismas, por lo que el contenido sólido sea el mismo en algunas formulaciones su espesor no presenta los mismos valores. Para el caso de las películas de dos componentes, es el aceite de copaiba el componente que más influyó en la disminución del espesor, lo que podría deberse a que presenta buenas propiedades de gelificación y un alto índice de hinchamiento (Dangaran et al., 2009). En el caso de las pruebas mecánicas, en cuanto a la dureza en todas las películas varía principalmente en las que se añade el extracto. Fueron las que presentaron los valores más bajos de esfuerzo, siendo más flexibles. Estos resultados coinciden con lo descrito por (Coughlan et al., 2004). Las formulaciones preparadas solo con linaza M alcanzaron durezas más altas trabajadas bajo las mismas condiciones (ver gráfico 5). Logramos obtener biopelículas delgadas y flexibles no deberían ser muy duras ya que podría originar molestias al paciente y por consiguiente el incumplimiento. Al analizar el porcentaje máximo de deformación de cada una de las formulaciones., al determinar que la incorporación de mucílago aumentó el esfuerzo máximo de las películas, el porcentaje de deformación máximo disminuyó al incorporar los extractos. Esto se puede explicar ya que el grosor de las formulaciones también incremento al incorporarle los extractos por esta razón son más resistentes a la deformación (Gráfico 6).

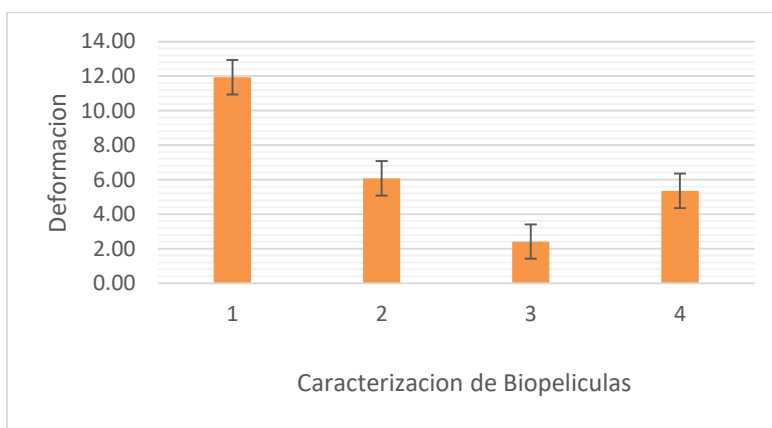


Gráfico 6. Deformación

En caso de la formulación de la película de linaza M se obtuvo una buena adhesividad, (Gráfico 7), al incorporarle el extracto de Copaiba MCO tuvo un incremento significativo. En la película MCA, el extracto de cardamomo tuvo un incremento que solo presentar linaza así la película MCOCA presento una adhesividad más alta que todas las formulaciones. Lo que nos indica que sería la

opción más viable para nuestro estudio ya que nos ayudara a que no se elimine tan rápido de la cavidad oral y nos permitirá que cumpla con su función.

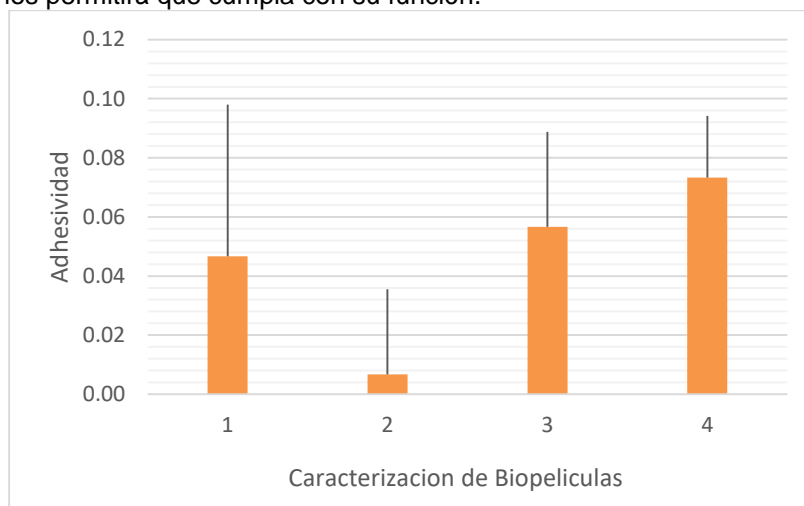


Gráfico 7. Adhesividad

## CONCLUSIONES

Fue posible el desarrollo de películas a base de mucilago de linaza incorporando compuestos activos *Elettaria cardamomun* y *Copaifera officinalis* y la combinación de ambos. La adición de los extractos en la formulación contribuyo a una disminución del espesor de las biopelículas comparado con los controles, no se encontró un efecto importante ya que las películas presentan valores muy similares. Así mismo, se disminuyó el tiempo de solubilidad y la dureza, se modificó el color  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , el porcentaje de deformación y la fracturabilidad, incrementándose la adhesividad. La formulación obtenida a base de linaza y en combinación de los extractos *Elettaria cardamomun* y *Copaifera officinalis* presentaron propiedades físicas, mecánicas y de solubilidad óptimas para los sistemas bioadhesivos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Dangaran, K., Tomasula, P. M., Qi, P., Structure and Function of Protein-Based Edible Films and Coatings., In: Embuscado, M. E., Huber, K. C. (Eds.), *Edible Films and Coatings for Food Applications.*, New York, Springer, 2009, pp. 25-56.
- Díaz O., Ferreiro T., Rodríguez-Otero J.L., Cobos A. Characterization of chickpea (*Cicer arietinum* L.) flour films: Effect of pH and plasticizer concentration. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20: 1246.
- Fakhouri, F. M., Martelli, S. M., Caon, T., Velasco, J. I., & Mei, L. H. I. (2015). Edible films and coatings based on starch/gelatin: Film properties and effect of coatings on quality of refrigerated Red Crimson grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 109, 57-64.
- García Gómez, A. (2023). Revisión Bibliográfica "Películas Mucoadhesivas".
- Giosafatto C.V.L., Al-Asmar A., D'Angelo A., Roviello V., Esposito M., Mariniello L. Preparation and characterization of bioplastics from grass pea flour cast in the presence of microbial transglutaminase. *Coatings*. 2018; 8:435.
- Hassan B., Chatha S.A.S., Hussain A.I., Zia K.M., Akhtar N. Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018; 109: 1095–1107.
- Imran, I., El-Fahmy, S., Revol-Junelles, A.M. y Desobry, S. Cellulose derivative based active coatings: Effects of nisin and plasticizer on physico-chemical and antimicrobial properties of hydroxypropyl methylcellulose films. *Carbohydrate Polymers*, 2010:81: 219–225.
- Otaguiri E. S., Morguette A. E. B., Biasi-Garbin R. P., Morey A. T., Lancheros C. A. C., Kian D., et al. Antibacterial combination of oleoresin from *Copaifera multijuga* Hayne and biogenic

- silver nanoparticles towards *Streptococcus agalactiae*. *Curr. Pharm. Biotechnol.* (2017) 18 177–190.
9. R. A. Sarria-Villa, J. A. Gallo-Corredor, M. I Páez Isolation of Catechin and Gallic Acid from Colombian Bark of *Pinus patula* *Chemical Science Journal*,2017: 8: 1-11.
  10. Rajan A., Rajan A.R., Philip D. *Elettaria cardamomum* seed mediated rapid synthesis of gold nanoparticles and its biological activities. *Open Nano.* 2017; 2:1.
  11. Rocha Gómez, M. M. (2015). *Elaboración de una biopelícula bioadhesiva incorporando amphipteryngium adstringens (cuachalalate) para su uso en mucosa oral* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
  12. Romero-Bastida, C. A; Bello-Pérez, L. A; García María A., Miriam N. Martino, Javier Solorza-Feria, Noemí E. Zaritzky, Physicochemical and microstructural characterization of films prepared by thermal and cold gelatinization from non-conventional sources of starches, *Carbohydrate Polymers*, Volume 60, Issue 2, 2005, Pages 235-244.
  13. Sepúlveda, C. T., & Zapata, J. E. (2019). Efecto de la Temperatura, el pH y el Contenido en Sólidos sobre los Compuestos Fenólicos y la Actividad Antioxidante del Extracto de *Bixa orellana* L. *Información tecnológica*, 30(5), 57-66.
  14. Shojaee-Aliabadi, S., Hosseini, H., Mohammadifar, M. A., Mohammadi, A., Ghasemlou, M., Hosseini, S. M., & Khaksar, R. (2014). Characterization of κ-carrageenan films incorporated plant essential oils with improved antimicrobial activity. *Carbohydrate polymers*, 101, 582-591.
  15. Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D., & Garcia-Viguera, C. (2014). Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: a review. *International journal of molecular sciences*, 15(9), 15638-15678.
  16. Zhu, J., Zhou, H., Gerhard, E. M., Zhang, S., Rodríguez, F. I. P., Pan, T., & Cheng, H. (2023). Smart bioadhesives for wound healing and closure. *Bioactive Materials*, 19, 360-375.
  17. Zhu, W., Chuah, Y. J., & Wang, D. A. Bioadhesives for internal medical applications: A review. *Acta biomaterialia*.2018;74, 1–16.

## GRADO DE CONOCIMIENTO DE LA DISTRIBUCIÓN DEL CINCUATE *PITUOPHIS DEPPEI* EN MÉXICO

Christian Acosta-Rodríguez<sup>1</sup>, Claudia Ballesteros-Barrera<sup>1</sup>, Emiliano Cruz-Torrejón, <sup>1</sup>, Rocío Zárate-Hernández<sup>1</sup>, Bárbara Vargas-Miranda<sup>1</sup>, Selene Ortiz-Burgos<sup>2</sup>, y Angélica Martínez Bernal<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Apartado Postal 55–535. CP 09340 Ciudad de México

<sup>2</sup>Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, CP 09230 Ciudad de México, México  
cmarg0611@gmail.com

### RESUMEN

En México la familia con mayor representación dentro de serpientes es Colubridae a la que pertenece el género *Pituophis*, el cual contiene siete especies, cinco son endémicas, tres de México y dos de Estados Unidos. *Pituophis deppei* también conocida como alicante o cincuate, es una especie endémica de México, cuya distribución abarca desde el Sur de Chihuahua y Coahuila hasta la zona centro del Altiplano Mexicano, llegando a lugares como Puebla y Veracruz. actualmente se encuentra catalogada como Amenazada de acuerdo con la NOM-059-2010 SEMARNAT. El objetivo de este trabajo fue actualizar y analizar cómo se ha ido generando la información de los registros de la especie a través del tiempo en nuestro país, en qué colecciones científicas se encuentra dicha información y en qué estados, tipo de vegetación y Áreas Naturales Protegidas (ANP) están. Para ello se generó una base de datos de registros de colecta de la especie a partir de la literatura y de colecciones científicas a través de portales digitales. A esta base de datos se le eliminaron los datos que no contaran con información de la localidad y sin coordenadas. Se analizaron los registros para obtener un recuento histórico del inventario de las colectas realizadas por año y colección y se realizó una curva de acumulación de registros en intervalos de 10 años. Asimismo, por medio del programa Qgis se intersecaron las localidades con los tipos de vegetación, los estados de la república y las ANP, y se obtuvo el número de registros que se encuentran dentro de ellos. Como resultados tuvo un total de 427 localidades, provenientes de 39 colecciones: 305 localidades de 28 colecciones de Estados Unidos de América, 111 de 11 colecciones nacionales y uno de una colección alemana. La colección con más ejemplares fue la ENCB (Laboratorio de Cordados Terrestres, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional) con 39 ejemplares. El primer registro de la especie fue colectado en 1950, por Smith y Taylor en la localidad de San Juan Teotihuacán, en el Estado de México. Los años con más registros fueron 1970 y 1978 con 14 registros por igual. De acuerdo con las coberturas de vegetación, esta especie se distribuye principalmente en matorral xerófilo y en bosques de pino-encino, con clima árido cálido, de acuerdo con las coberturas de ANP Federales de México, la especie se encuentra dentro de 21 ANP, de los 427 registros tan sólo 32 se encuentran dentro de algún ANP en los estados de Aguascalientes, Ciudad de México, Coahuila, Durango, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Veracruz y Zacatecas, mientras que en los estados de Chiapas, Chihuahua, Guanajuato, Guerrero, Estado de México, Nayarit, Oaxaca, Sonora, Tamaulipas y Tlaxcala no se encuentran en ninguna ANP, por lo que se sugiere que se implemente mayor protección a esta especie, ya que es una especie endémica y es muy importante para la fauna mexicana.

### INTRODUCCIÓN

México es el segundo país con el mayor número de especies de reptiles, “1,100 especies de reptiles y anfibios conjuntamente” (Sierra, et al., 2014). La fauna de reptiles de México es una de las más diversas del mundo y además con un alto grado de endemismo, los reptiles mexicanos han sido estudiados por lo menos desde tiempos de la colonia (Flores-Villela y García-Vázquez, 2014), es por esto por lo que su investigación es esencial, la evaluación de la distribución de las especies puede ayudar a mejorar su protección y cuidados dentro del país con reforzamientos de áreas protegidas o colocar alguna especie en rango de riesgo.

El género *Pituophis* pertenece a la familia Colubridae, la cual cuenta con la mayor riqueza de especies en México (Flores-Villela y García-Vázquez, 2014) y poco se sabe sobre la biología de las serpientes pertenecientes a dicha familia (Sosa-Bartuano, 2017), El género *Pituophis* se distribuye



en Norteamérica principalmente en México y Estados Unidos, dentro de este género encontramos un total de siete especies; *P. catenifer* (Blainville, 1835), *P. deppei* (Duméril, 1853), *P. insulanus* (Klauber, 1946), *P. lineaticollis* (Cope, 1861), *P. melanoleucus* (Daudin 1803), *P. ruthveni* (Stull, 1929) y *P. vertebralis* (Blainville, 1835), siendo *P. deppei* la más estudiada e investigada (Hidalgo y Gutiérrez, 2019).

*P. deppei* se caracteriza por tener una longitud de 100 a 130 cm, su coloración ventral es clara, cercana a blanco con ciertas manchas, mientras que la parte superior posee un color más amarillento con diferentes manchas más oscuras (27 - 49 manchas dorsales rectangulares, Duellman, et al., 1960). Es una especie endémica de México, cuya distribución abarca varias regiones del centro y sur de México, desde el Sur de Chihuahua y Coahuila hasta la zona centro del Altiplano Mexicano, llegando a lugares como Puebla y Veracruz. En sí, esta especie se localiza principalmente en la zona centro del país (Hidalgo y Gutiérrez, 2019). Su presencia en estas áreas muestra su adaptabilidad a diferentes tipos de hábitats. De acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010 (DOF, 2019) la especie se encuentra Amenazada (A), mientras que en Categorías de riesgo UICN se encuentra como Preocupación menor (LC). El objetivo de este trabajo fue actualizar y analizar cómo se ha ido generando la información de los registros de la especie a través del tiempo en nuestro país, en qué colecciones científicas se encuentra dicha información y en qué estados, tipo de vegetación y Áreas Naturales Protegidas (ANP) están.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de datos biológicos. Los datos de presencia de la especie se obtuvieron a partir de dos fuentes: 1) literatura especializada y 2) bases de datos digitales: Sistema Nacional de Información sobre Biodiversidad de México (SNIB, <https://www.snib.mx/>), The Global Biodiversity Information Facility (GBIF, [www.gbif.org](http://www.gbif.org)). Se analizó cada dato de la base obtenida con la finalidad de evitar datos mal georeferenciados y en casos de ser necesario se georeferenciaron diferentes datos a partir de las localidades, esto por medio de Global Gazetteer versión 2.3 (<http://www.fallingrain.com>) y Google Earth. A esta base de datos se le eliminaron los datos que no contaran con información de la localidad y sin coordenadas. Con lo que se obtuvo una base propia para poder realizar diferentes mapas de distribución por especie en programas como QGIS y ARCVIEW, esto con la finalidad de realizar un mapa general de la distribución.

Asimismo, se analizaron los registros para obtener un recuento histórico del inventario de las colectas realizadas por año y colección y se realizó una curva de acumulación de registros en intervalos de 10 años. Por medio del programa Qgis se intersecaron las localidades con coberturas digitales como los tipos de vegetación (Rzedowski, 1990), los estados de la República (INEGI, 2022) y las ANP (CONANP, 2002), y se obtuvo el número de registros que se encuentran dentro de ellos.

## RESULTADOS

Con los resultados obtenidos notamos que esta especie se distribuye casi por todo el país en los estados de Oaxaca, Jalisco, Michoacán, Morelos, Puebla, Veracruz, México, Ciudad de México, Chihuahua, Sonora, Zacatecas, Durango, Chiapas, Guerrero, Nayarit, Hidalgo y San Luis Potosí (fig. 1).



Figura 1. Localidades de registro de *Pituophis deppei* (puntos rojos).

Las colecciones científicas son un acervo de suma importancia de información de la biodiversidad, cada ejemplar recolectado representa información biológica y geográfica valiosa, ya que la información de la localidad asociada al ejemplar nos permite conocer su distribución geográfica e identificar patrones (Cervantes- Reza, 2016). En este trabajo se obtuvieron 3,349 registros, de los cuales tras la depuración quedaron 427, provenientes de un total de 39 colecciones: 305 localidades de 28 colecciones de Estados Unidos de América, 111 de 11 colecciones nacionales y uno de una colección alemana. La colección con más ejemplares es la ENCB (Laboratorio de Cordados Terrestres, Departamento de Zoología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional) con 39 ejemplares (Tabla 1). Únicamente 318 registros contaban con año de colecta, el año con mayor cantidad de registros son 1970 y 1978 con 14 registros por igual (fig. 2)

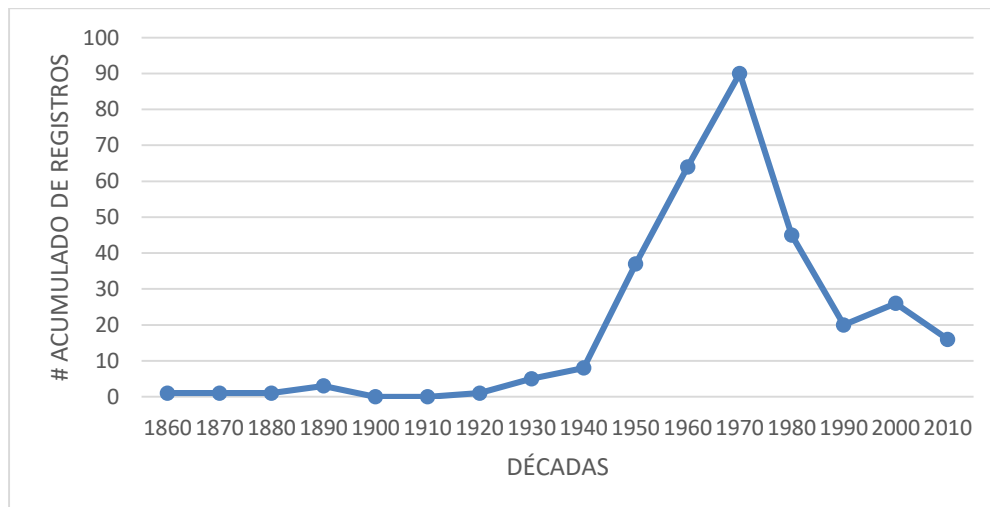


Figura 2.- Recuento histórico (registros acumulados) de las colectas de *Pituophis deppei* por décadas

Tabla 1.- Número de ejemplares de *Pituophis deppei* depositados en colecciones científicas nacionales (\*), de Estados Unidos (\*\*), y de Alemania (\*\*\*)

SIGLAS DE LA COLECCIÓN	NOMBRE DE LA COLECCIÓN	NÚMERO DE REGISTROS
ENCB*	Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional	39
TCWC**	Texas Cooperative Wildlife Collections, Texas A & M University	27
UMMZ**	University of Michigan, Museum of Zoology	25
CNAR*	Instituto de Biología, UNAM	25
UIMNH**	University of Illinois, Urbana Champaign	23
MZFC*	Museo de Zoología Alfonso L. Herrera, Facultad de Ciencias, UNAM	23
UTEP**	The Centennial Museum and Chihuahuan	22
KUH**	Biodiversity Institute and Natural History Museum, University of Kansas	22
AMNH **	American Museum of Natural History	19
UAZ**	University of Arizona	18
LSU**	Louisiana State University, Museum of Natural Science	18
USNM**	National Museum of Natural History, Smithsonian Institution	17
UTA**	University of Texas, Arlington	16
MCZ**	Museum of Comparative Zoology, Harvard University	16
LACM**	Natural History Museum, Los Angeles County	16
UCM**	University of Colorado, Boulder	13
CM**	Carnegie Museum of Natural History	12
CIB-UAEH*	Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo	8
CAS-HERP**	California Academy of Sciences	7
TNHC**	College of Natural Sciences, University of Texas, Austin	6
FMNH**	Field Museum of Natural History	6
UF**	Interdisciplinary Center for Biotechnology Research, University of Florida	5
MVZ**	Museum of Vertebrate Zoology, University of California, Berkeley	5
UANL*	Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León	4
TU**	Tulane University, New Orleans	4
LE-UBIPRO*	Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM	4
CZIIZD*	Instituto de Investigaciones de Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí	3
UMNH**	Utah Museum of Natural History, University of Utah	2
SDNHM**	San Diego Natural History Museum	2
NCSM**	North Carolina State Museum of Natural Sciences	2
MADUG-HE*	Museo de Historia Natural Alfredo Dugés, Universidad de Guanajuato	2
FLMNH**	Florida Museum of Natural History, University of Florida	2
BYU**	Monte L. Bean Life Science Museum, Brigham Young University	2
SMNS***	Staatliches Museum für Naturkunde Stuttgart	1
SLU**	Southeastern Louisiana University	1
OSU**	Oregon State University	1
ECO-SC-H*	El Colegio de la Frontera Sur, San Cristóbal de las Casas	1
EBUAP*	Escuela de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla	1
CARUM*	Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos	1

Con los resultados obtenidos con *Pituophis deppei* notamos que esta especie se distribuye casi por todo el país en los estados de Oaxaca, Jalisco, Michoacán, Morelos, Puebla, Veracruz, México, Ciudad de México, Chihuahua, Sonora, Zacatecas, Durango, Chiapas, Guerrero, Nayarit, Hidalgo y San Luis Potosí. Estos resultados validan la distribución vista en la literatura y solamente genera una propuesta de distribución con los estados del sur donde antes no se tenían tantos registros en los estados de Oaxaca y Guerrero y se toma al estado de Chiapa como un nuevo lugar de distribución. La poca diferencia entre lo obtenido en este trabajo con lo visto en la literatura se debe a que esta especie es la más estudiada de todo el género y, por lo tanto, los registros de su distribución son más recientes que en los otros casos. Es importante destacar que se encuentra una mayor cantidad de colecciones extranjeras con ejemplares de estas especies, a pesar de ser endémicas de México (Tabla 1).

La vegetación donde se encuentra *P. deppei* puede variar dependiendo de su ubicación geográfica. En general, estas serpientes se encuentran en bosques tropicales, matorrales, áreas rocosas y pastizales. Estos hábitats les proporcionan refugio y fuentes de alimento adecuadas para su supervivencia. De acuerdo con las coberturas de vegetación, esta especie se distribuye principalmente en matorral xerófilo y en bosques de pino-encino, con clima árido cálido. Algunas áreas naturales protegidas en México donde se ha registrado la presencia de *P. deppei* incluyen el Parque Nacional Cofre de Perote, la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán y la Reserva de la Biosfera Montes Azules, entre otras. De acuerdo con las coberturas de ANP Federales de México, de los 427 registros tan sólo 32 se encuentran dentro de algún ANP en los estados de Aguascalientes, Ciudad de México, Coahuila, Durango, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Veracruz y Zacatecas (fig. 2), mientras que en los estados de Chiapas, Chihuahua, Guanajuato, Guerrero, Estado de México, Nayarit, Oaxaca, Sonora, Tamaulipas y Tlaxcala no se encuentran en ninguna ANP, por lo que se sugiere que se implemente mayor protección a esta especie, ya que es una especie endémica y es muy importante para la fauna mexicana.

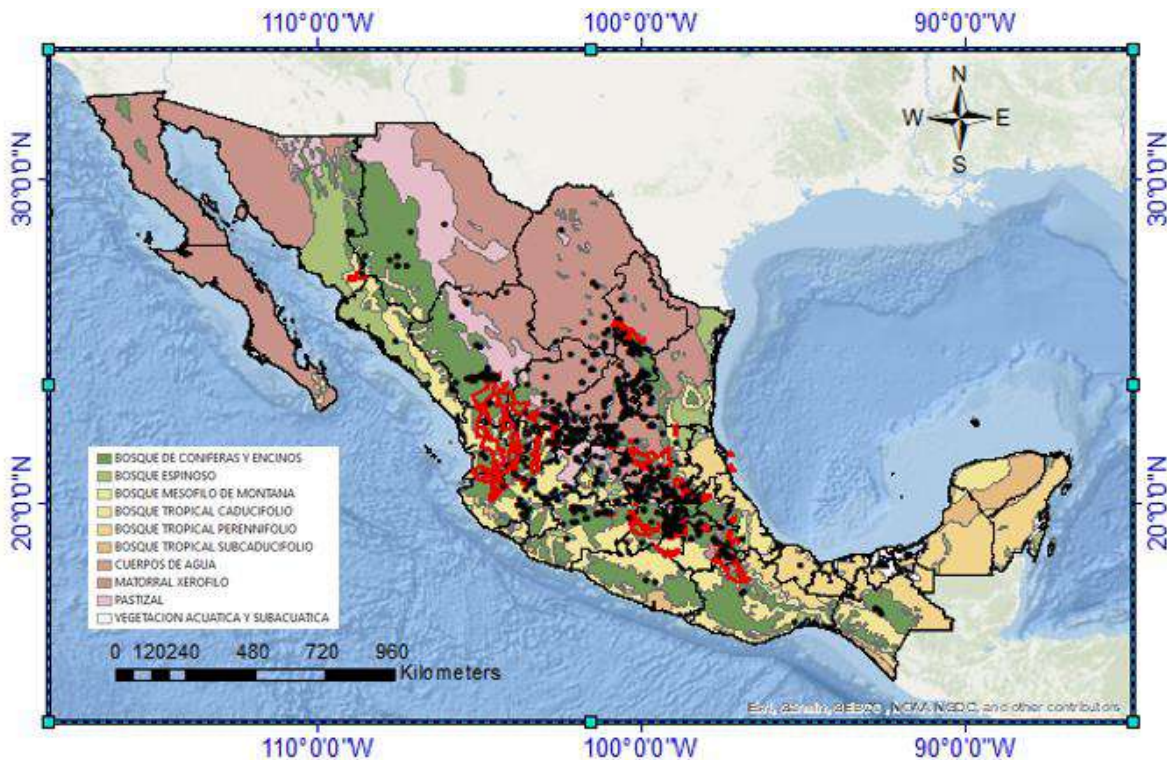


Figura 2. Localidades de registro de *Pituophis deppei* (puntos negros), Áreas Naturales Protegidas (polígonos rojos) y tipos de vegetación.



## CONCLUSIONES

La conservación de *P. deppei* es importante debido a su papel en el ecosistema y su valor como especie nativa de México. Aunque no se encuentra actualmente en peligro crítico, es necesario monitorear y proteger sus poblaciones para evitar posibles declives futuros. Aunque la Lista Roja de la UICN señala que la especie está en la categoría de “Preocupación menor”, la Norma Oficial mexicana (NOM-059-ECOL-1994) la coloca como “Amenazada”, lo que indica que enfrenta una amenaza de extinción. En México, existen (ANP) que desempeñan un papel importante en la conservación de la biodiversidad. Estas áreas proporcionan refugio y hábitats seguros para muchas especies, incluyendo a esta serpiente, sin embargo, gran parte de su área de distribución no se encuentra dentro del alguna ANP

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Cervantes, F. A. & p. Montañón Sosa. Rata de Magdalena: un importante mamífero mexicano, poco conocido y en riesgo de extinción”. Revista Digital Universitaria, 20, 5, 1990, doi: <http://doi.org/10.22201/codeic.16076079e.2019.v20n5.a2>
- 2.- CONANP (Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas), 'Áreas Naturales Protegidas Federales de México', Ciudad de México. (00/03/2022). [http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/?vns=gis\\_root/region/biotic/anpene2023gw](http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/?vns=gis_root/region/biotic/anpene2023gw)
- 3.- DOF (Diario Oficial de la Federación), Modificación del Anexo Normativo III, Lista de especies en riesgo de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo, publicada el 30 de diciembre de 2010. Publicada el 30 de diciembre de 2010. Diario Oficial de la Federación. México, 14 de noviembre del 2019.
- 5.- Dulleman, W., R. Hall, S. Henry & R. Wilson, A Taxonomic Study of the Middle American Snake, *Pituophis deppei*. University of Kansas Publications. Topeka, Kansas. 28.2493 pp.
- 6.- Flores-Villela, O. & O. U. García-Vázquez, Biodiversidad de reptiles en México. Revista Mexicana de biodiversidad. 85, 2014, pp. S467-S475.
- 7.- GBIF.org. (2022). GBIF Occurrence Download. Recuperado el 28 de marzo, 2022 de: <https://doi.org/10.15468/dl.acdwka>.
- 8.- Hidalgo, L. & M. Gutiérrez, Variación ecomorfológica en la serpiente *Pituophis deppei* (Squamata: Colubridae). Facultad de Ciencias Biológicas BUAP. Recuperado el 29 noviembre, 2021 de: <https://repositorioinstitucional.buap.mx/bitstream/handle/20.500.12371/4478/706119T.pdf?squence=1>.
- 9.- INEGI, (00/12/2022). 'Áreas geoestadísticas estatales, 2022', escala: 1:250000. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México. [http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/?vns=gis\\_root/dipol/estata/dest22gw](http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/?vns=gis_root/dipol/estata/dest22gw)
- 10.- Sosa-Bartuano, A. (2017). Catalogación de las serpientes de la familia Colubridae en la Colección Zoológica Dr. Eustorgio Méndez. Visión Antataura, 1(2), 101–101. Recuperado a partir de <https://revistas.up.ac.pa/index.php/antataura/article/view/216>
- 11.- Sierra, C., J. Sosa, P. Cortés, A. Solís, L. Íñiguez & R. Ortega-Rubio, México país megadiverso y la relevancia de las áreas naturales protegidas. Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. 60, 2014, pp. 16-22.
- 12.- Rzedowski, J. (1990). 'Vegetación Potencial'. IV.8.2. Atlas Nacional de México. Vol II. Escala 1:4000000. Instituto de Geografía, UNAM. México. [http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/?vns=gis\\_root/usv/otras/vpr4mgw](http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/?vns=gis_root/usv/otras/vpr4mgw)

## ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE EN LA DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA POR UV-VIS DE CICLAMATO SÓDICO, MICROEXTRAÍDO MEDIANTE EMULSIFICACIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO

Julieta Berenice Medina García<sup>1</sup>, Diana Paola Rojo García<sup>2</sup>, Yair Israel Ortiz Cruz<sup>3</sup>, Alejandro Núñez Vilchis<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Instrumentación Analítica, Parque Biotecnológico UAQ, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas S/N Querétaro, Qro. C. P. 76010  
[jmedina57@alumnos.uaq.mx](mailto:jmedina57@alumnos.uaq.mx)

### RESUMEN

El ciclamato de sodio es un edulcorante artificial no calórico utilizado en bebidas bajas en calorías, sus niveles en estos productos están regulados por la NOM-218-SSA1-2011 estableciendo la concentración límite en 350 mg/L considerando sus implicaciones en la salud humana siendo relacionado con cáncer de vejiga. En 2015, Hashemi y colaboradores, desarrollaron un método analítico para cuantificar dicho edulcorante a través de una microextracción previa emulsificación asistida por ultrasonido mediante la formación de un complejo con rodamina B en medio ácido, dicho complejo es colorido, permitiendo su determinación utilizando espectrofotometría visible. El método fue validado sin incluir el parámetro de incertidumbre. En este sentido, el objetivo del proyecto fue estimar la incertidumbre de medida considerando la repetibilidad, la reproducibilidad, la curva de calibración y la absorbancia como principales fuentes de influencia; un diagrama de Ishikawa permitió identificar al tiempo de sonicación, concentración de ácido sulfúrico y concentración de rodamina B, como variables de influencia en la medición de absorbancia del complejo. Mediante análisis de muestras sintéticas para la obtención de datos, y para el análisis de estos se utilizaron gráficos de superficie respuesta y modelos de correlación para obtener las funciones matemáticas entre las variables de influencia y el mensurando; obtenidos los modelos matemáticos se utilizaron derivadas parciales y la ley de propagación de la incertidumbre descrita en la Guía Para Estimar la Incertidumbre de la Medición (GUM) para calcular la incertidumbre combinada y la expandida utilizando un factor de cobertura (k) de 2. En el análisis de una muestra con concentración promedio de 434.86 ng/mL (N=6) se obtuvo una incertidumbre expandida de  $\pm 21.30$  ng/mL. La incertidumbre con mayor contribución a la incertidumbre de la absorbancia fue la asociada al tiempo de sonicación, con un porcentaje de 88.9%. Respecto a la contribución a la incertidumbre combinada del método, la que obtuvo una mayor aportación fue la asociada a la curva de calibración, con un porcentaje de 55.8%; seguida de la asociada a la absorbancia, con un porcentaje de 43.0%. Este proyecto permitió encontrar la fuente de mayor variación para este método analítico para cuantificar ciclamato sódico en muestras acuosas; por ende, conocer la certeza en la determinación de concentraciones del edulcorante mediante esta técnica y corroborar se encuentren dentro de los límites establecidos.

### INTRODUCCIÓN

Existen distintas mediciones a realizar para el aseguramiento de la capacidad de proporcionar datos con la calidad requerida para los usuarios, y que actualmente es un requerimiento formal para los laboratorios. Una de esas mediciones requeridas es la incertidumbre de medida (frecuentemente denominada en forma abreviada "incertidumbre") (CENAM-ema, 2008).

Para la determinación espectrofotométrica por UV-VIS que es una técnica comúnmente utilizada para el análisis de la concentración de compuestos en muestras, es importante tomar en cuenta las incertidumbres asociadas a el resultado obtenido. En este caso, para la determinación espectrofotométrica de ciclamato sódico, uno de los principales edulcorantes artificiales implementado en bebidas refrescantes bajas en calorías, ya que es crucial conocer el intervalo de confianza aproximado para el valor verdadero del mensurado debido a su implicación en la salud humana por un consumo mayor al límite establecido por la NOM-218-SSA1-2011.

Es por esto por lo que el objetivo de este estudio es realizar una estimación de la incertidumbre asociada a la determinación espectrofotométrica por UV-VIS del ciclamato sódico microextraído mediante emulsificación asistida por ultrasonido. Para ello, se llevará a cabo un análisis detallado de las fuentes de incertidumbre, incluyendo absorbancia del complejo [ciclamato] [RhBH<sup>+</sup>], factores que



afectan la absorbancia del complejo, la incertidumbre en la curva de calibración, entre otros factores relevantes. Por medio de la evaluación de los diferentes componentes de incertidumbre, se buscará establecer un enfoque confiable y preciso para la determinación cuantitativa del ciclamato sódico en muestras.

En resumen, este estudio se centra en la estimación de la incertidumbre en la determinación espectrofotométrica por UV-VIS de ciclamato sódico microextraído mediante emulsificación asistida por ultrasonido. La investigación realizada proporcionará información importante para mejorar la precisión y confiabilidad de los análisis de ciclamato sódico, lo que resulta fundamental en la industria alimentaria y para la protección de la salud pública.

## TEORÍA

La espectrofotometría UV-Vis se usa ampliamente para la determinación de varias especies orgánicas e inorgánicas y está disponible fácilmente en la mayoría de los laboratorios. Tienen las ventajas tener un bajo costo y fácil manejo. Sin embargo, la aplicación de esta técnica para el análisis de diferentes muestras reales está limitada por su escasa sensibilidad y selectividad. La combinación de este con algunos métodos avanzados de microextracción puede superar estos problemas. Es por esto el interés en la metodología desarrollada por (Hashemi,2015) debido a la necesidad de corroborar que los niveles de ciclamato en productos comerciales se encuentren dentro de los establecidos de acuerdo con la NOM-218-SSA1-2011, los cuales son de 350 mg/L; ya que es un compuesto cuyo consumo fuera de las concentraciones permitidas conlleva un riesgo biológico al consumidor.

## PARTE EXPERIMENTAL

### 1. Microextracción y cuantificación

Todas las disoluciones se prepararon con anticipación a excepción de las soluciones que tienen rodamina, estas fueron preparadas cada vez que tuvo a lugar la experimentación. Se preparó una solución madre de ciclamato sódico en ácido sulfúrico 1 mol/L de 1000 mg/L. A partir de esta se prepararon una segunda solución tomando 100  $\mu$ L para lograr una concentración de 10000 ng/mL. Se colocó el tubo de ensayo que contenía el ácido ciclámico en un baño ultrasónico a 60 Hz, de manera que el nivel del líquido contenido en el interior del tubo y el del ultrasonido se encontraran al mismo nivel, se agregaron 5000  $\mu$ L de rodamina 0.0002 M haciendo uso de una micropipeta y se inició con la sonicación por un tiempo de 20 a 25 s. Una vez finalizado el proceso de sonicación, se dejó reposar por 1 minuto para alcanzar el equilibrio y se centrifugó por 6 minutos a 3200 rpm. Al sacar el tubo de la centrífuga se observó la formación de una fase rosa en el fondo, este corresponde al complejo formado de [ciclamato] [RhBH<sup>+</sup>].

Se comenzó con la preparación de las 7 disoluciones estándar para la curva de calibración; a concentraciones de 0, 50, 150 300, 500, 750 y 900 ng/mL, esto de acuerdo con el rango lineal establecido (Hashemi, 2015). Con una micropipeta se extrajeron los microlitros necesarios del complejo para preparar las concentraciones antes mencionadas; se trasladó cada volumen a un matraz volumétrico de 2 mL y se aforó con cloroformo.

Se procedió con la lectura de cada disolución una celda de cuarzo para su lectura en el espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda máxima de 558 nm, utilizando cloroformo como blanco. Todo el procedimiento antes descrito se repitió 5 veces para obtener los datos necesarios para realizar el análisis estadístico. Las primeras 3 repeticiones fueron realizadas por el mismo analista para calcular la incertidumbre asociada a la repetibilidad y calcular la concentración en la muestra problema. Las otras dos repeticiones las realizaron los otros dos analistas del equipo para calcular la incertidumbre asociada a la reproducibilidad.

Para la cuantificación de ciclamato en muestras de bebida gaseosa se sintetizó la matriz utilizada; esta contenía agua gasificada, colorante comestible y otros edulcorantes diferentes al ciclamato sódico. La muestra se preparó para que se leyera una concentración de 435 ng/mL. Se desgasificó

en el ultrasonido por 6 minutos. Se tomaron 6 alícuotas de 5 mL, que fueron colocadas en tubos de ensayos, los cuales se le añadió 200  $\mu\text{L}$  de rodamina-B 0.0002 mol/L y se sonicaron por 20 a 25 segundos a 60 Hz. Una vez formado la fase orgánica rosa se tomaron 100  $\mu\text{L}$ , se transfirieron a un matraz volumétrico de 2 mL y se aforó con cloroformo; finalmente se transfirieron a la celda de cuarzo para su lectura a 558 nm en el espectrofotómetro.

## 2. Modelo matemático para la cuantificación del mensurado (concentración del ciclamato).

Después de obtener la curva de calibración para calcular el mensurado, con base en la ecuación de la recta obtenida se realizó una interpolación para calcular la concentración de ciclamato sódico. (Lorêdo de França, 2020).

## 3. Incertidumbre asociada a la curva de calibración

La lectura en UV-Vis de las disoluciones estándar se hizo por triplicado a concentraciones de 50, 150, 300, 500, 750 y 900 ng/mL (Karakurt, 2017).

## 4. Incertidumbre asociada a la absorbancia del complejo Ciclamato-RhB

Puesto que la absorbancia del complejo [ciclamato] [RhBH<sup>+</sup>] se ve afectada por la concentración de RhB, la concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el tiempo de sonicación, la ecuación para calcular la incertidumbre en la absorbancia del complejo es la siguiente (Lorêdo de França, 2020).

La matriz experimental que se utilizó para el modelo matemático se obtuvo mediante el software estadístico JMP, con el fin de evaluar cómo las absorbancias del complejo son afectadas por la concentración de RhB, concentración de ácido sulfúrico y tiempo de sonicación que se muestran en el cuadro 1. Las condiciones para todos los experimentos fueron el volumen de muestra de 5 mL, la concentración de ciclamato de 500 ng/mL, 200  $\mu\text{L}$  de rodamina y tiempo de centrifugación de 6 minutos. Con los valores obtenidos de dichos experimentos se calcularon las derivadas parciales de la ecuación 6 de cada una de las variables.

Cuadro 1. Matriz experimental utilizada para evaluar el efecto de [RhB], [H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] y el tiempo de sonicación sobre la absorbancia del complejo rodamina-ciclamato

No .Experimento	Concentración de RhB (mol L <sup>-1</sup> )	Concentración de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	de	Tiempo de sonicación (s)
#1	0.00035	0.00010		15
#2	0.00035	0.10000		15
#3	0.00018	0.05005		15
#4	0.00035	0.10000		50
#5	0.00002	0.00010		32
#6	0.00002	0.07053		50
#7	0.00002	0.10000		15
#8	0.00018	0.09650		32
#9	0.00035	0.05005		32
#10	0.00018	0.00010		50

Se preparó en un matraz aforado de 100 mL una disolución madre de ácido sulfúrico 0.1 mol/L; a partir de esta se prepararon 50 mL de solución a diferentes concentraciones, las cuales fueron 0.0001, 0.1, 0.05005, 0.07053 y 0.09650 mol/L. Se prepararon 5 disoluciones stock de ciclamato de sodio disuelto en ácido sulfúrico; para esto se colocó 0.01 gramos del edulcorante en 5 matraces

volumétricos de 10 mL y cada uno se aforó con solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a las 5 diferentes concentraciones molares antes mencionadas. Se enumeraron 10 matraces volumétricos de 5 mL del 1 al 10, se colocaron 2  $\mu\text{L}$  de las soluciones stock preparadas y se aforó con ácido sulfúrico acuerdo con las concentraciones indicadas en la tabla 2. Se transfirió el volumen de los matraces a tubos de ensayo. La concentración de RhB añadida y el tiempo de sonicación al que se sometió cada tubo, fue de acuerdo con lo establecido en el cuadro 1.

Se prosiguió a centrifugar por 6 minutos a 3200 rpm y se transfirieron 100  $\mu\text{L}$  del complejo formado a un matraz volumétrico de 2 mL, a continuación, se aforó con cloroformo para luego verter el contenido en una celda de cuarzo y realizar su lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda máxima de 558 nm.

#### 5. Incertidumbre asociada a la concentración de ácido sulfúrico y rodamina-B

Para estimar la incertidumbre asociada a la concentración de RhB y ácido sulfúrico se tomaron en cuenta la masa y el volumen.

El volumen tiene tres grandes influencias; tolerancia, repetibilidad y efectos de la temperatura. Se tomará la incertidumbre de la tolerancia reportada por el fabricante. En este caso, la incertidumbre estándar se calculó tomando en cuenta una distribución triangular, ya que, en un proceso productivo eficaz, el valor nominal es más probable que los extremos. La distribución resultante está mejor representada por una distribución triangular que por una rectangular (Ellison & Williams, 2012).

#### 6. Incertidumbre asociada al tiempo de sonicación

Para estimar la incertidumbre asociada al tiempo de sonicación se utilizó un cronómetro con certificado de calibración.

#### 7. Incertidumbre combinada

Teniendo en cuenta la ley de propagación de la incertidumbre, la incertidumbre combinada relativa se calculó como la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de las componentes de incertidumbre, de acuerdo con la ecuación (Takano, 2017).

#### 8. Incertidumbre expandida

La incertidumbre expandida,  $U$ , se calculó multiplicando la incertidumbre típica combinada por factor de cobertura,  $k$ , de acuerdo con la ecuación. Se utilizó un valor de  $k=2$  para el factor de cobertura, que proporciona un nivel de confianza de aproximadamente el 95 % (Uribe, 2009).

#### 9. Análisis r & R.

Para la verificación en la variabilidad del método se realizó un análisis r & R. Se inició con la preparación de una curva de calibración a 0, 50, 150, 300, 500, 750 y 900 (ng/mL) realizado por triplicado por parte del analista 1, con los datos obtenidos se realizó el cálculo para la repetibilidad, esto para conocer la variabilidad en el dispositivo de medición; en el caso de la reproducibilidad del método para estimar la variación causada por las diferencia entre los operadores, los otros dos operadores de igual manera, realizaron la medición de las concentraciones anteriormente mencionadas, y con los resultados obtenidos se estimó la reproducibilidad.

Se requiere que el resumen del trabajo sea aceptado, que se haya cubierto la cuota correspondiente al video y que sea presentado, así como cumplir con el formato aquí descrito, de lo contrario no será

considerado para el libro. También se requiere llenar y firmar el convenio de cesión de derechos de autor.

10. Análisis estadístico

Para saber cuál fue la fuente de incertidumbre que más influyo tanto en la incertidumbre asociada a la absorbancia del complejo, como a la incertidumbre total del método se utilizaron gráficas de barras.

**RESULTADOS**

El valor obtenido de repetibilidad fue 0.1228 UA; mientras que para la reproducibilidad fue de 0.1259 UA. Para obtener el porcentaje de la relación entre la repetibilidad y la reproducibilidad, se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\%r \& R = \sqrt{(Repetibilidad)^2 + (Reproducibilidad)^2} \times 100\% \quad (ecuación 1)$$

$$\%r \& R = \sqrt{(0.1228 \text{ ng/mL})^2 + (0.1259 \text{ ng/mL})^2} = 0.1759 \text{ ng/mL} \times 100\% = 17.59\%$$

En la interpretación de resultados, este valor se encuentra dentro del rango de 10% < r&R < 30%; lo que quiere decir que el sistema de medición es aceptable por el momento (Llamosa, 2007).

Con el promedio de las tres repeticiones de la curva de calibración se obtuvo el siguiente gráfico.

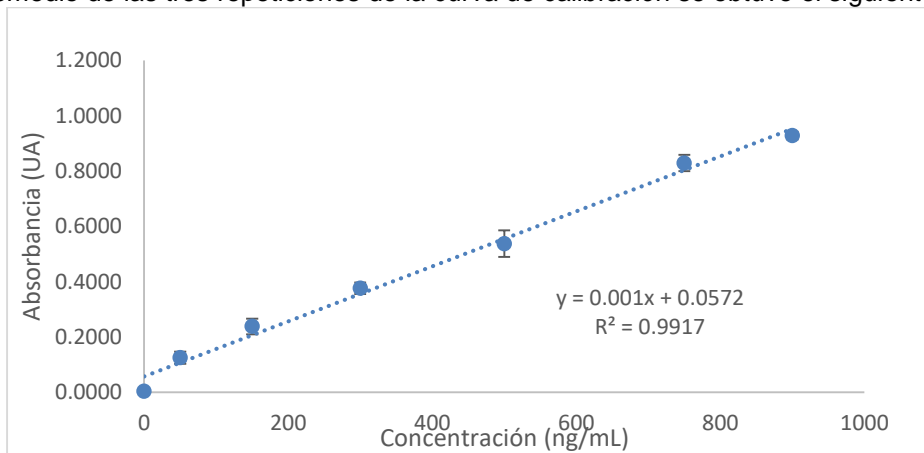


Figura 1. Curva de calibración con estándares de 0, 50, 150, 300, 500, 750 y 900 ng/mL

Los otros datos de calidad de la curva, límite de detección y límite de cuantificación, se calcularon por el método de residuales. El límite de detección fue de 96.26 ng/mL y el límite de cuantificación fue de 160.44 ng/mL. La muestra problema fue preparada con el fin de que la concentración fuera de 435 ng/mL. Se interpolaron las absorbancias en la ecuación de la recta para obtener la concentración. El promedio de las 6 repeticiones fue de 434.8601 ng/mL, con una desviación estándar de 5.73 ng/mL.

El procedimiento para el cálculo del valor de la incertidumbre asociada a la curva de calibración fue el siguiente:

$$(ecuación 2) \quad S_r = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [y_j - (a + b * c_j)]^2}{n - 2}} \rightarrow S_r = 0.0180$$

$$(ecuación 3) \quad S_{xx} = \sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c})^2 \rightarrow S_{xx} = 734285.7143 \text{ ng/mL}$$

$$(ecuación 4) \quad u_c = \frac{S_r}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c_0 - \bar{c})^2}{S_{xx}}} \rightarrow u_c = 8.4308 \text{ ng/mL}$$

Donde

$u_c$ =incertidumbre asociada a la curva de calibración

$S_{xx}$ =suma de cuadrados de los residuales de las concentraciones obtenidas por la curva de calibración

$s_r$ =desviación estándar del residual

$b$ =pendiente de la curva de calibración

$a$ =intersección de la curva de calibración

$p$ =número de mediciones realizadas para la determinación de la concentración de la muestra

$n$ =número de mediciones realizadas para la curva de calibración

$c_0$ =concentración de la muestra

$c_{avg}$ =promedio de la concentración de los estándares de calibración

$y_j$ =absorbancia del estándar de calibración

$c_{i/j}$ =concentración del estándar de calibración

El procedimiento para el cálculo del valor de la incertidumbre asociada a la absorbancia del complejo e incertidumbres asociadas con los factores que tienen efecto sobre esta fue el siguiente:

a) Incertidumbre asociada al tiempo de sonicación

$$(ecuación 5) \quad u_{t_{sonicación}} = \sqrt{u_{sd_{t_{sonicación}}}^2 + u_{cronómetro}^2}$$

$$u_{t_{sonicación}} = \sqrt{(0.7488 \text{ s})^2 + (0.065 \text{ s})^2} = \pm 0.7516 \text{ s}$$

Donde

$u_{t_{sonicación}}$ =incertidumbre asociada al tiempo de sonicación

$u_{sd_{t_{sonicación}}}$ =desviación estándar del tiempo de sonicación

$u_{cronómetro}$ =incertidumbre del cronómetro

b) Incertidumbre asociada a la concentración de ácido sulfúrico y rodamina B

#### INCERTIDUMBRE ASOCIADA AL VOLUMEN DE ÁCIDO SULFÚRICO Y RODAMINA B

$$(ecuación 6) \quad u(Mb, R) = \frac{1}{\sqrt{n}} \left( \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (Mb - \overline{Mb})^2} \right)$$

$$(ecuación 7) \quad u(Mc, R) = \frac{1}{\sqrt{n}} \left( \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (Mc - \overline{Mc})^2} \right)$$

Donde

$u(Mb, R)$ =incertidumbre asociada a la masa del matraz vacío

$u(Mc, R)$ =incertidumbre asociada a la masa del matraz lleno

$M_c$ =masa del matraz lleno

$M_b$ =masa del matraz vacío

$\overline{M_c}$ =promedio de las mediciones del matraz lleno

$\overline{M_b}$ =promedio de las mediciones del matraz vacío

$n$ =número de repeticiones

$$(ecuación 8) \quad c_{Mb} = \frac{\partial V_{20}}{\partial (Mb)} = - \left( \frac{1}{\rho_A - \rho_a} \right) \left( 1 - \frac{\rho_a}{\rho_B} \right) (1 - \alpha(T_A - 20))$$

$$(ecuación 9) \quad c_{Mc} = \frac{\partial V_{20}}{\partial (Mc)} = \left( \frac{1}{\rho_A - \rho_a} \right) \left( 1 - \frac{\rho_a}{\rho_B} \right) (1 - \alpha(T_A - 20))$$

Donde

$c_{Mb}$ =coeficiente de sensibilidad de la masa del matraz vacío

$c_{Mc}$ =coeficiente de sensibilidad de la masa del matraz lleno

$$(ecuación 10) \quad u_{repetibilidad_{V_{20}}} = \sqrt{(c_{Mb} * u_{Mb})^2 + (c_{Mc} * u_{Mc})^2}$$

$$(ecuación 11) \quad u_T = \frac{V_m \Delta T \gamma}{\sqrt{3}} \quad \gamma = 2.1 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$$

Donde

$u_T$ =incertidumbre asociada a la temperatura

$V_m$ =volumen del matraz

$\Delta T$ =variación de la temperatura del laboratorio

$\gamma$  = coeficiente de expansión de volumen de agua

$$(ecuación 12) \quad u_V = \sqrt{u_{tol}^2 + u_{rep}^2 + u_T^2}$$

Donde

$u_{tol}$ =incertidumbre asociada a la tolerancia del matraz

$u_{rep}$ =incertidumbre asociada a la repetibilidad del matraz

$u_T$ =incertidumbre asociada a la temperatura

*Incertidumbre asociada al volumen de ácido sulfúrico*

$$u(Mb, R) = \frac{1}{\sqrt{10}} \left( \sqrt{\frac{1}{10-1} * (0.0102 \text{ g})^2} \right) = \pm 0.0107 \text{ g}$$

$$u(Mc, R) = \frac{1}{\sqrt{10}} \left( \sqrt{\frac{1}{10-1} * (0.0331 \text{ g})^2} \right) = \pm 0.0192 \text{ g}$$

$$c_{Mb} = \frac{\partial V_{20}}{\partial (Mb)} = - \left( \frac{1}{0.998 \text{ g/mL} - 0.000956 \text{ g/mL}} \right) \left( 1 - \frac{0.000956 \text{ g/mL}}{8 \text{ g/mL}} \right) \\ (1 - 0.00001 \text{ K}^{-1}(23 \text{ } ^\circ\text{C} - 20)) = -3.0099 \text{ mL/g}$$

$$c_{Mc} = \frac{\partial V_{20}}{\partial (Mc)} = \left( \frac{1}{0.998 \text{ g/mL} - 0.000956 \text{ g/mL}} \right) \left( 1 - \frac{0.000956 \text{ g/mL}}{8 \text{ g/mL}} \right) \\ (1 - 0.00001 \text{ K}^{-1}(23 \text{ } ^\circ\text{C} - 20)) = 3.0099 \text{ mL/g}$$

$$u_{repetibilidad_{V_{H_2SO_4}}} = \sqrt{(-3.0099 \text{ mL/g} * 0.0107 \text{ g})^2 + (3.0099 \text{ mL/g} * 0.0192 \text{ g})^2} = \\ \pm 0.0661 \text{ mL}$$

$$u_{tolerancia} = \frac{0.1}{\sqrt{6}} = \pm 0.0408 \text{ mL} \quad u_T = \frac{(100 \text{ mL})(4 \text{ } ^\circ\text{C})(2.1 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1})}{\sqrt{3}} = \pm 0.0485 \text{ } ^\circ\text{C}$$

$$(ecuación 13) \quad u_{V_{H_2SO_4}} = \sqrt{u_{tol}^2 + u_{rep}^2 + u_T^2}$$

$$u_{V_{H_2SO_4}} = \sqrt{(0.0408 \text{ mL})^2 + (0.0661 \text{ mL})^2 + (0.0485 \text{ mL})^2} = \pm 0.0916 \text{ mL}$$



Incertidumbre asociada al volumen de rodamina B

$$u(Mb, R) = \frac{1}{\sqrt{10}} \left( \sqrt{\frac{1}{10-1} * (0.0030)^2} \right) = 0.0058 \text{ g}$$

$$u(Mc, R) = \frac{1}{\sqrt{10}} \left( \sqrt{\frac{1}{10-1} * (0.0030 \text{ g})^2} \right) = 0.0057 \text{ g}$$

$$u_{\text{repetibilidad}_{V_{RhB}}} = \sqrt{(-3.0099 \text{ mL/g} * 0.0058 \text{ g})^2 + (3.0099 \text{ mL/g} * 0.0057 \text{ g})^2} = \pm 0.0246 \text{ mL}$$

$$u_{\text{tolerancia}} = \frac{0.1 \text{ mL}}{\sqrt{6}} = \pm 0.0408 \text{ mL}$$

$$u_T = \frac{(10 \text{ mL})(4 \text{ }^\circ\text{C})(2.1 \times 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C}^{-1})}{\sqrt{3}} = \pm 0.0048 \text{ mL}^\circ\text{C}$$

$$u_{V_{RhB}} = \sqrt{(0.0408 \text{ mL})^2 + (0.0246 \text{ mL})^2 + (0.0048 \text{ }^\circ\text{C})^2} = \pm 0.049 \text{ mL}$$

INCERTIDUMBRE ASOCIADA A LA MASA DE ÁCIDO SULFÚRICO Y RODAMINA

$$(ecuación 13) \quad u_m = \sqrt{(u_{\text{calibración}})^2 + (u_{\text{repetibilidad}})^2}$$

Donde

$u_{m_{H_2SO_4}}$  = incertidumbre asociada a la masa del ácido sulfúrico

$u_{m_{RhB}}$  = incertidumbre asociada a la masa de la rodamina

$u_{\text{calibración}}$  = incertidumbre asociada a la calibración de la balanza

$u_{\text{repetibilidad}}$  = incertidumbre asociada a la repetibilidad de la balanza

$$(ecuación 14) \quad u_{\text{repetibilidad}_{balanza}} = \sqrt{(u_{Mb})^2 + (u_{Mc})^2}$$

Donde

$u_{Mb}$  = incertidumbre asociada a la masa del matraz vacío

$u_{Mc}$  = incertidumbre asociada a la masa del matraz lleno

$$u(Mb, R) = \frac{1}{\sqrt{10}} \left( \sqrt{\frac{1}{10-1} * (0.0001 \text{ g})^2} \right) = 0.0010 \text{ g} \quad u(Mc, R)$$

$$= \frac{1}{\sqrt{10}} \left( \sqrt{\frac{1}{10-1} * (0.0614 \text{ g})^2} \right) = 0.0261 \text{ g}$$

$$u_{\text{repetibilidad}_{balanza}} = \sqrt{(0.0001 \text{ g})^2 + (0.0261 \text{ g})^2} = \pm 0.0261 \text{ g}$$

Como incertidumbre asociada a la calibración de la balanza se tomó la desviación estándar de las 10 repeticiones, la cual fue de 0.0770 g.

$$u_m = \sqrt{(0.0770 \text{ g})^2 + (0.0261 \text{ g})^2} = \pm 0.0820 \text{ g}$$

COEFICIENTES DE SENSIBILIDAD DE LA INCERTIDUMBRE ASOCIADA A LA MASA Y EL VOLUMEN DE ÁCIDO SULFÚRICO Y RODAMINA B

Cálculo para los coeficientes de sensibilidad de la masa

$$M = \frac{g}{PM * L} \rightarrow n/L = \frac{g}{PM * L}$$

$$\frac{\partial M}{\partial g} = \frac{\partial}{\partial g} \left( \frac{g}{PM * L} \right) = \frac{\partial}{\partial g} \left[ \frac{1}{PM * L} (g) \right] = \frac{1}{PM * L} * \frac{\partial}{\partial g} (g) = \left( \frac{1}{PM * L} \right) (1) = \frac{1}{PM * L}$$

$$c_{i_{m_{H_2SO_4}}} = \frac{\partial M}{\partial g_{H_2SO_4}} = \frac{1}{PM * L} = \frac{1}{(98.079 \text{ g/mol})(0.1 \text{ L})} = 0.1020 \frac{\text{mol}}{\text{g} * \text{L}}$$

$$c_{i_{m_{RhB}}} = \frac{\partial M}{\partial g_{RhB}} = \frac{1}{PM * L} = \frac{1}{(479.02 \text{ g/mol})(0.005 \text{ L})} = 0.4175 \frac{\text{mol}}{\text{g} * \text{L}}$$

Cálculo para los coeficientes de sensibilidad del volumen.

$$M = \frac{g}{PM * L} \rightarrow n/L = \frac{g}{PM * L}$$

$$\frac{\partial M}{\partial L} = \frac{\partial}{\partial L} \left( \frac{g}{PM * L} \right) = \frac{\partial}{\partial L} \left[ \frac{g}{PM} * \frac{1}{L} \right] = \frac{g}{PM} * \frac{\partial}{\partial L} \left( \frac{1}{L} \right) = \left( \frac{g}{PM} \right) \left( -\frac{1}{L^2} \right) = -\frac{g}{PM * L^2}$$

$$c_{i_{V_{H_2SO_4}}} = \frac{\partial M}{\partial V_{H_2SO_4}} = -\frac{g}{PM * L^2} = -\frac{98.079 \text{ g/mol}}{(98.079 \text{ g/mol})(0.1 \text{ L})^2} = -3.0612 \frac{\text{mol}}{\text{L}^2}$$

$$c_{i_{V_{RhB}}} = \frac{\partial M}{\partial V_{RhB}} = -\frac{g}{PM * L^2} = -\frac{0.0240 \text{ g}}{(479.02 \text{ g/mol})(0.005 \text{ L})^2} = -2.0041 \frac{\text{mol}}{\text{L}^2}$$

Como las incertidumbres asociadas al volumen están en unidades de mL y el modelo matemático  $M = \frac{g}{PM * L}$  utilizado para calcular dicho coeficiente se encuentra en L, se pasaron de mL a L las incertidumbres del volumen de ácido sulfúrico y volumen de rodamina B. Obteniendo así los siguientes valores de incertidumbre.

$$u_{H_2SO_4} = \pm 9.16 \times 10^{-5} \text{ L} \quad u_{V_{RhB}} = \pm 0.0009 \text{ L}$$

$$(ecuación 15) \quad u_{C_{H_2SO_4}} = \sqrt{(u_{m_{H_2SO_4}} * c_{i_{m_{H_2SO_4}}})^2 + (u_{V_{H_2SO_4}} * c_{i_{V_{H_2SO_4}}})^2}$$

$$u_{C_{H_2SO_4}} = \sqrt{(0.0020 \text{ g} * 0.1020 \frac{\text{mol}}{\text{g} * \text{L}})^2 + [9.16 \times 10^{-5} \text{ L} * (-3.0612 \frac{\text{mol}}{\text{L}^2})]^2}$$

$$u_{C_{H_2SO_4}} = \pm 0.0220 \text{ mol/L}$$

$$(ecuación 16) \quad u_{C_{RhB}} = \sqrt{(u_{m_{RhB}} * c_{i_{m_{RhB}}})^2 + (u_{V_{RhB}} * c_{i_{V_{RhB}}})^2}$$

$$u_{C_{RhB}} = \sqrt{(0.0020 \text{ g} * 0.4175 \frac{\text{mol}}{\text{g} * \text{L}})^2 + [0.0009 \text{ L} * (-2.0041 \frac{\text{mol}}{\text{L}^2})]^2}$$

$$u_{C_{RhB}} = \pm 0.0531 \text{ mol/L}$$

Los gráficos realizados con las absorbancias obtenidas de la matriz experimental se muestran a continuación.

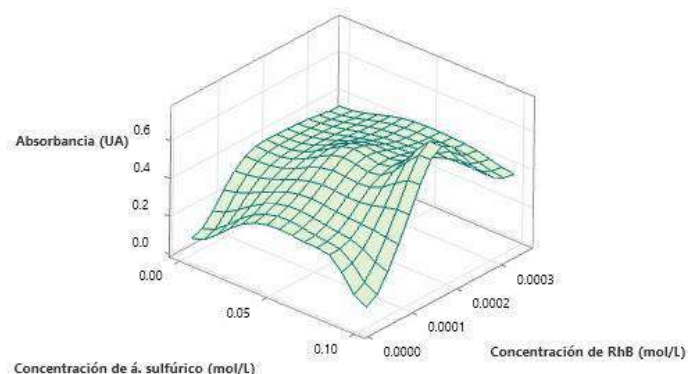


Figura 2. Gráfica de superficie Absorbancia Vs. Concentración de ácido sulfúrico, Concentración de Rodamina B

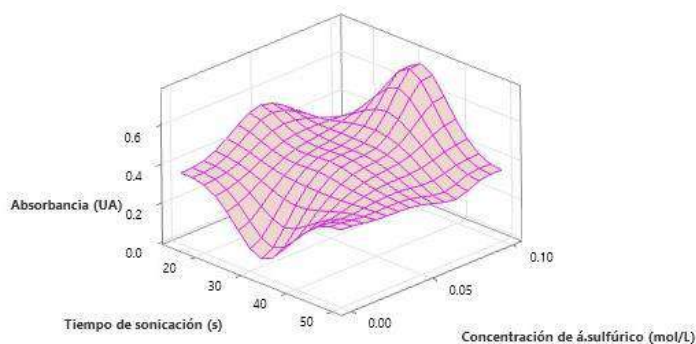


Figura 3. Gráfica de superficie Absorbancia Vs. Concentración de ácido sulfúrico, Tiempo de sonicación

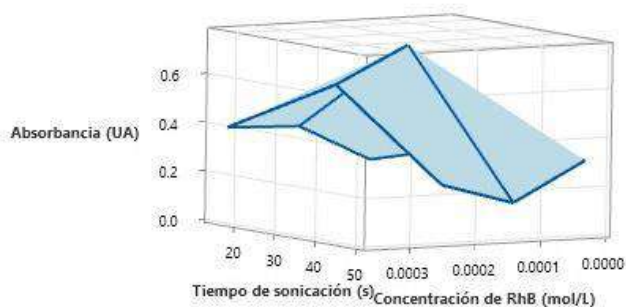


Figura 4. Gráfica de superficie Absorbancia Vs. Concentración de Rodamina B, Concentración de Rodamina B

Con los gráficos obtenidos se eligió el mejor modelo matemático para obtener la derivada parcial de cada incertidumbre relacionada a la absorbancia. Como se observa el comportamiento de las tres variables con respecto a la respuesta (absorbancia) varía dependiendo la zona del gráfico; así que, para construir las curvas y obtener su respectiva ecuación de la recta, se tomaron los datos de las zonas en las que el comportamiento es exponencial aun considerando más de una variable a la vez, ya que fue el que mejor se ajustó y obtuvo un coeficiente de correlación mayor. Las ecuaciones de la recta corresponden a los modelos matemáticos que se utilizaron para calcular mediante derivadas parciales los coeficientes de sensibilidad de las fuentes de la incertidumbre asociadas a la concentración de ácido sulfúrico, a la concentración de rodamina y al tiempo de sonicación. Las ecuaciones de cada curva, así como su coeficiente de correlación se muestran en el cuadro 2.

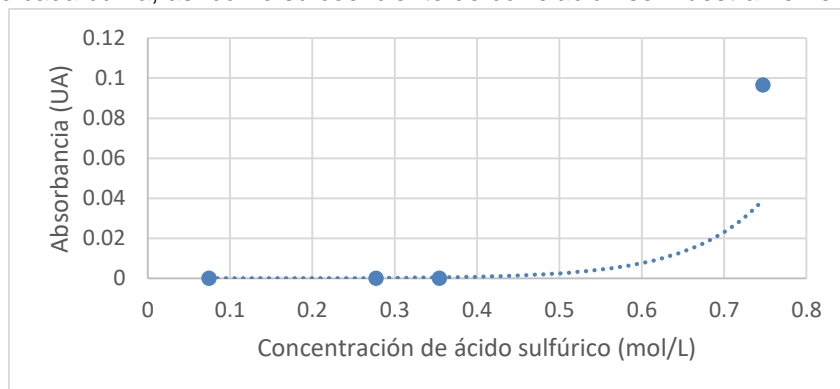


Figura 5. Curva absorbancia vs. Concentración de ácido sulfúrico.

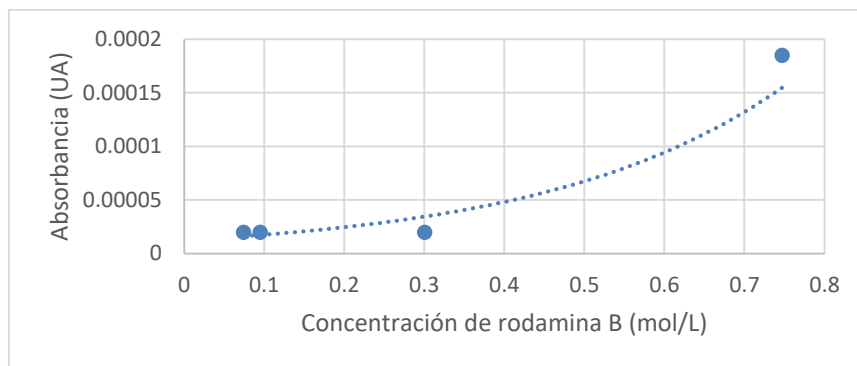


Figura 6. Curva absorción vs. Concentración de rodamina B.

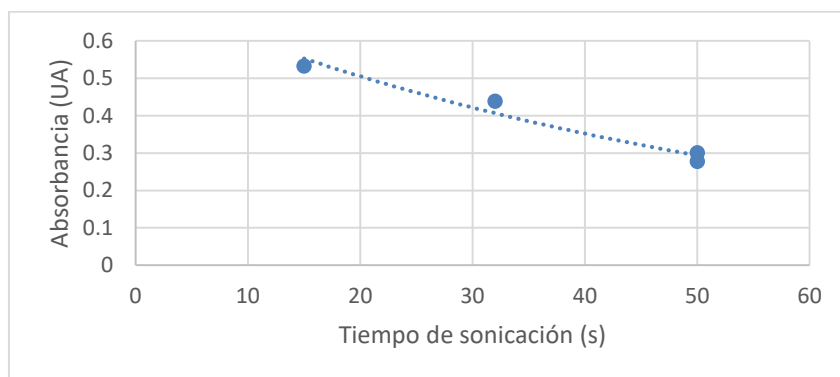


Figura 7. Curva absorción vs. Tiempo de sonicación

Cuadro 2. Modelos matemáticos y coeficientes de correlación obtenidos de las gráficas de absorción Vs. Concentración de ácido sulfúrico, Concentración de rodamina B y Tiempo de sonicación.

Gráfica	Modelo matemático	Coefficiente de correlación (R <sup>2</sup> )
Absorbancia Vs. Concentración de Rodamina B	$y = 1 \times 10^{-5} e^{3.3651x}$	0.9842
Absorbancia Vs. Concentración de ácido sulfúrico	$y = 1 \times 10^{-5} e^{11.068x}$	0.9999
Absorbancia Vs. Tiempo de sonicación	$y = 0.7255e^{-0.018x}$	0.9615

c) Incertidumbre asociada a la absorción del complejo

Con los modelos matemáticos obtenidos se calcularon las derivadas parciales, que corresponden a los coeficientes de sensibilidad, para cada incertidumbre relacionada a la absorción del complejo. A continuación, se muestra dicho procedimiento algebraico; donde el valor de  $x_1$ ,  $x_2$  y  $x_3$  es 0.1 mol/L, 0.0002 mol/L y 22.89 s, respectivamente, estos corresponden a la concentración de ácido sulfúrico, rodamina B y el promedio del tiempo de sonicación que se utilizaron en la metodología de microextracción.

$$\frac{\partial A}{\partial C_{H_2SO_4}} = \frac{\partial y}{\partial x_1} = \frac{\partial}{\partial x_1} (1 \times 10^{-5} e^{3.3651x_1}) = 1 \times 10^{-5} \frac{\partial}{\partial x_1} (e^{3.3651x_1}) = (1 \times 10^{-5})(e^{3.3651x_1})(3.3651)$$

$$\frac{\partial A}{\partial C_{H_2SO_4}} = (1 \times 10^{-5})(e^{3.3651 \cdot 0.1})(3.3651) \quad \frac{\partial A}{\partial C_{H_2SO_4}} = 3.35 \times 10^{-4} \text{ UA} \cdot \text{L/mol}$$

$$\frac{\partial A}{\partial C_{RhB}} = \frac{\partial y}{\partial x_2} = \frac{\partial}{\partial x_2} (1 \times 10^{-5} e^{11.068x_2}) = 1 \times 10^{-5} \frac{\partial}{\partial x_2} (e^{11.068x_2}) = (1 \times 10^{-5})(e^{11.068x_2})(11.068)$$

$$\frac{\partial A}{\partial C_{RhB}} = (1 \times 10^{-5})(e^{11.068 \times 0.0002})(11.068) \quad \frac{\partial A}{\partial C_{RhB}} = 3.37 \times 10^{-5} \text{ UA} \cdot \text{L/mol}$$

$$\frac{\partial A}{\partial t_{sonicación}} = \frac{\partial y}{\partial x_3} = \frac{\partial}{\partial x_3} (0.7255 e^{-0.018x_3}) = 0.7255 \frac{\partial}{\partial x_3} (e^{-0.018x_3}) = (0.7255)(e^{-0.018x_3})(-0.018)$$

$$\frac{\partial A}{\partial t_{sonicación}} = (1 \times 10^{-5})(e^{-0.018 \times 22.89})(-0.018) \quad \frac{\partial A}{\partial t_{sonicación}} = -8.65 \times 10^{-3} \text{ UA/s}$$

(ecuación 17) 
$$u_A = \sqrt{\left[ u_{C_{H_2SO_4}} \cdot \left( \frac{\partial A}{\partial C_{H_2SO_4}} \right) \right]^2 + \left[ u_{C_{RhB}} \cdot \left( \frac{\partial A}{\partial C_{RhB}} \right) \right]^2 + \left[ u_{t_{sonicación}} \cdot \left( \frac{\partial A}{\partial t_{sonicación}} \right) \right]^2 + \left[ u_{UV-Vis \text{ HP}} \cdot \left( \frac{\partial A}{\partial UV-Vis \text{ HP}} \right) \right]^2}$$

$$u_A = \sqrt{(0.0220 \text{ mol/L} \cdot 3.35 \times 10^{-4} \text{ UA} \cdot \text{L/mol})^2 + (0.0531 \text{ mol/L} \cdot 3.37 \times 10^{-5} \text{ UA} \cdot \text{L/mol})^2 + [0.7516 \text{ s} \cdot (-8.65 \times 10^{-3} \text{ UA/s})]^2 + (0.0008 \text{ UA} \cdot 1)^2}$$

$$u_A = \pm 0.0065 \text{ UA}$$

El procedimiento para obtener el coeficiente de sensibilidad de la incertidumbre asociada a la absorbancia se muestra a continuación.

$$\frac{\partial x}{\partial y} = \frac{\partial}{\partial y} \left( \frac{y-b}{m} \right) = \frac{\partial}{\partial y} \left[ \frac{1}{m} (y-b) \right] = \frac{1}{m} \cdot \frac{\partial}{\partial y} (y-b) = \frac{1}{m} (1-0) = \frac{1}{m}$$

$$c_{i_A} = \frac{1}{m} = \frac{1}{0.001 \text{ UA/mL} \cdot \text{ng}^{-1}} = 1000 \text{ ng/mL} \cdot \text{UA}$$

Sustituyendo el valor de la pendiente en el coeficiente de sensibilidad y multiplicándolo por la incertidumbre relativa de la absorbancia obtenemos el siguiente resultado.

$$u_{i_A} = (u_A)(c_{i_A}) = (0.0067 \text{ UA}) \left( \frac{1}{m} \right) = (0.0065 \text{ UA}) (1000 \text{ ng/mL} \cdot \text{UA}) = \pm 6.50 \text{ ng/mL}$$

Cuadro 3. Resultados de las incertidumbres relacionadas a la absorbancia del complejo

Incertidumbre	Fórmula	Valor (UA)	Coefficiente sensibilidad
Concentración de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	$u_{C_{H_2SO_4}} = \sqrt{u_{m_{H_2SO_4}}^2 + u_{v_{H_2SO_4}}^2}$	± 7.38x10 <sup>-6</sup>	3.35x10 <sup>-4</sup> UA · L/mol
Concentración de Rodamina B	$u_{C_{RhB}} = \sqrt{u_{m_{RhB}}^2 + u_{v_{RhB}}^2}$	± 1.79x10 <sup>-6</sup>	3.37x10 <sup>-5</sup> UA · L/mol
Tiempo de sonicación	$u_{t_{sonicación}} = \sqrt{u_{sd_{t_{sonicación}}}^2 + u_{cronómetro}^2}$	± 0.0065	-8.65x10 <sup>-3</sup> UA/s
Espectrofotómetro UV-Vis HP	No aplica	± 0.0008	1

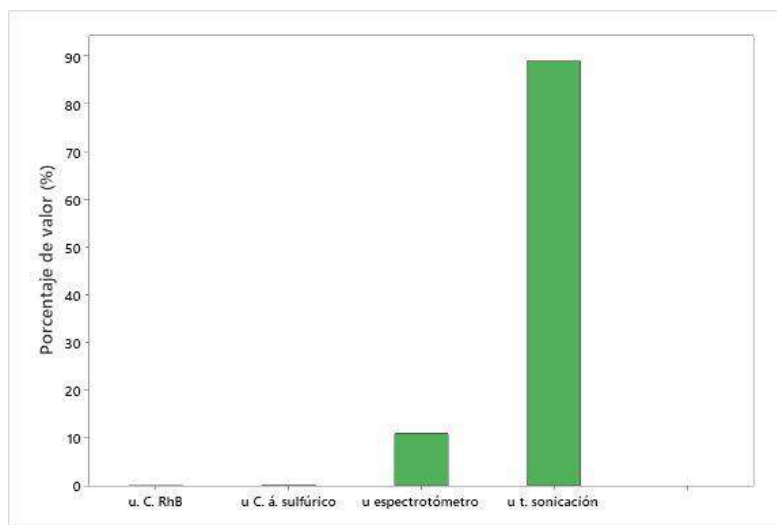


Figura 8. Gráfica de barras de la contribución a la incertidumbre asociada a la absorbancia con relación a la incertidumbre de la concentración del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentración de RhB, espectrofotómetro UV-Vis HP y tiempo de sonicación.

Como se observa, la incertidumbre con mayor contribución a la incertidumbre de la absorbancia fue la asociada al tiempo de sonicación. Una explicación experimental a esto es que la radiación ultrasónica se aplica para que ocurra la emulsión porque acelera el proceso de transferencia de masas; un proceso que en extracciones líquido-líquido, como es el caso, es fundamental. Si aplicamos un tiempo de sonicación menor al requerido, lo que puede pasar es que el proceso de emulsión y por ende la formación del complejo, no ocurra correctamente y no todo el ciclamato disuelto en el ácido sulfúrico interactúe con la rodamina b disuelta en el cloroformo; por lo tanto, no estaríamos cuantificando todo el edulcorante presente en la muestra. Si, por el contrario, el tiempo de sonicación es prolongado, el complejo formado en la fase orgánica aumenta su solubilidad en la fase acuosa y lo estaríamos perdiendo. (Hashemi, Zohrabi, & Abdolhosseini, 2015).

d) Incertidumbre combinada y expandida

La incertidumbre combinada se calculó sacando la raíz cuadrada de la sumatoria de los valores de entrada al cuadrado.

$$(ecuación 18) \quad u_Q = \sqrt{u^2_C + u^2_{iA} + u^2_{r\&R}}$$

$$u_Q = \sqrt{(8.43 \text{ ng/mL})^2 + (6.50 \text{ ng/mL})^2 + (0.18 \text{ ng/mL})^2} = \pm 10.65 \text{ ng/mL}$$

La incertidumbre expandida nos proporcionó el intervalo en el interior en el que pueda esperarse encontrar gran parte de la distribución de valores que podrían ser atribuidos al mensurando. Para calcularlo se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:

$$(ecuación 19) \quad U = u_Q \times k$$

$$U = 10.65 \text{ ng/mL} \times 2 = \pm 21.30 \text{ ng/mL}$$

El promedio de las 6 lecturas de la muestra problema fue de 434.86 Tomando el factor de cobertura de 2, que representa un nivel de confianza del 95% (CENAM-ema, 2008). Finalmente, el resultado de la determinación de la concentración del ciclamato sódico se expresa como:

$$Y = 434.86 \pm 21.30 \text{ ng/mL}$$

Cuadro 4. Resultados de la incertidumbre asociada a la curva de calibración, a la absorbancia; así como la incertidumbre combinada y expandida del método.



Incertidumbre	Fórmula	Valor (ng/mL)	Coefficiente sensibilidad
Absorbancia	$u_A = \sqrt{\left[ u_{C_{H_2SO_4}} * \left( \frac{\partial A}{\partial C_{H_2SO_4}} \right) \right]^2 + \left[ u_{C_{RhB}} * \left( \frac{\partial A}{\partial C_{RhB}} \right) \right]^2 + \left[ u_{t_{sonicación}} * \left( \frac{\partial A}{\partial t_{sonicación}} \right) \right]^2 + \left[ u_{UV-Vis HP} * \left( \frac{\partial A}{\partial UV-Vis HP} \right) \right]^2}$	± 6.50	1000 ng/mL * UA
Curva de calibración	$u_c = \frac{S_r}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c_0 - \bar{c})^2}{S_{xx}}}$	± 8.43	1
r & R	$\%r \ \& \ R = \sqrt{(Repetibilidad)^2 + (Reproducibilidad)^2}$	± 0.18	1
Combinada	$u_Q = \sqrt{u^2_c + u^2_{i_A} + u^2_{r\&R}}$	± 10.65	No aplica
Expandida	$U = k \times u_Q$	± 21.30	No aplica

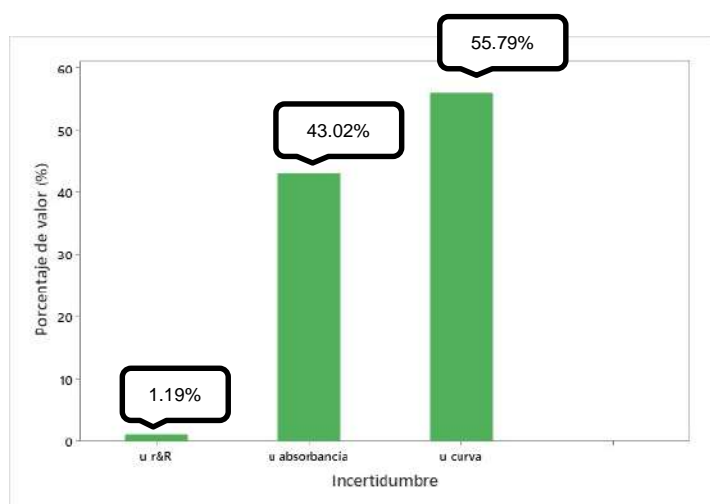


Figura 9. Contribución en la incertidumbre total en relación con la incertidumbre de la curva de calibración, absorbancia y r&R.

### CONCLUSIONES

En conclusión, el método implementado de cuantificación indirecta de ciclamato de sodio con la formación del complejo ciclamato [RhBH+] es un método eficiente y fácil de replicar. Asimismo, de acuerdo con lo visto en los resultados, se acepta la hipótesis planteada al tener un valor de la incertidumbre asociada a la curva de calibración mayor a la incertidumbre de la absorbancia.

También, por parte de las incertidumbres cuantificadas, la contribución del tiempo de sonicación es mayor en comparación de las otras fuentes de incertidumbre relacionadas a la absorbancia del complejo, y pudo obtener el intervalo con la incertidumbre expandida, en el cual se encuentra gran parte la distribución de valores que se atribuyen al mensurando.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. A. G. Evans, "Perspectiva on the development of high-toughness ceramics", *J. Am. Ceram. Soc.*, Vol. 73, 2, 1990, pp. 187-206.
2. T. Kreis, "Speckle Metrology," in *Holographic Interferometry* (Akademie Verlag Inc., New York, NY, 1996), Chapter 4, pp. 125-149.
3. Association of Official Analytical Chemists. 1990. En *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists* (págs. 1167-1169). Virginia, USA: Arlington, vol. 2.
4. Cádiz Carrasco, M. G., & García Alegría, A. M. 2015. ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE EN LA CUANTIFICACIÓN DE FÓSFORO POR ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA-VISIBLE. *Biotecnica*, 34-41.
5. CENAM-ema. 2008. Guía técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en las mediciones analíticas que emplea la técnica de espectrofotometría de ultravioleta-visible. México, 2-5.
6. Diaconu, I., Aboul-Enein, H., Bunaciu, A., & Tănase, I. 2010. Estimation of Uncertainty for Measuring Codeine Phosphate Tablets Formulation. *Analytical Letters*, 1207-1216.
7. Ellison, S., & Williams, A. 2012. Quantifying Uncertainty in. Alemania: CITAC, 3a ed.
8. Hashemi, M., Zohrabi, P., & Abdolhosseini, S. 2015. Spectrophotometric determination of cyclamate in artificial sweeteners and beverages after ultrasound-assisted emulsification microextractio. *Analytical Methods*, 2594-2602.
9. Karakurt, S., & Karakurt, S. 2017. MEASUREMENT UNCERTAINTY OF SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF HEXAVALENT CHROMIUM IN WATER. *Science Bulletin*, 182-194.
10. Llamosa, L.E., Contreras, L. G. M. & Arbelaez, M. B. 2007. Estudio de repetibilidad y reproducibilidad utilizando el método de promedios y rangos para el aseguramiento de la calidad de los resultados de calibración de acuerdo con la norma técnica NTC-ISO/IEC 17025. *Scientia et Technica*, 455-460.
11. Lorêdo de França, M., Separovic, L., Longo, L., de Oliveira, D., Rebelo Lourenço, F., & Calixto, L. 2020. Determining uncertainty in a simple UV-Vis spectrometry method employing dimethyl carbonate as green solvent for lead determination in water. *Measurement*, 1-23.
12. Núñez Vilchis, A. 2014. *Metrología y Calibración de Espectrofotómetros UV-Visible y Espectrofotómetros FT-IR*. Santiago de Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro.
13. Ruiz-Morer, R. 2006. Recomendaciones para la calibración de material volumétrico en el laboratorio clínico. *Química Clínica*, 104-110.
14. Schmid, W. A. 2004. "Guía para estimar la incertidumbre de la medición. México: CENAM.
15. Takano, D., de Souza, P., Kumar, A., & Rebelo, R. 2017. Estimation of Uncertainty for Measuring Desloratadine in Tablets Formulation Using UV Spectrophotometry. *Measurement*, 40-44.
16. Takayama, S., Renwick, A., Johansson, S., & Thorgeirs, U. 2000. Long-Term Toxicity and Carcinogenicity Study of Cyclamate in Nonhuman Primates. *Society of Toxicology*, 33-39.
17. Trujillo, S., & Arias, R. 2002. *Incetidumbre en la calibración de un matraz volumétrico*. Qro, México: CENAM.
18. Uribe Ortega, B., Montes Beneitez, N., & Quintana San José, J. 2009. *Determinación de la incertidumbre de medida de agentes químicos*. Madrid, España: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.

## ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE EN UN MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE LOS COLORANTES AZUL 1 Y AMARILLO 5 EN MEZCLA BINARIA MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA UV-V

Nadia Allina Lozano Segura<sup>1</sup>, Wendy Cruz Barrera<sup>2</sup>, Diego Hernández Garrido<sup>2</sup>, Lucía Monserrath Velázquez Villegas<sup>2</sup> y Alejandro Núñez Vilchis<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Querétaro, <sup>2</sup>Universidad Autónoma de Querétaro.  
nlozano02@alumnos.uaq.mx

### RESUMEN

El uso de colorantes azoicos, B1 (Azul 1) y Y5 (Amarillo 5), es común en la industria alimenticia. Los riesgos por su exposición crónica pueden provocar cáncer y mutaciones<sup>1</sup>. La NOM-218-SSA1 marca un límite de 100 mg/L de estos colorantes en alimentos, por lo que, considerando los riesgos antes mencionados, la correcta estimación de la incertidumbre en el análisis de estos compuestos químicos permitiría realizar una adecuada toma de decisión respecto a la liberación y comercialización de estos productos. El objetivo de este trabajo fue estimar la incertidumbre de medición en un método analítico por espectrofotometría UV-Vis<sup>2</sup> debido a sus ventajas respecto a otros métodos como la determinación simultánea de mezclas binarias de estos colorantes, la accesibilidad instrumental en los laboratorios y su bajo uso de consumibles. Asignamos el mensurando como la concentración de masa de los colorantes Amarillo 5 y Azul 1 en disolución acuosa ( $\gamma_{Y5}$  y  $\gamma_{B1}$  respectivamente) y se identificaron las principales fuentes de variación usando un diagrama de Ishikawa: precisión del método debido al analista, curvas de calibración, espectrofotómetro y medición en material volumétrico. Del diagrama también se identificaron las fuentes de variación asociadas a dichas fuentes principales, entre ellas: la repetibilidad y reproducibilidad analítica, la pureza del colorante, la medición de la masa, la dilución de las disoluciones para la curva de calibración y la variación por temperatura en el uso de material de vidrio, así como su tolerancia y calibración, respecto al espectrofotómetro se utilizó la incertidumbre reportada en su informe de calibración. El análisis de todas las disoluciones experimentales se realizó midiendo la absorbancia a 631 nm para B1 y a 429 nm para Y5 e interpolándolas en la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración preparada por sextuplicado. Mediante la ley de propagación de incertidumbre se obtuvo la incertidumbre combinada y, considerando un nivel de confianza del 95 %, se usó un factor de cobertura (k) de 2 para reportar la incertidumbre expandida la cuál fue de  $\pm 0.80$  g/L para una media (N=3) de  $\gamma_{B1}$ = 26.63 g/L y  $\gamma_{Y5}$ = 46.68 g/L. La principal fuente de incertidumbre del método fue la asociada a la curva de calibración y la de menor contribución fue el factor de dilución siendo sus aportes a la incertidumbre combinada de 83.81 % y 0.11% respectivamente. Este estudio permitió validar el parámetro de incertidumbre en un método analítico aplicable para la cuantificación de colorantes azoicos en mezcla binaria con baja dispersión y que podría representar una opción viable como método normativo para el análisis de los productos comerciales que los contienen.

### INTRODUCCIÓN

La industria alimentaria utiliza colorantes para alimentos para mejorar la estética visual de sus productos y hacerlos atractivos para mejorar sus ventas. El uso de colorantes para alimentos tiene lineamientos muy estrictos, debe estar indicado en las etiquetas de los productos, se debe indicar si se trata de un pigmento de origen natural o sintético, si el colorante está diluido o incorporado y su concentración.<sup>1</sup>

Entre los principales colorantes artificiales se encuentran el Azul 1 o Azul Brillante y el Amarillo 5 o Tartrazina, ambos colorantes son colorantes azoicos (se caracterizan por la presencia de un grupo azo (-N=N-) en la molécula que une, al menos, dos anillos aromáticos. El grupo azo tiene 6 electrones deslocalizados que a su vez están deslocalizados con los anillos aromáticos adyacentes. La biotransformación dérmica de los colorantes azo puede liberar aminas aromáticas (AA) que pueden absorberse dérmicamente en gran medida. Las exposiciones a éstas en los productos de consumo conllevan riesgos para la salud humana, particularmente asociados a mutaciones, propiedades génicas y/o cancerígenas de ciertas AA.<sup>3</sup>

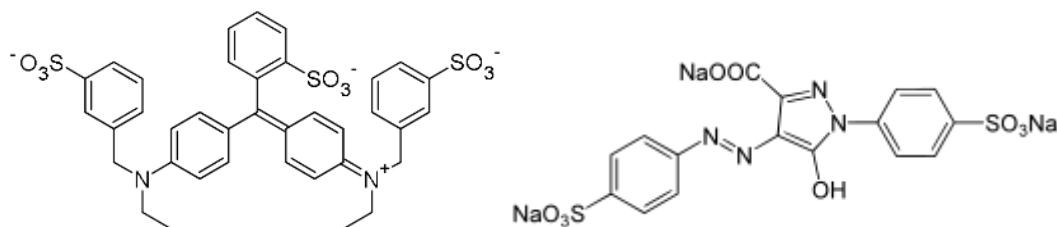


Figura 1. Estructura del colorante azoico Azul 1 y Amarillo 5 respectivamente

La importancia de reportar la incertidumbre para el método estandarizado de cuantificación de colorantes azo (Y5 y B1) en mezclas binarias por espectroscopía UV/Vis radica en la necesidad de cuantificar estos colorantes en aguas y/o bebidas de consumo o desecho, pues representan un riesgo biológico que incrementa cada vez más por la dificultad de su cuantificación sin la utilización de técnicas caras; por lo que al usar el espectro UV/Vis se reducen costos y es más accesible a un laboratorio de calidad<sup>2</sup>. Más del 90% de los colorantes persisten después de los tratamientos. Las estructuras químicas de las moléculas de colorantes resisten la exposición solar o el ataque químico, por lo que, en la mayoría de los casos, resultan también resistentes a la degradación microbiana. Se ha demostrado que ciertos colorantes azo pueden ser carcinogénicos y mutagénicos, además de que sus productos de degradación pueden resultar más tóxicos. Las aminas aromáticas que se generan de la ruptura del enlace azo son comúnmente conocidas por su potencial carcinógeno<sup>1</sup>. La espectrofotometría UV/Vis nos permite determinar la concentración de un compuesto en una solución midiendo la cantidad de luz absorbida en la longitud de onda en la que la molécula absorbe la mayor cantidad de energía. Los colorantes por analizar mediante esta metodología son azul 1 y amarillo 5 los cuales son de tipo ácido y azoico, tienen una longitud de onda máxima de 630 nm y 425 nm respectivamente<sup>2</sup>.

La cuantificación de colorantes azoicos en mezclas binarias se desarrolló basado en el algoritmo de espacio de color para mezclas de colorantes CIE 1931. Se hizo el análisis de medidas de absorbancia de 400 a 700 nm para cada colorante para comparar las absorbancias obtenidas a 10 mg/L así como sus longitudes de onda características (Figura 2) esto con el fin de proporcionar una aproximación a la capacidad de absorción de cada molécula. Posteriormente se realizaron curvas de calibración de ambos colorantes en mezcla binaria con concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25 mg/L en las longitudes de onda predominantes halladas anteriormente (426 nm para Y5 y 629 nm para B1). Debido al comportamiento lineal de las absorbancias en las longitudes de onda características de cada colorante se estandarizó el espacio de color CIE generado a partir del espectro de absorbancia de cada colorante (Figura 3).

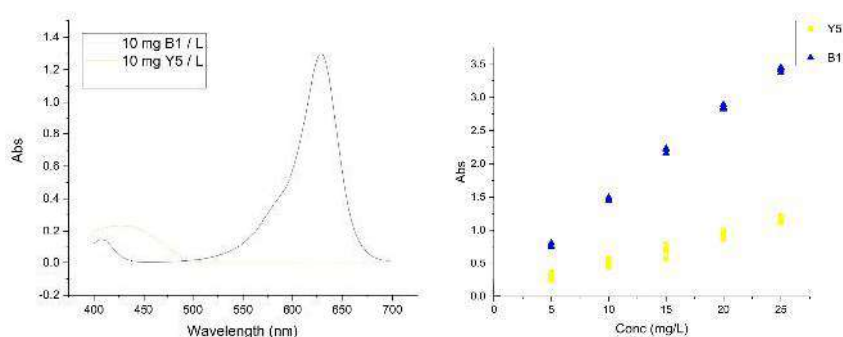


Figura 2 y 3. Espectros de absorción obtenidos a una concentración de 10 mg/L y comportamiento lineal de las absorbancias en las longitudes de onda.

Es el contexto de la evaluación de la incertidumbre, la especificación del mensurando demanda una declaración clara y ambigua de lo que es el mensurando, como bien, una expresión cuantitativa que conecte el valor del mensurando con los parámetros de los cuales depende<sup>4</sup>.

Con el fin de enlistar las fuentes de incertidumbre es conveniente usar un diagrama de causa y efecto (Diagrama de Ishiwaka) pues este muestra las fuentes conectadas unas con otras indicando su influencia en el resultado.



Figura 4. Diagrama de causa y efecto para la cuantificación de colorantes Amarillo 5 y Azul 1 en mezcla binaria en disolución acuosa (mg.L<sup>-1</sup>)

El diagrama de causa y efecto presenta las principales fuentes de incertidumbre presentes en el estudio. Las principales ramas representan los parámetros que influyen el resultado. Estos parámetros son presentados en los modelos matemáticos:

$$x_{B1} = C_{B1} * f_d = \frac{y_{B1} - a_{B1}}{b_{B1}} * f_d$$

$$x_{Y5} = C_{Y5} * f_d = \frac{y_{Y5} - a_{Y5}}{b_{Y5}} * f_d$$

Donde:

- $y_i$  = Señal analítica experimental para cada medición  $i$
- $x_i$  = Concentración para cada medición  $i$
- $a$  = Ordenada al origen de la curva de calibración
- $b$  = Pendiente de la curva de calibración
- $f_d$  = Factor de dilución

Después de identificar las fuentes de incertidumbre, el siguiente paso es cuantificar la incertidumbre combinada de todas las fuentes. El paso final es calcular la incertidumbre expedita, eligiendo cuidadosamente el factor de conversión<sup>4</sup>.

### TEORÍA

La intención de medir es determinar el valor de una magnitud llamada mensurando el cual se define como el atributo sujeto a medición de un fenómeno, cuerpo o sustancia que puede ser distinguido cualitativamente y determinado cuantitativamente<sup>4</sup>.

La incertidumbre de una medición se define como el parámetro asociado al resultado que caracteriza la dispersión de los valores que pueden ser atribuidos al mensurando. En otras palabras se puede decir que la incertidumbre está dada por los errores sistemáticos y aleatorios presentes en un ensayo analítico<sup>4</sup>.

Para la estimación de ésta es necesaria la identificación de las diferentes fuentes de incertidumbre posibles, las cuales provienen de diversos factores en la medición como lo pueden ser la calibración del material o la repetibilidad de la medición. Es importante no desechar ninguna fuente de incertidumbre por más insignificante que parezca para evitar descartar una importante a causa de la ignorancia. Generalmente estas fuentes son representadas gráficamente en un diagrama de Ishikawa para facilitar su identificación durante el proceso analítico<sup>4</sup>.

Las fuentes de incertidumbre son evaluadas generalmente en tipo A y tipo B. La evaluación de incertidumbre tipo A es la que está basada en un análisis estadístico de una serie de mediciones y

se evalúan con datos obtenidos a partir de observaciones repetidas bajo condiciones de repetibilidad y se estima con base en la dispersión de los resultados individuales. Mientras que la evaluación de tipo B comprende todas las demás maneras de estimar la incertidumbre como los certificados de calibración del material volumétrico<sup>4</sup>.

Al cuantificar las fuentes de incertidumbre es necesario asignar un valor y la distribución que los datos van a seguir. Las distribuciones más frecuentemente presentadas son:

- Distribución normal. Cuando realizamos una medición que es afectada por magnitudes de influencia que varían aleatoriamente generalmente los resultados obtenidos se aproximan a una distribución normal. También la incertidumbre señalada en los certificados de calibración tienden generalmente a una distribución normal<sup>4</sup>.
- Distribución rectangular. En este tipo de distribución cada valor de un intervalo dado tiene la misma probabilidad. Se supone este tipo de distribución cuando únicamente hay conocimiento de los límites superior e inferior del intervalo de variabilidad de la magnitud de entrada. Un ejemplo de esto es la resolución de un instrumento analítico o tolerancia documentada de un instrumento<sup>4</sup>.
- Distribución triangular. Es similar a la distribución rectangular, sin embargo en la triangular hay evidencia de que hay una probabilidad más alta para valores en el centro del intervalo y se reduce hacia sus límites.

La determinación de la incertidumbre se realiza en 4 pasos: Determinación de las fuentes de incertidumbre, expresar los componentes en una incertidumbre estándar, combinar las diferentes incertidumbres y la determinación de la incertidumbre expandida que consiste en multiplicar la incertidumbre combinada por un factor de cobertura  $k=2$  para así tener un intervalo de confianza del 95%<sup>4</sup>.

La expresión de la incertidumbre expandida  $U$  incluye su indicación como un intervalo centrado en el mejor estimado y del mensurando (afirmación de que  $p$  es del 95%)<sup>4</sup>. El resultado de la medición con su incertidumbre se presenta como:

$$Y = y \pm U$$

Generalmente para la expresión de la incertidumbre se usa una sola cifra significativa o dos cuando la exactitud es alta. Este número de cifras significativas del valor del mensurando debe ser consistente con el de la incertidumbre<sup>4</sup>.

## PARTE EXPERIMENTAL

Obtención de los espectros de absorción UV-Vis y determinación de la longitud de onda de absorción máxima para B1 y Y5

Se prepararon soluciones a una concentración arbitraria de 2.5 mg/L de los colorantes Y5 y B1, y una mezcla de ambos a la misma concentración, en agua destilada para realizar un barrido en un rango de longitud de onda de 325 a 800 nm, correspondiente aproximado al rango del espectro visible, en el espectrofotómetro UV-Vis Hewlett Packard (UV-VIS-HP). El fabricante indica una pureza del 99.99% de producto colorante, con una dispersión de  $\pm 0.01\%$ .

Para la preparación de las soluciones, se preparó una solución madre (stock) a una concentración de 250 mg/L de ambos colorantes, pesando 0.0063 g de colorante y aforando con agua destilada a 25 mL. Esta concentración corresponde a un factor de concentración de 10 a partir del último punto de la curva de calibración (25 mg/L) que se va a preparar para la siguiente sección metodológica.

A partir del stock, se realizó una dilución 1/100 para lograr la concentración deseada de 2.5 mg/L. Esta concentración nos permite obtener un color en la solución no tan saturado para que el instrumento pueda realizar mediciones lógicas.

El barrido en el espectrofotómetro UV-VIS-HP nos permitió conocer las longitudes de onda de máxima absorción de ambos colorantes, los cuales se compararon contra la bibliografía para hacer



una estimación de la pureza de los colorantes. El barrido de la mezcla debe mostrar ambas bandas correspondientes a las  $\lambda_{\text{máx}}$  de ambos colorantes en la mezcla.

Calibración del material de vidrio y estimación de la incertidumbre asociada a la medición del volumen.

El material volumétrico para la preparación de muestras serán matraces volumétricos de 25 mL y pipetas graduadas de 1 y 5 mL. La calibración se realizó mediante el método gravimétrico, el cual consiste en determinar el volumen de agua contenida o entregada por el recipiente, se medirá la masa de los recipientes con agua y sin agua la diferencia de estas mediciones será la masa de agua contenida en el recipiente. La estimación de la incertidumbre del material de vidrio se hizo de acuerdo a considerar las siguientes fuentes principales de incertidumbre:

- A. Medición del contenido, tipo A, 10 experimentos.
- B. Calibración del material de vidrio, tipo B, triangular.
- C. Variación de la temperatura, tipo C, triangular.

Estimación de la incertidumbre asociada a la medición de volumen

La masa del recipiente vacío y la masa del recipiente con agua se midieron con una balanza analítica, con 10 repeticiones por cada matriz. Las fuentes de incertidumbre en este punto son: la repetibilidad, resolución de la balanza y calibración de la balanza.

La documentación del fabricante identifica tres fuentes de incertidumbre para el peso neto: la repetibilidad, la resolución digital de la balanza y la contribución debida a la incertidumbre en la función de calibración de la escala. Esta función de calibración tiene dos fuentes de incertidumbre potenciales identificadas como la sensibilidad de la balanza y su linealidad. La sensibilidad puede despreciarse porque la masa se da por diferencia en la misma balanza en un rango muy estrecho; por lo que la incertidumbre de la calibración estará dada como la incertidumbre asociada a la linealidad únicamente.

La incertidumbre debido a los cambios en los resultados de las mediciones de la masa de los recipientes vacío y lleno (repetibilidad) se calculó a partir de la desviación estándar de la media:

Recipiente vacío

$$u(M_b, var.) = \frac{1}{\sqrt{n}} \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (M_{b_i} - \bar{M}_b)^2}$$

$$u(M_b, var.) = \frac{S_{M_b}}{\sqrt{n}}$$

Recipiente lleno de agua

$$u(M_c, var.) = \frac{1}{\sqrt{n}} \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (M_{c_i} - \bar{M}_c)^2}$$

$$u(M_c, var.) = \frac{S_{M_c}}{\sqrt{n}}$$

Donde:

$u(M_x, var.)$  = Incertidumbre asociada a la variación en la medición de volumen.

$M_{x_i}$  = Medición de volumen para el recipiente vacío o lleno.

$\bar{M}_x$  = Promedio de la medición de volumen para el recipiente vacío o lleno.

$n$  = Numero de mediciones

$S_{M_x}$  = Desviación estándar de las mediciones para el recipiente vacío o lleno.

Para la incertidumbre asociada a la resolución de la balanza, se tomará el valor reportado por el fabricante, asumiendo que se trata de una distribución rectangular, realizando la conversión a incertidumbre estándar:

$$u(M, res.) = \frac{\text{resolución}}{\sqrt{3}}$$

Para la incertidumbre asociada a la calibración (linealidad) de la balanza, se tomará el valor reportado por el fabricante, asumiendo que se trata de una distribución rectangular, realizando la conversión a incertidumbre estándar; debe de considerarse dos veces, una vez para el taraje y otra para la medición de masa:

$$u(M, cal.) = \frac{\text{linealidad}}{\sqrt{3}}$$

Finalmente, la incertidumbre asociada a la repetibilidad será la raíz de la suma cuadrática de las incertidumbres individuales de las mediciones de recipiente vacío y con agua:

$$u(V, var.) = \sqrt{[u(M_b, var.)^2 + u(M_c, var.)^2 + u(M, res.)^2 + 2 \cdot u(M, cal.)^2]}$$

Incertidumbre asociada a la calibración del material

Se tomó en cuenta la incertidumbre de la calibración, referida como tolerancia, reportada por el fabricante, asumiendo que se trata de una distribución triangular, realizando la conversión a incertidumbre estándar:

$$u(V, cal.) = \frac{\text{tolerancia}}{\sqrt{6}}$$

Incertidumbre asociada a la variación de la temperatura

La incertidumbre en la variación de temperatura se debe a la diferencia entre la temperatura de especificación que marca el fabricante (20°C) y la de trabajo. Si la variación de temperatura está dentro de los límites de  $\pm 5^\circ\text{C}$  se tratará como una distribución rectangular:

$$u(V, temp.) = \frac{V_m * \Delta T * \gamma}{\sqrt{3}}$$

Dónde:

- $V_m$  = Volumen medido por el recipiente (mL)
- $\Delta T$  = Variación de la temperatura ( $^\circ\text{C}$ )
- $\gamma$  = Coeficiente de expansión volumétrica del agua ( $2.1 \times 10^{-4} \text{ C}^{-1}$ )

Finalmente, la incertidumbre combinada del material volumétrico se estimará mediante la combinación de la incertidumbre en la tolerancia del fabricante, repetibilidad en las mediciones y la variación de temperatura, con la siguiente fórmula:

$$u(V) = \sqrt{u(V, var.)^2 + u(V, cal.)^2 + u(V, temp.)^2}$$

Dónde:

- $u(V)$  = Incertidumbre asociada a la medición del volumen.
- $u(V, var.)$  = Incertidumbre asociada a la variabilidad de las medidas.
- $u(V, cal.)$  = Incertidumbre asociada a la calibración del material.
- $u(V, temp.)$  = Incertidumbre asociada a la variación de la temperatura.

Método de cuantificación de los colorantes azoicos Azul 1 y Amarillo 5 en mezcla binaria por espectrofotometría UV-Vis y estimación de la incertidumbre asociada a la curva de calibración obtenida.

Se siguió el método utilizado para cuantificar colorantes azoicos en mezclas binarias por espectroscopia UV-Vis que fue validado por García-González y colaboradores (2020).

Para calibrar el método se prepararon 6 disoluciones de calibración de los colorantes B1 y Y5 de muestras en mezclas binarias con cinco niveles de concentración entre 0 mg/L y 25 mg/L en intervalos de 5 mg/L. En todos los casos, las soluciones se prepararon en matraces aforados de 25

mL, agregando un volumen apropiado de solución estándar de cada colorante, 5 mL de solución reguladora de acetato de sodio y ácido acético (pH = 5) y aforando al volumen final de 25 mL con agua destilada. Se realizaron por triplicado. Las mediciones se realizaron a los valores de las longitudes de onda de máxima absorción que se obtuvieron del barrido

La ecuación de la curva de calibración tiene la forma:

$$y_i = a + bx_i$$

Donde:

- $y_i$  = Señal analítica experimental para cada medición  $i$
- $x_i$  = Concentración para cada medición  $i$
- $a$  = Ordenada al origen de la curva de calibración
- $b$  = Pendiente de la curva de calibración

La concentración de colorantes en mezcla fue calculada a partir de la curva de calibración establecida. Los límites de detección (LoD) y de cuantificación (LoQ) se calcularon por medio del método de residuales, para lo cual:

$$LoD = \frac{3 * s_{y/x}}{b} \quad LoQ = \frac{5 * s_{y/x}}{b}$$

Donde:

- $LoD$  = Límite de detección (mg.L<sup>-1</sup>)
- $LoQ$  = Límite de cuantificación (mg.L<sup>-1</sup>)
- $s_{y/x}$  = Desviación estándar de los residuales del ajuste lineal
- $b$  = Pendiente de la curva de calibración

Para lo cual, la desviación estándar de los residuales está dada por:

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [y_i - (a + bx_i)]^2}{n - 2}}$$

Donde:

- $\hat{y}_i$  = Señal analítica teórica para cada medición  $i$
- $n$  = Número de mediciones

Incertidumbre asociada al ajuste lineal de la curva de calibración

La incertidumbre de la muestra medida será dada por:

$$u(C_o, ajuste) = \frac{s_{x/y}}{b} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{p} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

Donde:

- $u(C_o, ajuste)$  = Incertidumbre asociada al ajuste lineal de la curva de calibración.
- $s_{x/y}$  = Desviación estándar de los residuales del ajuste lineal
- $b$  = Pendiente de la curva de calibración
- $n$  = Número de mediciones
- $p$  = Número de réplicas para las mediciones
- $x_0$  = Concentración calculada para la muestra problema
- $x_i$  = Concentración calculada para cada estándar de la curva
- $\bar{x}$  = Concentración promedio de los estándares de la curva

Esta incertidumbre se calculó tanto para la curva de calibración medida a 429 nm como para la curva medida a 631 nm.

Preparación de la muestra problema y estimación de la incertidumbre asociada al factor de dilución aplicado

Para realizar la medición de la muestra problema se trabajó con un colorante comercial verde Great Value®, realizándose diluciones seriadas de la muestra para que pudiera haber lectura de una señal apropiada dentro de los límites de detección, cuantificación y linealidad del método realizado.

Se necesitaron de 4 diluciones seriadas, 3 diluciones con un factor de 1/10, realizada con pipeta graduada de 1 mL y una cuarta dilución con un factor de dilución 1/2, realizada con pipeta graduada de 5 mL, dando como resultado un factor de dilución final de 1/2000 al aforar a 25 mL con el matraz el volumen final, con el cuál las señales dadas por el instrumento caían dentro del límite de linealidad de las curvas preparadas. La incertidumbre asociada al factor de dilución está dada por la siguiente expresión:

$$u(f_d) = \sqrt{\left(\frac{u(V)}{V}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{al_1})}{V_{al_1}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{al_2})}{V_{al_2}}\right)^2 + \dots + \left(\frac{u(V_{al_n})}{V_{al_n}}\right)^2}$$

Donde:

- $u(f_d)$  = Incertidumbre asociada al factor de dilución
- $u(V)$  = Incertidumbre asociada a la medición del volumen final
- $V$  = Volumen final medido
- $u(V_{al})$  = Incertidumbre asociada a la medición del volumen de la alícuota
- $V_{al}$  = Volumen medido de la alícuota

La incertidumbre asociada a la medición del volumen final y de las alícuotas está dada por las incertidumbres calculadas para el material usado para medirlo.

### **Incertidumbre asociada al instrumento empleado para la medición de las señales analíticas (UV-VIS-HP).**

El instrumento usado en las mediciones fue el UV-Vis Hewlett Packard (HP). Este instrumento fue previamente evaluado y calibrado por Núñez-Vilchis y Pedraza-Aboytes. La incertidumbre del instrumento está indicada en el trabajo escrito "Metrología y calibración de espectrofotómetros UV-Visible y espectrofotómetros FT-IR".

Incertidumbre asociada a los analistas, análisis de repetibilidad y reproducibilidad (r&R)

El análisis numérico se realiza mediante el cálculo de las componentes individuales de repetibilidad y reproducibilidad. La variabilidad interna ( $S_w$ ) para cada una de las p condiciones se estima como la desviación estándar de las "n" mediciones de cada condición.

La repetibilidad (r) se obtiene como resultado del promedio de las p varianzas que estiman la variabilidad interna de cada condición, esta variabilidad interna promedio ( $S_r$ ) es conocida como el ruido presente en el experimento:

$$r = \sqrt{S_r^2} = \sqrt{\sum S_w^2}$$

La reproducibilidad (R) o variabilidad entre las condiciones ( $S_L$ ) se obtiene mediante la diferencia de la varianza ( $S_m^2$ ) de los p promedios menos la varianza representativa del ruido del experimento ( $S_r^2$ ) entre la cantidad de mediciones "n" de cada condición:

$$R = \sqrt{S_L^2} = \sqrt{S_m^2 - \frac{S_r^2}{n}}$$

Y, finalmente la combinación r&R se obtiene como la raíz cuadrada de la suma de varianzas de repetibilidad (variabilidad interna promedio) y reproducibilidad (variabilidad entre condiciones):

$$r\&R = \sqrt{r^2 + R^2} = \sqrt{S_r^2 + S_L^2}$$

Combinación y expansión de las fuentes de incertidumbre

Ya que la incertidumbre es la raíz de la suma cuadrática de las incertidumbres individuales multiplicadas por los coeficientes de sensibilidad, se tendrá como resultado la ecuación:

$$u = \sqrt{\sum_{i=1}^n c_{z_i}^2 * u(z_i)^2} = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial x_0}{\partial z_i}\right)^2 u(z_i)^2}$$

$$u = \sqrt{\left(\frac{\partial x_0}{\partial y_0}\right)^2 u(y_0)^2 + \left(\frac{\partial x_0}{\partial C_0}\right)^2 u(C_0)^2 + \left(\frac{\partial x_0}{\partial f_{d_0}}\right)^2 u(f_{d_0})^2}$$

Donde:

$$c_{z_i} = \frac{\partial y_0}{\partial z_i} = \text{Coeficiente de sensibilidad para la variable z; derivada parcial del modelo matemático con respecto de la variable z.}$$

$$u(z_i) = \text{Incertidumbre asociada a la variable z.}$$

Cada término se repitió para cada modelo matemático, tanto para B1 como para Y5:

$$u_{B1} = \sqrt{\left(\frac{\partial x_{B1}}{\partial y_{B1}}\right)^2 u(y_{B1})^2 + \left(\frac{\partial x_{B1}}{\partial C_{B1}}\right)^2 u(C_{B1})^2 + \left(\frac{\partial x_{B1}}{\partial f_{dB1}}\right)^2 u(f_{dB1})^2}$$

$$u_{Y5} = \sqrt{\left(\frac{\partial x_{Y5}}{\partial y_{Y5}}\right)^2 u(y_{Y5})^2 + \left(\frac{\partial x_{Y5}}{\partial C_{Y5}}\right)^2 u(C_{Y5})^2 + \left(\frac{\partial x_{Y5}}{\partial f_{dY5}}\right)^2 u(f_{dY5})^2}$$

Finalmente, la incertidumbre expandida, con un factor de cobertura  $k = 95\%$  ( $k = 2$ ) estará dada por la ecuación:

$$U = ku = 2u$$

Donde:

$$U = \text{Incertidumbre expandida para el método (mg.L}^{-1}\text{)}$$

$$k = \text{Factor de cobertura}$$

$$u = \text{Incertidumbre estándar combinada para el método (mg.L}^{-1}\text{)}$$

## RESULTADOS

Espectros de absorción de los colorantes Azul 1 y Amarillo 5 en solución acuosa individual y en mezcla binaria.

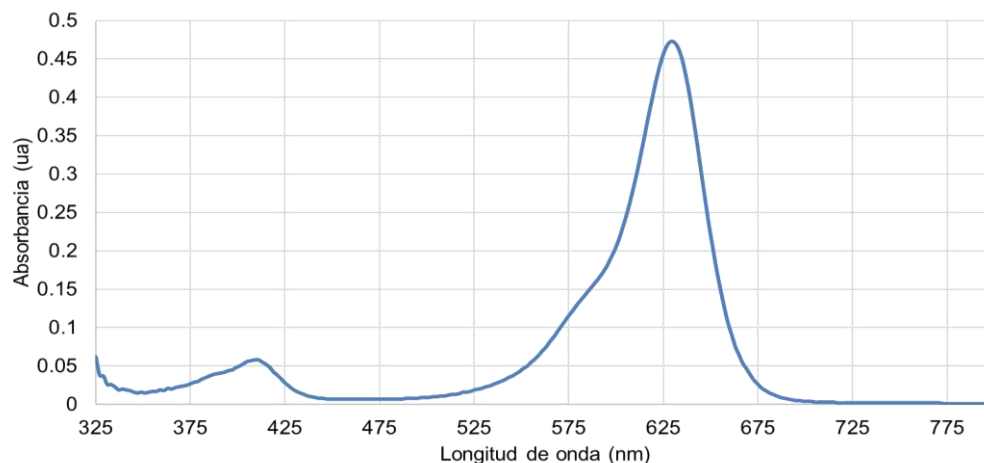


Figura 4. Barrido del Azul 1 en agua 2.5 mg.L<sup>-1</sup>, en rango UV-Vis (325-800 nm)  
 $\lambda_{M\acute{a}x} = 631 \text{ nm}$

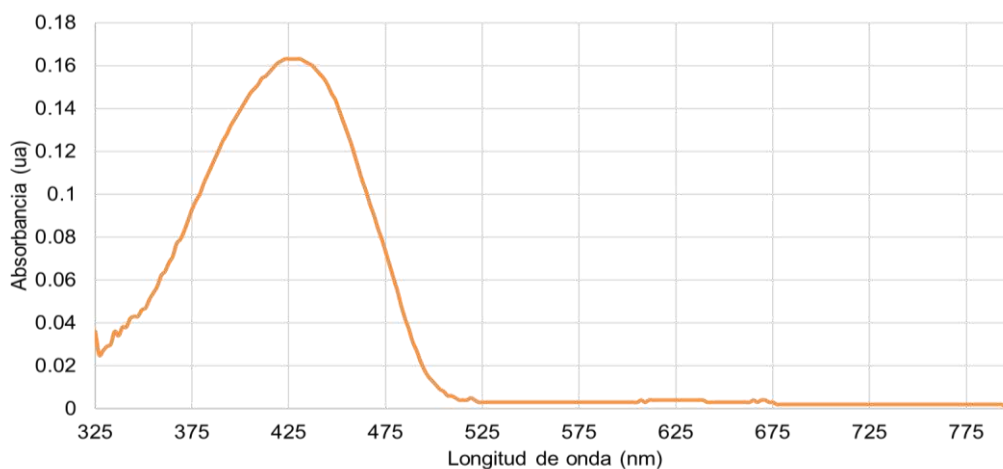


Figura 5. Barrido del Amarillo 5 en agua 2.5 mg.L<sup>-1</sup>, en rango UV-Vis (325-800 nm)  
 $\lambda_{M\acute{a}x} = 429 \text{ nm}$

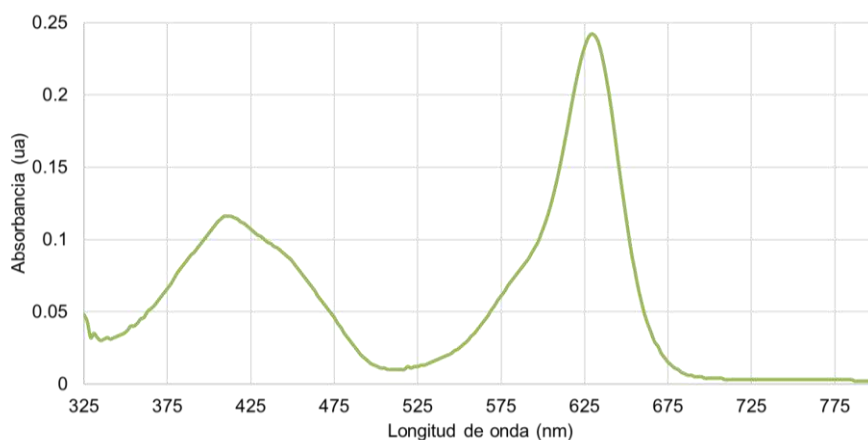


Figura 6. Barrido de una mezcla Azul 1-Amarillo 5 en agua 2.5 mg.L<sup>-1</sup> (325-800 nm)

Calibración del material de vidrio y estimación de la incertidumbre asociada a la medición del volumen



Tabla 1. Valores e incertidumbre para la medición de volumen por el material de vidrio empleado

Material	Valor medido	Incertidumbre estándar
Matraz volumétrico	25 mL	±0.0131 mL
Pipeta graduada	5 mL	±0.0136 mL
Pipeta graduada	1 mL	±0.0278 mL

Cuantificación de los colorantes Azul 1 y Amarillo 5 en mezcla binaria, y estimación de la incertidumbre asociada a la cuantificación por las curvas de calibración

Análisis por espectrofotometría UV-Vis para Azul 1

Tabla 2. Datos de la curva de calibración medida a 631 nm para B1

Punto	Conc. de B1 (mg/L)	$\bar{A}$	SD
1	0	0.0005	0.0001
2	5	0.6327	0.0227
3	10	1.2689	0.0306
4	15	1.8234	0.0577
5	20	2.4790	0.0683

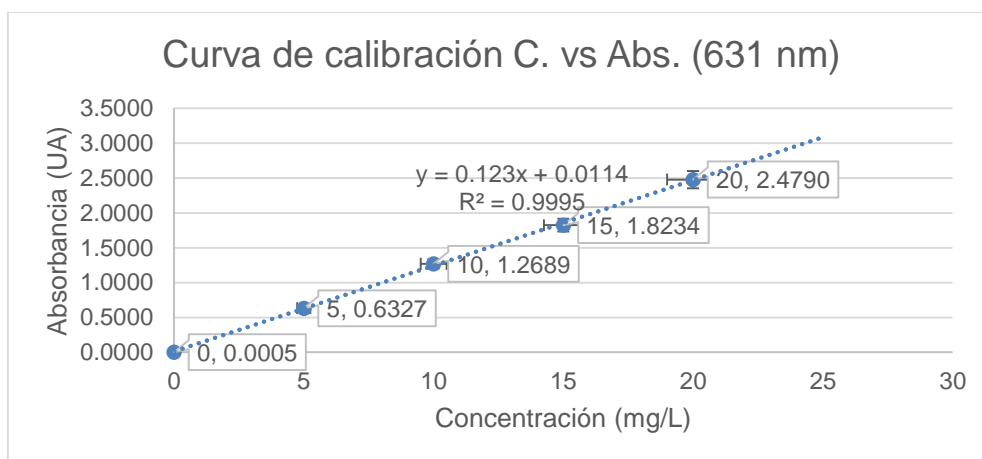


Figura 7. Curva de calibración de calibración medida a 631 nm para B1

Tabla 3. Cálculo de los residuales, la desviación estándar de los mismos y los límites de detección y cuantificación para la curva de calibración medida a 631 nm

Conc. de B1, $x_i$ (mg/L)	Señal promedio, $y_i$	Señal teórica, $\hat{y}_i$	Residuales $(y_i - \hat{y}_i)^2$
0	0.0005	0.0114	0.0001
5	0.6327	0.6261	0.0000
10	1.2689	1.2409	0.0008
15	1.8234	1.8557	0.0010
20	2.4790	2.4704	0.0001
<b>n</b>	5	$\sum (y_i - \hat{y}_i)^2$	0.0021
<b>gl</b>	3	<b>LoD</b> (mg.L <sup>-1</sup> )	0.63

$s_{y/x}$	0.0262	$LoQ$ (mg.L <sup>-1</sup> )	1.07
-----------	--------	-----------------------------	------

Tabla 4. Datos para cuantificación de B1 en la muestra problema

	Señal de la muestra, $y_0$	Conc. de B1, $x_0$ (mg/L)
Medias	1.6484	13.3139

Estimación de la incertidumbre asociada al ajuste lineal de la curva de calibración

$$u(C_o, ajuste) = \frac{s_{x/y}}{b} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{p} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

Para la curva a 631 nm, los parámetros son los siguientes:

Tabla 5. Datos para la estimación de la incertidumbre asociada al ajuste lineal de la curva de calibración medida a 631 nm

$x_i$ (mg.L <sup>-1</sup> )	$(x_i - \bar{x})^2$
Promedio, $\bar{x}$	Sumatoria, $s_{xx}$
10	250

$$u(C_{B1}, ajuste) = \frac{0.0262}{0.123} \sqrt{\frac{1}{5} + \frac{1}{3} + \frac{(13.3139 - 10)^2}{250}} = \pm 0.162 \text{ mg.L}^{-1}$$

Análisis por espectrofotometría UV-Vis para Amarillo 5

Tabla 6. Datos de la curva de calibración medida a 429 nm para Y5

Punto	Conc. de B1 (mg/L)	$\bar{A}$	SD
1	0	0.0004	0.0001
2	5	0.2171	0.0066
3	10	0.4436	0.0172
4	15	0.6620	0.0311
5	20	0.8938	0.0457
6	25	1.1000	0.0945

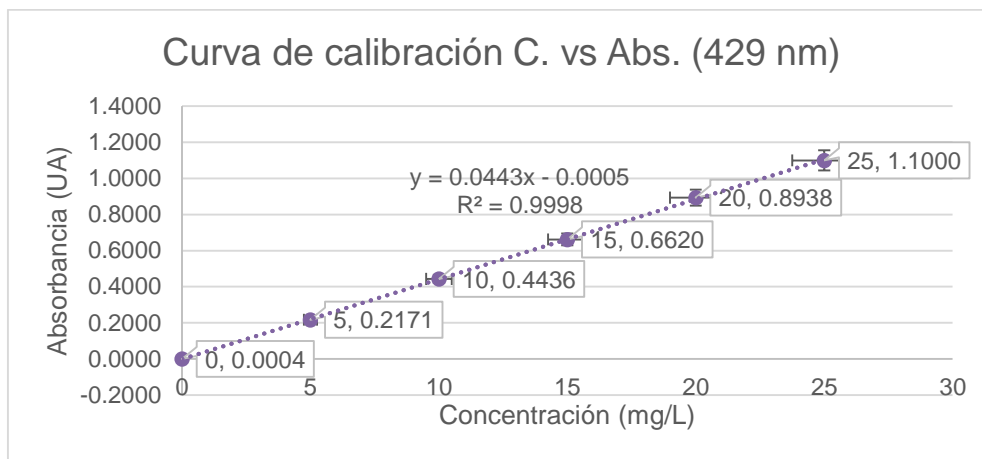


Figura 8. Curva de calibración medida a 429 nm para Y5

Tabla 7. Cálculo de los residuales, la desviación estándar de los mismos y los límites de detección y cuantificación para la curva de calibración medida a 429 nm

Conc. de Y5, $x_i$ (mg/L)	Señal promedio, $y_i$	Señal teórica, $\hat{y}_i$	Residuales $(y_i - \hat{y}_i)^2$
0	0.0004	-0.0005	$7.8730 \times 10^{-7}$
5	0.2171	0.2208	$1.4011 \times 10^{-5}$
10	0.4436	0.4421	$2.2291 \times 10^{-6}$
15	0.6620	0.6635	$2.1632 \times 10^{-6}$
20	0.8938	0.8848	$8.0977 \times 10^{-5}$
25	1.1000	1.1061	$3.8008 \times 10^{-5}$
<b>n</b>	6	$\sum (y_i - \hat{y}_i)^2$	$1.3138 \times 10^{-4}$
<b>gl</b>	4	<b>LoD</b> (mg.L <sup>-1</sup> )	0.3883
<b><math>s_{y/x}</math></b>	0.0059	<b>LoQ</b> (mg.L <sup>-1</sup> )	0.6639

Tabla 8. Datos para cuantificación de Amarillo 5 en la muestra problema

	Señal de la muestra, $y_0$	Conc. de B1, $x_0$ (mg/L)
Medias	1.6484	13.3139

Estimación de la incertidumbre asociada al ajuste lineal de la curva de calibración

$$u(C_o, ajuste) = \frac{s_{x/y}}{b} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{p} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

Tabla 9. Datos para la estimación de la incertidumbre asociada al ajuste lineal de la curva de calibración medida a 631 nm

$x_i$ (mg.L <sup>-1</sup> )	$(x_i - \bar{x})^2$
Promedio, $\bar{x}$	Sumatoria, $s_{xx}$
12.5	437.5

$$u(C_{Y5}, \text{ajuste}) = \frac{0.0059}{0.0443} \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{3} + \frac{(23.3396 - 12.5)^2}{437.5}} = \pm 0.116 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$$

Preparación de la muestra problema y estimación de la incertidumbre asociada al factor de dilución aplicado a la muestra.

$$u(f_d) = \sqrt{\left(\frac{0.0131 \text{ mL}}{25 \text{ mL}}\right)^2 + 3 * \left(\frac{0.0278 \text{ mL}}{2.5 \text{ mL}}\right)^2 + \left(\frac{0.0136 \text{ mL}}{25 \text{ mL}}\right)^2} = \pm 0.0193$$

Incertidumbre asociada al instrumento empleado para la medición de las señales analíticas.

Incertidumbre en la escala de absorbancia

Tabla 10. Incertidumbre asociada a la señal analítica del UV-Vis-HP en la escala de Absorbancia (UA) en valores certificados del filtro 3 a 750 nm de longitud de onda

Valor de referencia	Coeficiente de sensibilidad		Incertidumbre (k = 2)
	Función	Valor	
0.306 %T	$\frac{1}{-\%T * \ln 10}$	-0.008785	±0.0016

Como en este caso, la incertidumbre para la escala de absorbancia se encuentra expandida, se tomó su cociente entre el factor de cobertura reportado (k = 2), para obtener una incertidumbre estándar de ±0.0008.

Incertidumbre en la escala de longitud de onda

Tabla 11. Incertidumbre asociada a la señal analítica del UV-Vis-HP en la escala de longitud de onda

Filtro de óxido de holmio		
Valor obtenido (nm)	Error (nm)	Incertidumbre (nm)
280	0.68	±0.58
288	0.38	±0.58
334	0.07	±0.60
345	0.47	±0.58
348	0.14	±0.58
361	0.17	±0.58
382	0.32	±0.58
386	0.17	±0.58
391	0.28	±0.59
419	0.41	±0.59
425	0.20	±0.58
537	0.65	±0.59
546	0.04	±0.59
638	0.38	±0.59

La información reportada arroja una incertidumbre promedio de  $\pm 0.59$  nm.

Análisis de repetibilidad y reproducibilidad (r&R)

Análisis r&R para Azul 1

Tabla 12. Resultados de las mediciones para repetibilidad en función de B1

C (mg/L)	A1 (UA)	A2 (UA)	A3 (UA)
0	0.0004	0.0006	0.0005
5	0.6086	0.6359	0.6537
10	1.2395	1.3005	1.2667
15	1.7964	1.8896	1.7841
20	2.4748	2.5494	2.4129
Varianzas	0.9421	1.0088	0.8878

$$r_{B1} = \sqrt{S_r^2} = \sqrt{\sum S_w^2} = 1.6848$$

Tabla 13. Resultados de las mediciones para reproducibilidad en función de B1

C (mg/L)	A1 (UA)	A2 (UA)	A3 (UA)
0	0.0003	0.0003	0.0003
5	0.6528	0.6045	0.5899
10	1.2477	1.2659	1.2636
15	1.9396	1.9493	1.8842
20	2.5844	2.3847	2.4327
Promedios	1.2477	1.2659	1.2636

$$R_{B1} = \sqrt{S_L^2} = \sqrt{S_m^2 - \frac{S_r^2}{n}} = 0.5804$$

$$r\&R_{B1} = \sqrt{r^2 + R^2} = \pm 1.7820$$

Análisis r&R para Amarillo 5

Tabla 14. Resultados de las mediciones para repetibilidad en función de Y5

C (mg/L)	A1 (UA)	A2 (UA)	A3 (UA)
0	0.0004	0.0004	0.0003
5	0.2174	0.2235	0.2103
10	0.445	0.4601	0.4258
15	0.6288	0.6904	0.6668
20	0.842	0.9282	0.9112
25	0.9919	1.1673	1.1407

Varianzas	0.1411	0.1911	0.1851
-----------	--------	--------	--------

$$r_{Y5} = \sqrt{S_r^2} = \sqrt{\sum S_w^2} = 0.7139$$

Tabla 15. Resultados de las mediciones para reproducibilidad en función de Y5

C (mg/L)	A1 (UA)	A2 (UA)	A3 (UA)
0	0.0003	0.0003	0.0003
5	0.6528	0.6045	0.5899
10	1.2477	1.2659	1.2636
15	1.9396	1.9493	1.8842
20	2.5844	2.3847	2.4327
Promedios	1.2477	1.2659	1.2636

$$R_{Y5} = \sqrt{S_L^2} = \sqrt{S_m^2 - \frac{S_r^2}{n}} = 0.3461$$

$$r \& R_{Y5} = \sqrt{r^2 + R^2} = \pm 0.7982$$

Combinación y expansión de las fuentes de incertidumbre

Tabla 16. Valores e incertidumbres en la cuantificación de Azul 1 y Amarillo 5 en mezcla binaria mediante espectrofotometría UV-Vis

Variable	Descripción	Valor experimental	Incertidumbre estándar
$C_{B1}$	Concentración calculada por la curva de calibración para B1	13.314 mg.L <sup>-1</sup>	±0.162 mg.L <sup>-1</sup>
$C_{Y5}$	Concentración calculada por la curva de calibración para Y5	23.339 mg.L <sup>-1</sup>	±0.112 mg.L <sup>-1</sup>
$f_{dB1}$	Factor de dilución para B1	2000	±0.0193
$f_{dY5}$	Factor de dilución para Y5	2000	±0.0193
$x_{B1}$	Señal del instrumento para B1	1.6468 ua	±0.0008 ua
$x_{Y5}$	Señal del instrumento para Y5	1.0326 ua	±0.0008 ua

Tabla 17. Coeficientes de sensibilidad para las fuentes de incertidumbre

Variable	Descripción	Expresión ( $\frac{\partial x_0}{\partial z}$ )	Coficiente de sensibilidad (c <sub>z</sub> )	c <sub>z</sub> <sup>2</sup> *u <sup>2</sup> (z) [mg.L <sup>-1</sup> ]
$C_{B1}$	Análisis UV-Vis B1	$f_d$	2000	324.079
$C_{Y5}$	Análisis UV-Vis Y5	$f_d$	2000	232.802
$f_{dB1}$	Factor de dilución (B1)	$\frac{x_{B1} - a_{B1}}{b_{B1}}$	13.314	0.257



$f_{dY5}$	Factor de dilución (Y5)	$\frac{x_{Y5} - a_{Y5}}{b_{Y5}}$	23.339	0.450
$x_{B1}$	Señal analítica para B1	$\frac{f_d}{b_{B1}}$	16260.163	13.008
$x_{Y5}$	Señal analítica para Y5	$\frac{f_d}{b_{Y5}}$	45146.727	36.117

Cálculo de la incertidumbre combinada

La incertidumbre combinada se obtiene a partir de la raíz de la suma cuadrática de los componentes individuales de incertidumbre multiplicados por su coeficiente de sensibilidad:

$$u(B1) = 324.24 \text{ mg.L}^{-1} = 0.3242 \text{ g.L}^{-1}$$

$$u(Y5) = 235.59 \text{ mg.L}^{-1} = 0.2356 \text{ g.L}^{-1}$$

Cálculo de la incertidumbre expandida

Obtenida la incertidumbre combinada del método, se multiplica por el factor de cobertura ( $k = 2$ ) para cubrir intervalo de confianza del 95%.

$$U(B1) = 2 * u(B1) = 648.68 \text{ mg.L}^{-1} = 0.6487 \text{ g.L}^{-1}$$

$$U(Y5) = 2 * u(Y5) = 471.17 \text{ mg.L}^{-1} = 0.4712 \text{ g.L}^{-1}$$

Contribuciones a las incertidumbres estándar

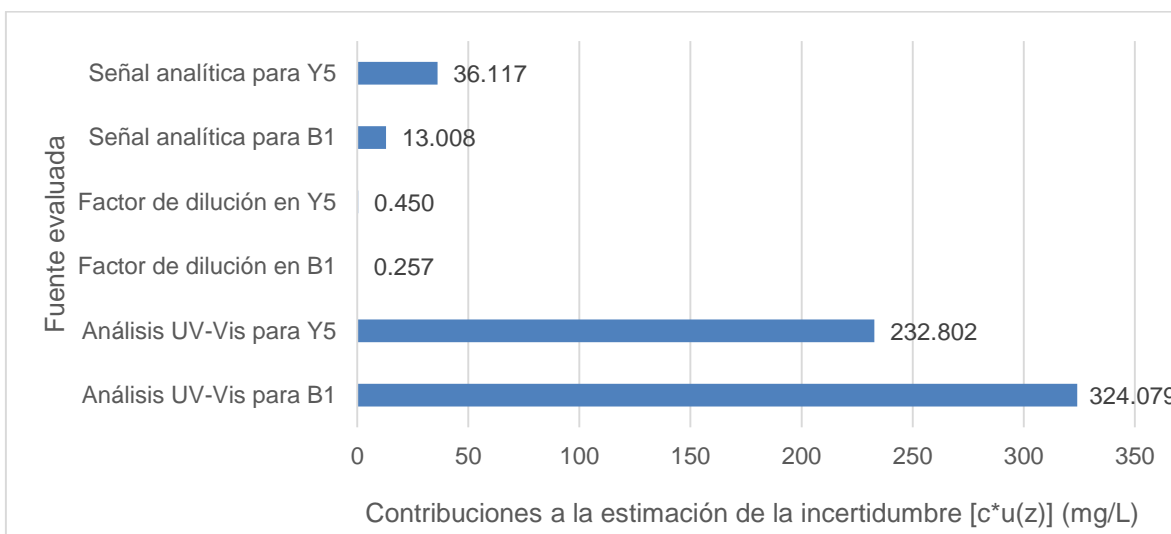


Figura 9 Contribución de las variables a la incertidumbre del método de cuantificación de B1 y Y5 en mezcla binaria

Reporte de resultados para la cuantificación de colorantes en muestra comercial

Concentración de Azul 1 en  $\text{mg.L}^{-1}$  en el colorante comercial

$$y_{B1} = 26.628 \pm 0.6487 \text{ g.L}^{-1}$$

Concentración de Amarillo 5 en  $\text{mg.L}^{-1}$  en el colorante comercial

$$y_{Y5} = 46.679 \pm 0.4712 \text{ g.L}^{-1}$$

## CONCLUSIONES

Los resultados muestran que la principal fuente de incertidumbre del método fue la asociada a la curva de calibración para ambos colores. Mientras que la de menor contribución fue el factor de dilución. Los aportes a la incertidumbre combinada de cada fuente de incertidumbre son de 83.81 % y 0.11% respectivamente.

De acuerdo con la NOM-218-SSA1-2011, las concentraciones de los colorantes Azul 1 y Amarillo 5 en el colorante verde comercial sobrepasan el límite máximo permisible.

De acuerdo con el análisis r&R reportamos valores mayores sugeridos a la bibliografía lo que nos indica que se necesita más experimentación, en diferentes instrumentos y condiciones.

Este estudio permitió validar el parámetro de incertidumbre del método analítico para la cuantificación de colorantes azoicos en mezcla binaria con certeza de resultados y con baja dispersión. Este método podría representar una opción viable como método normativo para el análisis de los productos comerciales que los contienen.

## BIBLIOGRAFÍA

1. A. Cortazar-Martínez, C. A. González-Ramírez, C. Coronel-Olivares, J. A. Escalante-Lozada, J. Castro-Rosas, J. R. Villagómez-Ibarra, "Biotecnología aplicada a la degradación de colorantes de la industria textil", Universidad y ciencia, Villahermosa, Vol. 28, n. 2, p. 187-199, 2012.
2. A. García-González, R. E. Zavala-Arce, P. Ávila-Pérez, M. L. Jiménez-Núñez, B. García-Gaitán, J. L. García-Rivas, "Development of standardized method for the quantification of azo dyes by UV-Vis in binary mixtures, Analytical Biochemistry, Vol. 608, 2020.
3. Brüscheweiler, B., & Merlot, C. (2017). Azo dyes in clothing textiles can be cleaved into a series of mutagenic aromatic amines which are not regulated yet. Regulatory Toxicology And Pharmacology, 88, 214-226. doi: 10.1016/j.yrtph.2017.06.012
4. Schmid W. & Lazos R. (2004). Guía para Estimar la Incertidumbre de la Medición. Centro Nacional de Metrología. [http:// www.cenam.mx](http://www.cenam.mx)

## EVALUACIÓN DE LA INGESTA DE UNA DIETA CETOGÉNICA SOBRE EL MATERIAL GENÉTICO EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Stefanía Lizbeth Jara Castro<sup>1</sup>, Blanca Patricia Lazalde Ramos<sup>1</sup>, Marisol Galván Valencia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Maestría en Ciencias Biomédicas, U.A de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Zacatecas.

gavm001144@uaz.edu.mx

### RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica que a nivel mundial ocupa los primeros lugares de mortalidad. Esta condición se presenta cuando el páncreas no secreta suficiente insulina o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce<sup>1</sup>. De acuerdo a la Federación Internacional de Diabetes (FID) 537 millones de personas en todo el mundo de 20 a 79 años viven con esta enfermedad<sup>2</sup>. En México la ENSANUT 2018 publicó que la DM es más frecuente en mujeres (13.22%) que en hombres (7.75%)<sup>3</sup>. El manejo de la DM comienza con cambios en el estilo de vida: realizar actividad física y una alimentación sana; si esto no funciona se administran medicamentos de acuerdo a las GPC<sup>4</sup>. Desde principios del año 2000 quedó demostrado que el daño oxidativo en el ADN es uno de los mecanismos de la patogénesis en enfermedades crónicas como la DM<sup>(5,6,7)</sup>. Por otro lado, estudios más recientes dan evidencia que una dieta cetogénica es una alternativa dietética temporal para prevenir y controlar la DM, ya que logra en poco tiempo normalizar el nivel de glucosa en ayunas, reducir el peso y mejorar el perfil lipídico<sup>8</sup>. Al momento no hay publicaciones en donde se haya evaluado el efecto de una dieta cetogénica sobre biomarcadores de daño al ADN e inestabilidad cromosomal en pacientes con DM, lo cual resulta novedoso en el actual estudio. El ensayo de micronúcleos (MN) aplicado en la mucosa bucal humana es un método mínimamente invasivo que se utiliza como biomarcador para estudiar el daño al ADN, la inestabilidad cromosómica, la muerte celular y el potencial regenerativo del tejido<sup>9</sup>. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la ingesta de una dieta cetogénica sobre el daño genotóxico y citotóxico en células epiteliales de la mucosa bucal de pacientes con DM2 mediante la metodología de micronúcleos. Se diseñó una dieta cetogénica de manera personalizada a 10 pacientes de 20 a 65 años de edad con diagnóstico de DM2, los cuales firmaron un consentimiento informado y posteriormente se elaboró su historia clínica, se tomaron medidas antropométricas y muestras del epitelio de la cavidad oral al inicio, al mes y a los tres meses de la intervención y se procesaron por la técnica de micronúcleos. Los resultados demuestran que hubo un decremento estadísticamente significativo del daño genotóxico en el corto plazo, expresado como el número de células con MN y BN con respecto de los valores basales; mientras que se observó un decremento de células con PN a partir del primer mes y hasta los 3 meses con respecto al basal, pero sin alcanzar significancia estadística. En el daño citotóxico hubo un decremento en el número de células CC y CL al mes y a los tres meses con respecto al basal. Mientras que en las células CR hubo un decremento con respecto a los valores basales. En el número de células PICN no hubo diferencias significativas. A partir de los resultados se sugiere que el consumo de una dieta cetogénica se relaciona con una reducción del daño genotóxico en las células epiteliales de la mucosa bucal de los pacientes.

### INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad que se presenta cuando el páncreas no secreta suficiente insulina (tipo 1) o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce (tipo 2; DM2)<sup>1</sup>. Esta última es la forma más prevalente y se desarrolla en el transcurso de muchos años por lo que se diagnostica principalmente en adultos que previamente hayan cursado por síndrome metabólico. Su diagnóstico se basa en el nivel de glucemia en ayunas  $\geq 126$  mg/dL, o al azar  $\geq 200$  mg/dL, o en una prueba de tolerancia a la glucosa con una carga de 75g si a las 2 h la glucemia es  $\geq 200$  mg/dL o si el nivel de hemoglobina glicosilada es  $\geq 6.5\%$  <sup>(10)</sup>. La hiperglucemia crónica en la DM2 es responsable de las complicaciones micro y macrovasculares; mientras que la neuropatía somática y autonómica se asocian a su alta morbi-mortalidad<sup>1,2</sup>. A nivel mundial la Federación Internacional de Diabetes (FID), estimó que en 2019 había 463 millones de personas con diabetes y

que esta cifra podía aumentar en un 51% para alcanzar 700 millones en 2045. América del Norte y el Caribe es una de las regiones más afectadas con 32 millones de personas con diabetes en el 2019 y una proyección de 63 millones para el 2045 con un aumento del 33%<sup>3</sup>. En México de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) del 2018, se reportaron 8.6 millones de personas de 20 años y más que padecían DM. Particularmente en el Estado de Zacatecas la prevalencia de DM se ubicó en 10.9% cifra superior a la media nacional, siendo más prevalente en mujeres que hombres y en ambos casos entre los mayores de 60 años<sup>11</sup>.

La DM2 es una enfermedad compleja y de etiología multifactorial que involucra tanto factores genéticos como ambientales tales como el consumo de alimentos y la actividad física. Se caracteriza por hiperglucemia y alteración del metabolismo de la glucosa y los lípidos, de la secreción y acción de la insulina, e inflamación de bajo grado<sup>10</sup>. Evidencia experimental sugiere que en el origen y la progresión de las complicaciones de la DM2 hay un aumento de especies oxidantes y una disminución en la actividad de los sistemas antioxidantes, provocando daño oxidativo en las macromoléculas. El catabolismo celular es básicamente oxidativo, siendo la glucosa la principal molécula que se oxida para generar energía. Durante el metabolismo aerobio los electrones que se extraen de las moléculas oxidadas se acumulan en cofactores reducidos para ser transferidos a la cadena respiratoria donde se reduce al oxígeno hasta agua. Sin embargo y aun en condiciones no patológicas, ocurre la reducción parcial del oxígeno generándose especies reactivas del oxígeno (ERO): el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ), además del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). De no ser eliminadas las ERO por los sistemas antioxidantes de la célula, terminan por causar daños oxidativos. Así ante el incremento del consumo energético, alteraciones del metabolismo, de la función respiratoria, o por procesos infecciosos, se potencia la formación de las ERO no solo durante la cadena transportadora de electrones, pues oxidasas como la NADPH y NADH oxidasas, la xantina oxidasa y las ciclooxigenasas también generan ERO<sup>12</sup>. También se producen especies reactivas de nitrógeno (ERN) por ejemplo por acción de la sintasa del óxido nítrico que produce óxido nítrico ( $NO\cdot$ ) a partir de la arginina. Incluso la reacción entre un ERO como  $O_2^{\cdot-}$  y un ERN como el  $NO\cdot$  genera radicales como el peroxinitrito ( $ONOO\cdot$ ) especie altamente reactiva<sup>12</sup>. Además del daño oxidativo de las especies radicalarias sobre las macromoléculas, se generan otros efectos negativos como el consumo del  $NO\cdot$  limitando su efecto vaso dilatador, o la disminución de la síntesis de ATP. El incremento de glucosa disponible sin aumento de las necesidades energéticas en la célula no da lugar a mayor síntesis de ATP ya que el almacenamiento de esta molécula es limitado, pero si da lugar a la formación de mayor cantidad de  $O_2^{\cdot-}$ . El aumento en el nivel de glucosa puede generar otros productos del metabolismo oxidativo de la glucosa como cuando se autooxida dando lugar al radical  $\alpha$ -hidroxialdehído que en presencia de metales como el  $Fe^{+3}$  reacciona con el oxígeno y proteínas en reacciones en cadena que inicialmente forman una base de Schiff pero que en posteriores rearrreglos forman los productos de Amadori que son más estables y los cuales en conjunto se denominan productos de glicación avanzada (AGE por sus siglas en inglés) generando daño estructural y funcional en proteínas, lípidos y ADN, y con potencial para oxidar parcialmente al oxígeno. Algunos otros intermediarios del metabolismo de la glucosa estimulan de manera indirecta la producción de ERO y AGE, o bien consumen poder reductor, tal es el caso de la vía del sorbitol que se obtiene de la reducción de la glucosa. La acumulación de sorbitol incrementa la osmolaridad intracelular, consume NADPH y genera  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot-}$ . Al consumirse los cofactores reducidos se disminuye la regeneración de los antioxidantes glutatión y las vitaminas C y E<sup>12</sup>.

Se han empleado biomarcadores para evaluar el daño oxidativo sobre el ADN entre ellos el ensayo de micronúcleos que se puede aplicar tanto en el análisis de linfocitos como en células epiteliales obtenidas de las mucosas<sup>13</sup>. El ensayo de citoma de MN bucal (BMcyt por sus siglas en inglés) es un método mínimamente invasivo que se usa ampliamente para evaluar la genotoxicidad y la citotoxicidad por exposición a un agente tóxico. Esta técnica es particularmente atractiva ya que las células bucales se pueden recolectar de una manera rápida, sencilla y fácilmente accesible. Básicamente se evalúan efectos genotóxicos en función del número de células micronucleadas (MN), binucleadas (BN) y con prolongaciones nucleares (PN); además del daño citotóxico con el conteo de células con cromatina condensada (CC), cariólisis (CL), cariorrexis (CR) y picnosis (PICN)<sup>14,15</sup>. El ensayo BMcyt se ha aplicado ampliamente desde 1980 en el biomonitorio de la inhalación o exposición local a agentes genotóxicos y para investigar y evaluar el impacto del estado

nutricional y los factores del estilo de vida en el daño al ADN, la proliferación celular y la muerte celular<sup>16</sup>.

## TEORÍA

Muchos son los trabajos en donde se ha valorado el daño al ADN en paciente diabético asociado a la hiperglucemia, al consumo de fármacos, a los estilos de vida, a la exposición a tóxicos ambientales y al genotipo, siendo el ensayo de BMCyt el más utilizado para valor genotoxicidad y citotoxicidad. Ibarra-Costilla y cols. en 2009 realizaron un estudio de casos y controles en donde evaluaron el nivel de daño al ADN en 71 pacientes mexicanos diagnosticados con DM2 y 14 individuos control, utilizando el ensayo cometa. Los pacientes con DM2 fueron agrupados por edad en tres subgrupos. Los resultados indicaron un aumento leve pero no significativo en el daño al ADN en los pacientes con DM2 con edades de 40 a 60 años con respecto a los pacientes con DM2 de mayor edad (61 a 70 años) y con respecto al grupo control. Concluyendo que el daño al ADN y por lo tanto el daño oxidativo fue similar entre los pacientes y el grupo control<sup>17</sup>.

Quintero y cols. en el 2018, evaluaron con el ensayo de BMCyt el aumento de anomalías nucleares (MN, CC, CR, PN, PINC y CL) en el epitelio bucal y mucosa lingual de pacientes con DM tratados con insulina (DM1) o metformina (DM2), y en un grupo control. La frecuencia de MN observados en el epitelio bucal y la mucosa lingual fue superior tanto en pacientes con DM1 y DM2 comparados con el grupo control. Los autores observaron un crecimiento similar en el número de MN entre los pacientes con DM1 y DM2, y concluyeron que el ensayo de BMCyt es adecuado y accesible para monitorear el daño genotóxico en pacientes con DM1 y DM2 incluso con muestras pequeñas<sup>18</sup>.

En el 2013 Da Silva y cols. publicaron sus resultados en donde demostraban como el control glucémico, el consumo de fármacos antidiabéticos y los polimorfismos de los genes XRCC1 y XRCC3 influyen sobre la frecuencia del daño al ADN en pacientes con DM2 utilizando el ensayo de BMCyt y el ensayo cometa en un sistema ex vivo de linfocitos estimulados mitogénicamente. Ellos observaron que la concentración plasmática de metformina se relacionó con disminución de la frecuencia de MN, y cuando combinaban terapia de metformina y glibenclamida aumentaba la frecuencia de MN. Al considerar el polimorfismo 399Gln del gen XRCC1 el efecto de la metformina se perdió, aumentando en estos individuos el número de MN. Los autores destacan que las combinaciones entre terapia antidiabética y polimorfismos de genes involucrados en la reparación del daño al ADN influye sobre la frecuencia de lesiones cromosómicas, y sugieren la cuantificación de MN como un biomarcador adecuado en estas u otras enfermedades como cáncer<sup>19</sup>.

Muzher y cols. demostraron la relación entre los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c) con la oxidación en el ADN y la inestabilidad genómica en pacientes con DM2 midiendo el nivel de 8-OHdG en muestras de orina, y con el ensayo BMCyt células MN y BN exfoliadas de la mucosa bucal, respectivamente. El resultado fue una fuerte correlación positiva entre la frecuencia de MN y los valores de HbA1c, enfatizando el potencial clínico del ensayo BMCyt para valorar el estado de pacientes con DM u otras enfermedades crónicas<sup>20</sup>. Esto concuerda con el estudio que realizó Grindel y cols. en 2017 mostrando un aumento significativo en el conteo de MN en pacientes con DM2 en comparación con los controles sanos. Se encontraron correlaciones positivas entre las frecuencias de MN y HbA1c así como el nivel de glucosa plasmática en ayunas. Los pacientes con tratamiento de insulina mostraron un aumento del doble de las frecuencias de MN en comparación con los que tenían una monoterapia o con quienes no consumían fármacos<sup>21</sup>. De esta manera se ha generado evidencia que indica que durante la etiopatogenia de la DM2 así como algunos tratamientos farmacológicos en pacientes con DM2, influyen en los niveles de MN y otras anormalidades nucleares (AN), a través del daño oxidativo al ADN.

Por otro lado hay estudios que sugieren que cambios en el estilo de vida como la alimentación ayuda a disminuir el daño al ADN y por lo tanto mejora los niveles de MN y AN, una de estas intervenciones nutricias son las dietas cetogénicas (DC). Estas dietas se caracterizan por una reducción en el consumo de los hidratos de carbono y un aumento en la proporción de grasa, por lo general manteniendo el de proteínas<sup>22</sup>. Entre los diferentes tipos de DC tenemos la estándar, con un bajo contenido de carbohidratos (10%) con moderada cantidad de proteína (20%) y alta de grasas (70%). La DC cíclica, implica periodos de carbohidratos altos, por ejemplo, cinco días cetogénicos seguidos de dos días ricos en carbohidratos; La DC dirigida, la cual permite agregar carbohidratos adicionales cuando se tiene periodos de entrenamiento físico intensivo; y por último, la dieta cetogénica alta en

proteínas, la cual proporciona alrededor de 60% de grasa, 35% de proteína y 5 % de carbohidratos. La DC estándar es la más investigada y se ha utilizado ampliamente desde principios del siglo XX como tratamiento para la epilepsia y más tarde como tratamiento de la obesidad<sup>24</sup>. Mientras el cuerpo está en ayuno se metabolizan los depósitos de grasa a través de la lipólisis y los ácidos grasos mediante la beta-oxidación dando como origen a dos cuerpos cetónicos: acetoacetato y  $\beta$ -hidroxibutirato. Estos metabolitos pueden ser utilizados como precursores energéticos. Las DC tienen beneficios en la prevención y tratamiento de la DM2 ya que mejora el perfil glucémico, la sensibilidad a la insulina y los niveles plasmáticos de HbA1c<sup>23</sup>. Sin embargo, hasta el momento no hay estudios en donde se haya evaluado el efecto de una dieta cetogénica sobre los marcadores citotóxicos y genotóxicos del daño al ADN en pacientes con DM2, lo cual resulta novedoso en nuestro estudio.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Diseño de estudio y muestra de la población de estudio

El diseño del estudio es clínico, longitudinal, y prospectivo, y por el tamaño de la muestra, de carácter exploratorio. La muestra se integró con 10 pacientes con diagnóstico de DM2 que acudían al consultorio multidisciplinario de la Maestría en Ciencias Biomédicas en el Campus Siglo XXI de la Universidad Autónoma de Zacatecas a recibir atención médica, nutricional y odontológica. Se incluyeron individuos de ambos sexos, de 20 a 65 años, con tratamiento de hipoglucemiantes y/o insulina, con sobrepeso u obesidad, sin descompensaciones metabólicas o complicaciones severas, y que no consumieran de manera crónica fármacos diferentes a los antidiabéticos. Una vez que al paciente se le informaba e invitaba a participar en el proyecto y cumplía con los criterios establecidos, firmaban un consentimiento informado, se elaboraba su historia clínica, y se les tomaban medidas antropométricas. La intervención consistió en consumir durante 3 meses una dieta cetogénica baja en carbohidratos sin restricción en la cantidad de calorías consumidas. Se consideró un consumo de carbohidratos <30 g/día (de fuentes no almidonosas), proteínas < 2.2 g/kg de peso, y consumo de lípidos *ad libitum* del tipo poli y monoinsaturados con <5% de grasas saturadas. Regularmente los pacientes medían su glucemia en ayunas con glucómetro digital (Free Style Optium Neo) y al inicio, al mes y al tercer mes se les tomaba una muestra de la mucosa bucal. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Unidad Académica de Enfermería con el No. de registro CI-UAE-06-2021.

### Recolección de muestras y ensayo de citoma de micronúcleo bucal (BMCyt)

Se tomaron muestras por duplicado de la mucosa bucal antes de la intervención nutricional, al mes y a los 3 meses. Las muestras se tomaban en laminillas previamente etiquetadas con el código del paciente. Para tomar la muestra el paciente permanecía sentado, se humedecía y enjuagaba la boca con agua purificada, se le pedía abriera la boca y sacara la lengua, y en ese momento se introducía un portaobjetos limpio y estéril, con el que se raspaba la pared interior para obtener células de la mucosa bucal. Las laminillas se secaban al aire y se fijaban con metanol absoluto por 48 horas<sup>32</sup>. Para la tinción de las laminillas, estas se sumergen en 500 ml de solución amortiguadora de fosfatos con 8  $\mu$ g de naranja de acridina disuelto (16 ng/mL), dejando teñir durante 10 minutos a temperatura ambiente en obscuridad y con agitación constante para lograr una tinción homogénea. Luego se retiran las laminillas, se escurre el exceso de líquido sobre papel y se sumergen en solución amortiguadora de fosfatos durante 10 minutos para eliminar el exceso de colorante. Enseguida, las laminillas se escurren sobre papel y se guardan protegidas de la luz y el polvo a temperatura ambiente hasta su lectura. Las laminillas se observan bajo un microscopio de epifluorescencia con objetivo de 100x, y para el conteo se utilizó un piano contador diferencial de células, contando y clasificando 2000 células por laminilla como células con micronúcleos (MN), binucleadas (BN) y con prolongaciones nucleares (PN); además del conteo de células con cromatina condensada (CC), cariólisis (CL), cariorrexis (CR) y picnosis (PICN).

### Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron como promedio  $\pm$  desviación estándar. Se utilizó la prueba de normalidad de Shapiro Wilk. Las comparaciones se realizaron mediante ANOVA de una vía para medidas repetidas y se empleó un post hoc de Bonferroni para múltiples comparaciones. Para las pruebas de correlación entre Se consideró estadísticamente significativo cuando  $p < 0.05$ . Se utilizó el programa SPSS versión 20 para Windows



**RESULTADOS**

**Características clínicas y sociodemográficas de los pacientes**

En la Tabla 1 se resumen el perfil socioeconómico de los pacientes con una edad promedio de 49.7±4.9 años, siendo la mayoría mujeres (70%), con un nivel de estudios alto (50% con una licenciatura), empleados (70%) y casados en su mayoría (60%). Fue frecuente que tuvieran antecedentes familiares de HTA (90%), seguido de DM2 (70%), dislipidemias (60%), insuficiencia renal (40%), y enfermedad CV (10%). Dentro de los malos hábitos perjudiciales para la salud que manifestaron los pacientes, los más frecuentes fueron el sedentarismo (70%), el consumo de alcohol (30%) y el tabaquismo (10%). Entre el grupo de pacientes el promedio de años de desarrollo de la DM2 desde su diagnóstico fue de 6.7±6.9 años. Otras de las morbilidades asociadas a la DM2 fue la HTA (40%), seguido de problemas gastrointestinales como diarrea, gastritis, pirosis, estreñimiento, colitis, úlceras y náuseas. En cuanto a las medidas antropométricas, la altura de los participantes fue en promedio de 1.65 metros (con mínimo y máximo de 1.5 y 1.9, respectivamente) lo cual concuerda con la talla promedio del mexicano (entre 1.58 y 1.64 metros). El peso de los participantes tuvo una mediana de 87.3 kg (máximo y mínimo de 68.2 y 128.2 kg), de ahí que el IMC varió entre 23.6 a 37.8 como mínimo y máximo, respectivamente. A partir de estos datos se determinó que el 40% de los pacientes tenían obesidad tipo 1, 30% obesidad tipo 2, 20% sobrepeso y sólo el 10% tuvo un peso saludable.

Tabla 1. Resumen de las características sociodemográficas, clínicas y antropométricas de los pacientes. La edad se expresa como promedio±D.E, la talla, peso e IMC como mediana (mínimo-máximo), y el resto de las variables en porcentaje. HTA: hipertensión arterial. CV: cerebro vascular. IMC: índice de masa corporal.

Perfil Socioeconómico		Características Clínicas		Antropometría	
<b>Edad</b>	49.7±4.9 años	<b>Antecedentes familiares</b>		<b>Talla</b>	1.6 (1.5-1.9)
<b>Género</b>		HTA	90%	<b>Peso</b>	87.3 (68.2 - 128.2)
Mujeres	70%	DM2	70%	<b>IMC</b>	33.6 (23.6 - 37.8)
Hombres	30%	Infarto al miocardio	0%	<b>Diagnóstico</b>	
<b>Escolaridad</b>		Enfermedad CV	10%	Normal	10%
Primaria	10%	Dislipidemias	60%	Sobrepeso	20%
Secundaria	10%	Insuficiencia renal	40%	Obesidad tipo 1	40%
Licenciatura	50%	<b>Hábitos de vida</b>		Obesidad tipo 2	30%
Posgrado	20%	Tabaquismo	10%		
<b>Ocupación</b>		Alcohol	30%		
Ama de casa	20%	Toxicomanías	0%		
Empleado	70%	Actividad física	30%		
Jubilado	10%	<b>Comorbilidades</b>			
<b>Estado Civil</b>		Diarrea	30%		
Soltera	20%	Estreñimiento	25%		
Casada	60%	Gastritis	30%		
Unión libre	10%	Úlceras	10%		
Divorciado	10%	Náuseas	10%		
		Pirosis	30%		
		Vómito	0%		
		Colitis	20%		
		HTA	40%		
		DM2 (años de evolución)	6.7±6.9 años		

**Glucemia**

Las guías de práctica clínica basan el control glucémico en el tratamiento farmacológico, el apego a una dieta hipocalórica baja en grasas y alta en fibra, y en cambios del estilo de vida<sup>4</sup>. El poco apego a esta dieta y el hecho de que los fármacos antihiper glucémicos pierden su eficacia con el tiempo, aunado al sedentarismo, limitan el éxito esperado. Recientemente se ha comprobado la eficacia de dietas cetogénicas como tratamiento nutricional del control glucémico para DM2<sup>14</sup>. Este tipo de dietas

no han sido validadas en población mexicana ya que el entorno económico, sociocultural y la constitución genética es totalmente distinto al de las poblaciones donde se ha estudiado. En este estudio se pidió a los pacientes que participaron se midieran su glucemia en ayunas durante los tres meses que siguieron la dieta (Figura 1). En aquellos pacientes que se apegaron a la dieta el efecto sobre el nivel de glucosa en sangre capilar fue evidente desde la primera semana. En la Figura 1 se presenta un gráfico con los valores de las mediciones de uno de los pacientes en donde se observa que a partir de la primera semana la glucosa disminuyó de 205 mg/dL al inicio del estudio a 102 mg/dL, y a partir de ese momento se mantuvo alrededor de 100 mg/dL durante los tres meses.

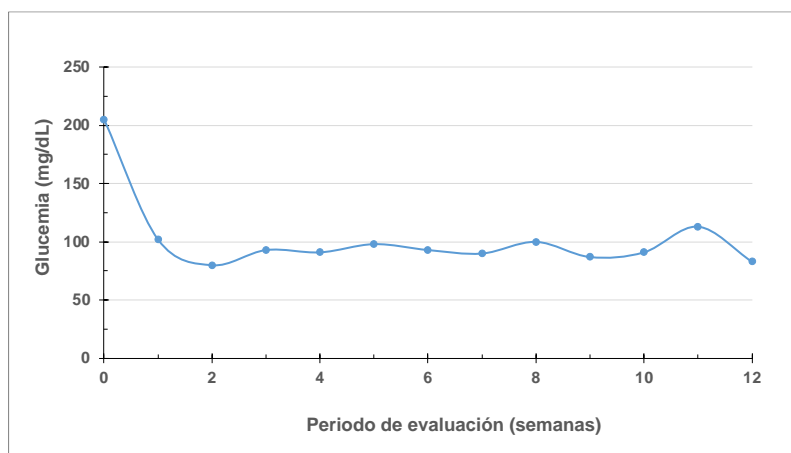
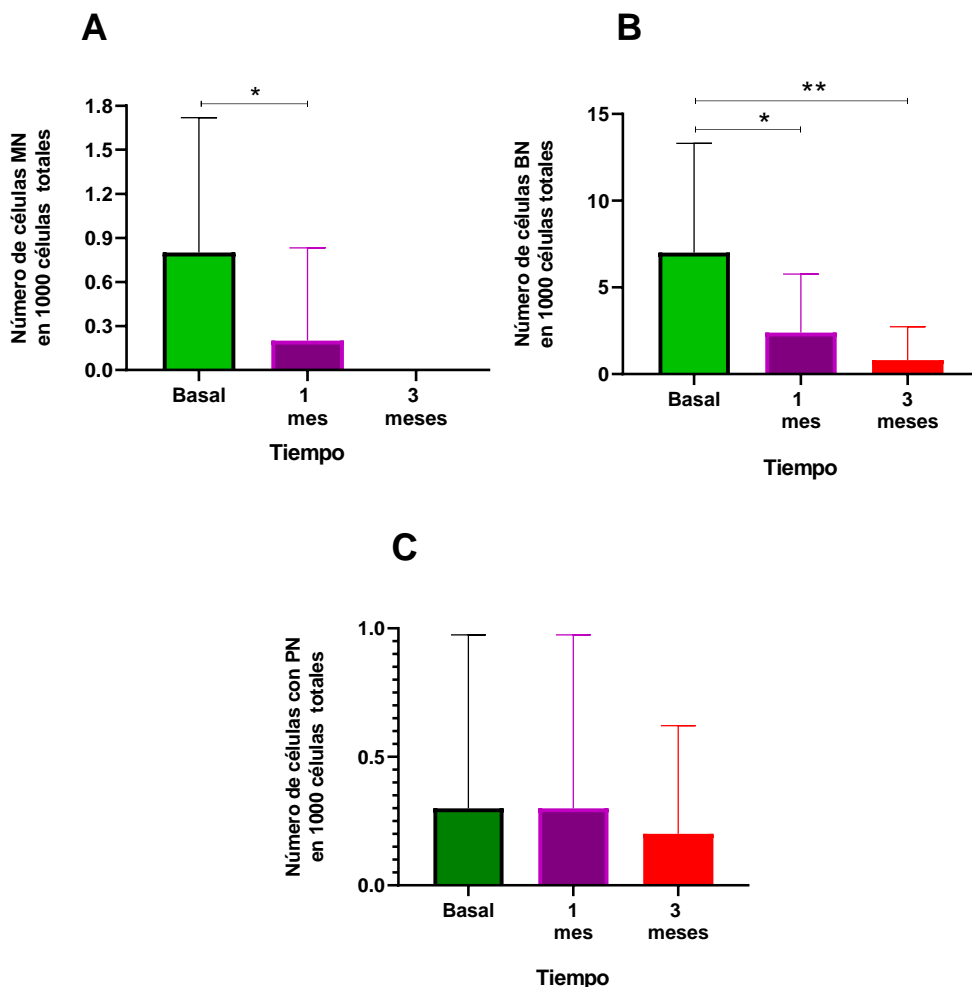


Figura 1. Glucemia en ayunas. El paciente se midió la glucemia capilar en ayunas con glucómetro digital. Como se aprecia en el gráfico, una vez iniciada la dieta, la glucemia se mantuvo por debajo de la meta de control glucémico para paciente diabético (<130 mg/dL).

El valor promedio de glucosa sérica entre el grupo de pacientes al inicio del estudio fue de  $175.1 \pm 87.1$  mg/dL y después de tres meses disminuyó a  $131.6 \pm 48.4$  mg/dL. Desafortunadamente el apego de los pacientes a la dieta fue bajo, ya que es difícil cambiar los hábitos de alimentación.

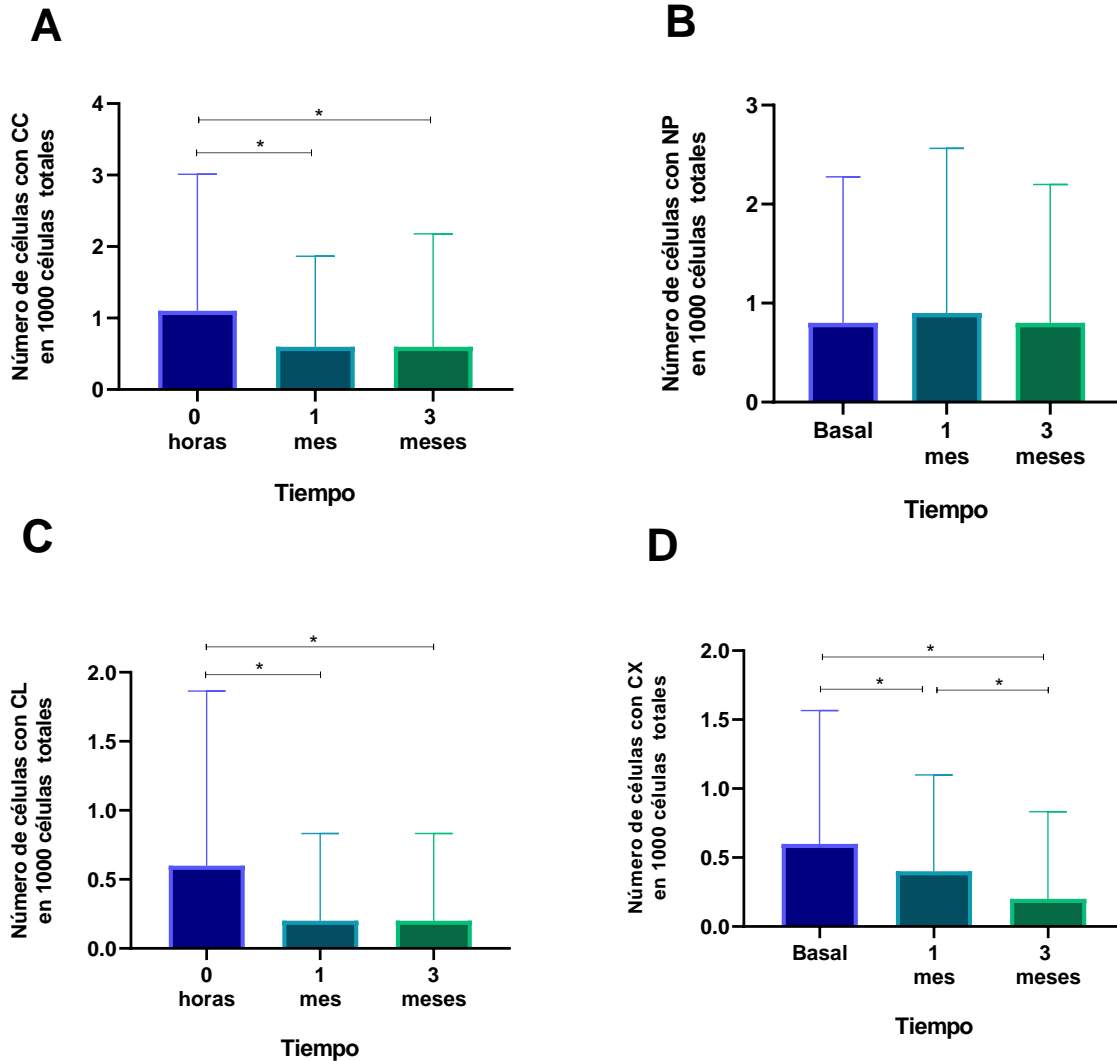
#### Genotoxicidad y citotoxicidad

Se determinó el daño al material genético mediante la cuantificación del número de MN y AN en las células de mucosa oral de pacientes con DM2 antes de la intervención nutricia, al mes y a los tres meses. Se consideran indicativas de daño citotóxico las células con CC, CL, CR y PIC y de daño genotóxico las células con MN, BN y PN. En pacientes con DM, se han reportado frecuencias de MN significativamente más altas dentro de los grupos de pacientes con glucosas en sangre mal controlada y un mayor daño cromosómico también se ha relacionado con la progresión de la enfermedad<sup>25</sup>, la duración de la enfermedad<sup>26</sup>, y la intensidad de la medicación<sup>27</sup>. De acuerdo a los resultados en relación al daño genotóxico obtenidos mediante el BMCyT, los pacientes mostraron un decremento estadísticamente significativo del número de células MN al mes de la intervención con la dieta cetogénica ( $p < 0.05$ ) este decremento continuo hasta un promedio de cero células a los tres meses de la intervención (Figura 2, Panel A). De igual manera el número de células binucleadas decreció estadísticamente a partir del primer mes hasta los tres meses de la intervención siendo estadísticamente significativo este decremento en relación al valor basal (Figura 2, Panel B). En relación al número de células con prolongación nuclear se observó un pequeño decremento hasta el tercer mes de la intervención nutricia con la dieta cetogénica en relación al nivel basal, no siendo significativo este decremento (Figura 2, Panel C)



**Figura 2. Evaluación genotóxica en los individuos de estudios.** Panel A: Número de micronúcleos; Panel B. Número de células binucleadas; Panel C: Número de células con prolongación nuclear. Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  desviación estándar. En análisis se realizó mediante ANOVA de medidas repetidas con un post hoc de Bonferroni. Se consideró estadísticamente significativo cuando  $p \leq 0.05$ . MN: micronúcleos; BN: binucleadas; PN: prolongación nuclear; \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.001$

De igual manera, se determinó el daño citotóxico mediante la cuantificación del número de las células con CC, CL, CR y NP los cuales son biomarcadores de muerte celular. En relación al número de células con CC y CL como se puede observar en la Figura 3, panel A y C, decrementó estadísticamente al mes de la intervención dietética en relación al valor basal y se mantuvo hasta los tres meses. En contraste el número de células con NP no sufrió cambios significativos asociados a la intervención dietética. La intervención dietética decrementó el número de células en CR de forma tiempo dependiente, siendo estadísticamente significativo este decremento en relación al valor basal (Figura 3, Panel D)



**Figura 3. Evaluación citotóxica en los individuos de estudio.** Panel A: Número de células con cromatina condensada; Panel B: Número de células con núcleo picnótico; Panel C: Número de células en cariolisis, Panel D: Número de células en cariorrexis. Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  desviación estándar. En análisis se realizó mediante ANOVA de medidas repetidas con un post hoc de Bonferroni. Se consideró estadísticamente significativo cuando  $p \leq 0.05$ . CC: cromatina condensada; NP: núcleo picnótico; CL: cariolisis; CX: cariorrexis;  $*p \leq 0.05$

El decremento en estos parámetros se pudiera explicar por el metabolismo de los cuerpo cetónicos, dado que inician una respuesta adaptativa caracterizada por la activación de los reguladores maestros del mecanismo de protección celular, factor 2 relacionado con el factor eritroide 2 nuclear (Nrf2), sirtuinas y quinasa activada por AMP dando como resultado la resolución del estrés oxidativo, mediante la regulación positiva de las actividades antioxidantes y antiinflamatorias mejorando la función y el crecimiento mitocondrial, la reparación del ADN y la autofagia<sup>28</sup>. Se ha descrito que la dieta cetogénica modula las enzimas dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) y reduce el daño del ADN en el hipocampo<sup>29</sup>.

La prueba de HbA1c (hemoglobina glucosilada) muestra la cantidad promedio de glucosa adherida a la hemoglobina en los últimos tres meses. Es un promedio de tres meses porque ese es el tiempo de vida típico de los glóbulos rojos. En la Figura 4 se muestran los valores de la fracción A1c donde

se observa una diferencia con significancia estadística entre el valor inicial y la evaluación al mes de la intervención con un valor de  $p < 0.05$ ; así como entre el valor al inicio de la intervención y tres meses después de la intervención  $**p < 0.001$ . Hay estudios en donde se han encontrado resultados similares, que indican que la dieta baja en carbohidratos reduce la HbA1c en personas con DM2, pero aún no se han comparado intervenciones con otro tipo de dietas. A un corto y mediano plazo de alrededor de 6 meses se ha encontrado que tanto la dieta cetogénica como las dietas altas y moderadas en carbohidratos reducen la HbA1c. En un estudio de García *et al.* en 2016 se muestra el comparativo entre diferentes dietas y los valores de HbA1c a los seis meses de intervención. Westman *et al.* 2008, empleando una dieta cetogénica lograron disminuir en -1.5% el valor de la HbA1c, mientras que dietas altas en carbohidratos el valor aumentaba en 0.5%. Yamada *et al.* en 2014 administrando dieta cetogénica redujeron el valor de la HbA1c entre -0.6% a -0.2%. en comparación con Davis *et al.* 2009, tiene -0.93%-0.41%, Dynson *et al.* 2010, -0.8%-0.41%, Guldbbrand *et al.* 2012 -0.5%-0.1%, Iqbal *et al.* 2010, -0.5%-0.1%.

Los estudios mencionados aportan evidencia de que la dieta cetogénica mejora las cifras de HbA1c en comparación con las dietas que restringen los lípidos manteniendo alto el consumo de carbohidratos. Una de las inquietudes sobre las dietas cetogénicas son los efectos a largo plazo que puedan tener, sin embargo, los estudios realizados implementando las dietas a largo plazo de uno a dos años reportan resultados positivos sobre HbA1c, particularmente la reducción se observa a partir de los seis meses<sup>36</sup>.

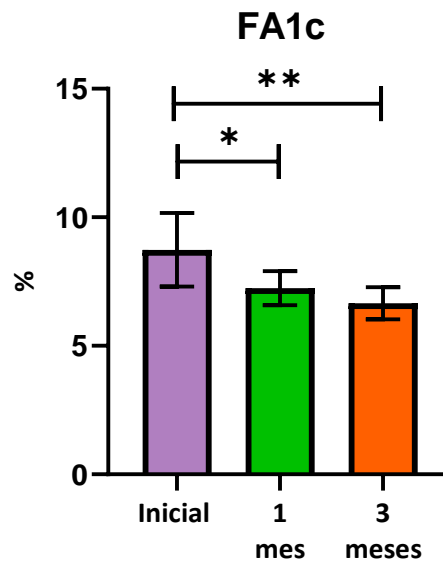


Figura 4. Valores de HbA1c. Los resultados se muestran como medias  $\pm$  DE, antes de iniciar la dieta, al primer mes y a los 3 meses. Las diferencias entre las medias se establecieron mediante la prueba post hoc de Bonferroni. Para la comparación entre el valor inicial y el primer mes se consideró estadísticamente significativo cuando  $**p \geq 0.05$ , y en la comparación entre el valor inicial y el tercer mes \*cuando  $p \geq 0.05$ .

## CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que la dieta cetogénica fue eficaz para alcanzar la meta de control glucémico en un periodo de 3 meses, particularmente en aquellos pacientes que se apegaron a la dieta. El nivel de HbA1c disminuyó paulatina y significativamente durante los tres meses de la dieta. En cuanto al efecto sobre el daño al ADN, se observó una reducción en los marcadores de daño genotóxico (MN y BN) y citotóxico (CC, CL y CX) en las células epiteliales de la mucosa bucal de los pacientes con DM2.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Organización Mundial de la Salud “Diabetes” 2022 <http://www.who.int/es/newsroom/factsheets/detail/dia>
2. J. Mencía-Valenzuela., R. Fernández-Castillo., M. B. Martos-Cabrera., J.L. Gómez-Urquiza., L. Albendín-García y G.A. Cañadas de la Fuente, “Dietas bajas en hidratos de carbono para diabéticos de tipo 2: revisión sistemática”. *Nutrición Hospitalaria*, Vol. 34 2017, pp. 224-234.
3. Asociación Latinoamericana “Clasificación de la diabetes mellitus” *Revista de la asociación latinoamericana de diabetes*. 2019, pp. 100-105.
4. Guía de práctica clínica IMSS 718-18 Diagnóstico y tratamiento farmacológico de la Diabetes Mellitus Tipo 2 en el Primer Nivel de Atención 2018 <http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/718GER.pdf>
5. M. G. Andreassi, R. Barale, P. Iozzo, and E. Picano. The association of micronucleus frequency with obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Mutagenesis* 26 (1): 2011; pp 77–83. doi:10.1093/mutage/geq077
6. Milic M., Frustaci A., Del Bufalo A., Sánchez-Alarcón J., Valencia-Quintana R., Russo P., Bonassi S. DNA damage in non-communicable diseases: a clinical and epidemiological perspective. *Mutat Res*; 776: 2015 pp 118-27. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2014.11.009
7. Deo P., Fenech M., Dhillion V.S. Association between glycation biomarkers, hyperglycemia, and micronucleus frequency: A meta -analysis *Mutation Research* 787, 2021; doi: 10.1016/j.mrrev.2021.108369
8. L. Monnier., and C. Colette. & quot; Definiciones y clasificaciones de los estados diabéticos. & quot; *Diabetología* 37 2020 pp 40-43.
9. J. E. Guyton & amp; Hall. “Insulina glucagón y diabetes mellitus” en *Tratado de fisiología médica* Capítulo 78 pp. 950-954
10. R. Goyal, I. Jialal. Diabetes Mellitus Type 2. En *StatPearls [Internet]*; [actualizado 19 junio 2022]; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2022. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513253/> (acceso 10 abril 2023).
11. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-2019: metodología y perspectivas, salud publica mex. 2019; 61(6) 917-923pp.
12. J. V. Calderón Salinas, E. G. Muñoz Reyes, M.A. Quintanar Escorza. Estrés oxidativo y diabetes mellitus 32(2) 2013; 53-66pp
13. M. Zalacain, L. Sierrasesumaga & amp; A. Patiño. “El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos”. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* Vol. 28, 2005, pp. 227-236.
14. J. García-Muñoz, “Dieta cetogenica baja en carbohidratos como tratamiento en la Diabetes Mellitus Tipo 2: Una revisión sistemática. Universidad de Jaén Facultad Ciencias de la Salud 2016 pp. 5-8
15. S. Grossman & amp; C.M. Porth. *Fisiopatología Alteraciones de la salud. Conceptos básicos* Novena edición Barcelona: 2014 Wolters Kluwer
16. C. A. Squier & amp; M. J. Kremer “Biology of Oral Mucosa and Esophagus”. *Journal of the National Cancer Institute Monographs* Vol. 29, 2001, pp. 7-15. doi: 10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a003443
17. E. Ibarra-Costilla, R. M. Cerda-Flores, M. I. Dávila-Rodríguez, A. Samayo-Reyes, C. Calzado-Flores, & E. I. Cortés-Gutiérrez. DNA damage evaluated by comet assay in Mexican patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetológica*, Vol. 47 2009 111-116pp. DOI:10.1007/s00592-009-0149-9
18. J. E. Quintero Ojeda, M. Aguilar-Medina, V. Olimón-Andalón, R. A. García Jau, A. Ayala Ham, J. G. Romero Quintana, E. L. Silva-Benítez, G. Sanchez-Schmitz, R. Ramos-Payán. Increased Micronuclei Frequency in Oral and Lingual Epithelium of Treated Diabetes Mellitus Patients. *Biomed Research International*. 2018 DOI: 10.1155/2018/4898153. PMID: 29546061; PMCID: PMC5818950.
19. B. S. Da Silva, D. L. Roaris, R. M. Bonotto, J. B. Meyer, R. E. Grohe, M. S. Perassolo, R. P. Palazzo, S. W. Maluf, R. Linden, F. M. Andrade. The influence on DNA damage of glycaemic parameters, oral antidiabetic drugs and polymorphisms of genes involved in the DNA repair system. *Mutagenesis*. 28(5) 2013 525-530pp. DOI: 10.1093/mutage/get029. PMID: 23793614



20. H. M Muzher, F. A. Shafi, & A. N. Alrekabi, Association between Glycated Hemoglobin A1c Levels with Genomic Instability in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Sistematic Reviews in Pharmacy* Vol. 12 2021; 598-605pp.
21. A. Grindel, H. Brath, A. Nersesyan, S. Knasmueller & K. H. Wagner. Association of genomic instability with HbA1c levels and medication in diabetic patients. *Scientific reports*, 7(1), 2017 PMID 41985.
22. J. Shilpa, V. Mohan. Ketogenic diets: Boon or bane? *Indian Journal of Medical Research* 148 2018; 251-253pp.DOI: 10.4103/ijmr.IJMR\_1666\_18. PMID: 30425213; PMCID: PMC6251269
23. J. Pérez Guisado "Las dietas cetogénicas: beneficios adicionales a la pérdida de peso y efectos secundarios infundados. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* Vol. 58 2008, pp.323-3229
24. R. C. Pérez-Kast, H. D. Castro-Cortéz, A. Lozano-Tavárez, A. Arreguín-Coronado, V. Urias-Orona, H. Castro-García "Dieta cetogénica como alternativa en el tratamiento de la obesidad: un estudio de revisión bibliográfica". *Revista Salud pública y nutrición* Vol. 20, 2021 pp.1-12
25. S. C. Corbi., A. S. Bastos. S. R. Orrico., R. Secolin., R. A. Dos Santos., C. S. Takahashi & R. M. Scarel- Caminaga. Elevated micronucleus frequency in patients with type 2 diabetes, dyslipidemia and periodontitis. *Mutagenesis*, Vol. 29(6), 2014, pp. 433-439.
26. M. Prasad., S. C. Bronson., T. Warrior., A. Badarinath, S. Rai., K. Baid., & A. Shanmugam. "Evaluation of DNA damage in Type 2 diabetes mellitus patients with and without peripheral neuropathy: A study in South Indian population". *Journal of natural science, biology, and medicine*, Vol. 6(1), 2015 p. 80.
27. A. Grindel., H. Brath., A. Nersesyan., S. Knasmueller & K. H. Wagner. Association of genomic instability with HbA1c levels and medication in diabetic patients. *Scientific reports*, Vol. 7(1), 2017 pp. 1-9.
28. H. Kolb., K. Kempf., M. Röhling., M. Lenzen-Schulte., N. C. Schloot., S. Martin. "Ketone bodies: from enemy to friend and guardian angel". *BMC Medicine*. Vol. 19(1) 2021 p.313.
29. M. Elamin., D. N. Ruskin., S. A. Masino., P. Sacchetti. "Ketogenic Diet Modulates NAD+-Dependent Enzymes and Reduces DNA Damage in Hippocampus". *Frontiers in Cellular Neuroscience* Vol. 12 2018 pp.12-83. doi: 10.3389/fncel.2018.00263.
30. García-Peñas JJ. Epilepsia, cognición y dieta cetogénica. *Rev Neurol* 2018;66 (Supl. 1):S71-S75 doi: [10.33588/rn.66S01.2017529](https://doi.org/10.33588/rn.66S01.2017529)
31. Yamada, Y., Uchida, J., Izumi, H., Tsukamoto, Y., Inoue, G., Watanabe, Y., Irie, J., & Yamada, S. A non-calorie-restricted low-carbohydrate diet is effective as an alternative therapy for patients with type 2 diabetes. *Internal medicine 2014 (Tokyo, Japan)*, 53(1), 13–19. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.53.0861>
32. Davis NJ, Tomuta N, Schetcher C, et al.; Comparative study of the effects of a 1-year dietary intervention of a low-carbohydrate diet versus a low-fat diet on weight and glycemic control in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2009; 32:1147–1152.
33. Dyson, P. Dietas bajas en carbohidratos y diabetes tipo 2: ¿cuál es la evidencia más reciente?. *Terapia de diabetes*, 6, 2015, 411-424.
34. Guldbbrand, H., Dizdar, B., Bunjaku, B., Lindström, T., Bachrach-Lindström, M., Fredrikson, M., ... & Nystrom, FH. En la diabetes tipo 2, la aleatorización al consejo de seguir una dieta baja en carbohidratos mejora transitoriamente el control glucémico en comparación con el consejo de seguir una dieta baja en grasas que produce una pérdida de peso similar. *Diabetología*, 55 (8), 2012, 2118-2127.
35. Iqbal, N., Vetter, ML, Moore, RH, Chittams, JL, Dalton-Bakes, CV, Dowd, M., ... y Wadden, TA. Efectos de una intervención de baja intensidad que prescribió una dieta baja en carbohidratos versus una dieta baja en grasas en participantes obesos y diabéticos. *Obesidad*, 18 (9),2010, 1733-1738.
36. Westman, EC, Yancy, WS, Mavropoulos, JC, Marquart, M. y McDuffie, JR. El efecto de una dieta cetogénica baja en carbohidratos versus una dieta de bajo índice glucémico en el control glucémico en la diabetes mellitus tipo 2. *Nutrición y metabolismo*, 5 (1), 2008, 1-9.

## INFLUENCIA DEL GRUPO FUNCIONAL EN LA EMISIÓN DE COMPUESTOS LUMINISCENTES MONONUCLEARES

Carlos Felipe Hernández Fuentes<sup>1</sup>, Teresita del Refugio Jiménez Romero<sup>2</sup>, Ángel de Jesús Morales Ramírez<sup>2</sup>, María Luz Carrera Jota<sup>2</sup>, Alejandra Angelique Castro Juarez<sup>3</sup> y Hilda Margarita Alfaro López<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Escuela Superior de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, Instituto Politécnico Nacional, Av. Luis Enrique Erro S/N, Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Zacatenco, GAM, C.P. 07738,

<sup>2</sup> Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas, Instituto Politécnico Nacional, Av. Luis Enrique Erro S/N, Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Zacatenco, GAM, C.P. 07738 CDMX, Mexico,

<sup>3</sup> Centro de Investigación e Innovación Tecnológica, Instituto Politécnico Nacional, cerrada de Cecati Sta. Catarina Azcapotzalco CP. 02250 CDMX, Mexico.

[charlos\\_552@hotmail.com](mailto:charlos_552@hotmail.com)

### RESUMEN

El trabajo presenta la síntesis, composición y el estudio de las propiedades luminiscentes, de nuevos complejos mononucleares de europio (III) con el uso ácido benzoico y tres variantes de ácido bifeníl carboxílico como ligantes. Los datos analíticos y espectroscópicos obtenidos de las tres estructuras revelan la formación de tres nuevos complejos mononucleares, libres de disolventes en su esfera de coordinación con una metodología hasta el momento no reportada. Se obtuvieron los espectros de excitación, emisión, decaimiento luminiscente y se simuló el rendimiento cuántico con el programa LUMPAC. Los complejos con bifeníl fueron comparados con precursores de ligandos más sencillos, los bifeníl presentaron mejores propiedades luminiscentes, la localización del segundo anillo aromático en cada uno de los bifeníl (grupo activador) con respecto al anillo carboxílico (grupo sustractor de carga) cambiaron las capacidades de excitación, emisión, y un rendimiento cuántico. El rendimiento cuántico en uno de los productos de ácido bifeníl carboxílico fue 400% superior que en los monoarilos.

### INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el desarrollo científico y tecnológico en torno al uso de lantánidos ha cobrado gran importancia, sus propiedades químicas permiten una amplia gama de aplicaciones en diferentes áreas, incluyendo análisis químico<sup>[1]</sup>, catálisis<sup>[2]</sup> y aplicaciones biológicas<sup>[3-4]</sup>. En particular los lantánidos se utilizan por sus propiedades luminiscentes, incluido el color de alta pureza<sup>[5-6]</sup> y la vida útil de radiación corta<sup>[7]</sup>. Entre los lantánidos, el europio (III) destaca por su amplia gama de aplicaciones ópticas; sin embargo, el uso de lantánidos puros es poco común debido a que la absorción directa de los estados excitados 4f-4f es poco eficaz, debido a la formación de transiciones prohibidas por las reglas de paridad, las cuales resultan en coeficientes de absorción muy bajos <sup>[8]</sup>. La solución a este problema es el uso de ligandos que proporcionen un efecto de antena. El efecto antena se define como un proceso de conversión de luz a través de la absorción-transferencia-emisión de energía (Figura 1), en la cual el ligando funciona como un recolector de luz, para posteriormente transportar la energía al ion metálico y que este lo disipe en forma de emisión luminiscente <sup>[9-11]</sup>.

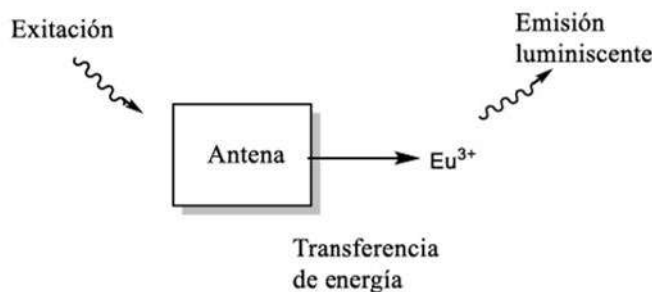


Figura 1. Mecanismo en el efecto antena

### TEORIA

Existe un creciente interés en el uso de ligandos orgánicos, especialmente compuestos carboxílicos que presenten dicho efecto sensibilizador<sup>[12-13]</sup>. Estos ligandos se han estudiado extensamente debido a la alta estabilidad cinética y termodinámica que presentan una vez coordinados a los iones lantánidos, además de mejorar considerablemente las propiedades luminiscentes de compuestos con tierras raras<sup>[14, 15]</sup>.

En este tipo de compuestos, es posible modificar la transferencia de energía de los ligandos en función del tipo de coordinación (número y tipo de ligandos) y por lo tanto sus propiedades luminiscentes, de tal manera que existe la necesidad de sintetizar compuestos luminiscentes los cuales sean, por diseño capaces de tener un mejor aprovechamiento de la energía absorbida. Es por esto por lo que el desarrollo de nuevas metodologías de complejos luminiscentes debe considerar la obtención de compuestos mononucleares exentos de disolventes en la esfera de coordinación. El siguiente trabajo abarca la síntesis de 5 compuestos de europio. Dos de ellos con ácido benzoico y 3 de ellos con derivados de ácido bifenil como ligando que complementen la esfera de coordinación. La síntesis se lleva en dos etapas y el análisis de sus propiedades luminiscentes tiene como objetivo determinar el compuesto que presente un mayor rendimiento cuántico.

### PARTE EXPERIMENTAL

La reacción se realizó a condiciones de presión y temperatura ambiente. Se eliminó el uso de disolventes orgánicos para la síntesis de estos complejos, con el objetivo de que no interfieran en la esfera de coordinación del nuevo compuesto.

Tanto el ácido benzoico (99%), el hidróxido de sodio (99.9%) y el cloruro de europio (99%) como los tres ligandos de ácido bifenil carboxílico usados (ácido bifenil-2-carboxílico, ácido bifenil-3-carboxílico, ácido bifenil-4-carboxílico) son de Sigma Aldrich. Como único disolvente se utilizó agua la cual fue previamente desionizada.

La metodología desarrollada para la formación de los 2 complejos mononucleares se muestra en la Figura 2.

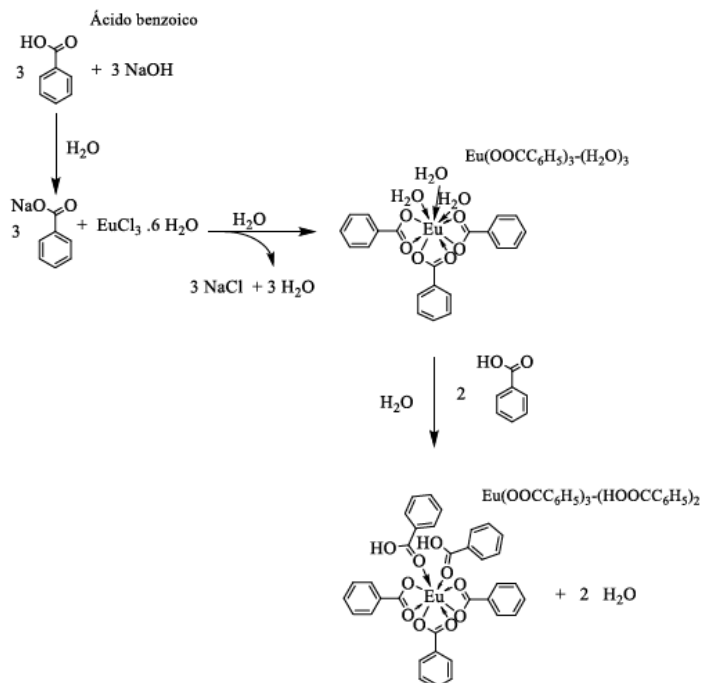


Figura 2. Diagrama de síntesis de los 2 complejos de Europio y ácido benzoico y la nomenclatura para su identificación

La síntesis con los tres ácidos bifeníl carboxílicos se muestra en la figura 3

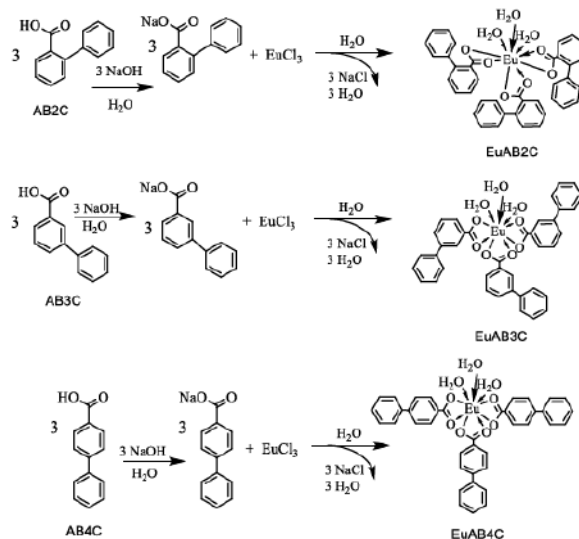


Figura 3. Diagrama de síntesis de los complejos de Europio obtenidos a partir de los isómeros del ácido bifeníl carboxílico y la nomenclatura para su identificación

### ANÁLISIS DE RESULTADOS

En la figura 4 se muestran los Espectros de absorción y emisión de los compuestos obtenidos a partir de ácido benzoico:  $[\text{Eu}(\text{OOCC}_6\text{H}_5)_3 \cdot (\text{H}_2\text{O})_3]$  y  $[\text{Eu}(\text{OOCC}_6\text{H}_5)_3 \cdot (\text{HOCC}_6\text{H}_5)_2]$ . Ambos espectros de excitación se realizaron con  $\lambda_{\text{em}} = 616 \text{ nm}$ . Para el complejo  $[\text{Eu}(\text{OOCC}_6\text{H}_5)_3 \cdot (\text{H}_2\text{O})_3]$  se observa una banda ancha asignada a la transición  $S_0-S_1$  centrada a 290 nm, y para el complejo  $[\text{Eu}(\text{OOCC}_6\text{H}_5)_3 \cdot (\text{HOCC}_6\text{H}_5)_2]$  dicha banda se encuentra centrada en 288 nm, del lado derecho, se observan las excitaciones corresponden a las bandas de absorción que se originaron desde el estado

fundamental  ${}^7F_0$  al nivel excitado  ${}^5L_7$  centrado en 393 nm. En el complejo  $[\text{Eu}(\text{OOCCH}_2\text{C}_6\text{H}_4)_3(\text{HOOCCH}_2\text{C}_6\text{H}_4)_2]$ , este último nivel excitado es, en términos de intensidad, más alto que en el complejo  $[\text{Eu}(\text{OOCCH}_2\text{C}_6\text{H}_4)_3(\text{H}_2\text{O})_3]$  (es decir, el área bajo la curva muestra un 70% más de absorción de energía en el complejo 3 que en el complejo 2), lo que indica la contribución potencial de una energía. ligando a los estados de transferencia de carga de metal (LMCTS) de los dos ligandos adicionales. Esto corresponde al efecto de la antena; a esta longitud de onda, absorbe el ligando y posteriormente transfiere la energía al ion  $\text{Eu}^{3+}$ .

En los espectros de emisión de ambos complejos se observa que el compuesto que contiene cinco grupos carboxílicos presenta mayor emisión, incluso cuando tiene el mismo europio (III) ( $5 \times 10^{-3}$  mmol). Este efecto se puede explicar por el hecho de que, al presentar un mayor número de ligandos, el complejo 3 permite una mayor transferencia de energía hacia el centro luminiscente, como se observa en el espectro de excitación. Sin embargo, la intensidad del  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ , la transición del dipolo magnético (centrada en 592 nm) es independiente del entorno de  $\text{Eu}^{3+}$ , mientras que la intensidad de  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ , correspondiente a la transición del dipolo eléctrico centrada a 616 nm, es muy sensible a la simetría del sitio. En ambos complejos, el área bajo la curva se calculó usando la integración para la transición  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ . Se determinó que el complejo  $[\text{Eu}(\text{OOCCH}_2\text{C}_6\text{H}_4)_3(\text{HOOCCH}_2\text{C}_6\text{H}_4)_2]$  presenta un 15% más de emisión de energía que el complejo  $[\text{Eu}(\text{OOCCH}_2\text{C}_6\text{H}_4)_3(\text{H}_2\text{O})_3]$ .

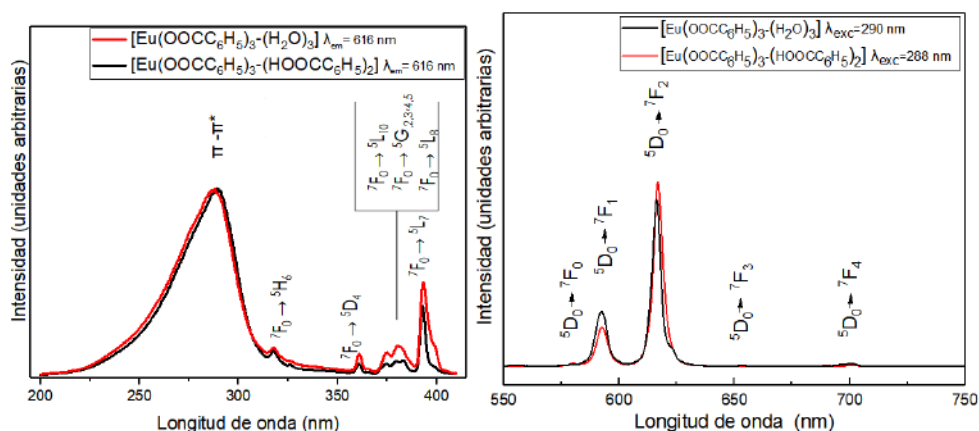


Figura 4. Espectros de absorción y emisión de los compuestos de Europio con ácido benzoico. En la figura 5 se muestran los espectros de excitación y emisión de los complejos sintetizados a partir de europio y las 3 variaciones de ácido bifenil carboxílico, los cuales se realizaron a la mayor emisión ( $\lambda_{em}$ ) en cada uno de los complejos (Eu AB2C = 614 nm; Eu AB3C = 616 y Eu AB4C = 615). Las bandas asignadas a la transición  $S_0-S_1$  ( $\pi$ ,  $\pi^*$ ) se encuentran centradas en 300 nm, 323 nm y 314 nm para los compuestos con ligandos bifenilos en posición orto, meta y para respectivamente. De estos tres compuestos el que contiene el ligando con el bifenilo en posición *para* posee una mayor absorción de energía (90% y 270% más de los complejos EuAB3C y EuAB2C respectivamente), representadas por el área bajo la curva del espectro correspondiente. Los compuestos con ligando en posición orto, y el que contiene ligandos en posición meta presentan menor energía de excitación. Para los tres compuestos se observan las excitaciones a 393 nm que corresponden a las bandas de absorción que se originaron desde el estado fundamental  ${}^7F_0$  al nivel excitado  ${}^5L_7$ , en esta banda transición, el complejo EuAB4C es el de mayor energía de excitación. los espectros de emisión de los tres complejos sintetizados, las muestras se realizaron a condiciones equimolares (con  $5 \times 10^{-3}$  mmol de muestra de cada producto) para poder ser comparables entre si. Una mayor emisión en los tres compuestos, correspondiente a la transición  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$  se debe a la forma en la cual el ion ocupa los sitios de simetría. Cuando el ion  $\text{Eu}^{3+}$  se localiza en sitios con inversión de simetría es la transición  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$  (dipolo magnético) favorecida y domina la señal, mientras que si el ion ocupa sitios sin inversión de simetría la transición dominante es  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$  (dipolo eléctrico) y se incrementa debido al aumento de la distorsión del campo local alrededor del  $\text{Eu}^{3+}$ .

De los tres compuestos, el complejo con el ligando bifenilo en la posición para es el que presenta mayor emisión en las transiciones  $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$  (dipolo magnético) y  $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$  (dipolo eléctrico). En términos de intensidad este incremento es de 91% más que el complejo EuAB2C y 210% más en el complejo EuAB3C. Los espectros son comparables al haberse realizado en condiciones equimolares (misma cantidad de europio).

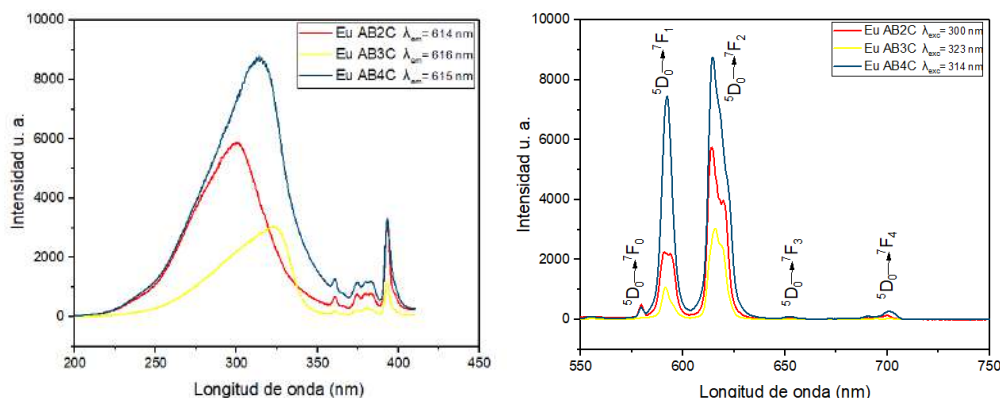


Figura 5 Espectros de absorción y emisión de los compuestos de Europio con las 3 variantes de ácido bifenil carboxílico

El cálculo del rendimiento cuántico se realizó mediante el software LUMPAC.

Los resultados del rendimiento cuántico simulado para los complejos con ácidos bifenil carboxílico fueron 6.61%, 8.99% y 12.25% para los compuestos EuAB2C, EuAB3C y EuAB4C respectivamente. De estos compuestos sintetizados, el que mejores propiedades luminiscentes presenta es el compuesto con ácido bifenil 4 carboxílico como ligando al presentar mayor excitación y como resultado mayor emisión en las transiciones  $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$  y  $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$  además de un rendimiento cuántico de 12.25%.

## CONCLUSIONES

En los complejos sintetizados con ácido benzoico el complejo de fórmula  $[\text{Eu}(\text{OOC}\text{C}_6\text{H}_5)_3 \cdot (\text{HOOC}\text{C}_6\text{H}_5)_2]$  presenta mayor emisión (15 %) para las transiciones  $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$  y  $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ , mayor tiempo de decaimiento y finalmente un rendimiento cuántico de 2.96%, mayor al de 2.31% del complejo  $[\text{Eu}(\text{OOC}\text{C}_6\text{H}_5)_3 \cdot (\text{H}_2\text{O})_3]$ . En ambos complejos la emisión se ve favorecida por la asimetría del ion europio, al observarse una mayor emisión en las transiciones  $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$  (correspondiente a la transición del dipolo eléctrico), respecto a las  $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$  y  $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$ .

En la síntesis de los complejos de europio con los 3 isómeros del ácido bifenil carboxílico, el ácido bifenil 4 carboxílico genera un mejor aprovechamiento de la energía cuando se coordina al ion europio, alcanzando un rendimiento cuántico de hasta 12.25%. La disposición del segundo anillo (grupo donador de carga) en las posiciones orto y para con respecto al ácido carboxílico (grupo sustractor de carga) favorece la transferencia de carga del ligando al metal.

Los complejos a partir de biarilos son más eficientes en el aprovechamiento energético comparados con los complejos con monoarilos, aun cuando tienen disolvente en la esfera de coordinación. La distribución del grupo donador de carga en ciertas posiciones favorece el aprovechamiento de energía en los complejos luminiscentes.

Al obtenerse productos de estructura semejante, la ruta de síntesis descrita en este trabajo puede ser utilizada para la síntesis de complejos de europio mononucleares con diferentes ácidos carboxílicos como ligando.



## REFERENCIAS

1. Doat, A.; Fanjul, M.; Pellé, F.; Hollande, E.; Lebugle, A. Europium-doped bioapatite: A new photostable biological probe, internalizable by human cells. *Biomaterials* 2003, 24, 3365–3371.
2. Lai, J.; Wang, T.; Zhang, H.; Ye, L.; Yan, C.; Gu, W. Modulating the photoluminescence of europium oxide nanoparticles by controlling thermal decomposition conditions. *J. Lumin.* 2019, 214, 116534.
3. Zou, Y.; Sun, F.; Liu, C.; Yu, C.; Zhang, M.; He, Q.; Xiong, Y.; Xu, Z.; Yang, S.; Liao, G. A novel nanotheranostic agent for dual-mode imaging-guided cancer therapy based on europium complexes-grafted-oxidative dopamine. *Chem. Eng. J.* 2019, 357, 237–247.
4. Xuan, Y.; Song, X.L.; Yang, X.Q.; Zhang, R.Y.; Song, Z.Y.; Zhao, D.H.; Hou, X.L.; An, J.; Zhang, X.S.; Zhao, Y. Di Bismuth particles imbedded degradable nanohydrogel prepared by one-step method for tumor dual-mode imaging and chemo-photothermal combined therapy. *Chem. Eng. J.* 2019, 375, 122000.
5. Decadt, R.; Van Hecke, K.; Depla, D.; Leus, K.; Weinberger, D.; Van Driessche, I.; Van Der Voort, P.; Van Deun, R. Synthesis, Crystal Structures, and Luminescence Properties of Carboxylate Based Rare-Earth Coordination Polymers. *Inorg. Chem.* 2012, 51, 11623–11634.
6. Singh, R.; King, A.; Nayak, B.B. Reddish emission of europium doped zinc oxide nanophosphor prepared through precipitation route using sodium borohydride. *J. Alloys Compd.* 2019, 792, 1191–1199.
7. Xu, H.; Sun, Q.; An, Z.; Wei, Y.; Liu, X. Electroluminescence from europium(III) complexes. *Coord. Chem. Rev.* 2015, 293–294, 228–249.
8. Binnemans, K. Interpretation of europium(III) spectra. *Coord. Chem. Rev.* 2015, 295, 1–45.
9. Mech, A.; Karbowski, M.; Görlner-Walrand, C.; Van Deun, R. The luminescence properties of three tetrakis dibenzoylmethane europium(III) complexes with different counter ions. *J. Alloys Compd.* 2008, 451, 215–219.
10. Pham, Y.H.; Trush, V.A.; Amirkhanov, V.M.; Gawryszewska, P. Structural and spectroscopic study of the europium complex with N-(diphenylphosphoryl)pyrazine-2-carboxamide. *Opt. Mater.* 2017, 74, 197–200.
11. Akerboom, S.; Meijer, M.S.; Siegler, M.A.; Fu, W.T.; Bouwman, E. Structure, Photo- and triboluminescence of the lanthanoid dibenzoylmethanates: HNEt<sub>3</sub>[Ln(dbm)<sub>4</sub>]. *J. Lumin.* 2014, 145, 278–282.
12. Hilder, M.; Lezhnina, M.; Junk, P.C.; Kynast, U.H. Spectroscopic properties of lanthanoid benzene carboxylates in the solid state: Part 3. N-heteroaromatic benzoates and 2-furanates. *Polyhedron* 2013, 52, 804–809.
13. Lee, B.H.; Chung, K.H.; Shin, H.S.; Park, Y.J.; Moon, H. Europium(III) complexes of polyfunctional carboxylic acids: Luminescence probes of possible binding sites in fulvic acid. *J. Colloid Interface Sci.* 1997, 188, 439–443.
14. Bergbreiter, D.E.; Poteat, J.L.; Zhang, L. Complexation of europium using polyethylene carboxylic acid. *React. Polym.* 1993, 20, 99–109.
15. Feng, J.; Zhang, H. Hybrid materials based on lanthanide organic complexes: A review. *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 387–410.

## POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR DE CU Y ER PARA LA REMOCIÓN SELECTIVA

Abraham Zepeda Navarro<sup>1</sup>, Eglá Yareth Bivian Castro<sup>2</sup>

Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de los Lagos, Enrique Diaz de Leon, Paseos de la Montaña, Lagos de Morenon Jalisco, Mexico.

abraham.zepeda4162@alumnos.udg.mx, eglá.bivian@academicos.udg.mx\*

### RESUMEN

La contaminación del agua es un problema mundial que afecta a millones de personas en todo el mundo. Uno de los principales contaminantes del agua son los metales pesados, que pueden ser tóxicos para los seres humanos y los animales. La presencia de metales pesados en el agua puede ser el resultado de la actividad industrial, la minería, la agricultura y otras actividades humanas. Para remediar este problema, los investigadores están trabajando en el desarrollo de materiales que puedan eliminar los metales pesados del agua. Uno de los materiales más prometedores son los polímeros de impresión molecular (MIP, por sus siglas en inglés). Los polímeros de impresión molecular son materiales sintéticos que se crean mediante la combinación de monómeros y moléculas de plantilla. Estos polímeros tienen una estructura tridimensional que les permite reconocer y unirse específicamente a una molécula determinada. En el caso de la remoción de metales pesados, los polímeros de impresión molecular se diseñan para reconocer y unirse a los iones metálicos presentes en el agua contaminada. La principal ventaja de los polímeros de impresión molecular es su alta selectividad y capacidad de adsorción. Debido a su estructura tridimensional, los MIPs son capaces de unirse selectivamente a los iones metálicos, lo que les permite adsorber y remover los metales pesados del agua. En este trabajo se presenta el desarrollo de polímeros de impresión molecular utilizando como moléculas plantilla los metales de Cu y Er además se utilizan como monómeros el ácido vinilbenzoico y la fenantrolina, estos son aplicados para la remoción selectiva de metales pesados.

### INTRODUCCIÓN

La contaminación hídrica es una problemática global que afecta tanto a la salud humana como a la biodiversidad del planeta. Los cuerpos de agua dulce, como ríos, lagos y acuíferos, están siendo contaminados por una gran cantidad de contaminantes químicos, biológicos y físicos. La mayoría de estos contaminantes son producidos por actividades humanas. Los contaminantes pueden ser de origen orgánico o inorgánico, los contaminantes inorgánicos son aquellos que no contienen carbono y pueden incluir metales pesados, nitratos, amoníaco, cloro y fluoruros, entre otros. Estos contaminantes pueden ser de origen natural o antropogénico, y pueden entrar al agua a través de diversas fuentes, como la minería, la industria, la agricultura y los vertederos. Entre los contaminantes más preocupantes se encuentran los metales pesados y se refiere a aquellos metales que causan un impacto ambiental debido a su toxicidad. En concreto un metal pesado es un elemento con alta densidad (mayor a 4 g/cm<sup>3</sup>), masa y peso atómico por encima de 20 se caracterizan por ser altamente tóxicos y bioacumulables (1,2,3). La mayoría de ellos tienen una marcada afinidad con el azufre evitando la función de las enzimas y formando enlaces entre ellas a través de sus grupos con azufre. Así mismo, pueden precipitar biocompuestos de fosfato o catalizar su descomposición. El ácido carboxílico de las proteínas y los grupos aminos también se enlazan químicamente con los metales pesados. Algunos de los metales pesados potencialmente más tóxicos son: antimonio, arsénico, cadmio, cobre, cromo, mercurio, níquel, plomo, selenio, zinc.

Eliminarlos de los sistemas de aguas contaminadas ha sido un papel crucial en los últimos años para la salud pública sin embargo los sistemas de adsorción actuales resultan poco eficientes. Una de las técnicas recientes y prometedoras para esta área es la aplicación de los polímeros de impresión molecular. Los Polímeros de Impresión Molecular (MIP) son materiales sintéticos que se construyen con cavidades o poros específicos que presentan alta afinidad y selectividad para una o varias moléculas objetivo también llamados plantillas. La función de cavidades específicas es identificar moléculas objetivo con los mismos tamaños, formas, estructuras y propiedades que la plantilla. En general, la interacción entre el polímero y la molécula molde sigue el principio de una "llave y cerradura molecular" como las interacciones anticuerpo-antígeno. En este sentido, los MIP

representan receptores artificiales, imitando a sus contrapartes naturales usando interacciones semi-covalente para unirse a los objetivos. Sin embargo, la unión de MIP puede seguir diferentes enfoques, incluidas las interacciones covalentes y la quelación con metales. Estas cavidades, que son compatibles con la molécula objetivo en tamaño y estructura se obtienen por polimerización de esta, en presencia de un monómero, un entrecruzante, un iniciador y un solvente (4).

## SINTESIS

### Monómero funcional de cobre/erbio

Se hacen reaccionar 1 mmol de ácido vinilbenzoico (VBA) disuelto en 20 mL de agua desionizada, con 19 mmol de hidróxido de sodio (NaOH), luego a esta mezcla se le añadió 1 mmol de nitrato de cobre trihidratado ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) / Tricloruro de Erblio hexahidratado ( $\text{ErCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) disuelto en 5 mL de agua desionizada, después a esta solución se le agrega 1 mmol de fenantrolina (fen) disuelta en 10 mL de etanol, la reacción se deja en agitación constante durante una hora a temperatura ambiente.

### Polímero de impresión molecular de cobre/erbio

Se disuelve 0.18 mmol del monómero funcional de cobre/erbio en 10 mL de solvente DMF, después de disolverse se le agregaron 3.59 mmol de EGDMA y 0.06 mmol de AIBN recristalizado en metanol. La mezcla resultante se mantuvo en agitación constante por 48 horas a 70 °C bajo condiciones de atmósfera de argón. Al final se obtuvo un precipitado color verde el cual se filtró y se secó.

### Eliminación de molécula molde del polímero (Lavado Acido)

Se colocó 0.3 g de polímero de impresión molecular Cu/Er en un extractor Soxhlet con una solución de ácido acético/metanol con una relación de 1:9 y se puso a lixiviar durante 24 horas. Se obtuvo un precipitado color blanco el cual se lavó con agua desionizada y se secó.

### Blanco

Se hace reaccionar 0.035 mmol de VBA con 0.017 mmol de fenantrolina y se disuelve en 10 mL de solvente DMF, después de disolverse se le agregaron 3.59 mmol de EDGMA y 0.06 mmol de AIBN recristalizado en metanol. La mezcla resultante se mantiene en agitación constante por 48 horas a 70 °C bajo condiciones de atmósfera de argón y se obtuvo un precipitado color blanco el cual se filtró y se secó (5).

## ADSORCIÓN

El proceso de remoción consiste en poner en contacto un fluido con un sólido, uno o más de los componentes del fluido son atraídos a la superficie del adsorbente. La sustancia atraída hacia la superficie se llama adsorbato, mientras que aquella a la que se adhiere es el adsorbente. La magnitud de la adsorción depende, en gran parte, de la naturaleza del sólido y de las moléculas que están siendo adsorbidas, así como de la concentración y la temperatura. Al aumentar la superficie de adsorbente y la concentración de adsorbato, aumenta la cantidad adsorbida. La capacidad de adsorción (Q) es una de las características más importantes de los polímeros impresión molecular. Se expresa como la cantidad total de iones o moléculas adsorbidos por gramo de muestra de polímero (mg/g). En los experimentos, se determinó la capacidad de adsorción estática, que se define como la concentración más alta de iones metálicos que el polímero adsorbe en equilibrio. Se utilizó la siguiente fórmula (6,7):

$$Q = \frac{(C_i - C_f)V}{W}$$

Donde  $C_i$ ,  $C_f$  concentraciones iniciales y finales de la solución (mg/L) y  $W$  es la masa de adsorbente (g) y  $V$  es el volumen de la solución (L), respectivamente.

## PARTE EXPERIMENTAL/RESULTADOS

## Monómero funcional de cobre

Se sintetizó el monómero de cobre [Cufen(VBA)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O] el cual se presenta en la Figura 1. La estructura molecular del compuesto se determinó mediante difracción de Rayos X, en la Figura 2 se puede observar un átomo de cobre coordinado a una molécula de fenantrolina a través de los átomos de nitrógeno, dos moléculas de VBA a través de los átomos de oxígeno al igual que una molécula de agua. Se forma un entorno pentacoordinado y un sistema mononuclear. Los complejos de cobre son redox activos y frecuentemente lábiles. En los complejos de Cu (II), el número de coordinación varía de 4, 5 y 6 y prefiere fuertemente los ligandos que tienen átomos donantes N, O, S y haluros. Es por ello que el complejo forma enlaces de coordinación con grupos carboxilatos en los ligantes VBA y donantes N en los ligantes de fenantrolina, además el complejo presenta un número de coordinación de 5 (8,9).



Figura 1. Compuesto [Cufen(VBA)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O]

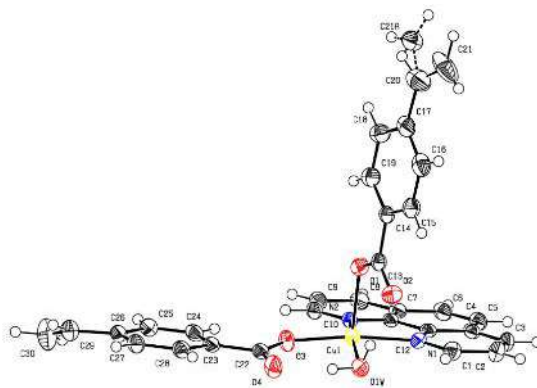


Figura 2. Diagrama ORTEP del compuesto [Cufen(VBA)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O]

## Monómero funcional de Erbio

Se sintetizó el monómero de erbio el cual se presenta en la Figura 3. La coordinación de compuestos polimetálicos de lantánidos como erbio está basada en donantes de oxígeno como grupos fenolatos, carboxilatos y acetilacetatos que van desde compuestos dimetálicos hasta octametálicos y establece puentes entre metales a través de grupos: ftalocianinas, fenolatos, N-donantes, haluros, tiolatos y carboxilatos. Es por ello que se espera que el complejo forme un sistema dimetálico debido a la disposición de varios grupos carboxilatos en los ligantes VBA por lo tanto se plantea la siguiente estructura: [Er<sub>2</sub>fen<sub>2</sub>(VBA)<sub>6</sub>] (10).



Figura 3. Compuesto  $[\text{Er}_2\text{fen}_2(\text{VBA})_6]$

#### Polímero de impresión molecular de cobre/eliminación de cobre

Se obtuvo el polímero de impresión molecular de cobre y se eliminó la molécula molde en este caso cobre. La característica principal la cual nos está indicado que se está llevando correctamente la eliminación del metal a través del lavado ácido en cada caso del polímero es la pérdida o disminución de la intensidad del color que es proporcionado usualmente por el metal, se puede observar la comparación en la Figura 4.



Figura 4. Polímero de impresión molecular con cobre (derecha)/polímero de impresión molecular sin cobre (izquierda).

#### ADSORCIÓN

Para evaluar la capacidad de adsorción del polímero de impresión molecular, se preparó una gama de soluciones de 25 mL con un rango de concentración de nitrato de cobre trihidratado en soluciones de 400-1600 mg/L. Enseguida se le añadió a la solución la cantidad de 100 mg de partículas trituradas del polímero y se agitaron a temperatura ambiente durante 6 h. Posteriormente, las partículas se separaron por centrifugación y se secaron durante 12 h. Después se analizó la solución restante por espectroscopia de absorción atómica con el equipo Varian Spectra 220FS para determinar la concentración final y se realizaron las pruebas por triplicado. Para cada solución se determinó su capacidad de adsorción. La cantidad de iones Cu adsorbidos por unidad de masa de las partículas de polímero aumentó hasta la saturación con la concentración inicial de Cu(II). La máxima capacidad de adsorción estática para IIP-Cu fue de 287.5 mg/g. En la figura 5 se muestra la gráfica.

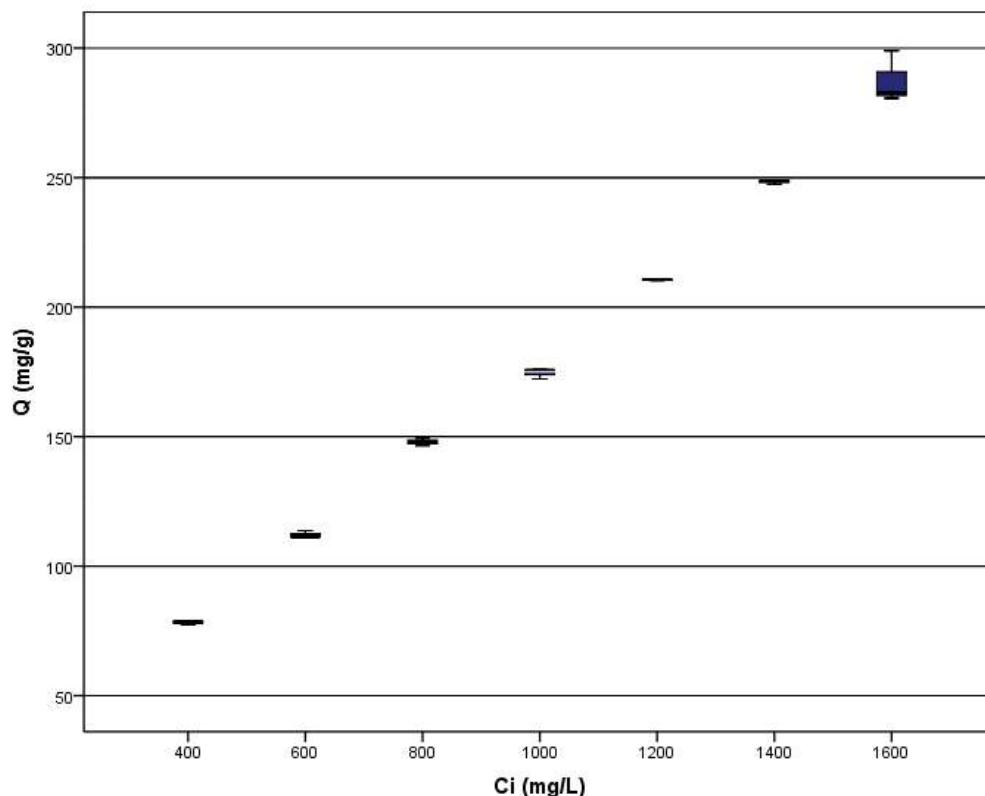


Figura 5. Capacidad de adsorción del polímero de impresión molecular de cobre.

## CONCLUSIONES

**Se logro sintetizar el polímero de** impresión molecular de cobre y medir su capacidad de adsorción, los resultados para del análisis de la capacidad de adsorción arrojaron una adsorción máxima de 287.5 mg/g resultados bastante satisfactorios ya que otros polímeros de impresión molecular con características similares tienen una adsorción de 16-115 mg/g, muestran un alto potencial que podría aplicarse para aguas contaminadas con cobre directamente (10). En el caso del polímero de impresión molecular con erbio solo se logró sintetizar el monómero, se sigue trabajando para obtener el polímero.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Murdaya, N., & Triadenda, A. L. (2022). A Review: Using Multiple Templates for Molecular Imprinted Polymer: Is It Good? MDPI, 14, 4441. doi: <https://doi.org/10.3390/polym14204441>.
2. Nguyen, T. A., & Ngo, H. H. (2021). A review of heavy metal removal from wastewater by adsorption using graphene-based materials. *Journal of Cleaner Production*, 314.
3. Londoño Franco, Luis F., Londoño Muñoz PAULA T., (2017), Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal, *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, Vol. 14 Pág. 145-153



4. Sharma, G., & Kandasubramanian, B. (2020). Molecularly Imprinted Polymers for Selective Recognition and Extraction of Heavy Metal Ions and Toxic Dyes. *ACS*, 65, 396–418. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.9b00953>
5. Bivián-Castro, E. Y., & Zepeda-Navarro, A. (2023). Ion-Imprinted Polymer Structurally Preorganized Using a Phenanthroline-Divinylbenzoate Complex with the Cu(II) Ion as Template and Some Adsorption Results. *Polymers*, 15(1186). <https://doi.org/10.3390/polym15051186>
6. Kuras Marzena Joanna, Perz Karolina, 2017, Synthesis, characterization and application of a novel zinc(II) ion-imprinted polymer, *Polym. Bull.* Vol.74, Pag. 5029–5048
7. Marzena Joanna, Perez Karolina, 2017, Synthesis, characterization and application of a novel zinc(II) ion-imprinted polymer, Springer, *Polym Bull*, Vol.74, Pag. 5029-5048
8. Mohamed Mokhtara, Dickson Sarah E., 2018, Preparation and characterization of ion selective membrane and its application for Cu<sup>2+</sup> removal, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, Vol. 60 Pág. 475-484
9. Nurul Amira Abdollah, Azrilawani Ahmad, 2020, Synthesis and Characterization of Molecular Imprinted Polymer for the Determination of Carbonate Ion, *Research*, Vol.11, Pag. 10620-10627 DOI:10.33263/BRIAC113.1062010627
10. Özgecan Erdem, Yeşeren Saylan, 2018, Molecularly Imprinted Polymers for Removal of Metal Ions: An Alternative Treatment Method, *MDPI*, Vol. 3, Pag.2-17 DOI:10.3390/biomimetics3040038

## PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE CULTIVADA CON CR (III) EN MEDIO MÍNIMO YNB ORIENTADA A LA PRODUCCIÓN DE SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS

Luis Adrián Vargas Martínez, Luis Fernando Mejía Díaz, Natalia Fernanda Salazar Valdez, Michelle Romero Hernandez, Eunice Yáñez Barrientos, Katarzyna Wrobel, Kazimierz Wrobel y Alma Rosa Corrales Escobosa

Universidad de Guanajuato. División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Química.  
la.vargasmartinez@ugto.mx; alma\_rce@ugto.mx

### RESUMEN

Las deficiencias nutricionales de oligoelemento como Fe, Zn, Mo, Se y Cr están asociadas con diversos problemas de salud. Para cubrir estas deficiencias, se utilizan suplementos enriquecidos con oligoelementos. Diversos informes han demostrado que la suplementación con Cr (III) tiene efectos beneficiosos para la salud en humanos y animales, reduciendo los niveles de triglicéridos y mejorando notablemente la acción de la insulina, el control de la diabetes y síndrome metabólico. Sin embargo, también existen reportes de altas dosis o tratamientos prolongados causan efectos adversos para la salud. Por lo cual, la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) recomienda que dosis de Cr (III) en el rango de 25-35 µg/día. Los suplementos nutricionales más utilizados en el mundo y en México son los que contienen picolinato de cromo (III) y levaduras como *S. cerevisiae* enriquecidas in vivo. Una desventaja de los suplementos que contienen CrPic3 es su baja biodisponibilidad de (alrededor del 2 %), además que la reactividad de los iones libres en el entorno celular puede ser perjudicial porque el Cr (III) puede reemplazar al Fe (III). Por otra parte, las células de *S. cerevisiae* enriquecidas en oligoelementos generalmente se reconoce como seguras y ricas en proteínas y vitaminas, en particular, para el caso de cultivos con cromo, la biomasa puede contener el Cr (III) en formas orgánicas (como el factor tolerante a glucosa) con mayor biodisponibilidad que las formas inorgánicas, aunado a que el proceso de producción por fermentación es simple y rápido. Sin embargo, para la producción por fermentación, hay que considerar sales inorgánicas de Cr a adicionar y el medio de cultivo, ya que posiblemente impacte en el crecimiento y enriquecimiento de *S. cerevisiae*. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo se basó en la producción y caracterización de células de *S. cerevisiae* cultivada medio mínimo YNB enriquecidas con cuatro concentraciones (10, 25, 100 y 250 ppm) de CrCl<sub>3</sub> y su comparación con controles no expuesto. Una vez obtenidos los cultivos se evaluó el crecimiento por peso seco, la incorporación de Cr a biomasa por espectroscopia de emisión atómica de plasma de microondas (MP-AES) y aminoácidos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Los resultados mostraron que Cr (III) inhibe el crecimiento conforme se aumenta la concentración de Cr (III) en el medio (de 10- 40 % para las concentraciones de 10–250 ppm de Cr (III) en el medio, respectivamente). La concentración de Cr unido a biomasa fue de 110, 188, 379 y 882 µg de Cr/g de biomasa cuando el cultivo contenía inicialmente de 10, 25, 100 y 250 ppm de Cr (III), respectivamente. Con estos datos, se obtuvo el factor de bioacumulación, donde se observó niveles más altos a más bajas concentraciones (alrededor de 0.7, 0.4, 0.2 y 0.1 µg de Cr en biomasa/Cr de µg en medio para 10, 25, 100 y 250 ppm de Cr (III) inicial, respectivamente). Se observaron diferencias en el perfil de aminoácidos con respecto al control.

### INTRODUCCIÓN

Los *suplementos dietéticos* se definen como productos naturales, intencionalmente enriquecidos o sintéticos, que contienen vitaminas, minerales, aminoácidos, hierbas y/o extractos de ciertos organismos, mismos que se administran para incrementar la ingesta dietética total, complementarla o suplir alguno de sus componentes, y así reducir el riesgo de desarrollar enfermedades [1]. [1]. En E.U., el “Center for Food Safety and Applied Nutrition” (CFSAN), parte de la FDA, es la responsable de supervisar estos productos en Estados Unidos de Norte América; mientras tanto en México, la secretaria de Salud es la responsable a través de la COFEPRIS. Cabe señalar que los suplementos

dietéticos no necesitan contar con registro sanitario, pero el fabricante es responsable de someter un “aviso de funcionamiento” a estas instituciones, y deberá de cumplir con el contenido, etiquetado e inocuidad de su producto. Dentro de los suplementos dietéticos más usados, se encuentran los vitamínicos/ multiminerales (MVMs) que contienen algunas de las siguientes especies o combinación de ellas: vitaminas A, C, D, E y K, conjunto de vitaminas B; así mismo especies de Ca, Fe, Zn, Co, Se, Cr, etc. En el caso de suplementos que proveen elementos benéficos para a salud, su característica importante es que deben contener conocidas y adecuadas concentraciones de las formas biodisponibles, bioactivas y estables de los elementos de interés.

Existen diversos reportes de que la suplementación con Cr (III) tiene efectos benéficos en la salud humana, especialmente relacionados con mejoramiento de la función de insulina y decremento de los niveles de triglicéridos; con ello se logra una menor incidencia de síndrome metabólico, el apoyo en el control de diabetes y mejor control de masa y composición corporal [2-5]. Sin embargo, también se sabe de algunos casos aislados donde tratamientos prolongados o en dosis altas generan efectos adversos a la salud en los que se incluye estrés oxidativo, genotoxicidad y daño renal [6]. Cabe señalar que la EFSA (European Food Safety Authority) recomienda como adecuadas las dosis de Cr (III) en intervalo de 25 a 35  $\mu\text{g}/\text{día}$  [7].

Un tema de investigación actual es la búsqueda suplementos que contengan la forma de Cr (III) más adecuada para asegurar una buena biodisponibilidad y utilización en el control de metabolismo de carbohidratos y lípidos, evitando al mismo tiempo excesiva acumulación de Cr que provoca los efectos adversos [3, 7, 8]. Entre los suplementos más utilizados a nivel mundial y en México son los que contienen picolinato de Cr(III) ( $\text{CrPic}_3$ ) [9] y la levadura de pan *S. cerevisiae* enriquecida *in vivo* que se obtiene generalmente agregando al medio de cultivo el cloruro de cromo (III) [8]. A pesar de que la biodisponibilidad de Cr(III) en forma de compuestos inorgánicos como  $\text{CrPic}_3$  es baja (aprox. 2%), la reactividad de ion libre en el ambiente celular puede causar efectos adversos, ya que el Cr(III) puede sustituir Fe(III) en su unión en transferrina y también puede formar aductos con otras biomoléculas afectando su estructura y funcionalidad [10, 11]. Aunado a ello, no hay certeza en cuanto a los mecanismos responsables por la absorción y transformación de Cr (III) en el organismo humano.

El estudio integral de un microorganismo utilizado para producir suplemento de Cr (III) debe tener dos vertientes. En primer lugar, es necesario realizar la caracterización y cuantificación de las especies formadas durante metabolización de Cr (III). En la segunda vertiente, es conocer el impacto que tiene la incorporación de Cr (III) sobre el estatus del microorganismo y, específicamente sobre sus rutas metabólicas y su perfil metabólico. Es bien conocido que, en las levaduras el metabolismo de los aminoácidos y sus mecanismos reguladores varían con el entorno de crecimiento, regulando los procesos anabólicos y catabólicos, incluida la absorción y exportación, y los estilos metabólicos forman una red compleja pero robusta. La homeostasis de los aminoácidos es esencial para el crecimiento y la supervivencia celular. En este sentido, este proyecto se plantea obtener cultivos de la levadura de pan *S. cerevisiae* enriquecida con Cr (III) en medio YNB y evaluar su perfil metabólico, enfocándose en los aminoácidos.

## OBJETIVO

Producir y caracterizar a la levadura de pan *S. cerevisiae* cultivada medio mínimo YNB enriquecidas con cuatro concentraciones (10, 25, 100 y 250 ppm) de  $\text{CrCl}_3$  y su comparación con controles no expuesto.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Producción de levadura enriquecida con Cr (III)

La cepa de una levadura panadera de *S. cerevisiae* fue estriada en una placa de Petri con medio PDA (agar papa dextrosa). Con un asa esterilizada se tomó una colonia de cepa fresca de *S. cerevisiae* y se realizó un preinoculo de 16 horas en medio mínimo YNB con glucosa al 4 %. Transcurrido el tiempo, las células fueron lavadas dos veces con agua mili Q estéril y se procedió a inocular  $1 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$  ( $\text{D.O}_{600 \text{ nm}}$  de 0.1 abs) en matraces de 125 mL con 25 mL de medio YNB con glucosa al 4 % y 0, 10, 25, 100 y 250  $\text{mg L}^{-1}$  de Cr (III) en forma de la sal de  $\text{CrCl}_3$ . [12]. Previo a la exposición a Cr (III), las células estarán en contacto con una solución de Cr (III) para facilitar la biosorción. Los matraces fueron incubados en 28 °C y 150 rpm por 24 y 48 h. Al finalizar el tiempo

se recuperó el medio gastado y la biomasa fue lavada tres veces con agua miliQ estéril para eliminar el exceso de Cr. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

**Determinación de cromo incorporado a biomasa por MP-AES**

Para la cuantificación de cromo total en biomasa se llevó a cabo la digestión acida. Para ello, se pesó 20 mg de biomasa y se le adicióno 0.5 mL de HNO<sub>3</sub> y se incubo inicialmente a 70 °C por 0.5 h y posteriormente se subió a 120 °C de 1 a 2 h. A continuación, a cada tubo se le adiciónó 0.5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se incubo 120 °C de 1-2 h. Una vez obtenidos las muestras mineralizadas, estas se diluyeron y fueron analizadas mediante la técnica analítica MP-AES (Espectrometría de emisión atómica con plasma de microondas, por sus singlas en inglés). La cuantificación se llevó a cabo mediante el método calibración externa en un rango de 0 a 2 mg·L<sup>-1</sup> seleccionando las λ= 425.433 nm y 427.480 nm para Cr [13].

**Determinación de Aminoácidos por GC-MS-SIM**

*Obtención de aminoácidos libres* [14]:.

Para la obtención de aminoácidos libres 10 mg de biomasa y 20 µL del estándar interno (norvalina 0.2 mM) fue colocado en vial con 1 mL de HClO<sub>4</sub> al 0.1 % y hervida 5 min en un baño húmedo. Posteriormente, la muestra fue transferida a un vial de 2 mL con perlas de zirconio de 0.1 mm aplicando 3 ciclos de 3000 rpm por 30 segundos y enfriando en hielo entre cada ciclo. Una vez realizado rompimiento, las muestras fueron centrifugadas a 15,000 x g por 10 min y sobrenadante fue trasferido a un tubo Eppendorf y secado en el SpeedVac. La muestra fue re suspendida en 200 µL de NaOH al 1 % y llevar a cabo la reacción de derivatización para aminoácidos como a continuación se describe.

*Derivatización de aminoácidos con metil cloroformiato (MCF) y metanol.*

Para la preparación de curva de calibración, se tomó una solución de estándares de aminoácidos AAS18 (Supelco) y se llevó a cabo diluciones para ajustar la curva de calibración en un rango de concentración en el rango de 2.5-200 µM y el estándar interno de norvalina. A cada una de solución estándar de AA (100 µL) y se le añadió 100 µL en NaOH 1 % e inmediatamente se realizó la reacción de derivatización con metilcloroformiato [15]. Para ello, a los 200 uL de muestra o estándares de calibración se le adiciónó 200 µL de MeOH : Pyr (4:1), 25 µL de metil cloroformiato (2X) 400 µL de Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>, 400 µL de CHCl<sub>3</sub> (aplicando agitación con vortex en después de cada paso). Inmediatamente se centrifugo a 10 000 x g por 5min y se pasó la fase orgánica a un tubo nuevo. La fase orgánica fue transferida a un vial con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para eliminar el agua. Finalmente, las muestras fueron analizadas en un cromatógrafo de gases utilizando los siguientes parámetros instrumentales.

Tabla 1. Parámetros instrumentales establecidos para la determinación de aminoácidos

Condiciones		Bruker SCION TQ MS		
Inyector		1 µL, split les		
Temp. de inyector		280 °C		
Flujo de gas acarreador		1 mL min <sup>-1</sup> He		
Columna		BP5-MS; longitud de 30m, 0.25 mm ID;		
	Temperatura	°C/min	Permanencia	Total
Programa de temperatura del horno	80	0.0	1.00	1.00
	300	15.0	2.00	17.670
Temp. de fuente de ionización		250 °C		
Temp. de línea de transferencia		280 °C		
Modo de adquisición		Full scan, SIM		
Rango de detección (Full scan: m/z)		50-400		

**RESULTADOS**

**Crecimiento por *S. cerevisiae* en medio YNB y Cr (III)**

Inicialmente se evaluó el efecto de las diferentes concentraciones de Cr (III) sobre la producción de biomasa en la levadura *S. cerevisiae* a las 24 y 48 h de cultivo. Como se muestra en la Fig. 1, existe una disminución en la producción de biomasa después de 48 h de cultivo independientemente de la concentración de Cr (III). Adicionalmente, se puede observar un efecto inhibitorio en el crecimiento conforme aumenta la concentración de Cr (III) en el medio. A las 24 horas de cultivo, hay una disminución en el crecimiento con respecto al control sin exposición, de 10, 15, 23 y 40 % cuando el medio contiene 10, 25, 100 y 250 mg L<sup>-1</sup> de Cr (III), respectivamente. Mientras que, a las 48 h la disminución de crecimiento respecto al control correspondió en una disminución del 11, 16, 19 y 50 % en presencia de 10, 25, 100 y 250 mg L<sup>-1</sup> de Cr (III), respectivamente.

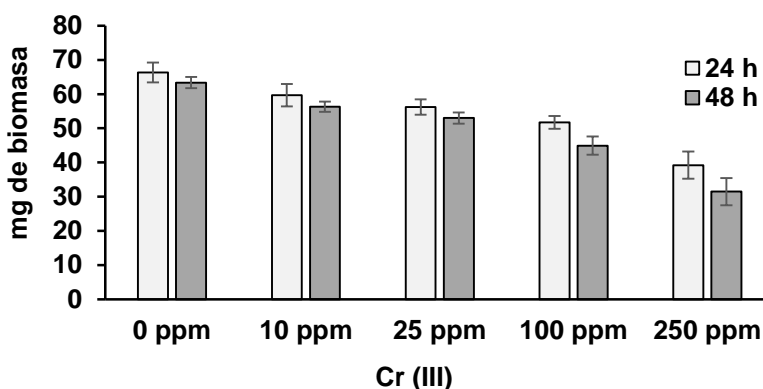


Fig. 1. Biomasa de *S. cerevisiae* cultivada en medio mínimo YNB con diferentes concentraciones de Cr (III) después de 24 y 48 h.

**Incorporación de Cr a biomasa de *S. cerevisiae* cultivada en medio YNB y diferentes concentraciones de Cr (III).**

Se evaluó la cantidad de cromo incorporado a la biomasa en los cultivos expuestos a las diferentes concentraciones de Cr (III) después de 24 y 48 h de cultivo. Los resultados obtenidos se presentan en la Fig. 2. Como es de esperarse, hay un aumento en la concentración de Cr en la biomasa, conforme aumenta la concentración de Cr (III) en el medio de cultivo y este aumento se ve favorecido con el tiempo de exposición. La cepa de *S. cerevisiae* es capaz de incorporar hasta 836 y 951 µg de Cr / g de biomasa después de 24 y 48 h de cultivo cuando el medio es ambientado con 250 mg L<sup>-1</sup> de Cr (III).

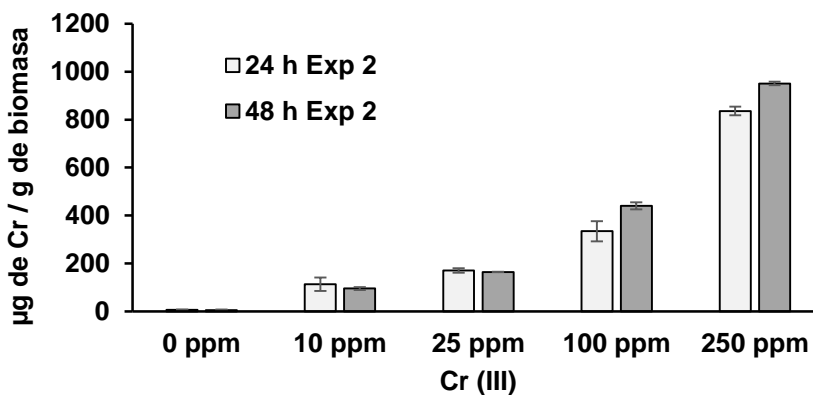


Fig. 2. Determinación por MP-AES de Cr (III) en biomasa de *S. cerevisiae* después de 24 h y 48 h de cultivo en medio YNB

Así mismo con estos datos, se obtuvo el factor de bioacumulación de Cr (III) en la biomasa de *S. cerevisiae* que indica la cantidad de Cr en biomasa con respecto al Cr total del medio. Este valor se generó al dividir la masa de Cr total incorporado a la biomasa sobre el Cr total en el medio de cultivo. Como se observa en la Fig. 3, este factor disminuye conforme aumenta la concentración de Cr (III) en el medio de cultivo (de 0.7, 0.4, 0.2 y 0.1 µg de Cr en biomasa/Cr de µg en medio para 10, 25, 100 y 250 mg L<sup>-1</sup> de Cr (III) inicial, respectivamente).

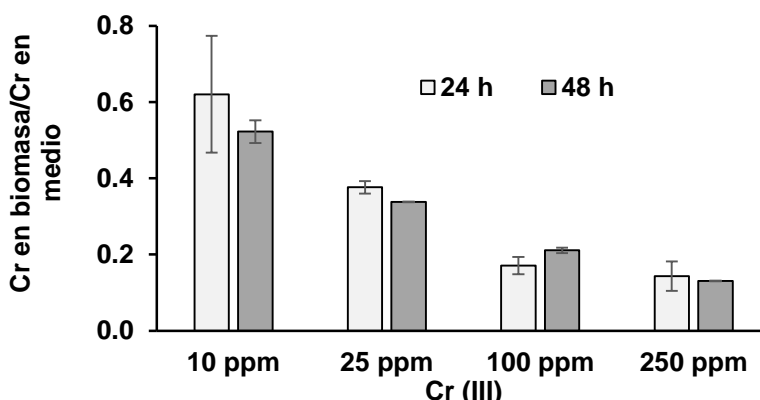


Fig. 3. Factor de bioacumulación de Cr (III) en biomasa de *S. cerevisiae*.

Determinación de aminoácidos derivatizados con MCF/MeOH analizados por GC/MS-SIM. Para la determinación de aminoácidos por GC-MS se siguió la metodología previamente descrita con algunas modificaciones [14][15]. Inicialmente se comenzó ajustando las condiciones de separación en el método cromatográfico en el modo de adquisición Full scan con una concentración inicial de 0.5 mM de la mezcla de estándares derivatizados con MCF y metanol y extracción con cloroformo. La fase orgánica que contenía a los aminoácidos derivatizados como se describió en la parte experimental, se inyectó al GC-MS para estandarizar las condiciones de separación y adaptación del método SIM (Monitoreo de ion selectivo) para cada uno de los analitos. En la figura 4 se presentan un ejemplo de los cromatogramas sobrepuestos correspondientes a la mezcla de estándares de aminoácidos derivatizados a concentración de 10, 50 y 100 µM obtenidos en el modo de adquisición SIM.

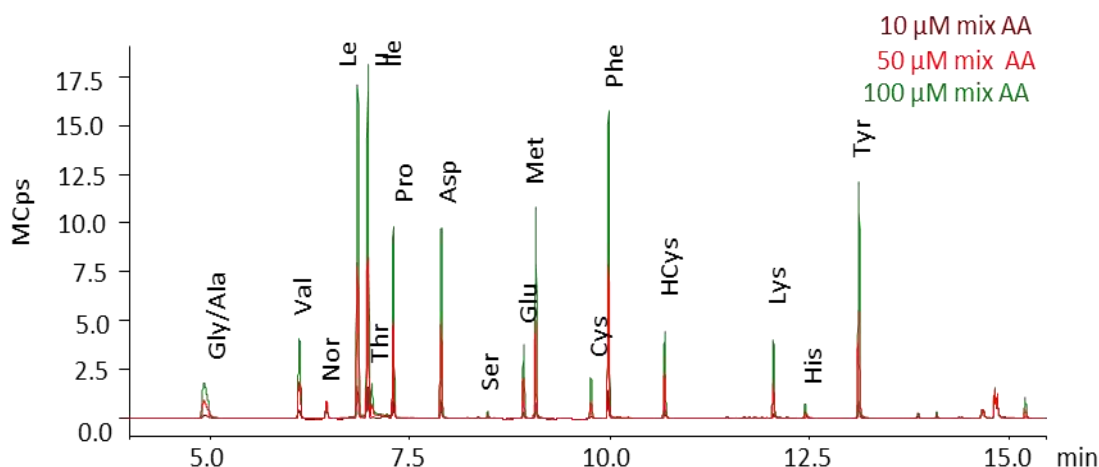


Fig. 4. Ejemplo de cromatograma obtenidos por GC-MS-SIM para mezcla de estándares de aminoácidos derivatizados con MCF/MeOH (10, 50 y 100 µM).



Los resultados de la cuantificación de aminoácidos libres obtenidos de la biomasa que fue cultivada en diferentes concentraciones de Cr (III) y/o el control sin Cr se presenta en las figuras 5 y 6. En estas gráficas se muestra que existe una disminución conforme aumenta la concentración de Cr (III) en el medio para Ala y Cys. Un aumento en los niveles para Glu, Leu, Pro, Tyr y Thr cuando existe 10 y 25 mgL<sup>-1</sup> de Cr (III). Mientras que los niveles de Asp, Lys, Val, Ser, His, y Phe permanecen prácticamente sin cambios en las distintas condiciones de cultivo. Cabe señalar que debido a la disminución en el crecimiento y bajo factor de acumulación, no se analizó la biomasa de los cultivos de 250 mg L<sup>-1</sup> de Cr (III).

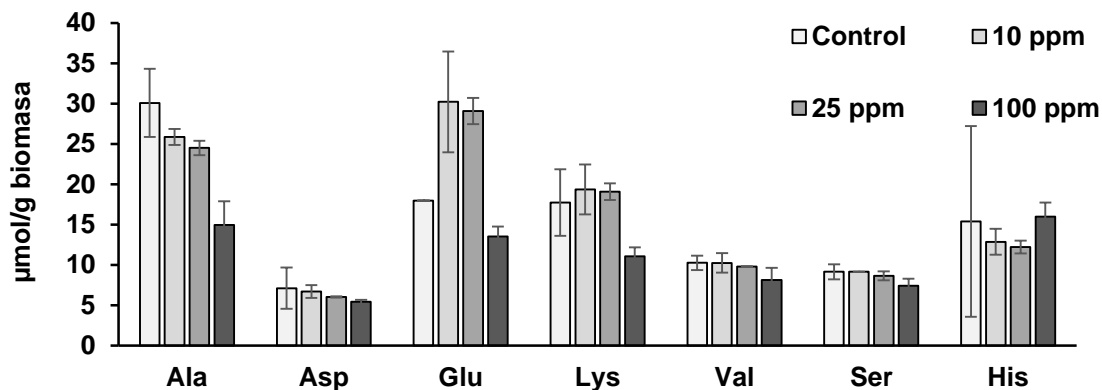


Fig. 5. Cuantificación de aminoácidos libres en biomasa determinados por GC-MS-SIM para Ala, Asp, Glu, Lys, Val, Ser, His.

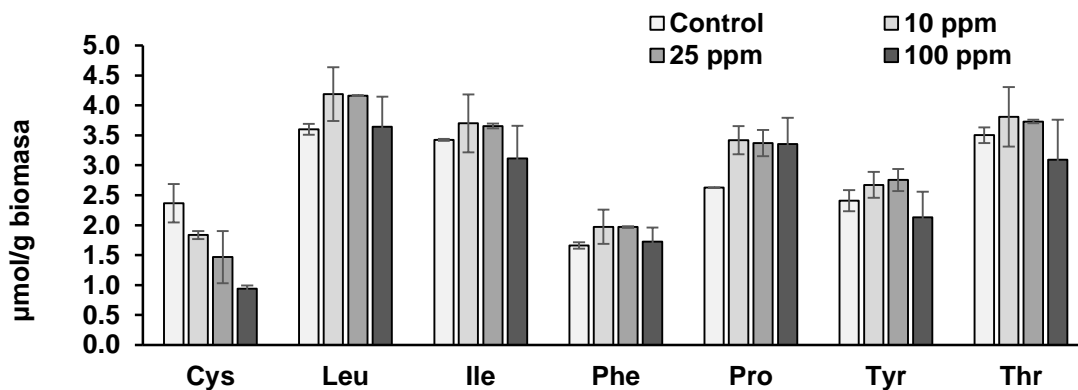


Fig. 6. Cuantificación de aminoácidos libres en biomasa determinados por GC-MS-SIM para Cys, Leu, Ile, Phe, Pro, Tyr, Thr.

### CONCLUSIONES

Los resultados mostraron que Cr (III) inhibe el crecimiento conforme se aumenta la concentración de Cr (III) en el medio (de 10- 40 % para las concentraciones de 10–250 mg L<sup>-1</sup> de Cr (III) en el medio a las 24 h, respectivamente). Adicionalmente, en este tiempo de cultivo (24 h), la concentración de Cr unido a biomasa fue de 113, 170, 335 y 836 μg de Cr/g de biomasa cuando el cultivo contenía inicialmente de 10, 25, 100 y 250 mg L<sup>-1</sup> de Cr (III), respectivamente. Con estos datos y junto con el cromo del medio de cultivo, se obtuvo el factor de bioacumulación, donde se observó niveles más

altos cuando las concentraciones de cromo eran menores al inicio del cultivo (de 0.7, 0.4, 0.2 y 0.1  $\mu\text{g}$  de Cr en biomasa/Cr de  $\mu\text{g}$  en medio para 10, 25, 100 y 250  $\text{mg L}^{-1}$  de Cr (III) inicial, respectivamente). Se observaron diferencias en el perfil de aminoácidos libres con respecto al control. Aumentando los niveles de Glu, Leu, Pro, Tyr y Thr cuando existe 10 y 25  $\text{mg L}^{-1}$  de Cr (III).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Health, N.I.o. *Dietary Supplements: What you Need to Know*. 2020; Available from: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/WYNTK-Consumer/>.
2. Clodfelder, B.J., et al., *The trail of chromium(III) in vivo from the blood to the urine: the roles of transferrin and chromodulin*. J Biol Inorg Chem, 2001. 6(5-6): p. 608-17.
3. Maret, W., *Chromium supplementation in human health, metabolic syndrome, and diabetes*, in *Essential Metals in Medicine: Therapeutic Use and Toxicity of Metal Ions in the Clinic*, P.L. Carver, Editor. 2019, De Gruyter: Zürich, Switzerland. p. 231-252.
4. Achmad, R.T. and E.I. Auerkari, *Effects of chromium on human body*. Ann Res Rev Biol, 2017. 13(2): p. 1-8.
5. Hua, Y., et al., *Molecular mechanisms of chromium in alleviating insulin resistance*. J Nutr Biochem, 2012. 23(4): p. 313-319.
6. Wasser, W.G., N.S. Feldman, and V.D. D'Agati, *Chronic renal failure after ingestion of over-the-counter chromium picolinate*. Annals of Internal Medicine, 1997. 126(5): p. 410.
7. Broadhurst, C.L. and P. Domenico, *Clinical studies on chromium picolinate supplementation in diabetes mellitus—a review*. Diabetes technology & therapeutics, 2006. 8(6): p. 677-687.
8. Balk, E.M., et al., *Effect of chromium supplementation on glucose metabolism and lipids: a systematic review of randomized controlled trials*. Diabetes care, 2007. 30(8): p. 2154-2163.
9. Negrete, M.A.A., et al., *Determination of chromium (III) picolinate in dietary supplements by flow injection-electrospray ionization-tandem mass spectrometry, using cobalt (II) picolinate as internal standard*. Talanta, 2022. 240: p. 123161.
10. Edwards, K.C., H. Kim, and J.B. Vincent, *Release of trivalent chromium from serum transferrin is sufficiently rapid to be physiologically relevant*. Journal of inorganic biochemistry, 2020. 202: p. 110901.
11. Vincent, J.B. and S. Love, *The binding and transport of alternative metals by transferrin*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2012. 1820(3): p. 362-378.
12. Demirci, A. and A.L. Pometto, *Enhanced organically bound chromium yeast production*. Journal of agricultural and food chemistry, 2000. 48(2): p. 531-536.
13. Gonzalez Ibarra, A.A., et al., *Effect of copper and molybdenum in nutrient solution on Cu, Mo, Fe, Mg, Ca, Zn, Na, K status in sunflower*. Journal of Plant Nutrition, 2022: p. 1-17.
14. Lafaye, A., et al., *Combined proteome and metabolite-profiling analyses reveal surprising insights into yeast sulfur metabolism*. Journal of Biological Chemistry, 2005. 280(26): p. 24723-24730.
15. Chen, W.-P., et al., *Microscale analysis of amino acids using gas chromatography–mass spectrometry after methyl chloroformate derivatization*. Journal of Chromatography B, 2010. 878(24): p. 2199-2208.

## EFFECTO DE LA TEMPERATURA AMBIENTAL, HUMEDAD, Y RESPUESTA CONDUCTUAL TERMORREGULADORA SOBRE EL DESCANSO DEL MONO AULLADOR (*ALOUATTA PALLIATA*)

<sup>1</sup>Rael Martín Palestino-Sánchez, N. <sup>2</sup>Sofía Huerta-Pacheco, <sup>3</sup>Francisco García-Orduña, <sup>4</sup>Diana Arleth Colio-Martínez, <sup>3</sup>María de Jesús Rovirosa-Hernández

<sup>1</sup>Doctorado en Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, 91000, México

<sup>2</sup>Escuela Nacional de Ciencias Forenses, Universidad Autónoma de México, CDMX, 04510, México

<sup>3</sup>Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, 91000, México

<sup>4</sup>Facultad de Biología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, 91090, México

\*raelpalestino20@gmail.com

### RESUMEN

Cada día los cambios en el ambiente son más evidentes, como el efecto del cambio climático, esto se refleja en el comportamiento animal, haciendo que los animales deban responder por medio de estrategias conductuales para termorregular, para mantener un equilibrio térmico con el ambiente. Los primates no humanos pueden responder a través del uso de posturas para termorregular y seleccionar tercios arbóreos durante el descanso, lo que les permite amortiguar el efecto del clima, sin embargo, esto puede afectar el tiempo que invierten a su conducta diaria. El objetivo de este estudio fue explorar el efecto que tiene el utilizar estrategias conductuales para termorregular de acuerdo con los cambios en la temperatura ambiental y humedad, sobre el tiempo que descansa el mono aullador de manto (*Alouatta palliata*) en la isla de Agaltepec, Catemaco, Veracruz, México. Mediante un muestreo focal-animal, durante 6 días al mes desde octubre de 2018 hasta agosto de 2019, se observó el comportamiento diario de los aulladores, además del uso de posturas y tercios arbóreos que utilizaban cuando descansaban. Se observó que existe una influencia en los tiempos de descanso con la postura corporal que utilizan los monos ( $X^2 = 195.3$ ,  $df = 5$ ,  $p < 2.2e-16$ ) y del tercio arbóreo ( $X^2 = 23.65$ ,  $df = 2$ ,  $p = 7.301e-06$ ). Cuando incrementa la temperatura ambiental y disminuye la humedad, los monos utilizan la postura de extendido, principalmente en tercio arbóreos bajos y medios, aumentando el tiempo que descansan, a diferencia de cuando la temperatura ambiente desciende y la humedad relativa aumenta, utilizan principalmente la postura semi-fetal en los tercios arbóreos altos, aunque el tiempo que descansan no varió considerablemente en comparación de cuando utilizan la postura extendida. Se observó que los monos aulladores reconocen los cambios ambientales y responden implementando estrategias conductuales para termorregular, lo que les permite ajustarse a los cambios ambientales, pero estas estrategias afectan el tiempo que descansan, lo que se interpretaría como un menor o mayor tiempo disponible para invertir a otras conductas como la alimentación o locomoción. Se concluye que las condiciones cálidas pueden representar un problema mayor en el tiempo que dedican a cada comportamiento diario, y posiblemente sobre la demanda energética que requieren para mantener un equilibrio térmico con el ambiente, lo que hace que descansan más tiempo y afecte su comportamiento diario. Agradecemos a la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (RMPS-931440) y al proyecto (MJRH-174332019100).

### INTRODUCCIÓN

El clima es variable por naturaleza, por lo que resulta difícil distinguir el cambio climático de la variabilidad del clima natural (Díaz-Cordero, 2012), en términos simples, el clima es el conjunto de valores atmosféricos promedio (temperatura, precipitación, presión, humedad, viento, o radiación solar), los cuales determinan una zona o regiones climáticas de manera natural a través del tiempo, sin embargo, al referirnos al cambio climático, es la modificación del clima por causa de actividades humanas como la deforestación, cambio de uso del suelo, ganadería, agricultura, entre otras (Díaz-Cordero, 2012; IPCC, 2022). Las cuales favorecen la emisión de gases de efecto invernadero, lo que incrementa la concentración de gases en la atmósfera que absorben calor, propiciando que la temperatura ambiental aumente (IPCC, 2022).

En los últimos años ha sido de gran interés investigar los efectos del clima sobre la fisiología y comportamiento animal, para realizar mejores estrategias de conservación de la fauna silvestre

(Cantarelli et al., 2017). En general, los mamíferos tienen la capacidad de regular su temperatura corporal respecto a la del ambiente (Shelton y Alberts, 2018), a este proceso se le conoce como termorregulación, que consiste en la respuesta fisiológica y/o conductual que tienen los mamíferos para mantener estable su temperatura corporal (Rhoades y Bell, 2012; Picón-Jaimes et al., 2020). Aunque el mantener un equilibrio térmico con el ambiente en ocasiones puede llegar a ser demandante (Mitchell et al., 2018; Fuller et al., 2021), lo que puede provocar que los animales busquen estrategias para regular el consumo de energía y agua que se requiere al termorregular (Chaves et al., 2019; 2021; Fuller et al., 2021), haciendo que los animales utilicen estrategias conductuales para termorregular, que, de cierto modo, ayuden ahorrar recursos importantes dentro de la termorregulación (Fuller et al., 2021).

### TEORIA

Cada hábitat puede presentar características climáticas propias originado por diversas peculiaridades naturales, como el tipo de vegetación o la geografía, a esta condición climática propia de un área, se le conoce como microclima (Greiser et al., 2018). Los diferentes microclimas presentes dentro de un espacio influyen en los procesos biológicos y ecológicos, lo cual conlleva a tener un efecto en la vida de los organismos (Chen et al. 1999). Sin embargo, los microclimas están asociados al cambio climático, entonces, lo que experimentan los animales es el microclima del hábitat donde viven, pero a su vez también interactúan con el efecto del cambio climático (Chaves et al., 2019; Zellweger et al., 2019; Fuller et al., 2021).

Todo organismo debe estar en un equilibrio térmico para poder sobrevivir y llevar a cabo sus actividades (Porter y Gates, 1969). Se ha descrito que todo animal está adaptado a una zona termoneutral (Mitchell et al., 2018), que es el rango de temperatura ambiental en la que puede termorregular sin hacer un mayor costo de energía y agua al hacerlo (Mitchell et al., 2018; Fuller et al., 2021). Sin embargo, el aumento o decremento de la temperatura más allá del rango habitual, hace que los animales estén más expuestos a condiciones extremas, haciendo que salgan frecuentemente de su zona de confort, y experimenten zonas térmicas que demanden un mayor consumo de recursos para mantener un equilibrio térmico con el ambiente (Fuller et al., 2021).

Una de las formas de amortiguar los efectos del clima sobre la termorregulación que tiene cada animal, y evitar salir de su zona termoneutral, es por medio de las estrategias conductuales para termorregular (Fuller et al., 2021), estas estrategias pueden ser como consumir agua libre del ambiente (Fuller et al., 2016; 2021), consumir partes vegetales que posiblemente estén aportando algún nutriente que ayude a tener los recursos para equilibrar la temperatura corporal (Righini et al., 2015; Chaves et al., 2021), buscar sombra en horarios cuando la temperatura es más alta (Hill, 2006; Kosheleff y Anderson, 2009), retrasar el inicio de la búsqueda de alimento conforme sale el sol (Hilario et al., 2021), o utilizar posturas corporales y sitios específicos al descansar (Kosheleff y Anderson, 2009; Thompson et al., 2016).

En el caso de los primates no humanos, se ha relacionado el uso de diferentes posturas corporales durante el descanso, como una estrategia termorreguladora (Paterson, 1981; Bicca-Marques y Calegare-Marques 1988; Da Silva, 1993; Azevedo y Bicca-Marques 2003; Gestich et al. 2014; Lopes y Bicca-Marques, 2017; Palestino-Sánchez et al., 2020), lo que les permite de cierto modo, favorecer la regulación de su temperatura corporal (Bicca-Marques y Calegare-Marques 1988; Palestino-Sánchez et al., 2020), así mismo, también pueden seleccionar sitios específicos para descansar, esto para resguardarse o exponerse a las condiciones ambientales (Hill et al., 2004; Eppley et al., 2017). Aprovechando las condiciones del hábitat al realizar sus conductas diarias, evitando hacer gastos excesivos de energía al termorregular (Hill, 2006; Kosheleff y Anderson, 2009)

A pesar de que los primates no humanos presentan diferentes estrategias conductuales para hacer frente a las variaciones ambientales, estas pueden modificar la frecuencia y duración de las conductas que realizan dentro de su patrón diario de actividades (Hill et al. 2004; Eppley et al., 2017; Ceccarelli et al. 2019), Por ejemplo, en los monos aulladores (*Alouatta* spp.), se ha descrito que pueden descansar más tiempo conforme incrementa la temperatura ambiental (Serio-Silva, 1995), reducir la velocidad y frecuencia en que se desplazan (Ceccarelli et al. 2019), modificar su comportamiento, invirtiendo tiempo a conductas que no se presentan con normalidad, como consumir agua de fuentes alternativas (Dias et al. 2014; Chaves et al., 2021), o desplazarse y utilizar estratos arbóreos más bajos conforme incrementa la sensación de calor (Aristizábal et al. 2018).

La especie *Alouatta palliata* se considera como una especie con una amplia flexibilidad ecológica, ya que puede sobrevivir en diferentes ecosistemas porque puede modificar el tiempo que invierte a

cada conducta dentro de su patrón diario de actividades, de acuerdo con la disponibilidad de recursos y la calidad del hábitat (McKinney, 2019), a pesar de ello, esta especie presenta sensibilidad ante los cambios de la temperatura ambiente, lo cual modifica su temperatura corporal (Thompson et al. 2014), haciendo que utilice estrategias como las posturas corporales o el uso de estratos arbóreos para favorecer la termorregulación (Paterson, 1981; Palestino-Sánchez et al., 2020), Considerando lo anterior, el uso de estrategias conductuales para termorregular son importantes para mantener un equilibrio térmico con el ambiente (Fuller et al., 2021), y estas posturas se usan de forma específica ante condiciones cálidas o frías (Palestino-Sánchez et al., 2020), pero termorregular podría representar un costo, ya que el aumento de la temperatura ambiental puede demandar una mayor inactividad para evitar el gasto excesivo de energía y agua, o que aumente la temperatura corporal, por ello, el objetivo es explorar el efecto que tiene el utilizar estrategias conductuales para termorregular de acuerdo con los cambios en la temperatura ambiental y humedad, sobre el tiempo que descansa el mono aullador de manto (*Alouatta palliata*), prediciendo que, cuando se utilizan estrategias que favorecen la disipación de calor corporal, los monos aulladores descansarán más tiempo, en comparación cuando utilizan estrategias conservadoras de calor.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Ética

En el presente estudio se utilizaron métodos no invasivos siguiendo los protocolos de la Sociedad Internacional de Primatología, y cumpliendo los requisitos legales de la ley mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010.

### Área y sujetos de estudio

El trabajo se realizó en la isla de Agaltepec la cual se localiza al sur del estado de Veracruz (18°24' y 18°25' N y 95°05' y 95°06' W), dentro del lago de Catemaco, México, tiene una superficie de 8.3 ha. El clima presente en la zona está representado por dos estaciones muy marcadas a lo largo del año: una temporada húmeda que abarca los meses de junio-enero y otra seca que abarca los meses de febrero-mayo (Gutiérrez-García y Ricker, 2011). De acuerdo con los registros disponibles (periodo 2016-2018, estación climática de La Flor de Catemaco, S. de R.L. de C.V.), se presenta una temperatura promedio anual de 25.2°C, con un rango de temperatura mínima promedio anual de 17.1°C y una temperatura máxima promedio anual de 33.3°C

En la isla de Agaltepec habita una población de monos aulladores (*A. palliata*), la cual se encuentra dividida en dos grupos, conformados por aproximadamente 23 y 19 individuos respectivamente. Para este estudio sólo se consideró a los individuos juveniles, sub-adultos y adultos (n=16); los cuales están catalogados e identificados de acuerdo con Balcells y Veà (2009) de la siguiente manera: individuos juveniles (entre 25 y 28 meses de edad), los cuales son similares a una hembra sub-adulta con un tamaño corporal más pequeño; con hábitos alimenticios independientes, es decir, que seleccionan su propio alimento; sub-adultos (hembras y machos que van de entre 28 y 32 meses de edad), los cuales ya presentan principios de un dimorfismo sexual, en las hembras la vulva es claramente visible, y en los machos se presenta el desarrollo de la barba alrededor del rostro y el escroto comienza a descender y tomar un color blanco. Adultos (hembras que van de los 36-40 meses de edad en adelante y machos de 48 meses de edad en adelante), presentan un dimorfismo morfológico y sexual definido.

### Registro conductual

Durante ocho meses en un periodo entre octubre 2018 a agosto 2019, se registró el comportamiento durante seis días por mes, tres días continuos por cada semana, con un horario de 07:00 a 15:00 h. Los registros conductuales se obtuvieron por medio de un muestro focal-animal (Martin y Bateson, 1991), observando a los individuos durante una hora continua, variando entre hembras y machos, es decir, si el registro se comenzó con una hembra el siguiente registro fue con un macho, y así sucesivamente. Se registró el tiempo que descansaban los sujetos de estudio, así como, la postura utilizada durante el descanso, y el tiempo que invierten a cada una, y el estrato arbóreo donde se encontraban reposando.

Las posturas corporales se reportaron de la siguiente manera: semi-fetal, sentado, acostado, echado, tendido, y extendido; y los estratos arbóreos como: bajo, medio, y alto. Donde las posturas de tendido, extendido, y el uso del estrato arbóreo bajo se consideraron como estrategias disipadoras



de calor; y las posturas de semi-fetal, acostado, y el uso del tercio alto, se consideró como estrategia conservadora de calor.

#### Registro de datos climáticos

Los datos de temperatura ambiental ( $^{\circ}\text{C} \pm 0.5$   $^{\circ}\text{C}$ ) y humedad ( $\% \pm 3\%$ ), se obtuvieron de una estación climática portátil, que es un hidrómetro de bolsillo (Kestrel® 3000, Global Test Supply, Wilmington, NC), los datos fueron registrados lo más cercano posible a donde se encontraban los sujetos de estudio (<10m), y recolectados cada que se realizaba un registro conductual.

#### Análisis estadístico

Inicialmente, después del ordenamiento de nuestros datos se realizó la prueba de normalidad a nuestra variable dependiente (tiempo registrado a la conducta de descanso), por medio de la prueba de Shapiro-Wilk para determinar el análisis estadístico pertinente. Posteriormente, utilizamos tablas de frecuencia y la prueba Chi-cuadrada para analizar la dependencia del estrato del árbol según la postura corporal, si el valor de  $p$  es menor a 0.05 las variables (estrato del árbol y postura corporal) no son independientes entre sí, y existe una relación estadística entre el estrato arbóreo y la postura corporal de los monos durante el descanso.

Además, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar si el tiempo de descanso era diferente o similar entre las posturas corporales y el estrato arbóreo, esto para determinar si existe o no diferencia en el tiempo que descansan al utilizar estrategias conservadoras o disipadoras de calor. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa R versión 4. 2. 0. (2022-04-22), utilizando los paquetes de “readxl” (Wickham and Bryan, 2019); “ggplots” (Warnes et al., 2020); “ggplot2” (Wickham, 2016), y “car” (Fox and Weisberg, 2019).

#### RESULTADOS

Se obtuvieron un total de 384 horas de trabajo de campo, con un total de 1231 registros conductuales, de los cuales, en este estudio sólo se analizaron los registros asociados a la conducta de descanso ( $n= 629$  registros). Se registró una temperatura ambiental promedio de  $27.41 \pm 4.54$  ( $\text{Me} \pm \text{DS}$ ); y una humedad promedio de  $81.53 \pm 5.35$  ( $\text{Me} \pm \text{DS}$ ). Se observó cada postura corporal y su relación con los rangos de temperatura ambiental y humedad en que se presentaron cada una (Tabla 1). Así como el uso del estrato arbóreo, y los rangos de temperatura ambiental y humedad utilizados durante el descanso (Tabla 2).

Tabla 1. Rango de valores ambientales en que se registró el uso de cada una de las posturas corporales utilizadas por *A. palliata* durante el descanso

Postura	Frecuencia	Temperatura ambiente ( $^{\circ}\text{C}$ )			Humedad relativa (%)		
		Mínima	Máxima	Promedio	Mínima	Máxima	Promedio
Semi-fetal	50	17.4	28.5	21.2	72.3	96.1	84.7
Sentado	297	17.6	37.4	26.4	64.1	96.8	81.9
Acostado	114	18.4	33.2	27.5	66.3	94.1	81.4
Echado	91	22.1	36.7	29.5	69.7	89.5	80.9
Tendido	51	27.1	38.5	31.1	66.7	89.8	78.9
Extendido	26	29.1	40.2	35.9	69.9	80.1	75.9

Tabla 2. Rango de los valores ambientales en que se registró el uso del estrato arbóreo por *A. palliata* durante el descanso

Estrato	Frecuencia	Temperatura ambiente ( $^{\circ}\text{C}$ )			Humedad relativa (%)		
		Mínima	Máxima	Promedio	Mínima	Máxima	Promedio
Bajo	61	26.50	40.20	32.88	66.30	87.00	78.79
Medio	235	18.40	37.40	29.37	66.70	94.00	80.61
Alto	334	17.40	36.70	25.02	64.00	96.80	82.69

Al analizar el tiempo que descansan por medio de la prueba de normalidad, se observó que nuestros datos no se asocian a una distribución normal ( $W=0.7045$ ;  $p \leq 0.001$ ), por lo tanto, se utilizaron análisis estadísticos no paramétricos. Posteriormente, al analizar por medio de la prueba de Chi-cuadrada si, durante el descanso la postura corporal que utilizan está asociada o no con el estrato arbóreo, se encontró que las dos variables están relacionadas entre sí ( $X^2 = 184.17$ ,  $df = 10$ ,  $p < 0.001$ ). Asimismo, se observó que, cuando la temperatura ambiental decremente los monos aulladores al descansar utilizan la postura de semi-fetal en estratos arbóreos altos; en caso contrario, cuando la



temperatura ambiental incrementa, se registró el uso de las posturas de tendido y extendido, en los estratos arbóreos medios y bajos principalmente.

Al analizar el tiempo que invirtieron a cada postura corporal (Figura 1) y estrato arbóreo (Figura 2), la prueba de Kruskal-Wallis mostró que existe influencia en los tiempos que descansan los monos aulladores de acuerdo con la postura corporal ( $X^2 = 195.3$ ,  $df = 5$ ,  $p < 2.2e-16$ ) y el estrato arbóreo ( $X^2 = 23.65$ ,  $df = 2$ ,  $p = 7.301e-06$ ).

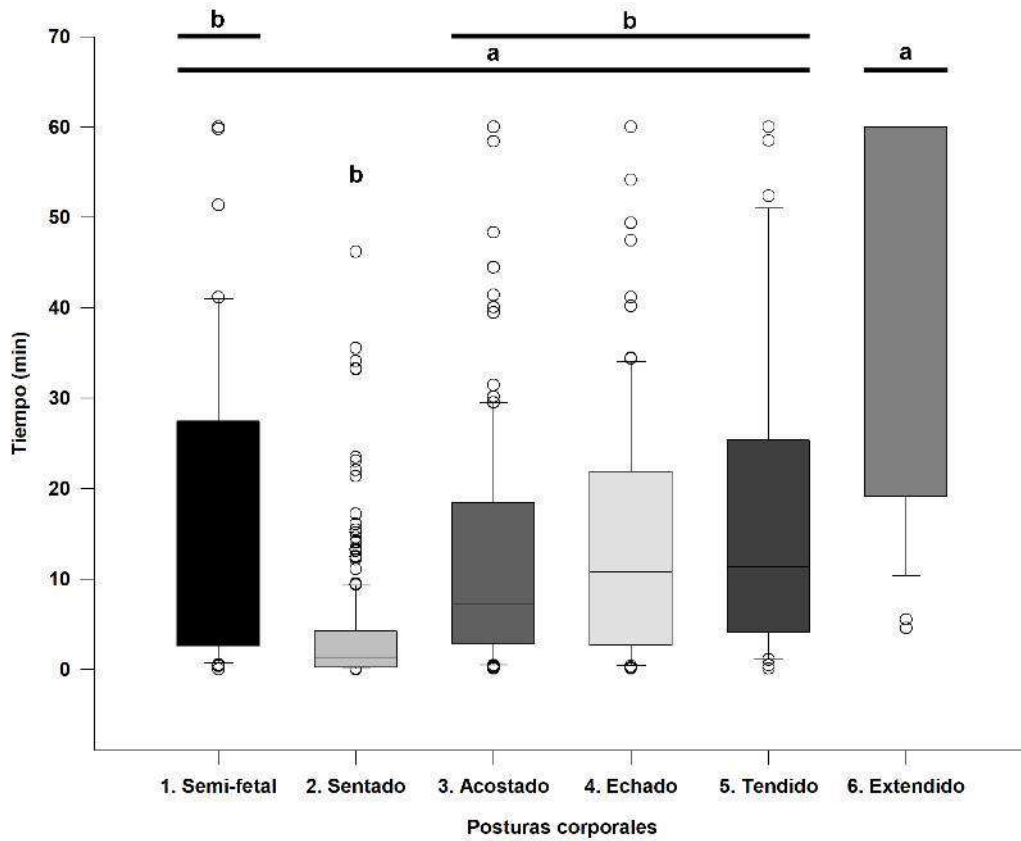


Figura 1. Comparación del tiempo que invierte *A. palliata* a cada postura corporal durante el descanso (Kruskal-Wallis,  $X^2 = 195.3$ ,  $df = 5$ ,  $p < 2.2e-16$ ;  $a = p \leq 0.05$ ;  $b = p \leq 0.05$ )

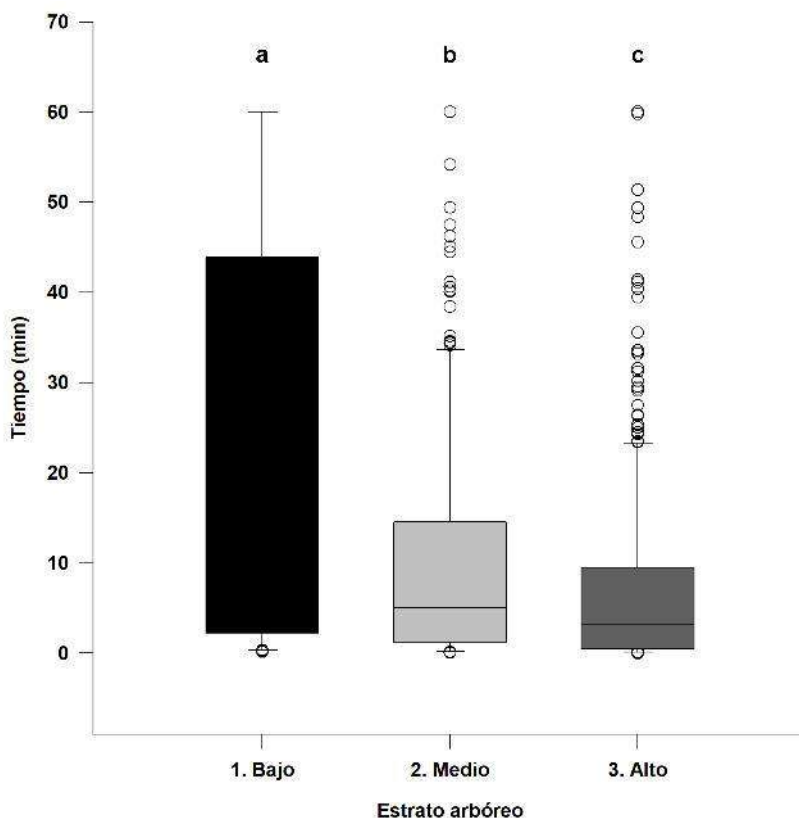


Figura 2. Comparación del tiempo que invierte *A. palliata* a descansar en cada estrato arbóreo (Kruskal-Wallis,  $X^2 = 23.65$ ,  $df = 2$ ,  $p = 7.301e-06$ ; todos los grupos mostraron diferencia entre sí:  $a = p \leq 0.05$ ;  $b = p \leq 0.05$ ;  $c = p \leq 0.05$ )

## CONCLUSIONES

Los monos aulladores invierten diferente cantidad de tiempo y realizan una postura específica como estrategia conductual para termorregular. En condiciones de temperaturas altas o cálidas, los monos aulladores utilizan principalmente la postura de extendido en el tercio arbóreo bajo durante el descanso, e incrementan el tiempo que invierten a este comportamiento en comparación de cuando utilizan otras posturas corporales, u otras partes del estrato arbóreo cuando descansan.

## BIBLIOGRAFÍA

1. J. F. Aristizábal, L. Lévêque, C. A. Chapman, y J. C. Serio-Silva. "Impacts of temperature on behavior of the Mexican endangered black howler monkey *Alouatta pigra* Lawrence, 1933 (Primates: Atelidae) in a fragmented landscape". ACTA ZOOLOGICA BULGARICA, Vol. 70, 3, 2018, pp. 377-382.
2. B. R. Azevedo, y J. C. Bicca-Marques. "Termorregulação Comportamental em Macacos-Aranha, *Ateles chamek* (Primates, Atelidae), em Cativeiro". Biociências, Vol. 11, 2, 2003, pp. 159-166.
3. D. C. Balcells, y J. J. Veà. "Developmental stages in the howler monkey, subspecies *Alouatta palliata mexicana*: A new classification using age-sex categories". Neotropical Primates, Vol. 16, 1, 2009, pp. 1-8.
4. J. C. Bicca-Marques, y C. Calegari-Marques. "Behavioral thermoregulation in a sexually and developmentally dichromatic neotropical primate, the black-and-gold howling monkey (*Alouatta caraya*)". American Journal of Physical Anthropology, Vol. 106, 1998, pp. 533-546.
5. V. Cantarelli, M. Perez-Rueda, M. M. Kowalewski, G. Mastromonaco, y M. Ponzio. "Validation of an enzyme immunoassay and comparison of fecal cortisol metabolite levels in black and gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) inhabiting fragmented and continuous areas of the humid Chaco Region, Argentina". American Journal Primatology, Vol. 79, 3, 2017, pp. 1-9.

6. E. Ceccarelli, A. Rangel-Negrín, A. Coyohua-Fuentes, D. Canales-Espinosa, y P. A. D. Dias. "An exploration of the factors influencing the spatial behavior of mantled howler monkeys (*Alouatta palliata*)". *International Journal of Primatology*, Vol. 40, 2019, pp. 197-213.
7. Ó. M. Chaves, F. A. Fernandes, G. T. Oliveira, y J. C. Bicca-Marques. "Assessing the influence of biotic, abiotic, and social factors on the physiological stress of a large neotropical primate in Atlantic forest fragments". *Science of the Total Environment*, Vol. 690, 2019, pp. 705-716.
8. Ó. M. Chaves, V. B. Fortes, G. P. Hass, R. B. Azevedo, K. E. Stones, y J. C. Bicca-Marques. "Flower consumption, ambient temperature and rainfall modulate drinking behavior in a folivorous-frugivorous arboreal mammal". *PLoS ONE*, Vol. 16, 2, 2021, pp. e0236974.
9. J. Chen, S. C. Saunders, T. R. Crow, R. J. Naiman, K. D. Brososke, G. D. Mroz, B. L. Brookshire, y J. F. Franklin. "Microclimate in forest ecosystem and landscape ecology". *BioScience*, Vol. 49, 4, 1999, pp. 288-297.
10. G. Da Silva. "Postural changes and behavioral thermoregulation in colobus polykomos: The effect of climate and diet". *African Journal of Ecology*, Vol. 31, 3, 1993, pp.226-241.
11. P. A. D. Dias, A. Rangel-Negrín, A. Coyohua-Fuentes, y D. Canales-Espinosa. "Factors affecting the drinking behavior of black howler monkeys (*Alouatta pigra*)". *Primates*, Vol. 55, 2014, pp. 1-5.
12. G. Díaz-Cordero. "El Cambio Climático". *Ciencia y Sociedad*, Vol. 37, 2, 2012, pp. 227-240.
13. T. Eppley, J. Watzek, K. Dausmann, y J. Ganzhorn. Huddling is more important than rest site selection for thermoregulation in southern bamboo lemurs. *Animal Behaviour*, Vol. 127, 2017, pp. 153-161.
14. J. Fox, y Weisberg. "An R companion to applied regression". Third. Thousand Oaks, CA., 2019.
15. A. Fuller, D. Mitchell, S. K. Maloney, R. S. Hetem, V. F. C. Fonsêca, L. C. R. Meyer, T. M. F. N. van de Ven, y E. P. Snelling. "How dryland mammals will respond to climate change: The effects of body size, heat load and a lack of food and water". *Journal of Experimental Biology*, Vol. 224, 2021, pp. jeb238113.
16. A. Fuller, D. Mitchell, S. K. Maloney, y R. S. Hetem. "Toward a mechanistic understanding of the responses of large terrestrial mammals to heat and aridity associated with climate change". *Climate Change Responses*, Vol. 3, 2016.
17. C. C. Gestich, C. B. Caselli, y E. F. Setz. "Behavioral thermoregulation in a small neotropical primate". *Ethology*, Vol. 120, 2014, pp. 331-339.
18. C. Greiser, E. Meineri, M. Luoto, J. Ehrlén, y K. Hylander. "Monthly microclimate models in a managed boreal forest landscape". *Agricultural and Forest Meteorology*, Vol. 250-251, 2018, pp. 147-158.
19. G. Gutiérrez-García, y M. Ricker. "Climate and climate change in the region of Los Tuxtlas (Veracruz, Mexico): A statistical analysis". *Atmósfera*, Vol. 24, 2011, pp. 347-373.
20. R. R. Hilário, S. M. Silvestre, F. Abreu, R. Beltrão-Mendes, C. S. S. de Castro, R. R. D. Chagas, M. F. De la Fuente, M. H. L. Duarte, S. F. Ferrari, M. Passamani, N. Schiel, A. Souto, R. J. Young, y J. P. Souza-Alves. "Temperature and exudatory as drivers of the marmoset (*Callithrix* spp.) daily activity period". *American Journal of Primatology*, 2021, pp. e23341.
21. R. A. Hill. "Thermal constraints on activity scheduling and habitat choice in baboons". *American Journal of Physical Anthropology*, Vol. 129, 2006, pp. 242-249.
22. IPCC. Summary for Policymakers [H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, E.S. Poloczanska, K. Mintenbeck, M. Tignor, A. Alegría, M. Craig, S. Langsdorf, S. Löschke, V. Möller, A. Okem (eds.)]. In: *Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, M. Tignor, E.S. Poloczanska, K. Mintenbeck, A. Alegría, M. Craig, S. Langsdorf, S. Löschke, V. Möller, A. Okem, B. Rama (eds.)]. (Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA, 2022), pp. 3–33.
23. V. P. Kosheleff, y C. N. K. Anderson. "Temperature's influence on the activity budget, terrestriality, and sun exposure of chimpanzees in the Budongo Forest, Uganda". *American Journal of Physical Anthropology*, Vol. 139, 2009, pp. 172-181.

24. K. G. D. Lopes, y J. C. Bicca-Marques. "Ambient temperature and humidity modulate the behavioral thermoregulation of a small arboreal mammal (*Callicebus bernhardi*)". *Journal of Thermal Biology*, Vol. 69, 2017, pp. 104-109.
25. P. Martin, y P. Bateson. *La Medición del Comportamiento*. (Alianza Editorial S. A., Madrid, España, 1991), pp. 69-139.
26. T. McKinney. "Ecological and behavioral flexibility of mantled howlers (*Alouatta palliata*) in response to anthropogenic habitat disturbance". *Folia Primatologica*, Vol. 90, 2019, pp. 456-469.
27. D. Mitchell, E. P. Snelling, R. S. Hetem, S. K. Maloney, W. M. Strauss, y A. Fuller. "Revisiting concepts of thermal physiology: Predicting responses of mammals to climate change". *J. Anim Ecol.*, Vol. 87, 2018, pp. 956-973.
28. R. M. Palestino-Sánchez, F. García-Orduña, D. Canales-Espinosa, M. F. López-Flores, J. F. Rodríguez-Landa, A. R. Sandoval-Jiménez, y M. J. Roviroso-Hernández. "Efecto de la temperatura ambiental sobre las posturas de descanso del mono aullador (*Alouatta palliata*)". *Neotropical Primates*, Vol. 26, 2, 2020, pp. 125-130.
29. J. D. Paterson. "Postural-positional thermoregulatory behavior and ecological factors in primates". *Canadian Review of Physical Anthropology*, Vol. 3, 1981, pp. 3-11.
30. Y. A. Picón-Jaimes, J. E. Orozco-Chinome, J. Molina-Franky, y M. P. Franky-Rojas. "Control central de la temperatura corporal y sus alteraciones: fiebre, hipertermia e hipotermia". *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud*. Vol. 23, 1, 2020, pp. 118-130.
31. W. P. Porter, y D. M. Gates. "Thermodynamic equilibria of animals with environment. *Ecol. Monogr*, Vol. 39, 1969, pp. 227-244.
32. R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2022.
33. R. A. Rhoades, y D. R. Bell. *Fisiología médica: Fundamentos de medicina clínica*. (Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, PA, United States, 2012), pp. 442-471.
34. N. Righini, P. A. Garber, y J. M. Rothman. "The effects of plant nutritional chemistry on food selection of Mexican black howler monkeys (*Alouatta pigra*): The role of lipids". *American Journal of Primatology*, Vol. 79, 4, 2015, pp. 1-15.
35. D. S. Shelton, y J. R. Alberts. "Development of behavioral responses thermal challenges". *Developmental Psychobiology*, Vol. 60, 2018, pp. 5-14.
36. J. C. Serio-Silva. "Patrón diario de actividades y hábitos alimenticios de *Alouatta palliata* en semilibertad". En: Rodríguez-Luna, E., Cortés-Ortiz, L. y Martínez-Contreras, J. (eds.). *Estudios primatológicos en México*. Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México. 1995, pp. 149-172.
37. C. L. Thompson, S. H. Williams, K. E. Glander, y C. J. Vinyard. "Measuring microhabitat temperature in arboreal primates: A comparison of on animal and stationary approaches". *International Journal of Primatology*, Vol. 37, 2016, pp. 495-517.
38. G. R. Warnes, B. Bolker, L. Bonebakker, R. Gentleman, W. Huber, A. Liaw, T. Lumley, M. Maechler, A. Magnusson, S. Moeller, M. Schwartz, y B. Venables. "Gplots: Various R programming tools for plotting data. R package version 3.1.0". 2020.
39. H. Wickham. "Ggplot2: Elegant graphics for data analysis". 2016.
40. H. Wickham, y J. Bryan. "Readxl: Read excel files. R package version 1.3.1.". 2019.
41. F. Zellweger, P. De Frenne, J. Lenoir, D. Rocchini, y D. Coomes. "Advances in microclimate ecology arising from remote sensing". *Trends in Ecology & Evolution*, Vol. 34, 4, 2019, pp. 327-341.

## FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOMATERIALES ORGANICOS LUMINISCENTES

Diana Emilia Moreno Vázquez , Mayra Lucila Melgoza Ramirez, Mario Alejandro Rodríguez Rivera

Centro de investigaciones en optica  
emivaz1202@gmail.com, mrodri@cio.mx,

### RESUMEN

La fabricación de materiales luminiscentes como partículas a escala nanométrica a partir de moléculas orgánicas ha resultado de gran interés, debido a su uso como marcadores celulares, agentes de contraste o como sensores químicos. (Aparicio, et al. 2016). En este trabajo, se fabricaron suspensiones acuosas de nanopartículas fotoluminiscentes por el método de reprecipitación, el cual tiene la ventaja de ser un método sencillo. Para la fabricación de las suspensiones se investigaron dos moléculas de tipo imina (DEM-01 y CG5a), este tipo de moléculas son conocidas por su poca estabilidad en agua. Para el proceso de reprecipitación se estudiaron parámetros como la concentración de la solución del fluoróforo, el disolvente, el volumen inyectado, el tipo y tiempo de agitación que busca favorecer la obtención de partículas a escala nanométrica. Las propiedades ópticas de las suspensiones se evaluaron mediante espectroscopia de absorción y emisión, se caracterizaron las propiedades morfológicas de las partículas por microscopia electrónica de barrido (SEM) y, la distribución de tamaño se determinó mediante la técnica dispersión dinámica de luz (DLS). Los espectros de absorción de las suspensiones acuosas mostraron bandas correspondientes al cromóforo que confirman la estabilidad de las iminas en suspensión, mientras que los espectros de emisión corroboran que se conservan las propiedades del fluoróforo. Las iminas aromáticas estudiadas resultaron ser moléculas apropiadas para fabricar partículas luminiscentes con morfología semiesférica de tamaños aproximados a 100 nm, lo cual es confirmado por microscopia SEM.

### INTRODUCCIÓN

Las iminas son moléculas orgánicas estables en sólido que se forman a partir de una reacción de condensación entre una amina y un compuesto carbonilo. Su estructura general es  $RR'C=NR''$ , donde R' puede ser un átomo de hidrogeno o un fragmento orgánico las cuales son inestables en soluciones acuosas debido a una reacción de hidrolisis (Navarrete, Azses, Ramirez, Ortiz, & Salazar, 2020). Las iminas aromáticas poseen propiedades de luminiscencia en solución y estado sólido, lo cual permite que puedan ser utilizadas como sensores, marcadores biológicos o agentes de contraste (Aparicio, et al, 2016). La presente investigación tiene como objetivo evaluar diversas condiciones de fabricación para conseguir o favorecer la generación de nanopartículas y, usando técnicas espectroscópicas de absorción y emisión, estudiar sus propiedades ópticas. En particular, partiendo de moléculas orgánicas luminiscentes de tipo imina en solución y usando el método de reprecipitación para la fabricación de suspensiones acuosas de nanomateriales.

### TEORÍA

Se considera que una molécula es orgánica cuando en su mayoría, está conformada por átomos de carbono unidos por enlaces de tipo sigma ( $\sigma$ ), también conocidos como enlaces sencillos, o del tipo pi ( $\pi$ ), cuando existe un enlace doble. Estos enlaces son responsables de las propiedades estructurales y ópticas de la molécula, así como de la presencia de elementos como oxígeno, nitrógeno o azufre en fragmentos conocidos como grupos funcionales. En este contexto, las moléculas que contienen únicamente enlaces sigma son, por lo general, incoloras, mientras que las moléculas con enlaces  $\pi$  en particular cuando están alternados con enlaces sencillos suelen prestarse como especies coloridas. Dentro de las moléculas orgánicas, las iminas son una familia de compuestos estables que se obtienen a partir de una reacción de condensación entre una amina ( $R''-NH_2$ ) y un compuesto carbonilo ( $R'-CHO$  o  $R'-CO-R$ ). Su estructura genera se representa como  $RR'C=NR''$ .

Las moléculas orgánicas que contienen dobles enlaces conjugados tal como las iminas aromáticas son coloridas debido a que absorben y reflejan determinadas longitudes de onda de la región visible

del espectro electromagnético (De los 400 y 800nm). El color observado por una molécula orgánica es producido por la presencia de grupos cromóforos, que corresponden a fragmentos con dobles enlaces conjugados (alternados) o sistemas aromáticos. Estos grupos ricos en electrones en orbitales  $\pi$  tienen la habilidad de absorber (banda de absorción) radiación electromagnética lo cual genera una transición electrónica que provoca pasar un electrón del estado basal a uno excitado (estado de mayor energía).

El proceso de emisión ocurre una vez que los electrones se encuentran en un estado excitado y se relajan liberando el exceso de energía en forma de radiación electromagnética (banda de emisión). La liberación de energía en forma de fotones se conoce como luminiscencia, y esta puede ser producida usando varios tipos de excitación, por ejemplo; luz (Fotoluminiscencia), una reacción química (quimioluminiscencia) o una corriente eléctrica (electroluminiscencia).

El proceso de excitación con luz ocurre cuando un fotón de una específica longitud de onda es suministrado por una fuente externa, creando un estado excitado. El estado excitado se mantiene durante cierto periodo de tiempo (aproximadamente 10 nanosegundos), posteriormente la energía puede ser disipada produciendo la fluorescencia. En otras palabras, un fotón es emitido, retornando al electrón a su estado fundamental.

Por otro lado, el proceso de reprecipitación usado para la fabricación de suspensiones acuosas se basa en el uso de una molécula en solución. El proceso consta de 3 elementos principales: la molécula orgánica a estudiar la cual debe ser insoluble en agua, un disolvente orgánico miscible en agua y agua milliQ (Gamboa, 2011). De manera general, el procedimiento se basa en la formación de una mezcla homogénea de los dos disolventes mientras se mantiene en agitación vigorosa y la insolubilidad de la molécula orgánica que favorece la formación de agregados los cuales varían significativamente en forma y tamaños. Se ha reportado que el uso de surfactantes favorece la estabilidad de las suspensiones y ayuda a controlar el tamaño de las partículas fabricadas, sin embargo, presenta la problemática de la citotoxicidad y la contaminación de la muestra durante la caracterización morfológica. Por lo tanto, en este trabajo se buscó evaluar el proceso de reprecipitación sin surfactante como método barato y sencillo para la fabricación de nanomateriales luminiscentes basados en dos moléculas del tipo imina.

## PARTE EXPERIMENTAL

Se fabricaron suspensiones acuosas de las iminas a partir de soluciones en acetona y tetrahidrofurano (THF) a diferentes concentraciones utilizando el método de reprecipitación. Se estudiaron diferentes concentraciones de las soluciones para encontrar las mejores condiciones (2mg de CG5a en 1mL de acetona y 1.44mg de DEM-01 en 5mL de THF). Otro parámetro evaluado fue el volumen inyectado (se evaluaron volúmenes desde 0.1 a 0.4 mL) y el tiempo de agitación (15 min a 24 h). Se encontraron las mejores condiciones inyectando 0.2 mL de la solución DEM-01 en 5mL de agua milliQ y 0.2 mL de CG5a en 6 mL de agua milliQ, manteniendo la mezcla en agitación ultrasónica por 15 minutos. Adicionalmente, para ambas iminas se investigó el efecto del uso de agitación mecánica durante 24 horas, lo cual provocó la degradación de las iminas.

Para purificar las suspensiones (reducción de la distribución de tamaño) se utilizó una centrifuga, las suspensiones de los nanomateriales fueron sometidos a 3000 rpm durante 30 min. El sobrenadante fue investigado en DLS para medir la distribución de tamaño y usando SEM para determinar la morfología de las partículas obtenidas.

## RESULTADOS

Se fabricaron las suspensiones acuosas de los nanomateriales basados en las iminas usando el método de reprecipitación, de manera general, las suspensiones son homogéneas después del proceso de purificación. Bajo iluminación de luz ultravioleta las suspensiones son luminiscentes y, bajo luz visible lucen coloridas, lo anterior indica que las características de las iminas CG5a y DEM-01 se conservan. Los espectros de absorción de las suspensiones corroboran la presencia de las bandas de absorción, mostrando la estabilidad de los fragmentos cromóforos (para CG5a en 260 y 400 nm y DEM-01 en 350 nm). Por otro lado, las propiedades luminiscentes de las suspensiones se evaluaron por espectroscopia de emisión, las bandas de emisión se registraron en 520 y 610 nm para CG5a y DEM, respectivamente. Estos resultados confirman la conservación de las propiedades ópticas de las iminas durante el proceso de reprecipitación.



La distribución de tamaños de las nanopartículas fabricadas fue evaluada por la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS), resultados que se utilizaron como medio para establecer los mejores parámetros a emplearse durante la reprecipitación. De los parámetros evaluados se encontró que el volumen de solución a inyectar es el que favorece en mayor medida la obtención de partículas de menor diámetro, por el contrario, al usar la agitación mecánica no se forman suspensiones estables (el material precipita o se degrada), mientras que la concentración (desde 1 a 3 mM) del fluoróforo mostró un efecto imperceptible. Las distribuciones de tamaño mostraron que las suspensiones basadas en la imina CG5a se obtienen partículas con tamaños promedio de 170.4nm, mientras que las basadas en DEM-01 son de 228.4 nm. Para completar el análisis morfológico de las suspensiones se analizaron usando microscopía electrónica de barrido, en ambos materiales se observa la formación de partículas con formas irregulares que presentan diámetros alrededor de los 100 nm, al evitar el uso de surfactantes se favorece la obtención de imágenes más limpias. Tal como se observa en la Figura 1.

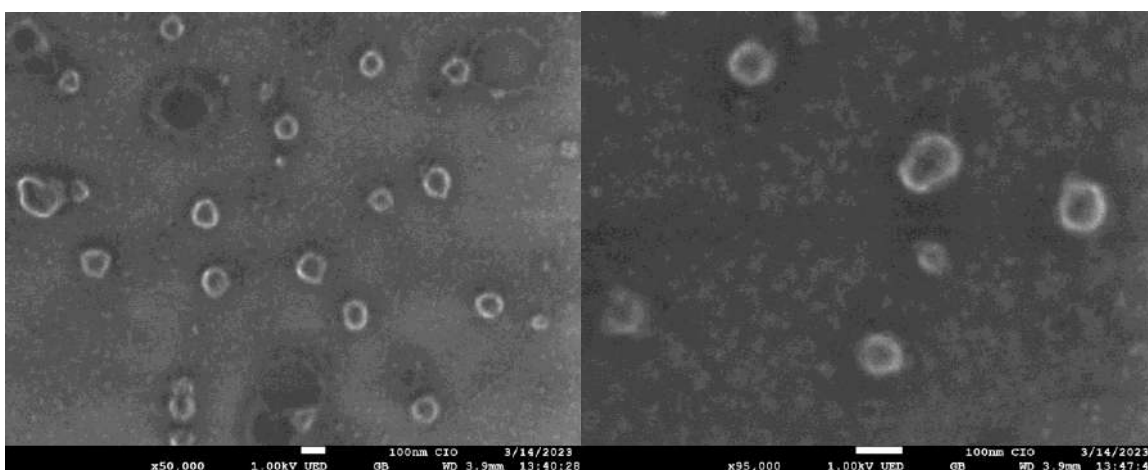


Figura 1 Imágenes de SEM de la molécula DEM-01 en suspensión

## CONCLUSIONES

El presente trabajo de investigación muestra que las moléculas tipo imina Cg5a y DEM-01 generaron suspensiones acuosas estables por el método de reprecipitación, evitando el uso de surfactantes. Las nanopartículas presentan diámetros alrededor de los 100 nm y morfologías semiesféricas lo cual se corroboró mediante microscopía electrónica de barrido. Mediante espectroscopía de absorción y emisión se confirmó que las moléculas conservan sus propiedades ópticas al ser procesadas como nanopartículas. Para el método de fabricación usado se encontró que el volumen inyectado es el parámetro que afecta en mayor medida la obtención de partículas con diámetros alrededor de 100 nm. Importante a resaltar que para las dos iminas estudiadas no es necesario el uso de surfactantes para favorecer la morfología ni controlar los tamaños, lo cual puede estar relacionado con el tamaño y tipo de molécula orgánica estudiada en este caso las iminas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Aparicio, L., Rosales, A. Ramos G., Rodríguez, M., Pichardo, M., Gutiérrez, G., Sabanero, M., et al. (2016). Two-Photon Imaging of a Cellular Line Using Organic Fluorescent Nanoparticles Synthesized by Laser Ablation, 10.1002/ppsc.201500199
2. Rodríguez, J., Aparicio, L., Rodríguez, M., Ramos, G., Maldonado, J., Jiménez A., Farfán, N., et al (2013) Synthesis, chemical–optical characterization and solvent interaction effect of novel fluorene-chromophores with D–A–D structure, 31-41.

3. Navarrete, A., Azses, J., Ramírez, Y., Ortiz, M., & Salazar, M. (2020). Estudio teórico de la síntesis de iminas a partir de aldehídos y anilinas . Revista Tendencias en Docencia e investigación en química 2020.
4. Gamboa, N. (2011). Preparación de Nanomateriales Orgánicos Fluorescentes. Tesis de licenciatura. Universidad Veracruzana

## MATERIAL ELECTROHILADO BIODEGRADABLE CON PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS Y ANTIOXIDANTES CON POTENCIAL USO COMO EMPAQUES DE FRESA

Michell García García<sup>1</sup>, Elizabeth Quintana Rodríguez<sup>2</sup>, Domancar Orona Tamayo<sup>2</sup> y Jesús Salvador Jaime Ferrer<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Posgrado Interinstitucional en Ciencia y Tecnología (PICYT), CIATEC, A.C., <sup>2</sup>Dirección de Investigación y Soluciones Tecnológicas, CIATEC, A.C.

mgarcia.picyt@ciatec.mx

### RESUMEN

El sector agroalimentario mexicano representa aproximadamente el 8% de la economía del país, manteniéndose así como el décimo productor de alimentos a nivel mundial. En el año 2021, el estado de Guanajuato se posicionó como uno de los 10 principales productores de fresas en el país. Sin embargo, la producción de fresas puede verse comprometida por múltiples factores ambientales, biológicos o ser vulneradas por enfermedades e infecciones durante su transporte y manipulación. El deterioro de los productos frescos tiene amplias implicaciones socioeconómicas ya que se correlaciona directamente con la escasez de alimentos, el desperdicio, el hambre en algunas partes del mundo, estrés hídrico, pérdida innecesaria de biodiversidad y el aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero. Es por lo que, los empaques alimenticios han sido utilizados para proteger a los productos de manera temporal durante su manipulación, transporte y almacenamiento. A medida que la demanda en cantidad de embalaje alimentario incrementa, el impacto ambiental relacionado a los materiales de empaque se convierte gradualmente en un problema mayor en el mundo. El surgimiento de alternativas para lograr la sostenibilidad en el envasado de alimentos ha permitido la innovación en los materiales de empaque sin comprometer las características de contención o las propiedades físicas de barrera y mecánicas. El uso de materiales nanoestructurados, como las nanofibras en el envasado de frutas, puede potenciar sus características funcionales. El desarrollo de nanofibras poliméricas que sean capaces de mejorar las propiedades de barrera y antimicrobianas de los materiales es prometedor. La técnica más utilizada para desarrollar este tipo de materiales es el electrohilado, el cual utiliza fuerzas electrostáticas para producir fibras a partir de soluciones poliméricas. Los materiales generados por esta técnica se han aplicado a empaques alimenticios ya que le confieren propiedades específicas, permitiendo la liberación gradual y controlada de compuestos activos en la superficie del alimento y a su vez, el empaque ofrece una alta porosidad, área superficial específica y una estructura maleable capaz de adaptarse al alimento a contener.

El presente proyecto pretende la incorporación de melanina previamente obtenida a partir de cáscaras de nuez permitiendo el aprovechamiento de este residuo. La cáscara de nuez es el subproducto no comestible de la nuez comercial, la cual contiene sustancias funcionales no utilizadas eficientemente. La recuperación de dichas sustancias es un enfoque atractivo para la reducción de residuos y obtención de fitoquímicos antioxidantes con valor agregado. La presencia de melanina como compuesto bioactivo en la matriz polimérica de fibras nanométricas permitirá la reducción del envejecimiento de las fresas a través de su actividad antioxidante y antimicrobiana. En este contexto, se desarrollaron fibras electrohiladas de los polímeros biodegradables de policaprolactona (PCL) y gelatina, a los cuales se le adicionó melanina como compuesto activo y se investigó su actividad antimicrobiana y antioxidante. A su vez, se aislaron hongos fitopatógenos característicos posterior a la cosecha encontrados en frutos de fresas deterioradas. Se evaluó la actividad antifúngica de la melanina sobre estos aislados y se encontró inhibición del crecimiento radial en ensayos *in vitro*. Por otro lado, la melanina en ensayos *in vitro* mostró una alta actividad antioxidante. Por lo que, la presencia de melanina como compuesto bioactivo en la matriz polimérica de fibras electrohiladas permitirá potencialmente aumentar la vida de anaquel de las fresas a través de su actividad antioxidante y antimicrobiana, previniendo el deterioro por microorganismos en la superficie de las fresas.

## INTRODUCCIÓN

En el año de 2020, las exportaciones de productos agroalimentarios mexicanos superaron las divisas que generan el turismo, el petróleo y la inversión extranjera directa en años recientes y fueron muy similares a las divisas que ingresan al país por las remesas. Adicionalmente, en el año 2021, el estado de Guanajuato se posicionó como uno de los 10 principales productores de fresas en el país. De esa producción, los frutos en fresco representaron 67,6%, los congelados 29,8% y el resto correspondió a los procesados. En Guanajuato, el 48% de las exportaciones totales se realizan por ferrocarril y el 32% por transporte de carga<sup>1</sup>. Durante el transporte y distribución del alimento, las hortalizas son particularmente vulnerables a pérdidas<sup>2</sup>. La pérdida de humedad, daño físico, condiciones higiénicas y descomposición posterior, son los principales responsables del desperdicio de frutos frescos<sup>3</sup>. El deterioro de los productos frescos tiene amplias implicaciones socioeconómicas ya que se correlaciona directamente con la escasez de alimentos, el desperdicio, el hambre en algunas partes del mundo, estrés hídrico, pérdida innecesaria de biodiversidad y el aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero<sup>4</sup>. En México de acuerdo con el Banco de Alimentos de México (BAMX), un tercio del alimento producido se desperdicia, lo que equivale a 38 toneladas por minuto<sup>5</sup>. La reducción en las pérdidas de frutas posterior a la cosecha juega un papel importante en la alimentación sustentable de la población mundial. Los cambios que ocurren en las frutas no pueden evitarse, pero es posible minimizarlos, por ello, los empaques han sido utilizados para proteger a los productos de manera temporal durante su manipulación, transporte y almacenamiento<sup>3</sup>. Los empaques, deben asumir funciones básicas, como protección y contención para minimizar los factores ambientales adversos, adicionalmente, brindan información relevante sobre el empaque mismo y sobre el alimento<sup>6,7</sup>. A medida que la demanda en cantidad de embalaje alimentario incrementa, el impacto ambiental relacionado a los materiales de empaque se convierte gradualmente en una problemática mayor a nivel mundial. El surgimiento de alternativas para lograr la sostenibilidad en el envasado de alimentos ha permitido la innovación en los materiales de empaque sin comprometer las características de contención o las propiedades físicas y mecánicas de barrera<sup>8</sup>. El envasado tradicional protege al alimento de forma pasiva del medio exterior funcionando como una barrera física. Sin embargo, la constante demanda en la mejora de los materiales de empaque existentes ha conducido a la generación de envases que participen directamente en la conservación del producto. En efecto, el uso de materiales nanoestructurados, como las nanofibras en el envasado de frutas, puede potenciar sus características funcionales. La técnica más utilizada para desarrollar este tipo de materiales es el electrohilado, el cual utiliza fuerzas electrostáticas para producir finas fibras<sup>9</sup>, mediante la deformación uniaxial o elongación de una gota de un polímero viscoelástico para formar un filamento con una alta porosidad y área superficial específica<sup>10</sup>. Diversos polímeros naturales y sintéticos han sido utilizados en la producción de materiales electrohilados para el envasado de alimentos<sup>11</sup>. Los materiales generados por esta técnica se han aplicado a empaques alimenticios ya que le confieren propiedades específicas, permitiendo la liberación gradual y controlada de compuestos activos en la superficie del alimento y a su vez, el empaque ofrece una estructura maleable capaz de adaptarse al alimento a contener. Un compuesto de interés por su actividad antimicrobiana y antioxidante es la melanina, misma que pertenece a una familia de pigmentos poliméricos heterogéneos presente en todas las formas de vida en la naturaleza. Provee a los organismos, entre otros, de pigmentación, protección ante la radiación y regulación térmica<sup>12</sup>. La cáscara de nuez contiene melanina y, representa el subproducto no comestible de la nuez comercial, la cual contiene sustancias funcionales no utilizadas eficientemente. La recuperación de dichas sustancias es un enfoque atractivo para la reducción de residuos y obtención de fitoquímicos antioxidantes con valor agregado<sup>13</sup>. El presente proyecto pretende la incorporación de melanina previamente obtenida a partir de cáscaras de nuez. Se desarrollaron fibras electrohiladas de los polímeros biodegradables de policaprolactona (PCL) y gelatina, a los cuales se le adicionó melanina como compuesto activo y se investigó su actividad antimicrobiana y antioxidante. A su vez, se aislaron hongos fitopatógenos característicos posterior a la cosecha encontrados en frutos de fresas deterioradas. Se evaluó la actividad antifúngica de la melanina sobre estos aislados y se encontró inhibición del crecimiento radial y alta actividad antioxidante en ensayos *in vitro*.

## TEORÍA

En el año 2021, el estado de Guanajuato se posicionó como el tercer principal productor de fresas (*Fragaria ananassa* D.) en el país. Reportando una producción total superior a las 97 mil toneladas, aumentando así, su producción en más del doble en los últimos diez años<sup>1</sup>. La producción de fresa puede verse comprometida por múltiples factores ambientales como cambios relativos de temperatura, precipitación, luminosidad, viento, entre otros. También se identifican como parte del problema, factores biológicos como lo son enfermedades e infecciones. La secadera de la fresa es la enfermedad principal del cultivo de fresa en el estado de Guanajuato, responsable de pérdidas de hasta el 50% de la producción. En Guanajuato, la enfermedad se asocia con 14 especies de hongos, siendo *Fusarium oxysporum* el más frecuente<sup>14,15</sup>. Las fresas son frutas altamente perecederas con una alta tasa de respiración, las cuales pueden ser almacenadas durante un corto periodo de tiempo. La temperatura de almacenamiento influye significativamente en la calidad de las fresas. Las fresas pueden mantenerse durante un periodo aceptable de tiempo a 10 °C y pueden conservarse durante un mayor periodo de tiempo a 0.5 °C, sin embargo, la refrigeración no resulta amigable con el medio ambiente debido a la liberación de clorofluorocarbonos e hidroclorofluorocarbonos en el medio ambiente por su efectos en el agotamiento de la capa de ozono y el calentamiento global<sup>12</sup>. Actualmente, la refrigeración y el control de los niveles de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> son los más métodos de conservación más utilizados para la disminución de la senescencia en la fresa. En los últimos años, el desarrollo de envases activos e inteligentes para fresas ha permitido incrementar su vida útil, a pesar de ello, es necesario seguir desarrollando empaques activos e inteligentes con nuevas funcionalidades que prolonguen la vida de anaquel de la fresa y, que sean capaces de preservar las características cualitativas del producto contenido, reduciendo efectos adversos en el medioambiente. El empaque activo puede ser considerado una plataforma que protege al alimento de los factores externos, capaz de extender su vida de anaquel. Adicionalmente, la preocupación sobre la adición de químicos sintéticos en los envases activos ha impulsado la investigación sobre el uso de alternativas innovadoras como los compuestos bioactivos obtenido de fuentes naturales. En este sentido, la aplicación de la nanotecnología puede mejorar las propiedades físicas, químicas y biológicas de los materiales al reducir el tamaño de sus partículas y aumentar su área de superficie de contacto y reactividad. En efecto, el uso de materiales nanoestructurados, como las nanofibras en el envasado de frutas, puede potenciar sus características funcionales. El desarrollo de nanofibras poliméricas que sean capaces de mejorar las propiedades de barrera y antimicrobianas de los materiales es prometedor. La técnica más utilizada para desarrollar este tipo de materiales es el electrohilado, el cual utiliza fuerzas electrostáticas para producir finas fibras<sup>9</sup>, mediante la deformación uniaxial o elongación de una gota de un polímero viscoelástico para formar un filamento con una alta porosidad y área superficial específica<sup>10</sup>. Diversos polímeros naturales y sintéticos han sido utilizados en la producción de materiales electrohilados para el envasado de alimentos, de los cuales destacan la gelatina y sus combinaciones con otros polímeros, celulosa y quitosano, así como polímeros sintéticos, ácido poliláctico (PLA), alcohol polivinílico (PVA) y policaprolactona (PCL). Cada uno de estos polímeros destaca por su biodegradabilidad, bioactividad y propiedades mecánicas de barrera<sup>11</sup>. Las nanofibras electrohiladas han incorporado aditivos funcionales tales como agentes antibacterianos, por ejemplo, se han incorporado complejos de aceite de canela β-ciclodextrina en nanofibras de alcohol polivinílico electrohiladas, las cuales mostraron fuertes efectos antimicrobianos contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*<sup>10</sup>. Se ha reportado la encapsulación de timol en fibras de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) mediante la técnica de electrohilado para obtener una película activa antimicrobiana capaz de preservar las fresas contra el crecimiento microbiano, la película electrohilada y las fresas fueron colocadas sin contacto en un contenedor hermético, evidenciando que el material activo disminuyó la incidencia microbiana total en fresas almacenadas a 25 °C durante dos días. El electrohilado ha permitido el desarrollo de materiales de empaque con actividad antimicrobiana prolongada<sup>16</sup>, posicionando al electrohilado como un buen candidato para la producción de materiales de empaque<sup>10</sup>. Uno de los compuestos que ha sido estudiado en CIATEC, A.C., que ha presentado propiedades antimicrobianas y antioxidantes es la melanina. La melanina es una familia de pigmentos poliméricos heterogéneos presente en todas las formas de vida en la naturaleza. Provee a los organismos, entre otros, de pigmentación, protección ante la radiación y regulación térmica<sup>12</sup>. La melanina es capaz de resistir el ataque de patógenos microbiológicos dado que forma parte de la respuesta inmune en plantas, hongos e invertebrados, puede ser clasificada de acuerdo con la fuente de obtención, o bien, de manera primaria en tres



categorías: a) eumelanina, b) feomelanina y c) alomelanina. Todas ellas comparten una combinación de características que incluyen la resistencia a ácidos fuertes, insolubilidad en la mayoría de los solventes y, la presencia de una población estable de radicales libres<sup>17</sup>. La cáscara de nuez contiene melanina. La cáscara es el subproducto no comestible de la nuez comercial, la cual contiene sustancias funcionales no utilizadas eficientemente. La recuperación de dichas sustancias es un enfoque atractivo para la reducción de residuos y obtención de fitoquímicos antioxidantes con valor agregado<sup>13</sup>. La producción mundial de nuez pecanera la encabezan Estados Unidos y México<sup>18</sup>. La nuez pecanera como alimento, así como sus semillas, son ricas en grasas crudas, aminoácidos, azúcares, nitrógeno, fósforo, magnesio, potasio, calcio y otros elementos minerales. Sus semillas adicionalmente son fuente de fenoles, vitamina E y flavonoides. El aceite proveniente de la nuez es rico en ácidos grasos poliinsaturados, los cuales pueden reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, son reguladores del metabolismo lipídico y el sistema inmune, con presencia de actividad anticancerígena y antioxidante<sup>19</sup>. La cáscara de nuez es el subproducto no comestible de la nuez comercial, la cual representa entre un 45% a un 50% del peso total del fruto. Se ha reportado que la cáscara de nuez contiene diferentes compuestos bioactivos con potencial para inhibir la oxidación celular, inhibir la proliferación celular cancerígena, y proveer una acción fotoprotectora y antimicrobiana<sup>13</sup>. Impulsado por estas observaciones, el posible uso de la cáscara de nuez en aplicaciones alimenticias, especialmente direccionadas a empaques antioxidantes activos, inhibición de pardeamiento enzimático en frutas y, estabilización de antocianinas ampliamente usadas como colorantes alimenticios es investigado<sup>20</sup>. El propósito de este estudio es el desarrollo y caracterización de un polímero integrando melanina como compuesto activo por la técnica de electrohilado haciendo uso de los polímeros policaprolactona (PCL) y gelatina, el cual permita la liberación gradual y controlada de la misma para reducir la senescencia sobre la superficie de la fresa mediante una acción antimicrobiana y antioxidante.

## PARTE EXPERIMENTAL

La melanina fue previamente extraída a partir de cáscara de nuez<sup>21</sup>, La cual fue caracterizada a través de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Se realizó la recolección de un espectro infrarrojo de la melanina molida haciendo uso del Espectrómetro Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) modelo Nicolet iS10, marca Thermo Scientific a través del accesorio de Reflectancia Total Atenuada (ATR) con cristal de diamante, de igual manera, se realizó la recolección del espectro infrarrojo de las melaninas comerciales, con referencia M2649, marca Sigma, número CAS 8049-97-6 siendo *Sepia officinalis* su fuente de origen y la melanina comercial, con referencia M0418, marca Sigma, número CAS 8049-97-6 de origen sintético, bajo condiciones de reproducibilidad con la finalidad de comparar la composición espectral de la melanina extraída con respecto a las establecidas comercialmente. Con la finalidad de continuar con el proceso de caracterización de la melanina, se realizaron mediciones a través del Espectrofotómetro ultravioleta-visible de doble haz, marca Thermo Scientific, modelo Evolution 300, el instrumento se manipuló a través del software VISIONpro. Para la obtención del espectro se realizó un barrido desde 190 nm hasta 800 nm. El blanco se realizó con la matriz de disolución, es decir, hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 M. Se continuó con la medición del ángulo de contacto para el entendimiento de la interacción superficial con tres sistemas de fases (sólido/líquido/aire). Las mediciones fueron realizadas mediante el equipo OCA 15EC, marca dataphysics, con cámara de 6.5 aumentos y tomas de hasta 25 cuadros/segundo, el cual fue manipulado a través del software module SCA 2.0. Para ejecutar la elaboración de las fibras hiladas se utilizó el dispositivo de electrohilado modelo NE100 Single Nozzle Electrospinning/Spaying Machine, marca Inovenso, en el cual se inyectaron 6 mL de cada solución polimérica a un flujo de 0.3 mL/h, que es proyectada hacia un tambor giratorio cubierto por una película de aluminio que se encuentra girando a 300 rpm, a una distancia de 15 cm entre la punta y el colector, aplicando un voltaje de 15 kV. Para el aislamiento de hongos fitopatógenos de fresas, se realizó el aislamiento de los hongos a partir de una fresa enferma, mediante cortes realizados a la fruta utilizando un bisturí estéril, posteriormente, el tejido sustraído fue colocado en cajas Petri de agar PDA (papa dextrosa) con antibiótico. Posteriormente, las placas fueron incubadas durante un periodo de 5-7 días a una temperatura de 28 °C. Se realizaron resiembras a través del corte de colonias de cultivos axénicos.



## RESULTADOS

En la Figura 2 se observa la comparación de los espectros FTIR-ATR de la melanina obtenida a partir de los residuos de cáscara de nuez, así como los espectros obtenidos a partir de las melaninas comerciales de identificación M0418 y M2649, siendo apreciable una similitud significativa entre los espectros.

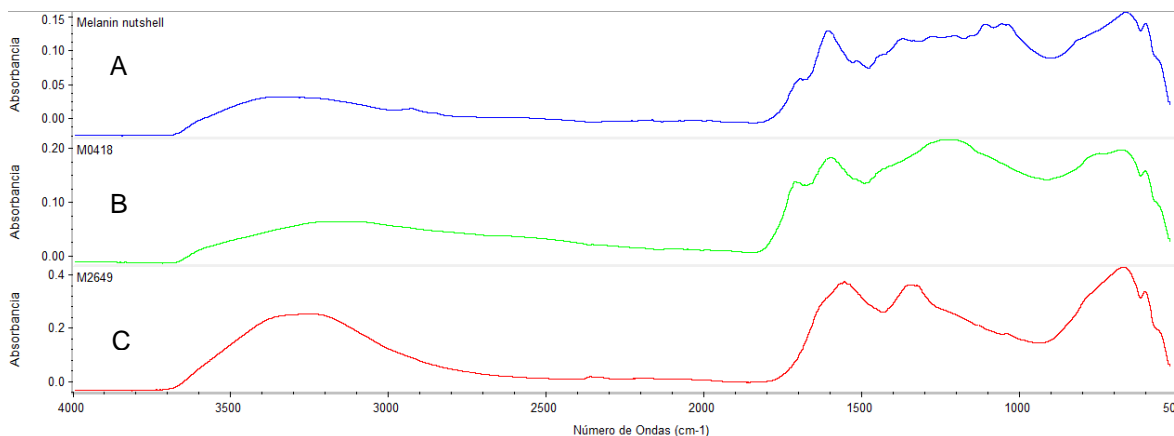


Figura 2. Espectro FTIR-ATR de la melanina extraída a partir de cáscara de nuez (A), comparado con melaninas comerciales de origen sintético (B) y de *Sepia officinalis* (C) marca Sigma Aldrich..

En la Figura 3 se puede observar una fuerte absorción de la melanina disuelta NaOH en el espectro ultravioleta-visible en la región ultravioleta.

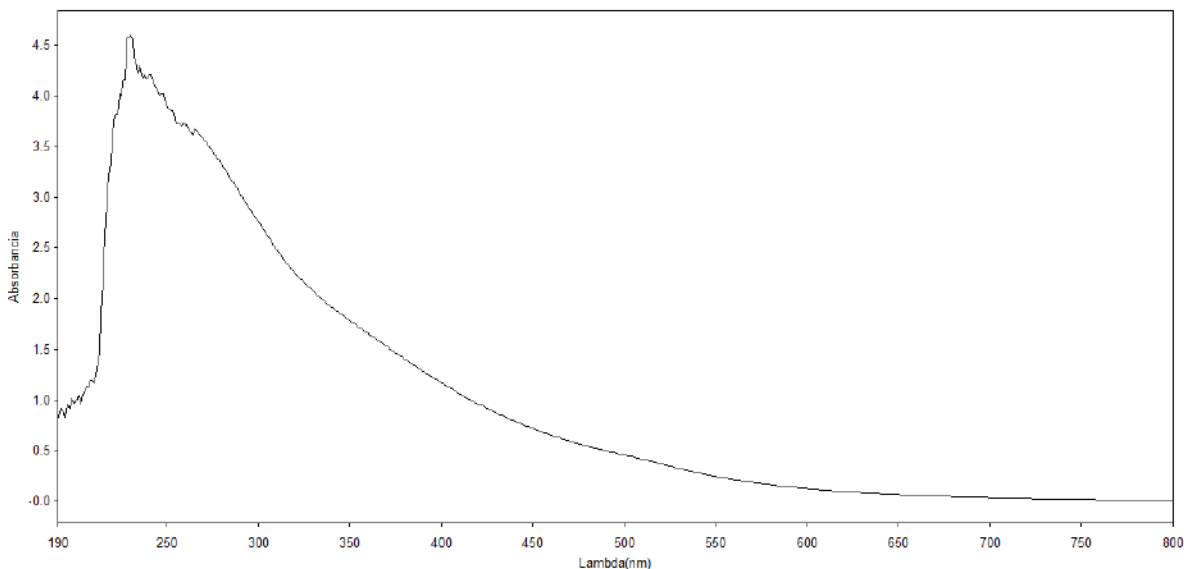


Figura 3. Absorbancia del barrido espectral de 190 a 700 nm de la muestra de melanina en NaOH 0.1 M.

La magnitud del ángulo de obtenido es asociada a la energía de la superficie de los materiales. Un valor de  $\theta < 90^\circ$  representa la superficie que tiene afinidad hacia el líquido, por lo cual, un ángulo de contacto menor a 90 grados es considerado hidrofílico. Mientras que, un valor  $\theta > 90^\circ$  se traduce a una menor afinidad de la superficie con el líquido, por lo cual, se considera hidrofóbico. En las superficies las cuales el ángulo de contacto es mayor a  $140^\circ$  son denominadas superficies superhidrofóbicas.

La Figura 4 muestra los resultados de la medición realizada.

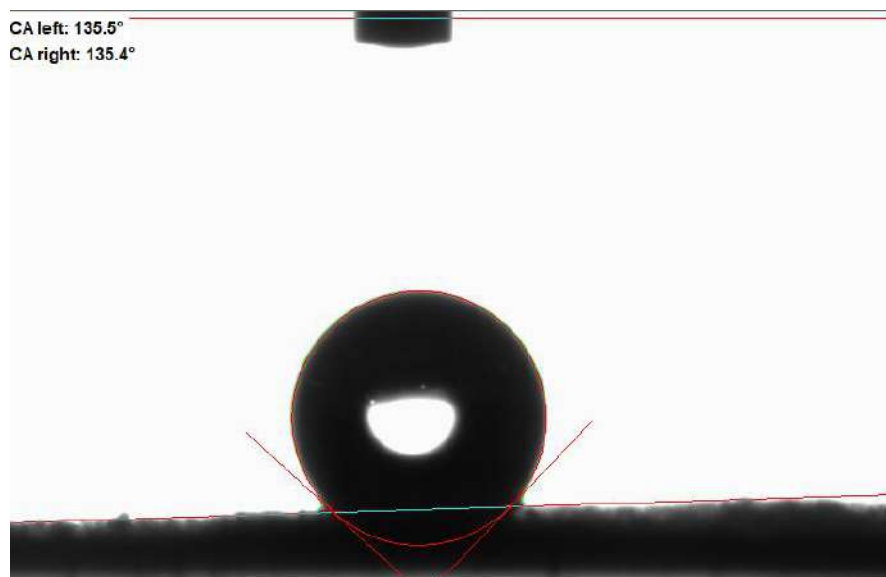


Figura 4. Medición del ángulo de contacto de la melanina molida.

Se muestra en la **Figura 5** sección A la caracterización morfológica de las fibras electrohiladas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de las fibras control (sin melanina) de policaprolactona (PCL) y gelatina, en la sección B se observa las fibras hiladas con melanina al 0.5% y 2.0% en la sección C, así como el equipo de electrohilado en la sección D.



Figura 5. Caracterización morfológica por SEM de las fibras electrohiladas PCL-gel (control) (A) y las fibras con melanina 0.5% (B) y 2.0% (C). Equipo de electrohilado (D).

En la **Figura 6** sección A es posible observar los hongos fitopatógenos aislados en microcultivos al microscopio, en la sección B es posible la visualización de los cultivos axénicos logrados en agar PDA adicionado con antibiótico posterior a una incubación de 7 días y, por último, en la sección C, se aprecia la infección *in vivo* de fresas sanas a través de la realización de los postulados de Koch para corroborar la patogenicidad de los hongos aislado y grado de daño en tejido vivo en un periodo de 7 días a temperatura ambiente, cumpliendo satisfactoriamente cada uno de los postulados descritos.

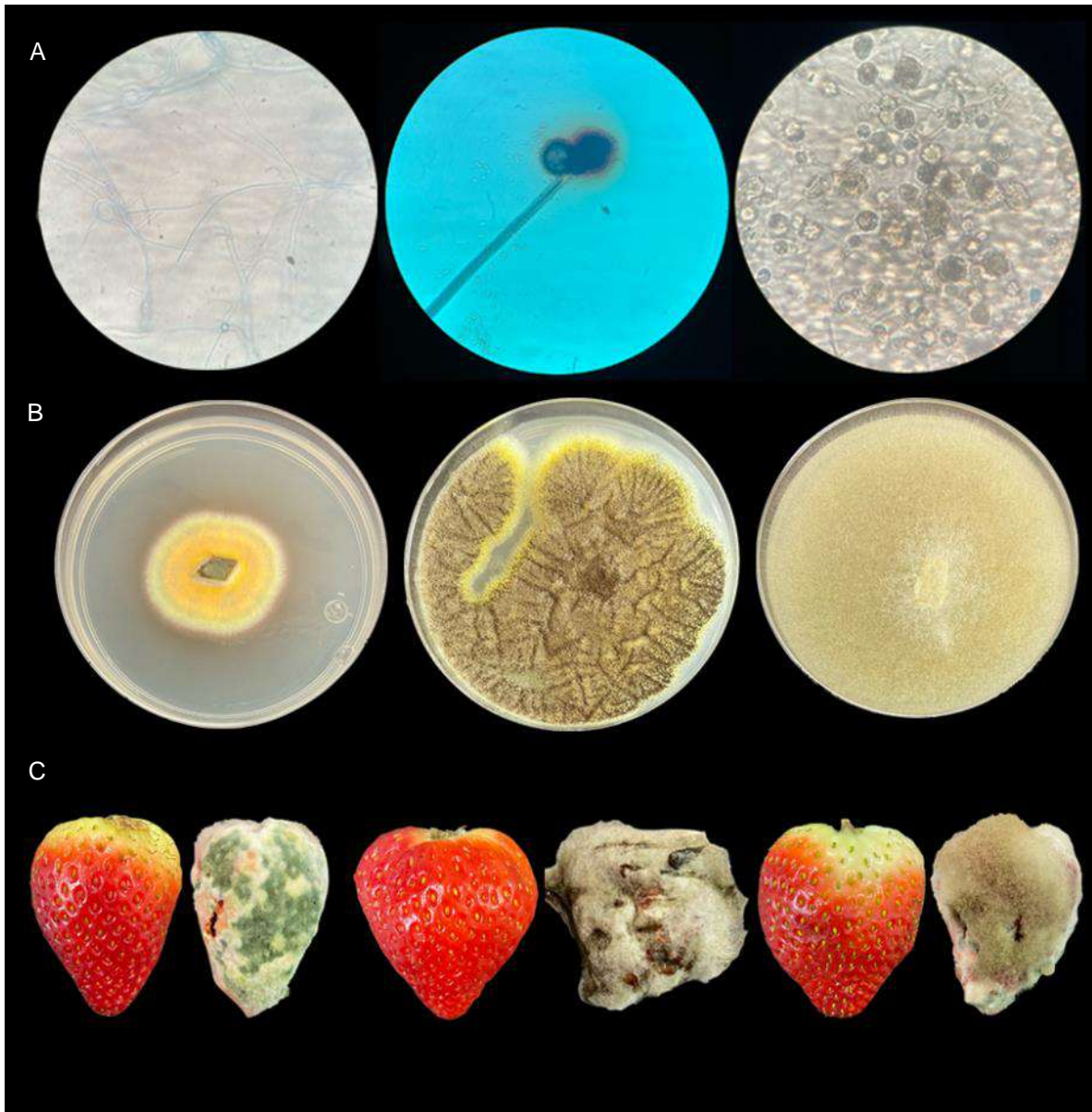


Figura 6. Hongos patógenos aislados a partir de una fresa infectada. Se muestran cultivos axénicos vistos al microscopio (1), en placas de agar papa dextrosa (PDA) (2) y, se observa la infección in vivo (3).

## CONCLUSIONES

El electrohilado, al ser una técnica que no requiere aplicación de altas temperaturas, se adapta a las condiciones específicas de sustancias termolábiles, mismas que incluyen a la melanina, dado que la estructura molecular comienza su degeneración con respecto al incremento de la temperatura a partir de 106,36 °C dando paso al sufrimiento de un daño estructural. Al estructurar una fibra a través de la técnica del electrohilado adicionando melanina extraída a partir de una fuente vegetal, en este caso específico, de la cáscara de nuez, permitirá el aprovechamiento de un residuo no comestible de la nuez que usualmente es desechado. La estructura de la melanina es altamente equiparable con respecto a melanina comerciales de origen sintético y animal, tal como es posible observarlos en los espectros infrarrojos por reflectancia total atenuada. Se pretende la obtención de un empaque funcional, capaz de proveer una barrera protectora del alimento contra factores tales como el calor,

la luz ultravioleta, observando claramente esta actividad en el espectro ultravioleta-visible. El empaque proveerá ventajas competitivas con respecto a los empaques actuales convencionales, generando una opción ante la adición directa de compuestos sintéticos activos en las frutas, anteponiéndose a su vez, a los posibles efectos adversos a la salud de los aditivos alimenticios.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) Secretaría de Desarrollo Agroalimentario y Rural. Diagnóstico Agrologístico del Estado de Guanajuato. [https://sdayr.guanajuato.gob.mx/contenido/adjuntos/evaluaciones/2020/DIAGNOSTICO\\_AGROLOGISTICO\\_DEL\\_ESTADO\\_DE\\_GUANAJUATO.pdf](https://sdayr.guanajuato.gob.mx/contenido/adjuntos/evaluaciones/2020/DIAGNOSTICO_AGROLOGISTICO_DEL_ESTADO_DE_GUANAJUATO.pdf) (accessed 2023-05-14).
- (2) FoodPrint. Food Waste Is a Massive Problem—Here's Why - FoodPrint. <https://foodprint.org/issues/the-problem-of-food-waste/> (accessed 2022-11-16).
- (3) Elik, A.; Yanik, D. K.; Istanbulu, Y.; Guzelsoy, N. A.; Yavuz, A.; Gogus, F. Strategies to Reduce Post-Harvest Losses for Fruits and Vegetables. *International Journal of Scientific and Technological Research* 2019. <https://doi.org/10.7176/jstr/5-3-04>.
- (4) Zhang, C.; Feng, F.; Zhang, H. Emulsion Electrospinning: Fundamentals, Food Applications and Prospects. *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd October 1, 2018, pp 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.005>.
- (5) PROFECO. Evita el desperdicio de alimentos | Procuraduría Federal del Consumidor | Gobierno | gob.mx. <https://www.gob.mx/profeco/documentos/evita-el-desperdicio-de-alimentos?state=published> (accessed 2022-11-16).
- (6) Risch, S. J. Food Packaging History and Innovations. *J Agric Food Chem* 2009, 57 (18), 8089–8092. <https://doi.org/10.1021/jf900040r>.
- (7) Bodbodak, S.; Rafiee, Z. Recent Trends in Active Packaging in Fruits and Vegetables. In *Eco-Friendly Technology for Postharvest Produce Quality*; Elsevier Inc., 2016; pp 77–125. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804313-4.00003-7>.
- (8) Wikström, F.; Williams, H.; Trischler, J.; Rowe, Z. The Importance of Packaging Functions for Food Waste of Different Products in Households. *Sustainability (Switzerland)* 2019, 11 (9). <https://doi.org/10.3390/su11092641>.
- (9) Bhardwaj, N.; Kundu, S. C. Electrospinning: A Fascinating Fiber Fabrication Technique. *Biotechnol Adv* 2010, 28 (3), 325–347. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004>.
- (10) Hemmati, F.; Bahrami, A.; Esfanjani, A. F.; Hosseini, H.; McClements, D. J.; Williams, L. Electrospun Antimicrobial Materials: Advanced Packaging Materials for Food Applications. *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd May 1, 2021, pp 520–533. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.014>.
- (11) Topuz, F.; Uyar, T. Antioxidant, Antibacterial and Antifungal Electrospun Nanofibers for Food Packaging Applications. *Food Research International* 2020, 130. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108927>.
- (12) Cao, W.; Zhou, X.; McCallum, N. C.; Hu, Z.; Ni, Q. Z.; Kapoor, U.; Heil, C. M.; Cay, K. S.; Zand, T.; Mantanona, A. J.; Jayaraman, A.; Dhinojwala, A.; Deheyn, D. D.; Shawkey, M. D.; Burkart, M. D.; Rinehart, J. D.; Gianneschi, N. C. Unraveling the Structure and Function of Melanin through Synthesis. *J Am Chem Soc* 2021, 143 (7), 2622–2637. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c12322>.
- (13) Flores-Estrada, R. A.; Gámez-Meza, N.; Medina-Juárez, L. A.; Castellón-Campaña, L. G.; Molina-Domínguez, C. C.; Rascón-Valenzuela, L. A.; García-Galaz, A. Chemical Composition, Antioxidant, Antimicrobial and Antiproliferative Activities of Wastes from Pecan Nut [*Carya Illinoensis* (Wagenh) K. Koch]. *Waste Biomass Valorization* 2020, 11 (7), 3419–3432. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00681-2>.
- (14) León López, L.; Linda, D.; Guzmán-Ortíz, A.; Abraham, J.; Berumen, G.; Gerardo, C.; Marmolejo, C.; Peña-Cabrales, J. J. Núm. 4 30 de Junio-13 de Agosto. *Rev Mex De Cienc Agric* 2014, 5, 673–686.
- (15) Mariscal-Amaro, L. A.; Rivera-Yerena, A.; Dávalos-González, P. A.; Ávila-Martínez, D. Situación Actual de Hongos Asociados a La Secadera de La Fresa (*Fragaria x Ananassa* Duch.) En Guanajuato, México. *Agrociencia* 2016, 51, 673–681.
- (16) Patiño Vidal, C.; López de Dicastillo, C.; Rodríguez-Mercado, F.; Guarda, A.; Galotto, M. J.; Muñoz-Shugulí, C. Electrospinning and Cyclodextrin Inclusion Complexes: An Emerging

Technological Combination for Developing Novel Active Food Packaging Materials. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2022, 62 (20), 5495–5510. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1886038>.

(17) Roy, S.; Rhim, J. W. New Insight into Melanin for Food Packaging and Biotechnology Applications. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2022, 62 (17), 4629–4655. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1878097>.

(18) Cervantes-Vázquez, M. G.; Orona Castillo, I.; Vázquez Vázquez, C.; Fortis Hernández, M.; Espinoza Arellano, J. D. J. Análisis Comparativo de Huertos de Nuez Pecanera (*Carya Illinoensis* Koch). *Rev Mex De Cienc Agric* 2018, 9 (1), 25–35.

(19) Wei, H.; Chen, Y.; Ouyang, Q.; Liu, S.; Jiang, Y.; Lv, F. Progress in Comprehensive Development and Utilization of Pecan Resources. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* 2021, 705 (1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/705/1/012032>.

(20) Moccia, F.; Agustin-Salazar, S.; Berg, A. L.; Setaro, B.; Micillo, R.; Pizzo, E.; Weber, F.; Gamez-Meza, N.; Schieber, A.; Cerruti, P.; Panzella, L.; Napolitano, A. Pecan (*Carya Illinoensis* (Wagenh.) K. Koch) Nut Shell as an Accessible Polyphenol Source for Active Packaging and Food Colorant Stabilization. *ACS Sustain Chem Eng* 2020, 8 (17), 6700–6712. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c00356>.

(21) Ramos-Espinoza, M. Análisis Paramétrico de Melanina Derivada de Cáscara de Nuez, Instituto Tecnológico Superior de Purísima del Rincón, Purísima del Rincón, 2020.



## CUANTIFICACIÓN DE METALES POR ICP-OES EN PARTÍCULAS ATMOSFÉRICAS EN TABASCO

Diana Laura Domínguez Arcos<sup>1</sup>, María Antonia Lunagómez Rocha<sup>1</sup>, Hermicenda Pérez Vidal<sup>1</sup>, Ana Karina Arias Cruz<sup>1</sup>, Ciro Eliseo Márquez Herrera<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, <sup>2</sup>Universidad Nacional Autónoma de México.

Correo: [182a20190@alumno.ujat.mx](mailto:182a20190@alumno.ujat.mx)

### RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la cuantificación de metales pesados asociadas a las partículas PM10, monitoreadas en el periodo 2020-2021 en 14 muestras de filtros del punto de monitoreo del “Nodo División Académica de Ingeniería y Arquitectura Centro de Investigación de Ciencia y Tecnología Aplicada de Tabasco (CICTAT)”. Para la cuantificación de metales contenidos en PM10, se utilizó un equipo de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES), en esta técnica, se realizó la introducción continua de la muestra líquida y un sistema de nebulización forma un aerosol que es transportado por el Argón a la antorcha del plasma, acoplado inductivamente por radio frecuencia. En el plasma, debido las altas temperaturas generadas, los analitos son atomizados y ionizados generándose los espectros de emisión atómicos de líneas características (Ribón B., 2020). El análisis ICP-OES, cuenta con una gran sensibilidad que permite tener picos no solapados para un mismo metal a longitudes de onda cercanas entre sí y por lo tanto se puede escoger la longitud de onda de medición para cada metal, de tal manera que no exista ninguna interferencia en el análisis, permite obtener una mayor intensidad de lectura y una linealidad en las curvas de calibración construidas que proporciona el equipo (Barsallo, D., *et al.*, 2021) En los filtros muestreados se logró cuantificar un total de 31 metales (As, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mg, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Sr, Ti, Tl, V, Zn, K, Si, Al, B, Ba, Na, Ag, Hg, P, S) por Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES). Las concentraciones de material particulado PM10 (del inglés Particulate Matter) evaluados en un promedio de 24 horas se obtuvieron que Bario y Arsénico rebasaron el límite permisible, encontrándose una concentración 19.71 µg/m<sup>3</sup> para Bario y para Arsénico de 0.019 µg/m<sup>3</sup>, en base a los criterios de Organización mundial de la Salud (OMS) y Criterios de la Calidad del Aire de Canadá en un periodo de 24h. Con objeto de minimizar el impacto ambiental y en la salud es necesario poner en funcionamiento estrategias de control y reducción de las emisiones de material particulado atmosférico. Ante este problema, surge la necesidad de analizar en Tabasco las partículas PM10 con el fin de estudiar y cuantificar los metales en estos tipos de partículas, así como evaluar la calidad de aire.

### INTRODUCCIÓN

Para la cuantificación de metales contenidos en PM10, se hizo uso del equipo de plasma de acoplamiento inductivo (ICP) junto a un espectrofotómetro de emisión óptico (OES) constituye el equipo de ICP-OES, en esta técnica, se realiza la introducción continua de la muestra líquida y un sistema de nebulización forma un aerosol que es transportado por el Argón a la antorcha del plasma, acoplado inductivamente por radio frecuencia. En el plasma, debido las altas temperaturas generadas, los analitos son atomizados e ionizados generándose los espectros de emisión atómicos de líneas características. Los espectros son dispersados por la red de difracción y el detector sensible a la luz se encarga de medir las intensidades de las líneas. La información es procesada por el sistema informático. Los análisis que se ofrecen incluyen prácticamente todos los elementos de la tabla periódica en una amplia variedad de muestras líquidas y sólidas (Ribón, B. 2020).

El material particulado (MP) se ha destacado por el efecto agravantes sobre la salud y el medio ambiente, así como los contaminantes no convencionales los cuales también pueden producir dichos efectos. La presencia de estos contaminantes ocasiona variedad de impactos a la vegetación, materiales y el hombre, entre ellos, la disminución visual, causada por la absorción y dispersión de la luz, problemas de salud como enfermedades cardíacas o pulmonares, asma agravada e incluso infartos de miocardio no mortales (Trelles, R.C. 2018).

### TEORIA

Las partículas (o aerosoles) son una mezcla compleja de sustancias orgánicas e inorgánicas en estado sólido o líquido que permanecen suspendidas en la atmósfera por periodos variables de



tiempo, con características físicas y químicas diversas que dependen de su origen entre los ambientes urbanos y rurales, así como de las fuentes específicas de generación y tipo de precursores (NOM-025-SSA1-2021).

Las partículas atmosféricas se han tratado y definido en función del tamaño de la misma, y son una minoría los estudios que identifican diversos tipos de partículas; y menos aún, los que identifican los tipos de partículas en función de sus características individuales en conjunto, es decir, "tamaño morfología-composición química". Lo que se medía únicamente cuando se comenzó a medir los niveles de partículas atmosféricas era la concentración del polvo atmosférico como partículas suspendidas totales (PST), y esto todavía bajo un gran desconocimiento del enorme daño a la salud que representan las partículas más finas (Aragón, A. 2011).

El objeto de un intenso estudio en los últimos años han sido los efectos sobre la salud del material particulado. En particular, las investigaciones epidemiológicas y toxicológicas han buscado establecer los componentes químicos principalmente responsables de la toxicidad de las partículas y con frecuencia han implicado al contenido de metales como un posible componente nocivo de las PM (Almeida., et al., 2015).

Características de las partículas atmosféricas.

Las partículas atmosféricas cuentan con muchas propiedades en las cuales se pueden incluir el tamaño de partícula y la forma de ellas mismas, los cuales pueden influir de manera muy importante en su comportamiento en el aire, sus efectos sobre la salud y medio ambiente. En estas propiedades podemos mencionar:

- ✓ Forma: La forma de estas van afectar su resistencia aerodinámica además de su área de superficie. Las formas de las partículas pueden ser prismáticas, esféricas, cúbicas, escamosas, fibrilares, de bastón, agregadas o floculares.
- ✓ Superficie: Esta puede variar según el cuadrado del diámetro. Sin embargo, en cuestión de los aerosoles con concentración de masa dada, la superficie total de este aumenta de manera inversamente proporcional al tamaño de las partículas. Ahora bien, en el caso de las partículas no esféricas, agregadas, con hendidura o poros internos, la relación de la superficie respecto al volumen puede ser mucho mayor que para las esferas.
- ✓ Volumen: Varía según el cubo del diámetro, por tanto, las partículas más grandes de un aerosol tienden a dominar su concentración de volumen (masa).
- ✓ Densidad: La velocidad de una partícula en respuesta a fuerzas gravitatorias o de inercia aumenta según la raíz cuadrada de su densidad.
- ✓ Velocidad de sedimentación terminal: Velocidad de equilibrio de una partícula que cae baja lo influencia de la gravedad y la resistencia de un líquido.
- ✓ Diámetro aerodinámico: En esta el diámetro de una esfera de densidad uno que tiene la misma velocidad de sedimentación terminal que la partícula en estudio es igual a su diámetro aerodinámico (Arias, R. 2019).

Metales en material particulado.

Los componentes tóxicos de las partículas son mezclas complejas de sólidos o líquidos con diferentes características (por ejemplo, masa, número, tamaño, forma, área superficial, composición química, acidez, solubilidad). Los componentes químicos pueden estar ubicados en la superficie o dentro de la partícula. Uno de los componentes adheridos a las pequeñas partículas son los metales que provienen de las impurezas derivadas de los aditivos de los combustibles y del desgaste de los frenos y neumáticos. Los metales de transición son generados por emisiones que no son de escape, impurezas en aditivos de combustible o procesos metalúrgicos. El hierro (Fe), el níquel (Ni), el vanadio (V), el cromo (Cr) y el cobre (Cu) son considerados debido a su potencial para producir Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en sistemas biológicos. Otros como el zinc (Zn) también pueden ejercer efectos tóxicos por otros mecanismos además de la producción de ROS. Los metales pesados como el cadmio, el plomo y el mercurio son algunos de los contaminantes atmosféricos más comunes emitidos por las actividades industriales, la combustión, la extracción y las actividades de procesamiento (Fortoul, T.I., et al., 2015).

Daños de los metales a la salud.

Los metales pesados pueden incorporarse al cuerpo humano a través del agua potable, ya sea por ingestión o por absorción dérmica durante una ducha o baño. Adicionalmente, pueden ser ingeridos, inhalados o absorbidos dérmicamente a partir de las partículas de polvo resuspendidas que

proviene de los suelos de áreas contaminadas (p. ej., superficies viales); y pueden actuar como potentes tóxicos tanto para los seres humanos (cancerígenos) como para los ecosistemas, según cuáles sean sus vías y tiempo de exposición, la dosis absorbida y la naturaleza química del metal pesado. (Zafra, C.A., et al, 2012).

El diagnóstico de los efectos en la salud de los metales pesados puede ser difícil si no hay evidencia previa de la fuente de exposición, mientras que las exposiciones agudas generalmente ocurren en el lugar de trabajo y se identifican más fácilmente, los signos y síntomas difieren dentro de los metales porque cada uno interactúa con diferentes dianas como: proteínas específicas de unión a metales (metalotioneínas, transferrina, ferritina, ceruloplasmina) en casos como Cd, Cu, Hg, Ag, Mn, Zn, Al y Se, proteínas transportadoras de membrana (transportadores de fosfato y sulfato), transportadores de cationes divalentes, algunos ejemplos son V, Cr, Mo, Se (Fortoul, T.I., et al., 2015).

Se han informado cambios en la ultraestructura de la célula bronquial no ciliada (NCBC) después de la inhalación de Pb junto con hipertrofia celular, estructuras similares a verticilos y desorden de crestas mitocondriales. El NCBC también fue el objetivo de la inhalación combinada de Cd y Pb. La exposición a partículas suspendidas (PM) aumenta el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, tanto a corto como a largo plazo. Los mecanismos propuestos incluyen inflamación y la inducción de hipercoagulabilidad, estrés oxidativo y disfunción endotelial.

Los metales pueden promover la carcinogénesis, a través de varias vías, tales como: producir daño en el ADN, activar diferentes vías de señalización que conducen a la progresión del tumor y promover la inflamación (Fortoul, T.I., et al., 2015).

Normas de los metales.

Los valores permisibles de los metales están de acuerdo a los estándares nacionales de calidad de aire y estándares de organismos internacionales: OMS y Canadá. Dada a la importancia de los daños que pueden causar estos metales a la salud es importante conocer los límites establecidos para cada uno de estos (Romero, D.G. 2020).

En la tabla 1 se observan los estándares nacionales e internacionales para contaminantes criterios de algunos metales según la Organización Mundial de la Salud y Criterios de Calidad del Aire Ambiente de Canadá.

Tabla 1. Estándares nacionales e internacionales para contaminantes criterio.

<b>Metal</b>	<b>OMS <sup>(1)</sup> (µg/m<sup>3</sup>) Promedio de 24 h</b>	<b>Canadá <sup>(2)</sup> (µg/m<sup>3</sup>) Promedio de 24 h</b>
<b>Calcio</b>	-	35
<b>Cromo</b>	0.2	0.00035
<b>Cobre</b>	-	50
<b>Hierro</b>	-	4.0
<b>Litio</b>	-	2.5
<b>Magnesio</b>	-	35
<b>Molibdeno</b>	-	120
<b>Vanadio</b>	1.0	2.0
<b>Zinc</b>	-	120
<b>Silicio</b>	-	5.0
<b>Boro</b>	-	120
<b>Bario</b>	-	10
<b>As</b>	0.01	-

(1) Air Quality Guidelines for Europe- WHOROEC 2000.

(2) Ambient Air Quality Criteria- Canadá.

(Promedio de 24 h).

Normas oficiales mexicanas.

Actualmente para efectos de protección de la salud existen NOM en las cuales se han establecido los límites permisibles para las concentraciones ambientales de las PM10 como de las PM2.5 y PST, en la siguiente tabla (ver tabla 2) podremos observar las especificaciones de las NOM vigentes.

Tabla 2. Especificaciones de las NOM vigentes

Norma	Contaminante	LMP NOM <sup>1</sup>
<p><b>NOM-025-SSA1-2014.</b> Salud ambiental. Valores límites permisibles para la concentración de partículas suspendidas PM10 y PM2.5 en el aire ambiente y criterios para su evaluación</p>	<p>Partículas PM<sub>10</sub></p>	<p>Promedio 24 horas: 75 µg/m<sup>3</sup></p>
		<p>Promedio anual: 40 µg/m<sup>3</sup></p>
	<p>Partículas PM<sub>2.5</sub></p>	<p>Promedio 24 horas: 45 µg/m<sup>3</sup></p>
		<p>Promedio anual: 12 µg/m<sup>3</sup></p>
<p><b>NOM-024-SSA1-1993.</b> "Salud Ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente, con respecto a las (PST). Valor permisible para la concentración de (PST) el aire ambiente, como medida de protección a la salud de la población"</p>	<p>PST</p>	<p>Promedio 24 horas: 260 µg/m<sup>3</sup></p>
		<p>Promedio anual: 75 µg/m<sup>3</sup></p>

<sup>1</sup>Límite máximo permisible correspondiente a cada una de las NOM.

Espectroscopia de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-OES).

La ICP-OES se basa en la emisión espontánea de fotones de los átomos que han sido excitados por un plasma de argón de alta temperatura (6800 k), cuya señal es característica de cada elemento y en ciertas condiciones proporcional a la concentración (Jiménez, M.E., et al., 2020).

Es una técnica de análisis multielemental capaz de determinar y cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica, a excepción de C, N, O, H, F, gases nobles, algunas tierras raras y otros elementos poco frecuentes, en concentraciones que van desde % hasta ppm (µg/L). Las muestras son introducidas en forma líquida, transformadas mediante un nebulizador en un aerosol y excitadas mediante un plasma de argón. Las emisiones de los átomos excitados se recogen mediante un sistema óptico basado en un policromado combinado con detectores CCD, obteniendo espectros de emisión para las líneas seleccionadas en cada elemento. Para poder llevar a cabo la transformación de la muestra en especie medible (forma líquida), podemos aplicar la digestión por vía húmeda mediante disolución ácida (microondas) o la mineralización por vía seca mediante fusión alcalina (Instituto De Catálisis Y Petroleoquímica, 2019).

**PARTE EXPERIMENTAL**

Los filtros utilizados fueron proporcionados por la Red Multi-institucional del estado de Tabasco del “Nodo División Académica de Ingeniería y Arquitectura”. El monitoreo se lleva a cabo de acuerdo con la NOM-025-SSA1-2014 y NOM-035-ECOL-1993, como se describe a continuación.

**Monitoreo de las partículas PM10**

Se llevó a cabo el monitoreo de las partículas PM10 en un equipo de alto volumen (High Volume PM10 Air Sampler), de la estación UJAT-DAIA ubicada en el municipio de Cunduacán Tabasco, marca Thermo Scientific, modelo HIVOL-AMBEE, AMBE.

**Cálculos de las concentraciones de PM10 por el filtro.**

Para calcular el promedio de 24 horas de cada día es necesario un mínimo de 75% de las concentraciones horarias válidas (NOM-025-SSA1-2014).

Para la obtención del promedio aritmético de 24 horas se realizarán los cálculos de acuerdo a la Ec. 1 ecuación:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Ec. 1

Donde:

$\bar{x}$  = promedio de 24 horas.

$n$  = número de concentraciones horarias válidas ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ).

$x_i$  = concentraciones horarias válidas.

**Determinación de metales por Espectroscopia de Emisión óptica de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES).**

La preparación de los filtros se llevó a cabo haciendo uso del Compendio Método IO-3.1: Selección, preparación y extracción de material del filtro. (EPA) (AGENCIA DE PROTECCIÓN AMBIENTAL DE ESTADOS UNIDOS DE NORTE AMERICA), así como de la NOM-025-SSA1-2014.

Procedimientos en base al compendio:

Preparación de los filtros para determinar los metales.

Los filtros utilizados fueron proporcionados por la Red Multiinstitucional del “Nodo División Académica de Ingeniería y Arquitectura, Centro de Investigación de Ciencias y Tecnología Aplicada de Tabasco”.

Los filtros proporcionados se recibieron doblados por la mitad a lo largo con el material particulado hacia adentro y dentro de sobres protectores.

Para el manejo y corte de los filtros fue necesario hacer uso de guantes en todo momento y utilizar una herramienta de corte como se describe en el Método Federal de Referencia para el plomo, obteniendo así tiras de “1x8” del filtro de 8”x10”, que fueron colocadas dentro de sobres protectores para su posterior uso.

**Aseguramiento de calidad.**

Para llevar a cabo el control de calidad se realizó la preparación de tres estándares, los cuales fueron Quality Control Standard 21, Quality Control Standard 7A y Standard Reference Material 1648 (Urban Particulate Matter). SRM NIST 1648. El procedimiento será el siguiente:

- a) Cortar 3 tiras de filtros de fibra de cuarzo para aire ambiente nuevos con dimensiones de 1”x8” como blancos.
- b) Pesar las tiras de los filtros y colocarlas en vasos de precipitados, haciendo uso en todo momento de guantes de vinilo, nombrarlas como Blanco 1, Blanco 2 y Blanco 3.
- c) Colocar en el Blanco 1, 0.2 mL del Quality Control Standard 21, 0.2 mL del Quality Control Standard 7A al Blanco 2 y 0.05 g del Standard Reference Material 1648 (Urban Particulate Matter) al Blanco 3.
- d) A cada uno de los blancos preparados se les colocará 10 mL de ácido de extracción ( $\text{HNO}_3/\text{HCl}$ ) previamente preparado, para posteriormente realizar la extracción con ácido caliente. Estos filtros nos servirán como blancos de control.

**Extracción con ácido caliente.**

a) Usar guantes de vinilo o fórceps de plástico, recuperar la tira del filtro anteriormente cortada y colóquela en un vaso de precipitados Griffin de 150 mL etiquetado. Coloque la tira del filtro en la

parte inferior del vaso de precipitados para asegurarse de que el volumen de ácido cubra todo el filtro.

b) Agregar con ayuda de una pipeta 10 mL de ácido de extracción (HNO<sub>3</sub>/HCl) previamente preparado para el análisis (el ácido debe cubrir la tira por completo).

c) Colocar el vaso de precipitados sobre la placa caliente, contenido en una campana de flujo, y refluya suavemente mientras se cubre con un vidrio de reloj durante 30 min. No permita que la muestra se seque. Retire los vasos de precipitados de la placa caliente y deje que se enfríen.

d) Enjuagar las paredes del vaso y lavar con agua desionizada. Agregue aproximadamente 10 mL de agua reactiva al material de filtro restante en el vaso de precipitados y deje reposar durante al menos 30 minutos. Este paso crítico no debe eliminarse; permite que el ácido se difunda desde el filtro hacia el enjuague.

e) Transferir el líquido de extracción del vaso de precipitados a un matraz aforado de 20 ml u otro recipiente graduado. Enjuague el vaso de precipitados y cualquier material sólido restante con agua Tipo I y agregue los enjuagues al matraz. Algunos sólidos del filtro pueden transferirse al matraz con los enjuagues; esto es aceptable. Diluir hasta la marca con agua Tipo I y agitar.

f) Verter en tubos Falcón estériles etiquetados y en tubos de 15 mL dispense 10 mL de la muestra para llevar a centrifugar.

g) El volumen de extracción final es de 20 mL según el procedimiento anterior. La muestra filtrada ya está lista para el análisis.

Preparación de estándares.

Se realizó la preparación de estándares a concentraciones de 0.1 ppm, 1 ppm, 10 ppm, para realizar el análisis de los metales en el equipo de ICP-OES.

Los estándares a utilizados fueron Estándar 21 y 7<sup>a</sup>, Estándar (Urban Particulate Matter). SRM NIST 1648.

Para realizar el preparado de las concentraciones se despeja la formula  $V_1C_1=V_2C_2$  quedando así de la siguiente manera la Ec.2:

$$V_2 = \frac{V_1 C_1}{C_2}$$

Ec. 2

#### Análisis de las muestras por ICP-OES.

De acuerdo con el Compendio Método IO-3.5. Determinación de metales en materia de partículas ambientales.

a) Encender el equipo y dejar que se caliente.

b) Las muestras de extracción deben estar contenidas en tubos de centrifuga de 15 mL.

c) Iniciar la configuración operativa del instrumento. Sintonizar y calibrar el equipo para los analitos de interés.

d) Ordenar las muestras y realizar la base de datos en el software del equipo.

e) Establezca los procedimientos de ejecución del software del instrumento para el análisis cuantitativo.

f) Utilizar un blanco para enjuagar el sistema entre muestras. Permita suficiente tiempo para eliminar los rastros de la muestra anterior o un mínimo de 1 min. Aspire las muestras durante 30 s. antes de la recopilación de datos.

g) Las muestras que tengan concentraciones superiores al rango dinámico lineal establecido deben diluirse en el rango y volver a analizarse.

h) Finalmente observar los gráficos obtenidos y guardar los resultados para posteriormente realizar los cálculos necesarios.

## RESULTADOS

El monitoreo de las partículas atmosféricas se llevó a cabo durante los años 2020-2021, en la tabla 3 podemos observar las concentraciones de PM<sub>10</sub> por fecha de monitoreo de los 14 filtros muestreados en los años ya mencionados, en los cuales se encontró que solo en uno de ellos con fecha 29-jun-2020 se rebasó el límite permisible en base a la NOM-025-SSA1-2014, ya que esta establece un límite de 75µg/m<sup>3</sup> en un promedio de 24 horas.

Tabla 3. Concentración de PM<sub>10</sub> por fecha de monitoreo.

N° de folio	Fecha.	Concentración µg/m <sup>3</sup>
1	28-ene-20	55.56
2	24-feb-20	40.92
3	13-mar-20	38.36
<b>4</b>	<b>29-jun-20</b>	<b>156.86</b>
5	05-jul-20	47.47
6	28-ago-20	60.17
7	09-sep-20	52.46
8	03-oct-20	16.24
9	26-nov-20	45.37
10	02-dic-20	40.15
11	26-dic-20	13.34
12	01-ene-21	39.23
13	15-feb-21	45
14	27-feb-21	14

En la cuantificación de los 31 elementos (As, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mg, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Sr, Ti, Tl, V, Zn, K, Si, Al, B, Ba, Na, Ag, Hg, P, S) por Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES), solo Ba y As rebasaron el límite permitido (Tabla 1), de acuerdo a los criterios los criterios establecidos por la OMS y criterios de calidad del Aire de Canadá.

En las siguientes tablas (ver tabla 4.1, 4.2 y 4.3) podemos observar las concentraciones de los 31 elementos cuantificados mediante la técnica ICP-OES, de los cuales se encuentran remarcados en rojo aquellos que rebasaron los criterios de calidad del aire.

Tabla 4.1 Concentraciones de los elementos cuantificados mediante la técnica de ICP-OES.

FECHA	As µg/m <sup>3</sup>	Be µg/m <sup>3</sup>	Ca µg/m <sup>3</sup>	Cd µg/m <sup>3</sup>	Co µg/m <sup>3</sup>	Cr µg/m <sup>3</sup>	Cu µg/m <sup>3</sup>	Fe µg/m <sup>3</sup>	Li µg/m <sup>3</sup>	Mg µg/m <sup>3</sup>
28/01/2020	-0.00137	0.00000	5.25859	0.00093	-0.00451	0.00255	0.01269	0.23457	0.00382	0.47859
24/02/2020	0.00294	0.00016	7.14320	0.00100	-0.01241	0.00384	0.00210	0.26835	0.00363	0.71233
13/03/2020	0.00363	0.00000	6.33643	0.00070	-0.01450	0.00437	0.01813	0.30372	0.00328	0.77468
29/06/2020	0.00057	0.00007	4.42224	0.00025	-0.00871	0.00383	0.00391	1.97337	0.00261	0.99488
05/07/2020	0.00416	0.00000	4.37064	0.00039	-0.01116	0.00296	0.00937	0.76061	0.00245	0.68901
28/08/2020	0.00051	0.00000	7.30735	0.00074	-0.02432	0.00462	0.04587	1.37273	0.00360	1.02776



09/09/2020	0.00380	0.00000	5.57116	0.00072	-0.00809	0.00331	0.06508	0.31526	0.00531	0.75939
03/10/2020	0.00268	0.00000	4.80416	0.00049	-0.01750	0.00377	0.01339	0.14087	0.00430	0.50241
26/11/2020	0.00463	0.00000	4.01313	0.00018	-0.01733	0.00245	0.00606	0.18656	0.00200	0.63817
02/12/2020	0.00373	0.00012	1.19873	0.00016	-0.00468	0.00039	0.00039	0.10573	0.00224	0.20419
26/12/2020	0.00688	0.00000	4.86258	0.00023	-0.01956	0.00107	0.00767	0.25252	0.00203	0.66442
01/01/2021	<b>0.01934</b>	0.00000	3.22711	0.00141	-0.01326	0.00107	0.00955	0.19936	0.00344	0.52968
15/02/2021	0.00537	0.00000	2.91682	0.00045	-0.00700	0.00126	0.02782	0.20281	0.00176	0.59222
27/02/2021	0.00246	0.00000	4.06898	0.00039	-0.01669	0.00089	0.01295	0.15924	0.00167	0.61426

Tabla 4.2 Concentraciones de los elementos cuantificados mediante la técnica de ICP-OES.

FECHA	Mn µg/m <sup>3</sup>	Mo µg/m <sup>3</sup>	Ni µg/m <sup>3</sup>	Pb µg/m <sup>3</sup>	Sb µg/m <sup>3</sup>	Se µg/m <sup>3</sup>	Sr µg/m <sup>3</sup>	Ti µg/m <sup>3</sup>	Tl µg/m <sup>3</sup>	V µg/m <sup>3</sup>
28/01/2020	0.00808	-0.00078	-0.00103	0.00220	0.00333	0.00490	0.18920	0.00573	0.00191	-0.00078
24/02/2020	0.00883	-0.00037	-0.00189	0.00205	0.00610	-0.00247	0.26524	0.00584	-0.00142	-0.00305
13/03/2020	0.00799	-0.00044	-0.00144	-0.00157	0.00415	-0.00363	0.21113	0.02123	-0.00131	-0.00148
29/06/2020	0.05636	-0.00055	0.00119	0.00007	-0.00129	0.00107	0.11200	0.02964	0.00030	0.00348
05/07/2020	0.02077	-0.00039	0.00035	-0.00047	0.00148	0.00517	0.14973	0.01132	0.00058	-0.00039
28/08/2020	0.03157	-0.00115	0.00083	0.00263	0.00078	-0.00148	0.24261	0.02174	0.00332	-0.00074
09/09/2020	0.01005	-0.00049	0.00034	0.00011	0.00098	0.00331	0.19459	0.00508	0.00056	-0.00286
03/10/2020	0.00498	-0.00094	-0.00102	-0.00283	0.00053	0.00502	0.18684	0.00294	0.00011	-0.00343
26/11/2020	0.00548	-0.00031	0.00000	-0.00321	0.00437	-0.00102	0.14491	0.00254	-0.00013	-0.00339

02/12/2020	0.00318	-0.00086	-0.00153	-0.00153	-0.00251	0.00039	0.13229	0.00094	0.00212	-0.00475
26/12/2020	0.00693	-0.00107	-0.00051	-0.00237	-0.00310	0.00310	0.16581	0.00355	0.00288	-0.00581
01/01/2021	0.00757	-0.00050	-0.00115	0.04425	0.00558	0.00256	0.11846	0.00390	0.00264	-0.00233
15/02/2021	0.00691	-0.00113	-0.00095	-0.00190	0.00077	-0.00117	0.08973	0.00312	0.00285	-0.00275
27/02/2021	0.00553	-0.00106	-0.00050	-0.00519	-0.00274	0.00525	0.14105	0.00184	0.00285	-0.00592

Tabla 4.3 Concentraciones de los elementos cuantificados mediante la técnica de ICP-OES.

FECHA	Zn µg/m <sup>3</sup>	K µg/m <sup>3</sup>	Si µg/m <sup>3</sup>	Al µg/m <sup>3</sup>	B µg/m <sup>3</sup>	Ba µg/m <sup>3</sup>	Na µg/m <sup>3</sup>	Ag µg/m <sup>3</sup>	Hg µg/m <sup>3</sup>	P µg/m <sup>3</sup>	S µg/m <sup>3</sup>
28/01/2020	12.89537	15.05164	1.56701	5.17021	10.22039	4.34521	-0.21566	0.00000	-0.20478	-0.08549	-12.13886
24/02/2020	17.57899	20.68387	2.37298	8.99190	16.53138	<b>10.83556</b>	-0.23148	0.00016	-0.18936	-0.08782	-25.72915
13/03/2020	14.19425	16.93027	1.70492	7.57839	14.22823	<b>12.34210</b>	-0.19226	0.00000	-0.24533	-0.08028	-1.11853
29/06/2020	6.61702	8.40648	2.06646	4.03247	6.93573	8.42089	-0.10954	0.00015	-1.65882	-0.01311	-13.60819
05/07/2020	10.00269	11.72731	1.59636	5.00053	9.10771	9.78618	-0.17120	0.00035	-0.59380	-0.02178	-5.45537
28/08/2020	15.41374	18.77550	2.79420	8.80658	15.93422	<b>19.71599</b>	-0.20315	0.00028	-1.18559	-0.10504	-14.06561
09/09/2020	12.89830	15.57227	1.59345	6.72387	12.26139	6.97529	-0.16568	0.00000	-0.28086	-0.02469	-5.79176
03/10/2020	12.52879	14.93670	1.48810	6.52045	12.46762	<b>14.03074</b>	-0.16602	0.00023	-0.08659	-0.07204	-1.08809
26/11/2020	10.84086	13.05810	1.49034	5.63799	11.20159	<b>13.96591</b>	-0.19609	0.00027	-0.15774	-0.08214	-2.52132
02/12/2020	3.28519	11.96550	0.20533	1.69599	3.33816	4.33595	-0.17296	0.00071	-0.03210	-0.08459	-5.86928
26/12/2020	12.30132	14.53920	1.76780	6.45899	12.48387	<b>15.94692</b>	26.18766	-0.00017	-0.22348	-0.11749	-25.94422
01/01/2021	8.63599	13.37999	1.14893	4.70009	8.37568	<b>10.77799</b>	-0.16822	0.00011	-0.15893	-0.06760	-2.54007

15/02/ 2021	6.677 85	8.237 39	0.74 310	2.34 356	5.419 16	6.311 28	15.90 965	- 0.00 068	- 0.18 823	- 0.10 712	- 11.54 190
27/02/ 2021	10.74 036	12.84 040	1.41 361	4.86 080	10.01 184	<b>13.73</b> <b>006</b>	22.44 377	- 0.00 084	- 0.08 026	- 0.12 737	- 2.529 05

## CONCLUSIONES

Solo un día se rebaso el límite permisible de PM10. En la cuantificación de los metales estudiados, Bario y Arsénico, estuvieron por arriba de los límites permitidos en base a los criterios de la OMS y Criterios de la Calidad del Aire de Canadá en un periodo de 24h.

## BIBLIOGRAFÍAS

- Almeida, S. M., Lage, J., Fernández, B., Garcia, S., Reis, M. A., & Chaves, P. C. (2015). Chemical characterization of atmospheric particles and source apportionment in the vicinity of a steelmaking industry. *Science of The Total Environment*, 521-522, 411-420.
- Aragón, A. (2011). ¿Cómo son las partículas atmosféricas antropogénicas y cuál es su relación con los diversos tipos de fuentes contaminantes? Copyright.
- Barzallo, D., Vera, H., Gavin, C., & Lazo, R. (2021). Determinación simultánea de metales traza en muestras de suelo mediante espectrometría de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES). *Ecuadorian Science Journal*, Vol. 5 (4), 130-139.
- Diario Oficial de la Federación (2014). NORMA Oficial Mexicana NOM-025-SSA1-2014, Salud ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente, con respecto a las partículas suspendidas PM10 y PM2.5. Valores normados para la concentración de partículas suspendidas PM10 y PM2.5 en el aire ambiente, como medida de protección a la salud de la población. (s.f). DOF-Diario Oficial de la Federación. Recuperado 10 de mayo de 2023, de [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5357042&fecha=20/08/2014#gsc.tab=0](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5357042&fecha=20/08/2014#gsc.tab=0)
- Fortoul, T. I., Rodríguez-Lara, V., Gonzalez-Villalva, A., Rojas-Lemus, M., Colin-Barenque, L., Bizarro-Nevares, P., García-Peláez, I., Ustarroz-Cano, M., López-Zepeda, S., Cervantes-Yépez, S., López-Valdez, N., Meléndez-García, N., Espinosa-Zurutuza, M., & Cano-Rodríguez, G. C.-G. and M. C. (2015). Health Effects of Metals in Particulate Matter. En Health Effects of Metals in Particulate Matter. IntechOpen.
- Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (2019). Espectroscopia de Emisión Atómica ICP-OES (2da Ed.) Consejo Superior de la Investigación Científica.
- Jiménez, M.E., Endara, A.M., & Solórzano, H.P. (2020). Plasma acoplado Inductivamente en Espectroscopia de emisión óptica (ICP-OES). Recimund: Revista científica Mundo de la Investigación y el conocimiento, vol. 4 (4), 2-12.
- L. Cheney, James; F. Davis, Michael; Elkins Jr., Joseph B.; G. Lewis, Robert; A. Manning, Justice; A. McClenny, William; F. McElroy, Frank y T. William. (1999). Compendium Method IO-3-1. Selection, preparation and extraction of filter material. Environmental Protection Agency (EPA).
- Ribón, B. (2020) Espectroscopia de Plasma ICP-OES. Laboratorio de Técnicas Instrumentales UVA. Recuperado el 16 de febrero del 2023: <https://laboratorioteccnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/espectroscopia-de-plasma-icp-oes>
- Romero, D.G. (2020). Análisis por icp-oes de metales en filtros de material particulado (pm10) en tabasco. [Tesis de licenciatura, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco].
- Trelles, R.C. (2018). Determinación del material particulado (pm10 y pm 2.5), dióxido de azufre (so2), dióxido de nitrógeno (no2) y monóxido de carbono (CO) en el distrito de Ocoruro provincia Espinar región Cusco. [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional de San Agustín. Facultad de Ingeniería de Procesos].
- Zafra, C. A., Rodríguez, L. G., & Cabrera, Y. A. (2013). Metales pesados asociados con las partículas atmosféricas y sedimentadas de superficies viales: Soacha (Colombia). *Revista Científica*, 17(1), 113-124.

## SINTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOESTRUCTURAS HÍBRIDAS DE $\text{TiO}_2@SiO_2$ -PABA

Maria Luz Carrera Jota<sup>1\*</sup>, Ernesto Rivera Becerri<sup>2</sup>, Margarita García Hernández<sup>3</sup>, Ángel de Jesús Morales Ramírez<sup>1</sup>, Teresita del Refugio Jiménez Romero<sup>1</sup>, Gelen Gómez Jaimes<sup>4</sup>, Carlos Felipe Hernández Fuentes<sup>5</sup>

<sup>1</sup>ESIQIE-IPN, Unidad Profesional Adolfo López Mateo, Av. Miguel Bernard S/N, Col. Zacatenco, Del. Gustavo A. Madero, C.P.: 07738, Ciudad de México, México.

<sup>2</sup>Departamento de Ciencias Naturales, DCNI, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa, Av. Vasco de Quiroga 4871, Col. Santa Fe, Del. Cuajimalpa de Morelos, C.P. 05300. Ciudad de México – México.

<sup>3</sup>CEcyT 16-IPN, Kilómetro 1.500, Actopan - Pachuca, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo.

<sup>4</sup>Instituto de Nanotecnología KIT, Campus Norte. Edificio principal 640 y edificio 717. Hermann-von-Helmholtz-Platz 1. 76344 Eggenstein-Leopoldshafen. Alemania.

<sup>5</sup>ESIME-IPN, Unidad Profesional, Av. Luis Enrique Erro, Adolfo López Mateos S/N, Zacatenco, Gustavo A. Madero, 07738 Ciudad de México

### RESUMEN

Uno de los principales problemas en el área de la salud es la baja eficiencia que presentan los sistemas de administración de fármacos usados actualmente. Como resultado en los últimos años se ha incrementado el interés en el desarrollo de nuevos vehículos de administración, destacando el uso de materiales a base de dióxido de silicio y dióxido de titanio, estos materiales se han reportado como biocompatibles, no tóxicos, y químicamente estables, además presentan una superficie químicamente funcionalizable debido a su área superficial, lo cual da lugar a la actividad biológica. En el presente trabajo se obtuvieron nanopartículas de  $\text{TiO}_2@SiO_2$  por el proceso sol-gel y mediante la esterificación de Fisher se llevó a cabo la incorporación del ácido *para*-aminobenzoico (PABA) el cual se usó como un modelo de fármaco en los sistemas nanoestructurados de  $\text{TiO}_2@SiO_2$ . Las nanopartículas de dióxido de titanio y silicio se obtuvieron a partir de diisopropóxido de titanio (DIPOT) y tetraetilortosilicato (TEOS). Las relaciones molares empleadas fueron  $\text{TiO}_2:SiO_2$  25:75, 20:80, 80:20, 60:40, 50:50, 75:25, 40:60 0:100 y 100: 0 respectivamente. Los soles obtenidos de  $\text{TiO}_2@SiO_2$  se secaron a 100 °C por 24 h y tratados térmicamente a 350 °C por 2 h. Los polvos de  $\text{TiO}_2@SiO_2$  se caracterizaron por espectroscopía de infrarrojo (IR) donde se observaron las bandas características de las diferentes relaciones molares  $\text{TiO}_2:SiO_2$  y  $\text{TiO}_2@SiO_2$ -PABA (20:80-PABA). Por difracción de rayos-X (DRX) se corroboró la fase cristalina-anatasa del dióxido de titanio. La morfología de las nanopartículas se analizó por microscopía electrónica de barrido (MEB), donde se observó que las nanopartículas pasan de ser irregulares a esféricas dependiendo de la cantidad de óxido de silicio en el sistema. Mediante el análisis termogravimétrico (ATG) se determinó la cantidad de PABA funcionalizado a las nanopartículas. Por el análisis de dispersión dinámica de luz (DLS), se obtuvieron los tamaños de las nanopartículas como aglomerados de 25 a 609 nanómetros con un potencial zeta negativo. Por resonancia magnética nuclear de Sólidos de  $^{29}\text{Si}$  se observaron los desplazamientos químicos de los silanoles. Finalmente, en los ensayos de liberación, el PABA se hidroliza en presencia de plasma humano, concluyendo que los grupos hidroxilo en la superficie de las nanopartículas promueven la incorporación de moléculas orgánicas que contienen ácidos carboxílicos en su estructura, siendo innovador en el área de la química y la farmacología, específicamente como vehículos de fármacos.

### INTRODUCCIÓN

Los materiales de óxidos metálicos ( $\text{MO}_2$ ) embebidos en óxido de silicio ( $\text{MO}_2@SiO_2$ ) resultan muy interesantes por sus propiedades fisicoquímicas, comúnmente presentan una estructura cristalina múltiple y se pueden obtener en una variedad de tamaños y formas [1]. Este tipo de materiales han sido empleados en el área de la electrónica y óptica, sin embargo, actualmente estos materiales están adquiriendo importancia para ser utilizados como portadores de principios activos, debido a su baja toxicidad, a la biocompatibilidad con el organismo y a su mejor biodisponibilidad, además de ser económicos [1]. El  $\text{TiO}_2$ , principalmente en su forma cristalina anatasa, es uno de los materiales más

ampliamente utilizados en estudios de liberación de principios activos. No obstante, aspectos como tamaño de partícula y áreas superficiales pobres, han motivado el desarrollo de nuevos sistemas, en los cuales el  $\text{SiO}_2$  ha surgido como un soporte adecuado para mejorar dichos aspectos [1-2], dado que es un material químicamente inerte, con gran área superficial y no tóxico. Las superficies de dióxido de silicio amorfo pueden describirse por el modelo de Zhuralev [3], que considera que el factor que determina las propiedades superficiales son los grupos silanoles y puentes siloxanos. Las reacciones químicas que involucran estos grupos conducen a modificaciones de las superficies que pueden usarse para: (i) obtener información sobre la estructura de la superficie, como nanorugosidad, fractalidad química, y distribución de grupos silanoles y para lograr una superficie con propiedades enteramente diferentes [4]. Para cualquier tipo de sílice completamente hidroxilada, independientemente de su origen, se ha encontrado un número de 4.6-4.9 grupos OH por  $\text{nm}^2$ . Los silanoles simples,  $(-\text{Si}-\text{O}-)_3\text{Si}-\text{OH}$ , y geminales,  $(-\text{Si}-\text{O}-)_2\text{Si}(\text{OH})_2$ , actúan como centros de adsorción de moléculas capaces de formar puentes de H o de sufrir interacciones del tipo donador-aceptor. La disociación de los silanoles superficiales resultan en una superficie cargada negativamente por la presencia de grupos  $\text{Si}-\text{O}^-$  [5]. A partir de varios estudios realizados en suspensiones acuosas de sílice o en sílice macroscópica se conoce que hay dos grupos de silanoles en la superficie de la sílice [6-11]: uno que comprende aproximadamente el 15% de los silanoles totales que presentan un pKa en el intervalo 4.5-6.5, asociado a los silanoles geminales, y otro que abarca el 85% de los silanoles que tienen un pKa de 8.5-9.0, asociado a los silanoles simples [12-17].

La funcionalización de la superficie a menudo se aplica a estos materiales para mejorar su estabilidad, capacidad de carga del fármaco y capacidad de direccionamiento, y para regular el tiempo y la ubicación precisa de la liberación de la sustancia activa. La funcionalización de  $\text{TiO}_2@/\text{SiO}_2$  con diferentes compuestos orgánicos, tales como 3-aminopropiltriectoxisilano (APTES) [27], quitosán [28] y ampicilina [29], da lugar a materiales híbridos orgánicos-inorgánicos que son químicamente estables y permiten la modificación de la superficie con otras moléculas, originando mayor biocompatibilidad de estos materiales.

Los métodos empleados comúnmente para sintetizar estos óxidos mixtos son: sol-gel, coprecipitación y deposición química de vapor [18-19]. El método sol-gel es el más empleado dada su capacidad para controlar las propiedades de textura y de superficie de los óxidos compuestos. Este método se basa en reacciones de hidrólisis y policondensación de un alcóxido metálico, para producir óxidos puros y homogéneos, cuidando parámetros de síntesis, entre ellos la etapa de hidrólisis [19-21].

Con el fin de funcionalizar las partículas de  $\text{TiO}_2@/\text{SiO}_2$  con un compuesto orgánico, el ácido *para*-aminobenzoico (PABA) se utilizó como el modelo de fármaco, el cual se empleó como un bloque de construcción para candidatos a fármacos debido a que se encuentra como intermediario en diferentes medicamentos con un fin específico. Esta molécula tiene un grupo carboxilo que puede formar un enlace covalente con la nanopartícula y generar los sililésteres correspondientes mediante la reacción de esterificación de Fisher. Las reacciones de esterificación son ampliamente utilizadas en numerosas industrias como la farmacéutica, cosmética y alimentaria; otras áreas destacadas por el uso de la esterificación de Fisher son las de plásticos y polímeros. Además, es una de las rutas más utilizadas para la transformación de ésteres. La reacción de esterificación más usual ocurre entre un ácido carboxílico orgánico ( $\text{R}-\text{COOH}$ ) y un alcohol ( $\text{R}-\text{OH}$ ), obteniendo un éster ( $\text{R}-\text{COO}-\text{R}$ ) y agua. Normalmente, los alcoholes utilizados son de cadena corta (metanol o etanol), debido a su amplia disponibilidad y alta reactividad. También ocurre con los ácidos, donde los más simples son aquellos que permiten la formación del éster más fácilmente. Estas reacciones suelen ser reversibles, por lo que los reactivos no desaparecen por completo. Estos procesos pueden llevarse a cabo en presencia o ausencia de un catalizador, que, a su vez, puede ser homogéneo o heterogéneo. Los catalizadores homogéneos más utilizados son el ácido clorhídrico (HCl) y el ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), debido a su fuerte acidez [30-31], para los catalizadores heterogéneos se encuentran el Fe y Pt.

Dentro de las propiedades del ácido *para*-aminobenzoico (PABA) se conoce que es estable como sólido y en solución, otro punto importante es que, de acuerdo a una base de datos de 12,111 medicamentos comerciales, se encontró que el 1.5% (184 medicamentos) contenían la estructura del PABA. Además, en un estudio realizado de los 184 fármacos que contienen PABA identificados, se encontraron 95 sustituciones diferentes en el grupo carboxílico y 61 en el grupo amino del bloque de construcción, de acuerdo a su actividad específica. Entre los 184 fármacos que contienen PABA,

161 de estos están sustituidos en el grupo carboxilo con 95 cadenas laterales diferentes (R1) [32]. La presencia de diferentes grupos funcionales desencadena diferentes actividades. El grupo éster está presente en los anestésicos locales y en los agentes de protección solar [32]. La razón se debe a la actividad del enlace éster presente en los anestésicos locales, debido a que éste se hidroliza rápidamente en presencia de esterasas plasmáticas, así como esterasas hepáticas, liberando la molécula activa tipo PABA [32]. De acuerdo a revisiones bibliográficas, no hay trabajos con respecto a las nanopartículas funcionalizadas de  $TiO_2@SiO_2$ -PABA, como resultado, en este trabajo, se realizó la síntesis de nanopartículas de  $TiO_2@SiO_2$  a diferentes relaciones molares de  $SiO_2$  para observar cualitativamente mediante infrarrojo la cantidad de grupos OH en la superficie, y finalmente llevar a cabo la funcionalización de  $TiO_2@SiO_2$  con PABA, el cual sirvió como el modelo de fármaco para generar los enlaces tipo siliesteres entre estas dos moléculas, las cuales fueron hidrolizadas en presencia de plasma humano.

**METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

En la Figura 1, se muestra el diagrama general experimental que consistió en 3 etapas: etapa 1) síntesis para la elaboración de los polvos de  $TiO_2$ ,  $SiO_2$  y  $TiO_2@SiO_2$ , etapa 2) funcionalización de las nanopartículas con el ácido *para*-aminobenzoico (PABA), etapa 3) las pruebas de liberación *in vitro* del sistema  $TiO_2@SiO_2$ -PABA.

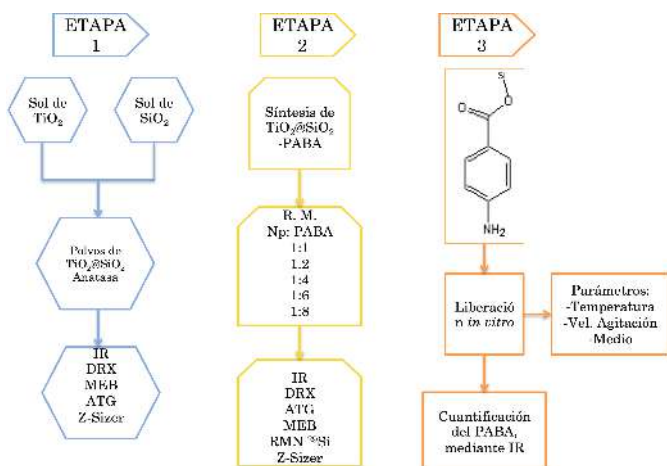


Figura 1. Esquema

experimental

general

**RESULTADOS**

**Espectroscopía de transformadas de Fourier**

El análisis de la formación de los enlaces de material Ti – O – Si, Si-OH se llevó a cabo utilizando espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier. En la Figura 2, se muestran los espectros de infrarrojo para las diferentes relaciones molares  $TiO_2:SiO_2$  20:80, 80:20, 25:75, 75:25, 40:60, 60:40, 50:50, 100:0 y 0:100 tratadas térmicamente a 350 °C durante 2 horas, en donde se observó la banda aproximadamente a 500  $cm^{-1}$  que corresponde a la vibración Ti-O-Ti, la banda a 1641  $cm^{-1}$  atribuida a enlaces de flexión O-H del Ti-OH, Si-OH y agua, las bandas anchas de estiramiento entre 3000-3750  $cm^{-1}$  fueron asignadas a los grupos hidroxilo (OH) y C-H de las nanoestructuras, donde se observó cualitativamente para la relación 80:20 una mayor cantidad de estos grupos.

Las señales alrededor de 1100  $cm^{-1}$  corresponden a la vibración asimétrica de Si-O-Si, de igual manera se observó la banda que se atribuye al Si-O-Ti alrededor de 949  $cm^{-1}$ .



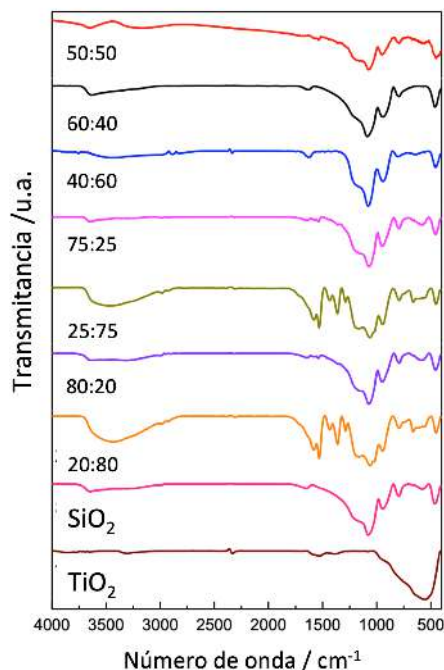


Figura 2. Espectros de infrarrojo para los materiales a diferentes relaciones molares  $TiO_2:SiO_2$  tratados térmicamente a  $350^\circ$  por 2 h

#### Análisis IR-FT de nanopartículas de $TiO_2@SiO_2$ funcionalizadas con PABA

Las nanopartículas de  $TiO_2@SiO_2$  se funcionalizaron con el ácido *para*-aminobenzoico (PABA) utilizando la reacción de esterificación de Fisher para lograr la unión covalente de los grupos silanol en la superficie, con el resto carboxilato del ácido *para*-aminobenzoico, obteniendo los ésteres correspondientes. Los ésteres son grupos funcionales importantes en los sistemas de administración de fármacos, ya que funcionan como profármacos, disminuyen la polaridad al aumentar la lipofilia y, por lo tanto, la absorción en los tejidos, y su liberación depende de la velocidad de hidrólisis del grupo éster.

En la Figura 3a, se muestra el espectro de la relación molar 20:80 con una señal amplia en torno a  $3600\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a las interacciones de enlace de los grupos silanol (Si-OH), lo que indica el mayor contenido de estos grupos en la superficie de las nanopartículas.  $TiO_2@SiO_2$ , y una señal a  $1641\text{ cm}^{-1}$  atribuida a las bandas de flexión de OH de Ti-OH, Si-OH y agua.

Por otro lado, la Figura 3b muestra bandas estrechas centradas alrededor de  $3460\text{--}3360\text{ cm}^{-1}$  corresponden a la banda de estiramiento N-H de la amina primaria en el PABA, y a  $1290\text{ cm}^{-1}$  (banda de estiramiento C-N) aparece la característica señal del grupo amina adherido al anillo aromático del PABA. Las bandas centradas alrededor de  $3229\text{--}2804\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento O-H) y a  $1665\text{ cm}^{-1}$  (C=O estiramiento) son características del grupo funcional ácido carboxílico [33].

El espectro infrarrojo se usó para confirmar la presencia del ligando orgánico de PABA unido covalentemente al sistema  $TiO_2@SiO_2$  (20:80). Mientras que en la Figura 3c, el sistema funcionalizado  $TiO_2@SiO_2$ -PABA muestra las bandas características de los grupos amino a  $3463\text{ cm}^{-1}$  y  $3362\text{ cm}^{-1}$  [130] y a  $1702\text{ cm}^{-1}$  la banda de un grupo carbonilo correspondiente (C=O) al éster y las señales de la banda del estiramiento asimétrico de Si-O-C a  $1165\text{ cm}^{-1}$ , lo que indica la funcionalización covalente de los grupos silanol con el ácido *para*-aminobenzoico [131], que probablemente esté relacionado con el mayor desplazamiento de la banda correspondiente al carbonilo que favorece los ésteres de sililo entre el PABA y la nanopartícula de  $TiO_2@SiO_2$  [33].

Además, se observaron las señales de la matriz de  $\text{SiO}_2$  en los modos de extensión asimétrica de Si-O-Si a  $1100\text{ cm}^{-1}$  y  $474\text{ cm}^{-1}$  en la muestra funcionalizada, así como la banda correspondiente a la vibración del enlace Si-O-Ti alrededor de  $949\text{ cm}^{-1}$  y el enlace alrededor de  $500\text{ cm}^{-1}$  que indica la banda Ti-O-Ti.

La incorporación de una mayor proporción de óxido de silicio a estos sistemas aumentó el área de la superficie, y de esta manera, el número de grupos silanol factibles de reaccionar con un ácido carboxílico para formar los correspondientes sililésteres, y como consecuencia, permite la generación de enlaces covalentes con alguna molécula de interés que contenga grupos carboxílicos en su estructura.

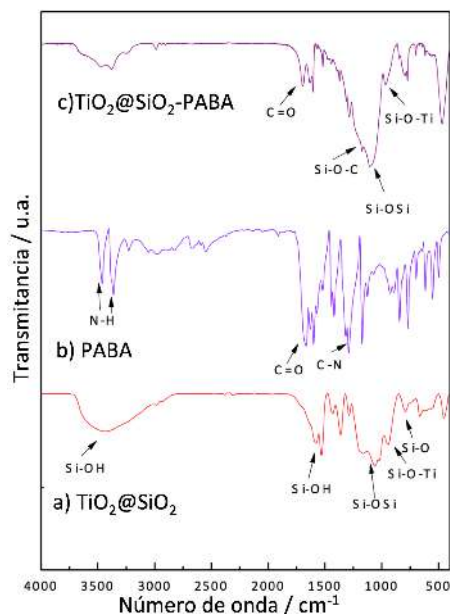


Figura 3. Espectros de infrarrojo de las muestras: a)  $\text{TiO}_2@\text{SiO}_2$  (20:80), b) PABA y c)  $\text{TiO}_2@\text{SiO}_2$ -PABA

#### Difracción de rayos x

La Figura 4 muestra los patrones de difracción de las diferentes relaciones molares  $\text{TiO}_2:\text{SiO}_2$  tratadas térmicamente a  $350\text{ }^\circ\text{C}$  durante 2 h. La concentración de óxido de silicio en todas las relaciones molares no juega un papel relevante para la formación de la fase de anatasa, ya que los planos aparecen a partir de la formación de dominios cristalinos dentro de la red del óxido amorfo. De acuerdo con la carta (COD 5000223) los patrones de difracción característicos de la fase anatasa de  $\text{TiO}_2$  fueron observados a  $25.27\text{ }^\circ$  (101),  $37.69\text{ }^\circ$  (004),  $47.98\text{ }^\circ$  (200),  $53.76\text{ }^\circ$  (105),  $54.99\text{ }^\circ$  (211),  $62.57\text{ }^\circ$  (204),  $68.59\text{ }^\circ$  (116) respectivamente. Se observó que a medida que se agrega  $\text{SiO}_2$  a las muestras de  $\text{TiO}_2$ , existe un comportamiento amorfo en el rango ( $20\text{-}30^\circ$ ) correspondiente al  $\text{SiO}_2$ , como se puede observar en las muestras [86], por lo que el método de sol-gel es muy eficiente y es una herramienta muy útil en la preparación de estos sistemas híbridos nanoparticulados.

Por otro lado, utilizando la ecuación de Debye Scherrer, se calculó el tamaño de cristalito de todas las muestras encontrando valores entre 8-12 nm.

En otras palabras, la formación del enlace Ti-O-Si y, posteriormente, la presencia de  $\text{SiO}_2$  amorfo alrededor de  $\text{TiO}_2$ , evita el aglomerado de partículas de  $\text{TiO}_2$ . La proporción de óxido de silicio y la temperatura de  $350\text{ }^\circ\text{C}$  favorecieron la formación de la fase anatasa, evitando así obtener la fase de rutilo sin la necesidad de agregar algunos iones u otras tierras raras tales como  $\text{Er}^{3+}$ .

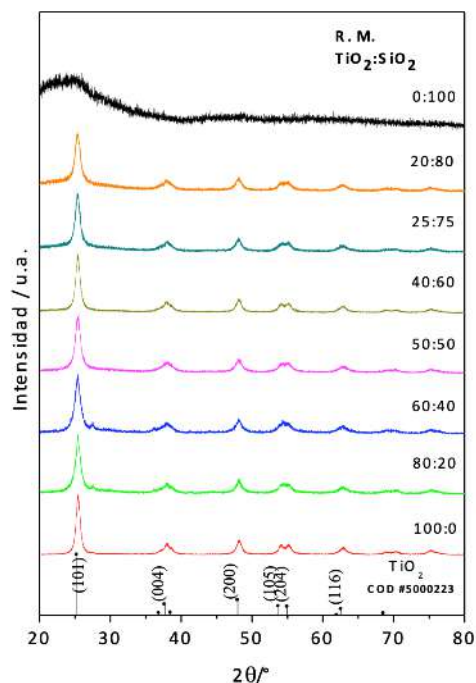


Figura 4. Patrones de difracción para los materiales  $TiO_2:SiO_2$  a diferentes relaciones molares

Para el caso de la muestra  $TiO_2@SiO_2$  (20:80) funcionalizada con PABA, se observó la formación de dominios cristalinos ( $2\theta = 25^\circ$ ) correspondientes a la fase anatasa y al ácido *para*-aminobenzoico, indicando el crecimiento sobre la red cristalina del  $TiO_2$  como se observa en la Figura 5. La interacción de la titania con los aminoácidos en particular es interesante porque está bien establecido que los ácidos carboxílicos se unen fuertemente a las superficies de la titania en forma de puente bidentado, después de la desprotonación del grupo ácido. Se cree que la adsorción de aminoácidos en las superficies de  $TiO_2$  a través del grupo carboxilo deja el grupo amina sin unir. El grupo amina libre podría usarse para injertar polímeros o biomoléculas en  $TiO_2$  para aplicaciones de biosensores o biomateriales novedosos. Se ha demostrado que las moléculas enlazadoras de cisteína mejoran la eficiencia de la transferencia de carga entre los puntos cuánticos. Se espera que un aminoácido aromático como el ácido *para*-aminobenzoico pueda mejorar aún más este efecto debido a la deslocalización en el anillo.

Se encontró que el ácido *p*-aminobenzoico se adsorbe en la superficie de anatasa de  $TiO_2$  (101) en un modo bidentado, lo más probable es que puentee los átomos de Ti vecinos coordinados en 5 veces en la dirección (010). Los espectros a nivel del núcleo sugieren que la molécula se adsorbe después de la desprotonación del grupo carboxilo y el zwitterión no se forma tras la adsorción. El grupo amina parece permanecer intacto y orientado lejos de la superficie con cobertura de monocapa y, por lo tanto, podría estar disponible para el injerto de biomoléculas o puntos cuánticos de recolección de luz. La superficie (101) se elige porque es la de menor energía de las estructuras comunes de  $TiO_2$  y, por lo tanto, es probable que sea la superficie más abundante en polvos de anatasa.

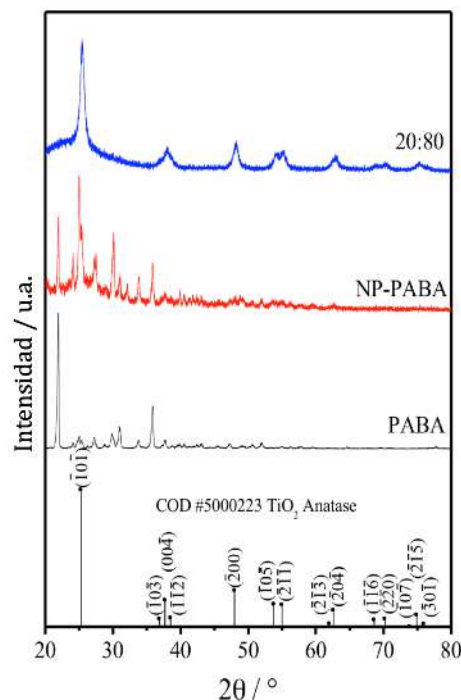


Figura 5. Patrones de difracción para la relación molar 20:80 con PABA

#### Análisis microestructural mediante microscopía electrónica de barrido

En la Figura 6, se ilustra la morfología de las diferentes muestras obtenidas por microscopía electrónica de barrido para a)  $\text{TiO}_2$  puro, b)  $\text{SiO}_2$  (20:80), c)  $\text{SiO}_2$  (80:20) y d)  $\text{SiO}_2$  puro. Las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  presentan un tamaño de cristalito de 12 nm de acuerdo a la literatura por difracción de rayos x y tienden a aglomerarse hasta 609 nm de acuerdo con los resultados obtenidos por el análisis de DLS, en donde es posible observar la presencia de partículas que forman aglomerados que tienden a disminuir su exceso de energía superficial y, por lo tanto, logran una mayor estabilidad cuando se aglomeran y, como resultado, este efecto puede dificultar su uso para la liberación de fármacos, donde se requieren tamaños menores a 100 nm para esta aplicación.

Para la muestra  $\text{TiO}_2@/\text{SiO}_2$  (20:80), se observó que el contenido de  $\text{SiO}_2$  evita que las partículas se aglomeren, causando una mejor propagación de estas con tamaños de 25 nm. Cabe mencionar que el tratamiento térmico utilizado a 350 °C no afecta el crecimiento por difusión de las partículas, ya que la temperatura es muy baja, en otros trabajos se ha reportado que las partículas comienzan a crecer cuando se exponen a temperaturas de 600 °C o superiores favoreciendo la fase rutilo del  $\text{TiO}_2$  [34]. Se observó para la muestra  $\text{TiO}_2@/\text{SiO}_2$  (20:80), que el  $\text{TiO}_2$  se dispersa dentro de la matriz de sílice como agregados esféricos de varios tamaños, donde los agregados están compuestos de cristalito con tamaños entre 8 y 12 nm según los resultados de DRX.

Por otro lado, para la muestra  $\text{TiO}_2@/\text{SiO}_2$  (80:20), se observó una morfología de aglomerados, se agregan sin forma específica con tamaños de 420 nm obtenidos por DLS.

En la muestra  $\text{SiO}_2$  puro, la morfología observada es esférica con tamaños de aglomerados de 342 nm. El análisis de las micrografías muestra que las partículas de  $\text{TiO}_2$  embebidas en una matriz de  $\text{SiO}_2$  genera tamaños de partículas más pequeñas en comparación con las partículas en ausencia de sílice, como se ha revisado en la bibliografía, debido a que la sílice proporciona una mejor distribución. También se observó que a medida que aumenta la proporción de  $\text{SiO}_2$ , los sistemas

adquieren una forma esférica, que se correlaciona con la observada por otros autores en la literatura. Finalmente, para el 100% de  $\text{SiO}_2$  se observó que el  $\text{TiO}_2$  sirve como puntos de nucleación y en ausencia de  $\text{TiO}_2$  el  $\text{SiO}_2$  comienza a nuclearse, por lo cual, el tamaño aumenta. También se notó que las nanopartículas de la muestra  $\text{TiO}_2@/\text{SiO}_2$  (80:20), exhibieron una morfología y un tamaño bastante similares a los del  $\text{TiO}_2$  puro.

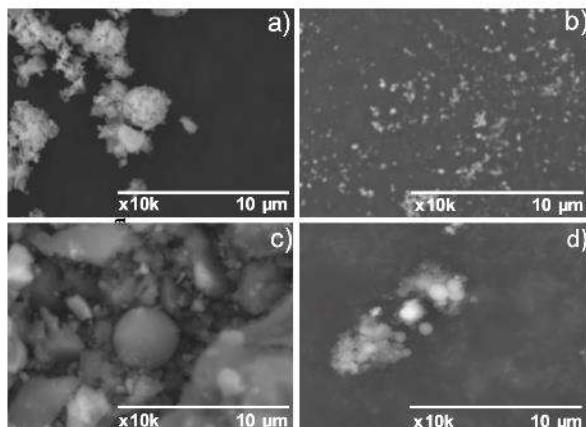


Figura 6. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de a)  $\text{TiO}_2$  puro, b)  $\text{SiO}_2$  (20:80), c)  $\text{SiO}_2$  (80:20) y d)  $\text{SiO}_2$  puro

#### Resonancia magnética nuclear de sólidos de $^{29}\text{Si}$

La Figura 7a muestra los espectros de RMN  $^{29}\text{Si}$  para la relación molar  $\text{TiO}_2@/\text{SiO}_2$  (20:80), e ilustra tres picos de señales asociadas con el desplazamiento químico a -88.99 ( $\text{Q}^2$ ), -98.69 ( $\text{Q}^3$ ) y -107.58 ( $\text{Q}^4$ ) ppm, que generalmente se asignan al silanol geminal, silanoles libres y grupos siloxano tridimensionales, respectivamente [35]. Estos picos están asociados con el desplazamiento químico de los sitios  $\text{Q}^2$  Si ( $\text{OSi})_2(\text{OX})_2$ ,  $\text{Q}^3$  Si ( $\text{OSi})_3(\text{OX})$  y  $\text{Q}^4$  Si ( $\text{OSi})_4$ , donde X es Ti o H. Para la muestra funcionalizada ( $\text{TiO}_2@/\text{SiO}_2$ -PABA), Figura 28b se observaron dos señales de desplazamientos químicos a -99.36 ( $\text{Q}^3$ ) y -109.59 ( $\text{Q}^4$ ) ppm. La ausencia de la señal  $\text{Q}^2$  a -88.99 ppm, demostró la funcionalización del sistema  $\text{TiO}_2@/\text{SiO}_2$  con PABA a través de los grupos silanoles geminales, además hubo una disminución en la intensidad de  $\text{Q}^3$  (silanoles libres) en -99.36 ppm, lo cual sugiere que la funcionalización también ocurre a través de ellos. Así mismo se mostró que las unidades estructurales  $\text{Q}^4$  representan tetraedros de  $\text{SiO}_4$  interconectados en el interior del núcleo, mientras que las unidades estructurales  $\text{Q}^3$  son unidades que están presentes en la superficie asociado con grupos silanol. Estos resultados se corroboran con el análisis FTIR.

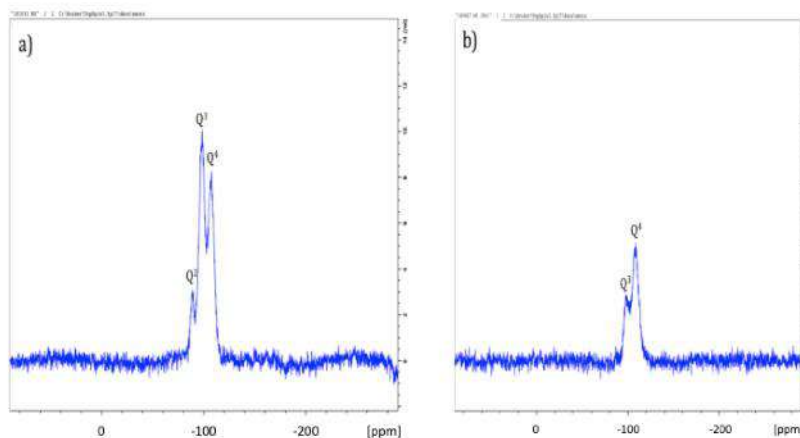


Figura 7. Desplazamiento químico  $^{29}\text{Si}$  para muestras: a) 20:80 nanopartículas y b) 20:80-PABA

#### Análisis de tamaño de partícula y determinación de potencial $\zeta$ por DLS

Las nanopartículas en sistemas dispersivos exhiben una notable tendencia a aglomerarse, este proceso puede monitorearse exitosamente midiendo la potencial zeta (lo que permite determinar el valor de las interacciones electrostáticas entre partículas coloidales dispersadas en soluciones acuosas) y analizando las curvas de distribución del tamaño de partícula.

Existe una correlación entre la disminución del potencial de las nanopartículas y la disminución de su tamaño, ya que los tamaños superiores a 100 nm tienden a aglomerarse, por lo que aumenta el potencial. Por otro lado, a medida que aumenta el contenido de  $\text{SiO}_2$  en las muestras, proporcionan una mayor cantidad de grupos hidroxilo internos y externos responsables de disminuir el potencial del sistema.

#### Análisis termogravimétricos (ATG)

En la Figura 8, se muestra el termograma correspondiente al sistema  $\text{TiO}_2@ \text{SiO}_2$  funcionalizado con PABA, mostrando la curva termogravimétrica entre 60-180 °C la pérdida de masa correspondiente al agua y los disolventes residuales adsorbidos físicamente en el compuesto de  $\text{TiO}_2@ \text{SiO}_2$ -PABA. La descomposición de la parte orgánica del PABA ocurrió entre 180-280 °C correspondiente al 32% de pérdida de masa. Además, entre 460-650 °C hubo una combustión de la materia orgánica residual de PABA, así como la condensación de grupos silanoles adyacentes resultantes de la unión, para dar origen a los enlaces siloxanos de nanopartículas de  $\text{TiO}_2@ \text{SiO}_2$  atribuidas al 16 % de pérdida de peso. Todos los resultados anteriores mostraron la exitosa funcionalización en la superficie de la nanopartícula de  $\text{SiO}_2@ \text{TiO}_2$  a través de enlaces covalentes. Por lo tanto, se puede inferir que el porcentaje de masa debido a la funcionalización con PABA es del 48 %, el cual corresponde aproximadamente a la pérdida total de masa en los dos últimos eventos.



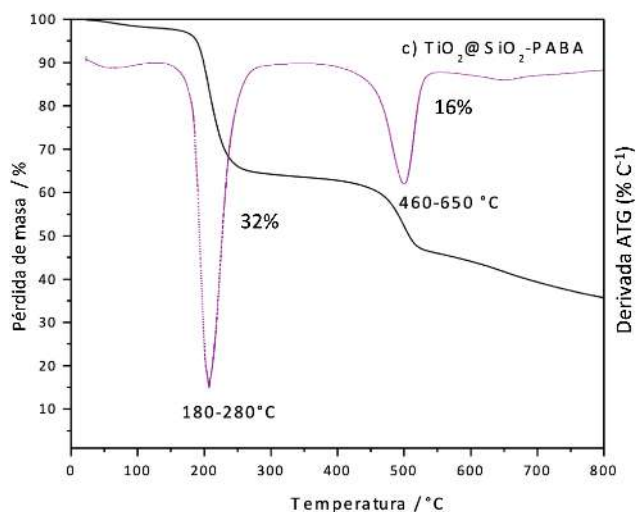


Figura 8. Análisis termogravimétrico de  $TiO_2:SiO_2$  (20:80) –PABA

Ensayo de liberación *in vitro*

En los resultados de liberación, para la muestra  $TiO_2@SiO_2$ -PABA que contenía plasma humano se observó una pérdida de peso de  $45.8\% \pm 0.76$ , en contraste con la muestra control sin plasma, la cual tuvo una pérdida de peso de  $19.5\% \pm 0.05$ , indicando la liberación de moléculas superficiales del ácido *para*-aminobenzoico. Además, la pérdida de peso en el grupo de control podría atribuirse a la hidrólisis del grupo éster producida por el pH del medio. El PABA se liberó por hidrólisis del enlace covalente formado por la reacción de esterificación, esta reacción es reversible y el agua regeneró los reactivos de partida de PABA y los grupos hidroxilo de las nanopartículas. El enlace éster es relativamente débil, en un medio ácido o básico, se hidroliza para formar alcoholes y ácidos carboxílicos, respectivamente. Estos resultados fueron corroborados por espectroscopía infrarroja. La Figura 9 muestra las señales características del sistema nanoestructurado después de la hidrólisis, donde no es posible observar la señal del carbonilo del grupo éster que aparece a  $1668\text{ cm}^{-1}$  (C=O estiramiento), y la banda de estiramiento asimétrico de Si-O-C a  $1165\text{ cm}^{-1}$  del sililéster.

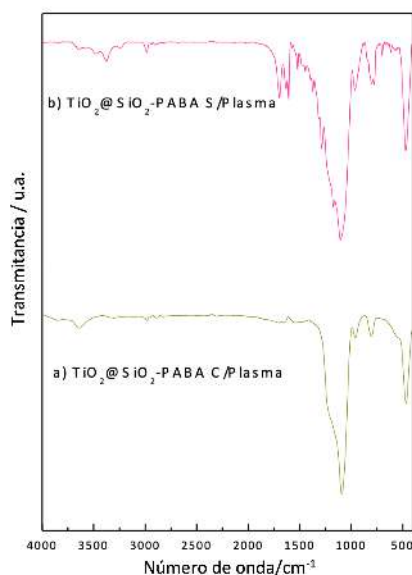


Figura 9.- Espectro infrarrojo de 20:80-PABA sin plasma y 20: 80-PABA con plasma

## CONCLUSIONES

La cantidad de grupos silanoles y siloxanos en las nanopartículas de  $\text{TiO}_2@\text{SiO}_2$  es función de la relación molar  $\text{TiO}_2:\text{SiO}_2$ , demostraron que la relación molar 20:80 ( $\text{TiO}_2:\text{SiO}_2$ ) contenía la mayor cantidad de dichos grupos. Además, se demostró que los grupos silanoles y siloxanos actúan como centros de unión covalente con el PABA. En todos los sistemas de  $\text{TiO}_2@\text{SiO}_2$  se observó que la forma amorfa del dióxido de silicio no influyó en la cristalización del titanio, las proporciones probadas presentaron la fase anatasa que se sabe es de menor toxicidad y estabilidad química del titanio.

El ensayo de liberación reveló que los grupos ésteres son grupos necesarios en los sistemas de administración de fármacos, lo que aumenta su absorción en las membranas biológicas, donde su liberación depende de la velocidad de hidrólisis de este grupo.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Christian Graziani García. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. Vol. 147. 2002. 143–148.
- 2.- Qing Dai. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. Vol.148. 2002. 148 17–24.
- 3.- Zhuralev, L. T. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 2000, 173, 1.
- 4.- Vidal A, E. Chemical reactivity. In *The surface properties of silica*; Legrand, A. P.- Ed.; John Wiley & Sons Ltd.: New York, 1998.
- 5.- Iler, R. K. *The chemistry of silica*; Wiley: New York, 1979; p 623.
- 6.- Maciel, G. E.; Sindorf, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* 1980, 102, 7606.
- 7.- Morrow, B. A.; Gay, I. D. *J. Phys. Chem.* 1988, 92, 5569.
- 8.-Tuel, A.; Hommel, H.; Legrand, A. P.; Sz. Kovats, E. *Langmuir* 1990, 6, 770.
- 9.- Van Roosmalen, A. J.; Mol, J. C. *J. Phys. Chem.* 1978, 82, 27
- 10.- Allen, L. H.; Matijevic, E. *J. Colloid Interface Sci.* 1969, 31, 287.
- 11.- Ong, S.; Zhao, X.; Eisenhal, K. B. *Chem. Phys. Lett.* 1992, 191, 327.
- 12.- Vance, F. W.; Lemon, B. I.; Ekoff, J. A.; Hupp, J. T. *J. Phys. Chem. B* 1998, 11, 1845.
- 13.-Kropp, P. J.; Daus, K. A.; Tubergen, M. W.; Kepler, K. D.; Wilson, V. P.; Craig, S. L.; Baillargeon, M. M.; Breton, G. W. *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 3071.
- 14.- Caregnato, P. *Photochemistry & Photobiology* 2005, 81, 1526.
- 15.- Caregnato. *J. Phys. Chem.B* 2003, 107, 6131.
- 16.- Shield, S. R. *J. Phys. Chem. B* 2000, 104, 8527.
- 17.- Zeng, H.C. *The Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*. pp.2539-2550, New York: Marcel Dekker. 2004.
18. - Amlouk, Amel. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*. Vol.67. No. 7. 2006. 1464-1468
- 19.- Brinker, C. Jeffrey. *Sol- Gel Science: the physics and chemistry of sol-gel processing*. San Diego, USA: Academic Press Inc., 1990, 881.
- 20.- Elia Andrés. *Macromolecular Symposia*. Vol.301. No.1. 2011. 136-145.
21. - Livage, Jacques. *Acta Materialia*. Vol. 46. No. 3. 1998. 743-750.
22. Feng, X. "Functionalized monolayers on ordered mesoporous supports", *Science*, 276, 923 (1997).
23. Diaz, I. Marquez. *J. Catalysis*, 193, 283 (2000)
24. Martin, T. *Chem. Communications*, 135, 24 (2001)
- 25.-Yeun Choi. *JACS*, 122, 5201 (2000)
- 26.-Jerzy Sokolnicki. *Journal of Solid State Chemistry* 180 (2007) 2400–2408
- 27.- Fabio Andrés Bermejo Altamar. *Ciencia de los materiales*. Universidad Antonio Nariño
- 28.- Christian Graziani García. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 147 143–148 (2002).
- 29.- Qing Dai, Joseph Rabani, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 148 17–24 (2002)
- 30.- Anders Hagfeldt. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 148 41–48 (2002)

- 31.- D.F. Ollis and H. Al-Ekabi, Elsevier Amsterdam (1993)
- 32.- T. Watanabe, A. Thin Solid Films 351 260-263 (1999)
- 33.- Sang-Hyeun Lee. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 146 121–128 (2001)
- 34.- A. Fujishima. Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews 1 1-21 (2000)
- 35.- Hilpa Khare. International Journal of Hydrogen Energy 25 327-332 (2000)

## MEDICIÓN ELÉCTRICA DE *GEOBACTER SULFURREDUCTENS* EN UNA CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANO DE DOBLE CÁMARA

Juana Elizabeth Alba Cuevas<sup>1</sup>; Virginia Villa-Cruz<sup>1</sup>, Isaac Zarazúa Macías<sup>1</sup>, Rita Patakfalvi<sup>1</sup> y Lily Xochilt Zelaya-Molina<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>Doctorado en Ciencia y Tecnología. Departamento de Ciencias de la Tierra y de la Vida, Centro Universitario de los Lagos, Universidad de Guadalajara. <sup>2</sup>Laboratorio de Recursos Genéticos Microbianos. Centro Nacional de Recursos Genéticos. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México.

[elizabethalba97@gmail.com](mailto:elizabethalba97@gmail.com)

### RESUMEN

La electricidad es una necesidad del humano de uso cotidiano, la generación de la misma es debida en su mayoría por fuentes no renovables, lo que desata no solo en su limitado acceso en un futuro, sino también en el daño que estas emiten al medio ambiente. Actualmente la naturaleza ofrece a la ciencia la oportunidad del uso de bacterias para generar electricidad como fuente alterna de energía. Las bacterias electrogénicas tienen la capacidad de liberar electrones a una superficie conductora. *Geobacter* sp. es una bacteria que puede oxidar y reducir sustratos generando un flujo de electrones que son expulsados por sus pili especiales denominados “nanowires”, por lo que se considera electrogénica, esta característica ha permitido su uso en celdas de combustible microbiano (CCM). Se considera que una CCM es un pequeño reactor biológico en donde se convierte la energía química en eléctrica a través de reacciones catalizadas por *bacterias*. El uso de la CCM con comunidades microbianas resulta una tecnología atractiva e innovadora para el campo de la bioenergía, sin embargo, se debe garantizar la respuesta eléctrica de la bacteria dentro del sistema bioeléctrico (su potencial eléctrico). En el presente trabajo se inoculó *Geobacter sulfurreducens* (ATCC 51573) en una CCM de doble cámara con electrodo de carbono. Se determinó el crecimiento microbiano mediante conteo electrónico (Cytosmart, software Cell counter), el potencial de circuito abierto (potenciostato Gamry reference 600) con un tiempo experimental de 816 h. Los resultados obtenidos nos muestran que el voltaje aumenta conforme incrementa el tiempo pero se mantiene estable en cada medición. Tomando un tiempo fijo de 50s, se observó el comportamiento progresivo del potencial. Con respecto al crecimiento de *Geobacter* éste presentó un incremento de un ciclo logarítmico durante las primeras horas y se mantuvo hasta cerca de las 800 horas. Relacionando el voltaje con el crecimiento de la bacteria se observó una relación proporcional, mayor crecimiento mayor voltaje. Las condiciones eléctricas de *Geobacter* en una CCM dependen de varios factores (electrodo, sustrato, tipo de cámara, membrana) por lo que se debe de seguir investigando el comportamiento de esta y otras bacterias con producción eléctrica

### INTRODUCCION

Las bacterias electrogénicas son microorganismos que tienen la capacidad de liberar electrones a una superficie conductora. Dentro de este tipo se encuentran las bacterias pertenecientes al género *Geobacter* cuya característica principal consiste en transferir electrones de forma directa a superficies conductoras, aceptores finales de electrones o electrodos, es decir, la bacteria se adhiere al electrodo y a través de sus citocromos envía electrones a la superficie y puede formar una biopelícula entrelazando sus pili (también llamados “nanocables” ya que estos no solo funcionan para formar biopelícula sino que también son auxiliares en el transporte de electrones de las bacterias que no se encuentran adheridas directamente al electrodo) generando pequeñas corrientes eléctricas.

Este comportamiento electrogénico de *Geobacter* permite su uso dentro de Celdas de Combustible Microbiano (CCM). Las CCM son reactores bioelectroquímicos a través de reacciones químicas catalizadas por comunidades bacterianas. Dentro de estos reactores, diversos elementos (físicos, químicos y biológicos) interactúan entre sí y pueden determinar el adecuado comportamiento de la celda. Desde el funcionamiento metabólico de las bacterias electrogénicas hasta la relación y características de cada sustrato dentro de una CCM. Debido a lo anterior, se analizó el crecimiento

de *Geobacter sulfurreducens*, su relación con la formación de biopelícula y generación de electricidad.

## TEORÍA

Se denomina “bioelectrogenesis” a la generación de electricidad dada por organismos vivos, en el caso de las bacterias electrogénicas, están oxidando la materia orgánica y los electrones producidos de estas reacciones se transmiten a una superficie conductora a través de acarreadores que son producidos por la misma bacteria o suministrados de manera artificial, generando pequeñas corrientes eléctricas, dentro de estos tipos de bacterias se encuentra *Geobacter sp.* (Romero Mejía et al., 2012).

*Geobacter sp.* Fue descubierta en 1987 en el sedimento de agua dulce del río Potomac en Washington por el doctor Derek Lovley. Las especies de *Geobacter* pertenecen a la familia Geobacteraceae, que se encuentra dentro del dominio Bacteria, phylum Proteobacteria, clase Deltaproteobacteria y orden Desulfuromonadales, son Gram-negativas, quimioorganotrofo anaerobio facultativo (Romero Mejía et al., 2012).

De las especies de *Geobacter*, las más estudiadas son: *G. metallireducens* y *G. sulfurreducens*. La primera especie fue recuperada en cultivo puro y con ella se logró desarrollar su sistema genético y enfocar la atención en dilucidar su fisiología así como su interesante metabolismo (la degradación anaerobia), mientras que, *Geobacter sulfurreducens* fue la primera especie de *Geobacter* manipulada genéticamente, desde entonces se ha elegido para los estudios genómicos para comprender el metabolismo de *Geobacter*, además es una especie de la cual los estudios arrojan más información, ha sido utilizada en mayor cantidad de estudios y reportada como una bacteria eficiente tanto en crecimiento como en potencial eléctrico al momento de ser colocada dentro de CCM (Aklujkar y Lovley, 2010; Coppi et al., 2001; Kim et al., 2005; Lloyd et al., 2003; Park y Kim, 2011; Rollefson et al., 2009; Ueki y Lovley, 2010; Caccavo et al., 1994; Lovley y Phillips, 1988; Lovley et al., 1987, 1993 )

Todos los aislados de *Geobacter* son varillas gramnegativas y dentro de sus características principales se encuentra la reducción de Fe(III), reducir Mn (IV), U (VI) insoluble (eliminando el uranio de agua subterráneas contaminadas y estimulando el crecimiento y actividad de las especies de *Geobacter* en el subsuelo por agregar acetato al agua subterránea siendo una técnica de biorremediación prometedora para acuíferos contaminados con estos elementos) así como azufre elemental, utilizando acetato como donante de electrones (Lovley et al., 2011; Leang et al., 2003; Lloyd et al., 2003; Lovley et al., 1991; Lloyd et al., 2000; Caccavo et al., 1994; Ortiz- Bernad et al., 2004).

Para el caso de *Geobacter sulfurreducens*, el donador de electrones principal es el acetato aunque también hay estudios que mencionan que pueden utilizar hidrógeno (H<sub>2</sub>) mientras que dentro de los aceptores de electrones además del Fe(III) destaca el fumarato. Estudios bioquímicos identificaron proteínas con actividades fumarato-reductasa que tienen la doble función de actuar como succinato-deshidrogenasa (Butler et al., 2006; Caccavo et al., 1994; Lin et al., 2004).

Los modelos teóricos indican que las bacterias reductoras de sulfato, utilizan acetato como donador de electrones para reducir enzimáticamente el Fe (III), para esto, el acetato se oxida a CO<sub>2</sub> por Fe (III) gracias al ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) y es esta misma capacidad lo que le confiere una característica biorremediadora importante ya que el acetato es el intermedio de la degradación anaerobia de materia orgánica en ambientes sedimentarios (Lovley y Chapelle, 1995; Caccavo et al., 1994).

Diversos autores han propuesto dos mecanismos de metabolismo dependiendo de la presencia del aceptor de electrones: Fe (III) o fumarato. En caso que *Geobacter sulfurreducens* se encuentre con la presencia de Fe (III), la bacteria parece tener la reducción en la membrana externa y la transferencia de electrones requiere varias membranas protoplásmicas y citocromos tipo C, el acetato (donador de electrones) entra a la bacteria y pasa a acetyl CoA, donde una cantidad mínima pasa a formación de biomasa y el otro porcentaje entra al ciclo del ácido tricarbóxico, se libera CO<sub>2</sub> y electrones, los cuales a través de diversos citocromos tipo C de la membrana interna pasan a los citocromos C de la membrana externa y de esta manera la bacteria cede los electrones al Fe(III), cabe mencionar que debido a la abundancia relativa de Fe (III) contra los metales contaminantes, este suele ser utilizado como el ejemplo general de la capacidad de biorremediación que se le atribuye a *Geobacter* (Finneran et al., 2002).

Para el caso en el que se tiene fumarato como aceptor de electrones, la bacteria parece tomar un camino metabólico diferente: nuevamente a partir del acetato (donador de electrones) para a acetil CoA, un porcentaje (mayor al metabolismo del Fe) forma biomasa y la mayor cantidad entra al ciclo del ácido tricarbóxico y gracias al mismo se convierte en malato y mediante la succinato deshidrogenasa pasa a succinato, los electrones resultantes parecen quedar en la membrana interna (Esteve Nuñez *et al.*, 2005).

Se ha reportado que, en presencia de ambos aceptores de electrones, *Geobacter sulfurreducens* tiene preferencia hacia la respiración del Fe (III). Aun así, el genoma sugiere que *G. sulfurreducens* tiene múltiples opciones para la absorción de acetato y los pasos iniciales en el metabolismo del acetato (Methe *et al.*, 2003).

Uno de los descubrimientos más sorprendentes en el estudio de la transferencia extracelular de electrones en especies de *Geobacter sulfurreducens* y presumiblemente otras especies de *Geobacter* es que produce pili que son eléctricamente conductores. Su número puede variar entre 100 y hasta 1000 por bacteria, su tamaño es aproximadamente de 3-5 nm de diámetro por 1-5  $\mu\text{m}$  de longitud (Romero Mejía *et al.*, 2012; Malvankar *et al.*, 2011; Reguera *et al.*, 2005).

Inicialmente se indicó que los pili eran importantes en la transferencia extracelular de electrones desde la observación de que *G. metallireducens* expresó pili cuando creció en óxidos de Fe (III) o Mn (IV). Estudios sobre pili en *G. sulfurreducens* han demostrado que este organismo puede producir filamentos de varias proteínas diferentes. Al ser observados con microscopía de fuerza atómica se demostró que los pili eran conductores a través de su diámetro y reveló que había otras proteínas asociadas con los pili, pero actuaban como aislantes (Childers *et al.*, 2002).

Estudios posteriores han proporcionado un mecanismo en el que el pili de *G. sulfurreducens* posee una conductividad similar a la metálica. Se propone que el electrón hace saltos entre citocromos y a distancia los pili forman redes conductoras (Malvankar *et al.*, 2011; Nevin *et al.*, 2009).

Cuando los pili fueron vistos en un sistema de dos electrodos, formaron una red que conducía electrones entre los electrodos. El mecanismo para el transporte de electrones a lo largo de los pili de *G. sulfurreducens* es bastante diferente a la conductividad propuesta para filamentos de otros microorganismos como *Shewanella oneidensis*. En presencia de electrodos las bacterias de *G. sulfurreducens* más cercanas a la superficie del electrodo transfieren electrones de manera directa desde los citocromos OmcB y las bacterias a su alrededor forman un entramado conductor a través de los pilis donde los electrones “saltan” de uno a otro formando una red (Nevin *et al.*, 2009; Bond y Lovley, 2003).

Internamente, *Geobacter* posee una red de citocromos tipo C multihemo, con el fin de transferir los electrones desde una sustancia que es oxidada a otra que se reduce o acepta electrones; los citocromos “c” de la membrana externa y los pilis de las células conductoras ayudan a facilitar la transferencia directa de electrones (Romero Mejía *et al.*, 2012; Cornejo Martell, 2013).

Una de las características más llamativas de las especies de *Geobacter* es su abundancia de citocromos de tipo c y la gran diversidad de citocromos codificados en su genoma. *Geobacter sulfurreducens* contiene el mayor número de genes que codifican para citocromos tipo c (103 genes en total). Además, el análisis de su genoma ha revelado que cada uno de estos citocromos se encuentra asociado a múltiples grupos hemo, pudiendo algunos citocromos llegar a presentar hasta 27 centros activos. Lo que explica la flexibilidad respiratoria de la bacteria y se supone responsable de la donación de electrones a un aceptor extracelular y/o servir de estructura de almacenamiento de electrones en ausencia de algún aceptor (Butler *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2006; Methé *et al.*, 2003).

La función de los citocromos tipo c solo se ha estudiado significativamente en *G. sulfurreducens*, por lo que se dificulta hacer generalizaciones sobre función específica del citocromo en especies de *Geobacter*.

Los primeros estudios sobre *G. Sulfurreducens*, mostraron que la una reducción de Fe (III), involucra a citocromos. Uno de estos citocromos fue purificado y descrito como citocromo OmcB. Este citocromo es capaz de reducir el óxido y el citrato de Fe (III); se encuentra incrustado en la membrana externa con una porción de la molécula expuesta en la superficie externa. Estudios en los que se eliminó el gen que codifica para OmcB inhibió la reducción del citrato y óxido de Fe (III). Otros citocromos de tipo c, de *sulfurreducens*, están completamente expuestos en la superficie celular externa (Leang *et al.*, 2003; Nevin *et al.*, 2009, Gaspard *et al.*, 1998; Magnuson *et al.*, 2000, Caccavo *et al.*, 1994; Magnuson *et al.*, 2001).



En *Geobacter* se sabe que la transferencia electrónica se da exclusivamente por contacto directo con el electrodo por lo que, los mediadores quedan descartados. Lo que aún queda por dilucidar es el mecanismo de dependencia entre los citocromos y los pili.

Las células más cercanas al electrodo transfieren los electrones por contacto directo mediante sus citocromos de membrana mientras que, las células más alejadas del electrodo, son capaces de combinar los citocromos con una red de pilis “nanowires” conductores para la transferencia electrónica a través del biofilm (Lovley *et al.*, 2011; Reguera *et al.*, 2005; Bond y Lovley, 2003).

Algunas especies de *Geobacter sp* (como *sulfurreducens*), han sido recomendadas por su abundancia en lodos y aguas contaminadas con algunos compuestos aromáticos, hidrocarburos e inclusive metales, los cuales pasan a una forma menos soluble y precipitan, siendo *Geobacter* pieza clave para la biorremediación. Otros estudios también mencionan su uso en bioelectrónica ya que sus pili también llamados “nanocables” son eléctricamente conductores (similares a los metálicos). Por otro lado, *Geobacter sulfurreducens* es una especie ampliamente recomendada para su uso en celdas de combustible microbiano (CCM), ya que, si se encuentra frente a un electrodo, realizará su metabolismo electrogénico y utilizará el electrodo colocado para anclarse y donar de manera directa los electrones resultantes de su metabolismo en presencia de ciertos compuestos (como acetato) (Lovley, *et al.*, 2011; Anderson *et al.*, 1998; Holmes *et al.*, 2004; Nevin *et al.*, 2005; Rooney-Varga *et al.*, 1999).

## PARTE EXPERIMENTAL

Para el crecimiento de *Geobacter sulfurreducens* se emplean medios de cultivo que deben contener componentes especiales, para ello se reporta que el medio “NABF” es el más apropiado para este tipo de bacterias cuando se utilizan en celdas de combustible, por lo tanto, se utilizó el medio de cultivo “NABF” reportado por O’Brien y Malvankar, 2016

Para las lecturas del crecimiento microbiano se utilizó el equipo Cytosmart (marca Corning) que tiene un software Cell counter, el cual permite el conteo celular de forma electrónica. Se tomó 20  $\mu$ L de cada muestra y se adicionaron 20  $\mu$ L de azul de tripano, posteriormente se colocó en la cámara de conteo (especial del contador electrónico). La cámara se colocó en el equipo y se ajustaron los parámetros de diluciones. El equipo toma la lectura y manda la información a una computadora, este equipo genera imágenes que se analizan mediante un algoritmo de recuento de células, toma imágenes de la muestra y las analiza mediante un software Cell counter arrojando datos numéricos de la concentración celular, células vivas y muertas, tamaño aproximado y viabilidad.

Antes del ensamblado de la CCM se activó la membrana de Nafion No. 117. Para esto se recortó la membrana a manera de un círculo de 1.5 cm de radio, después siguiendo la metodología de Taeger *et al.*, (2003) se sumergió en una solución de HCl 1N durante 48 horas, después se lavó con agua desionizada para eliminar el exceso de ácido y posteriormente se sumergió en 25 mL de una solución que contenía NaCl 2M durante 72 horas (para sustituir los H<sup>+</sup> por Na<sup>+</sup> en la membrana), pasado ese tiempo se lavó nuevamente con agua desionizada. Después de la activación la membrana se puede utilizar para el ensamblado de la celda. Una vez activada la membrana Nafion No. 117, se procedió al ensamblaje de la CCM (marca “Adams & Chittenden”), se colocó la membrana en la unión entre las dos cámaras y se selló de manera hermética con un seguro incluido en la celda.

En una cámara de anaerobiosis previamente preparada, a la cámara anódica se vaciaron 100 mL del medio de cultivo A con acetato y en la cámara catódica 100 mL de una solución de tris-HCl 30 mM más los reactivos del medio de crecimiento sin NaHCO<sub>3</sub>, apoyándose en la metodología de Lovely & Phillips, 1998, Esteve-Núñez y col 2005, Jain y col 2011.

Para los electrodos se utilizó grafito plano de 10 cm de largo por 1.5 cm de ancho (superficie total: 15 cm<sup>2</sup>) con conductividad eléctrica, asegurando que el área sumergida dentro de la CCM tanto para el ánodo como para el cátodo fuera la misma (6 cm de largo y 1.5 cm de ancho, área: 9 cm<sup>2</sup>)

Después de 816 h de uso, el medio de la cámara anódica que originalmente tenía un aspecto transparente y homogéneo, cambió a uno más opaco y con algunas partículas dispersas y precipitaciones.

**RESULTADOS**

En la figura 1 se representa la medición de potencial en la CCM desde el blanco hasta las 816h de experimento, la medición duró aproximadamente 300s con excepción del blanco y el inicio del experimento. Se puede observar que el voltaje (potencial) va aumentando conforme aumenta el número de horas, sin embargo, para cada medición se mantiene estable.

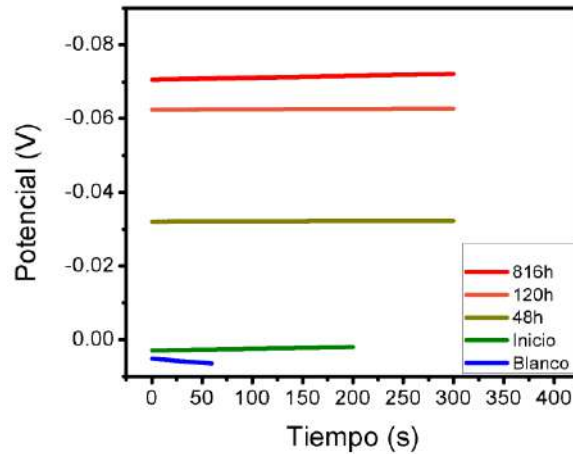


Figura 1: Potencial en circuito abierto para la CCM desde blanco a 816h de experimentación.

Para verificar el incremento de potencial se eligió 50s como tiempo común para todas las mediciones (Figura 2), en esta figura se puede observar claramente el cambio en el potencial y que aumenta lentamente durante las primeras 120h, posteriormente se observan variaciones y finalmente incrementa el potencial en el tiempo máximo de medición, 816h. Esta respuesta de potencial es lenta con respecto a lo reportado por Guo (2013) quien menciona que obtuvo respuesta de potencial en las primeras 50 h de análisis.

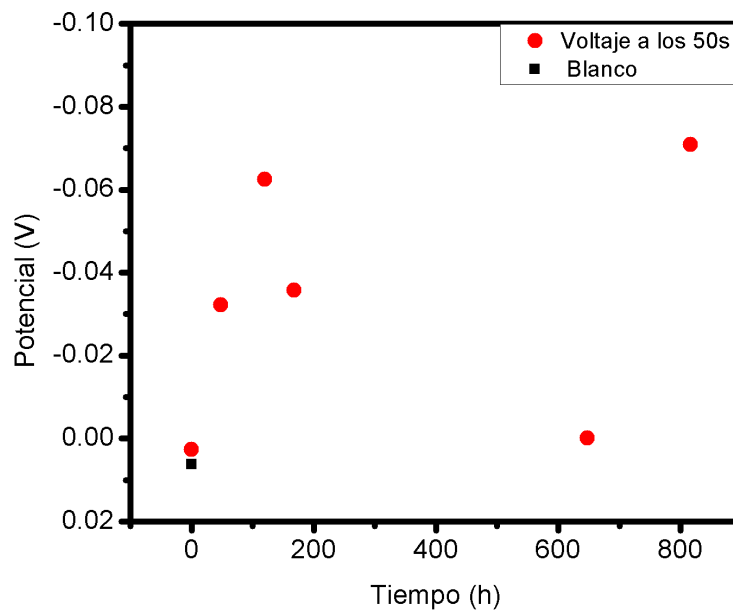
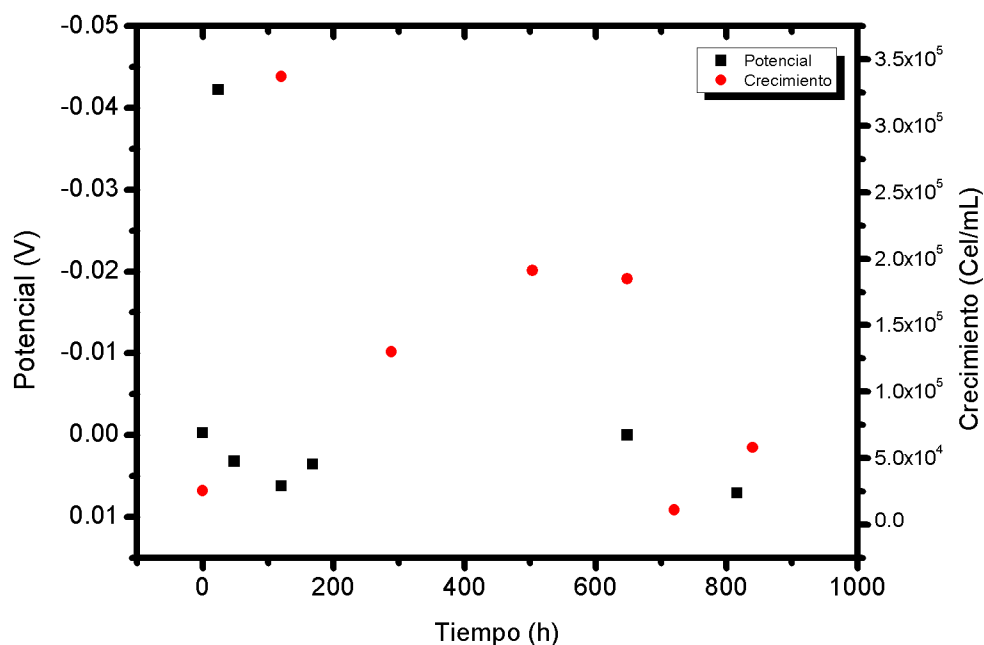


Figura 2: Potencial en circuito abierto para todas las muestras a los 50s de medición

Relacionando el potencial con el crecimiento de *G. sulfurreducens* (Figura 3), se observó primero que la bacteria crece una escala logarítmica y se mantiene en esta escala hasta por un tiempo de 30 días (720 horas) mayor a lo reportado por Wan et al., 2018 (50h), Jimenez-Escamilla, 2018 (20h) y Caccavo *et al.*, 1994 (552h) a condiciones similares a las utilizadas en este trabajo. Mientras que el potencial mantiene un comportamiento acorde al crecimiento de la bacteria, se observa que el voltaje aumenta y disminuye de manera directamente proporcional a la densidad de las células de *Geobacter sulfurreducens*, un poco mayor a lo reportado por Guo, 2013.

Figura 3. Potencial en circuito abierto vs crecimiento de *G. sulfurreducens* para todas las muestras a los 50s de medición

## CONCLUSIONES

El empleo de una CCM de dos cámaras permite el crecimiento de *G. sulfurreducens*. Aunque el crecimiento de *G. sulfurreducens* es bajo (incremento de una escala logarítmica) pero se mantiene estable durante 3 días (720 h), esta estabilidad de crecimiento sobre el tiempo podría ser benéfica para el análisis eléctrico, debido a que el metabolismo de la bacteria no está dirigiéndose a la producción de biomasa, sino que su metabolismo se encuentra enfocado en la producción energética lo que resulta en un mejor aprovechamiento de la CCM. Con el análisis de potencia se concluye que *G. sulfurreducens* está en la ruta bioeléctrica.

## BIBLIOGRAFÍA

1.-Aklujkar, M. and Lovley, D.R. (2010). Interference with histidyl-tRNA synthetase by a CRISPR spacer sequence as a factor in the evolution of *Pelobacter carbinolicus*. *BMC Evol. Biol.* 10, 230.

- 2.-Anderson, R.T., Rooney-Varga, J.N., Gaw, C.V. and Lovley, D.R. (1998). Anaerobic benzene oxidation in the Fe(III) reduction zone of petroleum contaminated aquifers. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1222–1229
- 3.-Bond, D.R., Lovley, D.R. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1548-55 (2003).
- 4.-Butler, J.E., Young, N.D. and Lovley, D.R. (2010). Evolution of electron transfer out of the cell: comparative genomics of six *Geobacter* genomes. *BMC Genomics* 11, 40.
- 5.-Caccavo, F., Jr., Lonergan, D.J., Lovley, D.R., Davis, M., Stolz, J.F. and McInerney, M.J. (1994). *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate- oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3752–3759
- 6.-Childers, S. E., S. Ciufo, and D. R. Lovley. 2002. *Geobacter metallireducens* accesses insoluble Fe(III) oxide by chemotaxis. *Nature* 416:767–769
- 7.-Coppi, M.V., Leang, C., Sandler, S.J., and Lovley, D.R. (2001) Development of a genetic system for *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Environ Microbiol* 67: 3180–3187
- 8.-Cornejo Martell, A. J. (2013). *Estudio del microbioma presente en celdas de combustible microbianas*
- 9.-Ding, Y.H., Hixson, K.K., Giometti, C.S., Stanley, A., Esteve-Nunez, A., Khare, T., Tollaksen, S.L., Zhu, W., Adkins, J.N., Lipton, M.S., Smith, R. D. Mester, T., et al. (2006). The proteome of dissimilatory metal-reducing microorganism *Geobacter sulfurreducens* under various growth conditions. *Biochim. Biophys. Acta* 1764, 1198–1206
- 10.-Esteve-Nunez, A., Rothermich, M., Sharma, M. and Lovley, D. (2005). Growth of *Geobacter sulfurreducens* under nutrient-limiting conditions in continuous culture. *Environ. Microbiol.* 7, 641–648
- 11.-Finneran, K.T., Anderson, R.T., Nevin, K.P., and Lovley, D.R. (2002) Potential for bioremediation of uraniumcontaminated aquifers with microbial U(VI) reduction. *Soil Sediment Contamination* 11: 339–357
- 12.-Gaspard, S., Vazquez, F. and Holliger, C. (1998). Localization and solubilization of the iron(III) reductase of *Geobacter sulfurreducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3188–3194
- 13.-Guo, K., Freguia, S., Dennis, P. G., Chen, X., Donose, B. C., Keller, J., Gooding, J. J., & Rabaey, K. (2013). Effects of surface charge and hydrophobicity on anodic biofilm formation, community composition, and current generation in bioelectrochemical systems. *Environmental Science & Technology*, 47(13), 7563–7570. <https://doi.org/10.1021/es400901u>
- 14.-Holmes, D.E., Bond, D.R., O'neil, R.A., Reimers, C.E., Tender, L.R. and Lovley, D.R. (2004a). Microbial communities associated with electrodes harvesting electricity from a variety of aquatic sediments. *Microb. Ecol.* 48, 178–190.
- 15.-Jiménez-Escamilla, M. G., Garibay-Orijel, C., & Borja-Salin, M. A. (2018). Modelo bioquímicamente estructurado para la estimación de la eficiencia de una celda de combustible microbiana. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34(2), 331–345.
- 16.-Kim J.; Min B.; Logan B. (2005). Evaluation of procedures to acclimate a microbial fuel cell for electricity production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 23-30.
- 17.-Leang, C., Coppi, M.V., and Lovley, D.R. (2003) OmcB, a c-type polyheme cytochrome, involved in Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *J Bacteriol* 185: 2096–2103.
- 18.-Lloyd, J.R., Leang, C., Hodges Myerson, A.L., Coppi, M.V., Ciufo, S., Methe, B., et al. (2003) Biochemical and genetic characterization of PpcA, a periplasmic c-type cytochrome in *Geobacter sulfurreducens*. *Biochem J* 369: 153–161
- 19.-Lovley, D.R. and Phillips, E.J. (1988a). Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1472–1480.
- 20.-Lovley, D.R., Stolz, J.F., Nord, G.L., Jr, and Phillips, E.J.P. (1987) Anaerobic production of magnetite by a dissimilatory iron-reducing microorganism. *Nature* 330: 252–254.
- 21.-Lovley, D.R., Phillips, E.J.P., Gorby, Y.A., and Landa, E.R. (1991) Microbial reduction of uranium. *Nature* 350: 413–416.
- 22.-Lovley, D.R. (1993). Dissimilatory metal reduction. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 263–290.
- 23.-Lovley, D.R. (2011a). Live wires: microbial extracellular electron transfer for bioenergy and the bioremediation of energy-related contamination

- 24.-Lovley, D.R., and Chapelle, F.H. (1995) Deep subsurface microbial processes. *Rev Geophys* 33: 365–381.
- 25.-Lloyd, J.R., Sole, V.A., Van Praagh, C.V., and Lovley, D.R. (2000) Direct and Fe(II)-mediated reduction of technetium by Fe(III)-reducing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 66: 3743–3749.
- 26.-Lloyd, J.R., Leang, C., Hodges Myerson, A.L., Coppi, M.V., Cuifo, S., Methe, B., et al. (2003) Biochemical and genetic characterization of PpcA, a periplasmic c-type cytochrome in *Geobacter sulfurreducens*. *Biochem J* 369: 153–161
- 27.-Malvankar, N.S., Vargas, M., Nevin, K.P., Franks, A.E., Leang, C., Kim, B.-C., Inoue, K., Mester, T., Covalla, S.F., Johnson, J.P., Rotello, V.M. Tuominen, M., et al. (2011). Tunable metallic-like conductivity in microbial nanowires networks. *Nat. Nanotechnol.* 6, 573–579.
- 28.-Magnuson, T.S., Hodges-Myerson, A.L. and Lovley, D.R. (2000). Characterization of a membrane-bound NADH-dependent Fe(III) reductase from the dissimilatory Fe(II)-reducing bacterium *Geobacter sulfurreducens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 185, 205–211.
- 29.-Magnuson, T.S., Ioyama, N., Hodges-Myerson, A.L., Davidson, G., Maroney, M.J., Geesey, G.G. and Lovley, D.R. (2001). Isolation, characterization and gene sequence analysis of a membrane-associated 89 kDa Fe(III) reducing cytochrome c from *Geobacter sulfurreducens*. *Biochem. J.* 359, 147–152
- 30.-Methe, B. A., K. E. Nelson, J. A. Eisen, I. T. Paulsen, W. Nelson, J. F. Heidelberg, D. Wu, M. Wu, N. Ward, M. J. Beanan, R. J. Dodson, R. Madupu, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, R. T. Deboy, A. S. Durkin, M. Gwinn, J. F. Kolonay, S. A. Sullivan, D. H. Haft, J. Selengut, T. M. Davidsen, N. Zafar, O. White, B. Tran, C. Romero, H. A. Forberger, J. Weidman, H. Khouri, T. V. Feldblyum, T. R. Utterback, S. E. Van Aken, D. R. Lovley, and C. M. Fraser (2003). Genome of *Geobacter sulfurreducens*: metal reduction in subsurface environments. *Science* 302, 1967-1969
- 31.-Nevin, K.P., Kim, B.C., Glaven, R.H., Johnson, J.P., Woodard, T.L., Methe, B. A., Didonato, R.J., Covalla, S.F., Franks, A.E., Liu, A. and Lovley, D.R. (2009). Anode biofilm transcriptomics reveals outer surface components essential for high density current production in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *PLoS One* 4, e5628.
- 32.-Ortiz-Bernad, I., Anderson, R.T., Vrioni, H.V., and Lovley, D.R. (2004) Vanadium respiration by *Geobacter metallireducens*: a novel strategy for the *in situ* removal of vanadium from groundwater. *Appl Env Microbiol* 70: 3091–3095
- 33.-O'Brien J. Patrick, Malvankar Nikhil S. (2016). A simple and Low-Cost procedure for growing *Geobacter sulfurreducens* cell cultures and biofilms in bioelectrochemical systems. *Current protocols in Microbiology.* 43:1-27. doi: 10.1002
- 34.-Park, I. and Kim, B.C. (2011). Homologous overexpression of omcZ, a gene for an outer surface c-type cytochrome of *Geobacter sulfurreducens* by single-step gene replacement. *Biotechnol. Lett.* 33, 2043–2048
- 35.-Reguera, G.; McCarthy, K.D.; Mehta, T.; Nicoll, J.S.; Tuominen, M.T.; Lovley, D.R. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature* 2005, 435, 1098–1101.
- 36.-Rooney-Varga, J.N., Anderson, R.T., Fraga, J.L., Ringelberg, D. and Lovley, D.R. (1999). Microbial communities associated with anaerobic benzene degradation in a petroleum-contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3056–3063.
- 37.-Romero Mejía, A. A., Vásquez, J. A., & Lugo González, A. (2012). Bacterias, fuente de energía para el futuro. *Revista Tecnura*, 16(32), 117.
- 38.-Rollefson, J.B., Levar, C.E. and Bond, D.R. (2009). Identification of genes involved in biofilm formation and respiration via mini-Himar transposon mutagenesis of *Geobacter sulfurreducens*. *J. Bacteriol.* 191, 4207–4217
- 39.-Ueki, T. and Lovley, D.R. (2010). Genome-wide gene regulation of biosynthesis and energy generation by a novel transcriptional repressor in *Geobacter* species. *Nucleic Acids Res.* 38, 810–821.

## OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE BIOPELÍCULAS A BASE DE RESIDUOS ORGÁNICOS

Maribel Santiago Teodoro, Ariana Monroy Hernández, Cesar Iván Hernández Garcés, Agustín Alfredo Torres Rodríguez

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

### RESUMEN

Actualmente se producen innumerables cantidades de plásticos de un solo uso generando grandes cantidades de residuos, por lo que para su degradación se requiere de muchos años ocasionando la contaminación de suelos, ríos y océanos. En este trabajo se propone una metodología para la obtención de biopelículas a partir de residuos naturales como la cáscara de plátano, naranja, papa y hueso de aguacate. Para llevar a cabo este procedimiento se utilizó glicerina, un porcentaje de almidón de maíz, agua y las cáscaras de los residuos. En cada biopelícula se buscó que tuvieran buenas propiedades de elasticidad, textura, homogeneidad, resistencia y durabilidad muy semejantes a las que se obtienen a partir de polietileno. Se llevó a cabo la caracterización de cada biopelícula midiendo la cantidad de humedad, densidad, solubilidad y permeabilidad. Las biopelículas obtenidas presentaron buenas propiedades físicas y mecánicas, observándose películas delgadas con una superficie lisa, casi transparente de color uniforme de acuerdo a la materia prima empleada. El de mejor resultado fue la biopelícula obtenida del hueso y cáscara de aguacate ya que presentaron mayor resistencia y durabilidad, además de que adquirieron un color naranja llamativo, importante para ser aplicado en un producto final.

### INTRODUCCIÓN

En la búsqueda de soluciones sostenibles y amigables con el medio ambiente, la investigación y desarrollo de biopolímeros a base de residuos orgánicos ha ganado relevancia en los últimos años debido a que se ha convertido en un campo prometedor y de gran importancia científica. Estos biopolímeros representan una alternativa para reemplazar los materiales convencionales derivados de recursos no renovables como los plásticos tradicionales, ya que se obtienen a partir de fuentes renovables y pueden ser biodegradables.

Los biopolímeros son polímeros naturales o sintéticos derivados de fuentes biológicas, como plantas, microorganismos y residuos orgánicos. Su estructura química única les confiere propiedades físicas y químicas ajustables, lo que los convierte en materiales versátiles con aplicaciones potenciales en diversas industrias, como la alimentaria, la farmacéutica, la cosmética, la agrícola y la de empaques, entre otras [1,2].

La utilización de residuos orgánicos como materia prima para la producción de biopelículas ofrece numerosos beneficios. En primer lugar, reduce la dependencia de los recursos fósiles y disminuye la presión sobre el medio ambiente, al aprovechar materiales que de otro modo se considerarían desechos. Además, fomenta la economía circular al cerrar el ciclo de vida de los residuos y convertirlos en recursos valiosos.

La producción de biopelículas a base de residuos orgánicos implica una combinación de procesos biotecnológicos y de ingeniería química. A través de la fermentación microbiana, se pueden obtener biopolímeros y metabolitos a partir de sustratos orgánicos, como residuos agrícolas, residuos de alimentos o subproductos industriales. Estos biopolímeros se pueden procesar para formar películas flexibles y resistentes que pueden ser utilizadas en una amplia gama de aplicaciones, como empaques biodegradables, recubrimientos protectores, productos médicos y materiales de construcción [3,6].

Por ejemplo, la cáscara de plátano, naranja, papa y hueso de aguacate contienen una variedad de componentes químicos valiosos que pueden ser aprovechados en la producción de biopolímeros. La cáscara de naranja y plátano es rica en polisacáridos como la celulosa, la hemicelulosa y la pectina. Estos polisacáridos pueden extraerse mediante métodos de pretratamiento y posterior hidrólisis



enzimática o química. Por su parte, el hueso de aguacate contiene quitina, que puede ser convertida en quitosano mediante procesos de desacetilación [7]. La cáscara de papa también contiene polisacáridos y otros compuestos que pueden ser extraídos y utilizados en la producción de biopolímeros. Los bioplásticos obtenidos a partir de residuos orgánicos presentan propiedades físicas y químicas ajustables que los hacen atractivos para diversas aplicaciones. La celulosa de la cáscara de naranja y plátano puede ser utilizada para la producción de películas y recubrimientos biodegradables con propiedades barrera y mecánicas adecuadas. La pectina, por su capacidad para formar geles, puede ser empleada en aplicaciones alimentarias y farmacéuticas, como espesantes y estabilizantes. El quitosano derivado del hueso de aguacate tiene propiedades antimicrobianas y puede ser utilizado en la fabricación de materiales biomédicos, como vendajes y suturas. Asimismo, los polisacáridos de la cáscara de tuna ofrecen potencial como agentes encapsulantes y liberadores de compuestos bioactivos [2,4,5].

Aunque los biopolímeros a base de residuos orgánicos presentan numerosas ventajas, existen desafíos que deben abordarse para su implementación a gran escala. Estos desafíos incluyen la optimización de los procesos de extracción y purificación de los componentes deseados, la estandarización de las propiedades de los biopolímeros obtenidos y la viabilidad económica de su producción a nivel industrial. Además, se requiere un mayor estudio sobre la biodegradabilidad y la vida útil de estos materiales, así como la evaluación de su impacto ambiental en comparación con los polímeros sintéticos convencionales.

En este trabajo, se muestra el estudio de biopolímeros a base de residuos orgánicos como la cáscara de naranja, papa, plátano y hueso de aguacate, con la finalidad de analizar sus propiedades fisicoquímicas y su potencial para reemplazar los materiales convencionales en diversas aplicaciones industriales.

## PARTE EXPERIMENTAL

La obtención del biopolímero se realizó mediante la metodología húmeda, en la cual se recolectó la materia prima como cáscaras de la fruta o hueso de aguacate, según el caso y se prosiguió a cortar el material en trozos mas pequeños para facilitar el procesamiento. En el caso del hueso de aguacate se rayó mediante un rayador de metal. Posteriormente se trituran con cierta cantidad de agua para después ser filtrado (Figura 1).



Figura 1. Cáscaras y hueso de aguacate para la obtención de bioplástico.

En seguida, se combina agua destilada y el filtrado en un vaso de precipitado, junto con el almidón de maíz hasta su completa disolución. Después se le agrega la glicerina que tiene la función de plastificante y coadyuva en las propiedades del biopolímero y vinagre el cual permite que la estructura del bioplástico se estabilice, neutralizando los polímeros no regulares que se encuentran presentes en el almidón. La mezcla se coloca en una parrilla de agitación-calentamiento manteniendo en agitación constante para lograr una distribución homogénea de los componentes (Fig.2).



Figura 2. Mezclado de componentes en proporciones adecuadas

La siguiente tabla (Tabla 1) muestra las proporciones utilizadas para la obtención de la biopelícula.

Tabla 1. Porcentaje en peso de sustancias para biopelícula

SUSTANCIAS	% peso
Agua destilada	56.24
Fécula de maíz	5.62
Glicerina	21.26
Vinagre	8.44
Residuo orgánico	8.44
	100

Finalmente se vierte la mezcla obtenida en un molde o recipiente plano, tomando en cuenta el espesor deseado de la película. Se extiende la mezcla de manera uniforme y se alisa la superficie con una espátula u objeto similar (Fig. 3). Se deja secar la biopelícula a temperatura ambiente. Se controla periódicamente el estado de secado y se retira la biopelícula del molde cuando esté completamente seca y rígida. Las biopelículas resultantes



Fig. 3 Extendido de mezcla para la biopelícula.

## RESULTADOS

Las biopelículas obtenidas a partir de cáscara de naranja (NR), papa (PP), plátano (PL), y hueso de aguacate (AG) (Figura 4) mostraron propiedades prometedoras. En términos de espesor, se observaron variaciones dependiendo del material utilizado, con un rango de 0.25 a 1.5 mm. La resistencia mecánica de las biopelículas varió según la fuente del material, mostrando valores de resistencia a la tensión de 49.38 a 60.55 Pa para el obtenido mediante hueso de aguacate, tal como se observa en la tabla 2.

En cuanto a la permeabilidad al vapor de agua, se encontró que las biopelículas a base de cáscara de plátano y papa presentaron una baja tasa de permeabilidad, lo que indica un buen potencial para su uso como recubrimientos protectores en aplicaciones de envasado de alimentos. Se determinó el porcentaje de humedad mediante una balanza termogravimétrica, obteniendo un rango de 43.85 a 47%. Todas las biopelículas mostraron una capacidad significativa para retener la humedad, lo que podría contribuir a la conservación y frescura de productos envasados. Las propiedades determinadas para los biopolímeros obtenidos son mostradas en la tabla 2.

Tabla 2. Propiedades de las biopelículas obtenidas

Muestra de acuerdo al residuo orgánico utilizado.	Densidad (g/mL)	Elasticidad	Resistencia a la tensión (Pa)	% humedad
PL	1.2493	0.35	49.38	44.57
NR	1.2390	0.25	55.55	53.48
PP	1.2365	0.24	60.49	47
AG	1.2341	0.25	60.55	43.85



Figura 4: Biopelículas obtenidas a base de la cascara de naranja, plátano y hueso de aguacate.

Se obtuvieron diversas biopelículas según el residuo utilizado (cascara de naranja, plátano y papa, y hueso de aguacate) dentro de los resultados se observó que el bioplástico elaborado a partir del hueso de aguacate, tuvo mejores propiedades ya que en cuanto a la flexibilidad, la película no mostró deformación alguna, además tuvo mejor resistencia a la tensión con respecto a las otras.



Fig.5. Biopelículas a base de residuos orgánicos.

**CONCLUSIONES**

La utilización de residuos orgánicos, como la cáscara de naranja, plátano, papa y hueso de aguacate, para la producción de biopolímeros representa una oportunidad valiosa para promover la sostenibilidad y reducir la dependencia de los recursos no renovables. Estos biopolímeros ofrecen propiedades ajustables y diversas aplicaciones en áreas como la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética y de empaques. Sin embargo, es necesario abordar los desafíos técnicos y económicos para su implementación a gran escala. La investigación continua en este campo es crucial para desarrollar soluciones sostenibles y contribuir a un futuro más respetuoso con el medio ambiente.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Alarcón Cavero, Hugo Arturo y Arroyo Benites Edmundo (2016). Evaluación de las propiedades químicas y mecánicas de biopolímeros a partir de almidón modificado de papa. *Rev Soc Quím Perú*. 82(3) 2016
2. Chan, J.X.; Wong, J.F.; Hassan, A.; Zakaria, Z. (2021) *Bioplastics from Agricultural Waste*; Matthew Deans: Oxford, UK.
3. Evelin Alata Mayhuire, Yuri Cuadros Huamaní, Luis Miranda Zanardi, Esperanza Medina de Miranda (2019). Biopelículas producidas con cáscara de naranja y reforzadas con celulosa bacteriana, *Rev Soc Quím Perú*. 85(2) 2019
4. Jayachandra S. Yaradoddi et al (2021). Bio-based material from fruit waste of orange peel for industrial applications, *Journal of Materials Research and Technology*, Volume 17, March–April 2022, Pages 3186-3197
5. Maura G. Alcivar-Gavilanes, et al (2022). Development of a Bioplastic from Banana Peel. *Ingeniería e Investigación*, vol. 42 No. 3, December – 2022. <https://doi.org/10.15446/ing.investig.92768>
6. Senthil Muthu Kumar T, Rajini N, Alavudeen A, Suchart Siengchin, Varada Rajulu A & Nadir Ayrilmis (2021) Development and Analysis of Completely Biodegradable Cellulose/Banana Peel Powder Composite Films, *Journal of Natural Fibers*, 18:1, 151-160, DOI: 10.1080/15440478.2019.1612811.
7. Wanli Zhang, Xiangxin Li, Weibo Jiang (2020). Development of antioxidant chitosan film with banana peels extract and its application as coating in maintaining the storage quality of apple, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.275

## EVALUACIÓN DE ASPECTOS DE LA DINÁMICA POBLACIONAL DE *FEROCACTUS PILOSUS* (GALEOTTI EX SALM-DYCK) WERDERM EN LA SIERRA DE CATORCE, SAN LUIS POTOSÍ

Rocío Zárate-Hernández<sup>1</sup>, Claudia Ballesteros-Barrera<sup>1</sup>, Selene Ortiz-Burgos<sup>2</sup>, Bárbara Vargas-Miranda<sup>1</sup>, Angelica Martínez-Bernal<sup>1</sup> y Emiliano Cruz Torrejón<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. C.P.: 09340, San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, D.F. México, <sup>2</sup>Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México. Batalla 5 de mayo S/N, Col. Ejército de Oriente, CP 09230. México, D.F.

gsob@xanum.uam.mx

### RESUMEN

México cuenta con más del 50% de su territorio ocupado por zonas áridas y semiáridas, pero a pesar de esto son unos de los ecosistemas de los que menor conocimiento se tiene sobre la biología de sus especies y que pueden contribuir a su potencial aprovechamiento y sustentabilidad. Este estudio se centra en la especie *Ferocactus pilosus* denominado “biznaga de espinas” rojas o “biznaga barril de lima”, especie endémica de amplia distribución y que actualmente se encuentra dentro la categoría de riesgo sujeta a protección especial, por la NOM-059-SEMARNAT 2010. Debido a la poca información que se tiene de esta, se realizó un registro en cinco zonas cercanas a la Sierra de Catorce en el estado de San Luis Potosí, México. Para cada individuo se registró la altura y el radio, realizándose un análisis descriptivo para la estructura de edades, además de aplicar una correlación simple y una regresión lineal, para determinar la relación entre estos dos parámetros. Se registraron un total de 60 individuos, con una altura que se encontró entre los 6 y 259 cm de altura y con un diámetro de entre 12 y 159 cm, la relación entre ambas variables resultó significativa ( $r=0.63$ ;  $p<0.0001$ ). Mediante el análisis de la estructura de edades se determinaron 6 clases donde se observa que hay un alto número de individuos en los primeros estadios, pero muy pocos en las últimas clases de edad. Mediante los resultados obtenidos se determinó que se presenta una distribución unimodal lo cual indica un reclutamiento constante en la población. Los resultados contribuyen a la comprensión la dinámica poblacional de esta especie de la cual aún se conoce poco, por lo que se resalta la importancia de realizar este tipo de estudios ampliándose al registro de estructuras reproductivas y frutos para así contribuir a un mayor conocimiento de la dinámica de esta especie.

### INTRODUCCIÓN

México cuenta con una amplia variedad de escenarios biológicos resultado de su compleja orografía e historia geológica, lo que resulta en la conformación de ecosistemas complejos y que debido a estas mismas causas ha obligado a las especies a responder a estas influencias ambientales. Entre estos organismos las especies de la Familia Cactacea son un ejemplo de respuestas evolutivas complejas que les han permitido adaptarse a un ambiente de características extremas en temperatura, radiación y escasez de agua. Debido a que México cuenta con más del 50% de su territorio ocupado por zonas áridas y semiáridas, son unos de los ecosistemas de los que menor conocimiento se tiene sobre la biología de sus especies lo que hace necesario resaltar la importancia de las cactáceas en la estructura y la dinámica de estos ambientes.

Destacando así la relevancia del estudio de las especies que se distribuyen en estas zonas, como lo es el cactus *Ferocactus pilosus*, considera una especie endémica de México y que se encuentra distribuida principalmente en los estados del norte del país, como son Durango, Coahuila de Zaragoza, Nuevo León, Zacatecas, Tamaulipas y San Luis Potosí. Es una especie con crecimiento lento debido a su adaptación a los hábitats de poca humedad y altas temperaturas, con baja dispersión y de migración corta, se conoce muy poco sobre su biología y dinámica poblacional.

Por lo que este estudio se centra en esa especie también denominada “biznaga de espinas rojas” o “biznaga barril de lima”, la cual actualmente se encuentra dentro la categoría de riesgo sujeta a protección especial, por la NOM-059-SEMARNAT 2010, a pesar de lo poco que se conoce de la biología de la especie (COBAPIT 2021a; 2021b).



## METODOLOGIA

Estudio se llevó a cabo en la Sierra de Catorce (Figura 1) esta región se localiza en el sector suroriental del Desierto Chihuahuense, al norte del estado de San Luis Potosí. Tiene una dimensión aproximada de 40 km de longitud, en el sentido N-S, y 35 km de anchura, en sentido E-W, y está delimitada por las coordenadas  $23^{\circ}16'47'' - 23^{\circ}53'58''$  N, y  $100^{\circ}29'64'' - 101^{\circ}05'49''$  W; sus cumbres, en torno a los 3,000 msnm., se elevan más de 1,500 metros con respecto a las planicies que la bordean (Giménez de Azcárate & González Costilla, 2011).

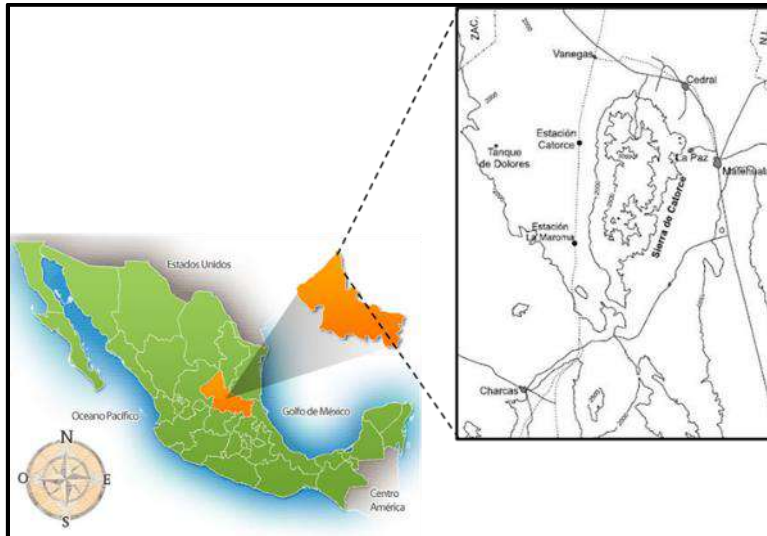


Figura 1. Toponimia del Municipio de Juárez, Chihuahua (Modificado de Mexicoreal, 2012, González Costilla, 2007).

Se ubicó a cada organismo al cual se le registró el radio y la altura, con esta información se realizó un análisis descriptivo para determinar la estructura de tamaños, así como una correlación simple y una regresión lineal para determinar la relación entre estos dos parámetros, después de haber evaluado los supuestos de normalidad y homocedasticidad.

## RESULTADOS

Se registraron un total de 60 individuos de *F. pilosus*, los cuales mostraron un promedio de altura de 67.2 cm y con un intervalo que se encontró entre los 6 y 250 cm. La distribución de la altura (Figura 2) mostró una conformación de seis clases de tamaño, presentando una distribución unimodal donde el número de individuos se concentró en la primera clase de tamaño indicando un alto número de organismos juveniles.



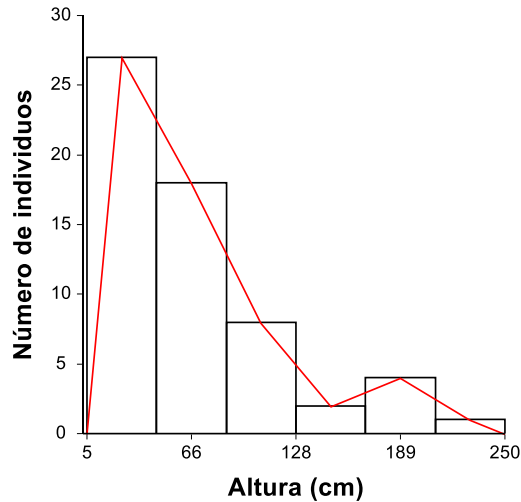


Figura 2. Distribución de la estructura de tamaños construido con la altura de *Ferocactus pilosus*.

La estructura de terminada mediante el radio (Figura 3) el cual se encontró entre 1 y 25.3 cm, la distribución del radio mostró ocho intervalos de tamaño donde se observa una distribución que muestra dos modas, una muestra radios pequeños que coinciden con el alto número de individuos en estados juveniles, la otra moda es alta en radios relativamente grandes.

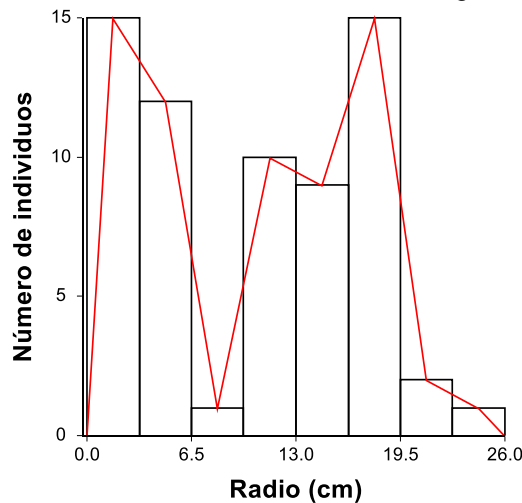


Figura 3. Distribución de la estructura de tamaños construido con el radio de *Ferocactus pilosus*.

El análisis de correlación simple de Pearson mostro un valor de  $r= 0.6271$ , con una probabilidad de  $p<0.0001$ , resultando significativa, demostrando que existe una relación media entre altura y radio, asimismo la regresión lineal resulto baja con una  $r^2=0.3932$  y resultando significativa ( $p<0.0001$ ).

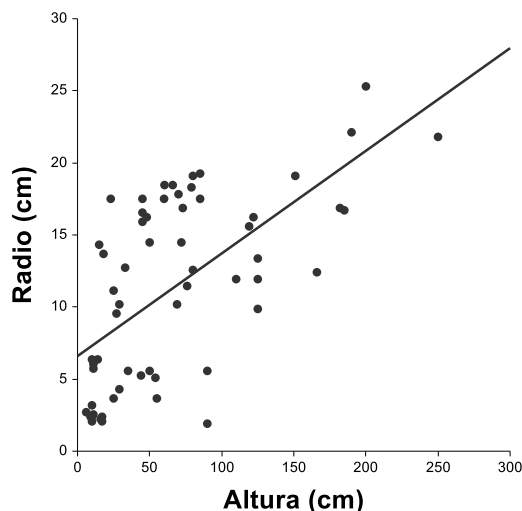


Figura 4. Línea de tendencia de la regresión lineal y distribución entre el radio y la altura de *Ferocactus pilosus*.

## CONCLUSIONES

Se demostró que en la población *F. pilosus* considerando la altura de los organismos y el radio, presenta una alta abundancia de organismos juveniles y radios pequeños demostrando que la población mantiene una dinámica estable ya que se asegura el reclutamiento de nuevos individuos y observando una disminución de individuos conforme aumenta la edad, el cual no es de forma drástica entre un intervalo y otro tanto para la altura como para el radio. La relación significativa entre radio y altura contribuye a determinar como se presenta el crecimiento resultando que este se asocia es decir crecen en altura y radio de una manera proporcional, lo cual puede determinar cómo se distribuyen los recursos en el desarrollo de *F. pilosus*, aspecto puede asociarse directamente con la reproducción.

Los resultados de este trabajo contribuyen a la comprensión la dinámica poblacional de esta especie de la cual aún se conoce poco, por lo que se resalta la importancia de realizar este tipo de estudios ampliándose al registro de estructuras reproductivas y frutos para así contribuir a un mayor conocimiento de la dinámica de esta especie. Sobre todo, es importante considerar que el hábitat cambia y se transforma de manera importante por las actividades humanas, además del saqueo que sufren muchas especies de cactáceas hace necesario conocer la biología de esta especie para así poder establecer bases para el manejo y conservación de la misma.

## BIBLIOGRAFÍA

1. COBAPIT. (Comisión de Parques y Biodiversidad de Tamaulipas). 2021a. "Conocimiento y acciones emprendidas para la conservación de la biznaga de espina roja *Ferocactus pilosus*". Sexto Informe Nacional de México ante el Convenio sobre la Diversidad Biológica. Disponible en: [https://chm.cbd.int/api/v2013/documents/7DFED332-8E25-6C00-8F1B-FD50DFBE5D54/attachments/210274/TAM\\_Conocimiento%20y%20conservaci%C3%B3n\\_Biznaga.pdf](https://chm.cbd.int/api/v2013/documents/7DFED332-8E25-6C00-8F1B-FD50DFBE5D54/attachments/210274/TAM_Conocimiento%20y%20conservaci%C3%B3n_Biznaga.pdf)
2. COPABIT. (Comisión de Parques y Biodiversidad de Tamaulipas). 2021b. "Conservación de la biznaga cabuchera (*Ferocactus pilosus*) en Tamaulipas". Sexto Informe Nacional de México ante el Convenio sobre la Diversidad Biológica. Disponible en:
3. [https://www.biodiversidad.gob.mx/media/1/planeta/internacional/files/6IN\\_parte\\_5\\_Meta\\_GSPC\\_2\\_CLOSE.pdf](https://www.biodiversidad.gob.mx/media/1/planeta/internacional/files/6IN_parte_5_Meta_GSPC_2_CLOSE.pdf)
4. Mexicoreal. 2012. "Estado de San Luis Potosí de la República Mexicana". Disponible en:
5. [https://mr.travelbymexico.com/imgBase/2012/04/sanluispotosi\\_edo.jpg](https://mr.travelbymexico.com/imgBase/2012/04/sanluispotosi_edo.jpg)

6. O. González Costilla, J. Giménez de Azcárate, J. García Pérez & J.R. Aguirre Rivera. Flórua vascular de la Sierra de Catorce y territorios adyacentes, San Luis Potosí, México. Act. Bot. Mex. 78, 2007. pp. 1-38
7. J. Giménez de Azcárate & O. González Costilla.. "Pisos de vegetación de la Sierra de Catorce y territorios circundantes (San Luis Potosí, México)". Acta Botánica Mexicana, 2011. 94: 91-123.
8. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/abm/n94/n94a4.pdf>
9. E.R. Rodríguez-Ruíz, H. Vaquera-Huerta, C.S. Venegas-Barrera, F. Cervantes-Ortíz, W.A. Poot-Poot, J.A. Rangel-Lucio. "Morfometría de fruto y semilla de poblaciones de *Ferocactus pilosus* del Altiplano Tamaulipeco". Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas Vol. 14, 1, 2023. pp. 39-49.

## SÍNTESIS VERDE DE COMPLEJOS METÁLICOS DE BASES DE SCHIFF TIPO SALÉN EN UNA SOLA ETAPA A TEMPERATURA AMBIENTE

Brenda Vianney Albarrán Cruz<sup>1</sup>, Ana Karen Márquez Juárez<sup>2</sup>, Fernanda Juárez Munguía<sup>2</sup>, Evelyn Mariana Gómez López<sup>2</sup>, Raúl Ángeles Santana<sup>1</sup>, Ana Karen Acero Gutiérrez<sup>3</sup> y Fabian Mendoza Hernández<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería Campus Hidalgo, IPN, <sup>2</sup>Centro de Estudios Científicos y Tecnológicos No. 16 "Hidalgo", IPN, <sup>3</sup>Escuela Superior de Ingeniería Mecánica y Eléctrica Unidad Zacatenco, IPN  
albarranbrenda27@gmail.com

### RESUMEN

Se presenta la síntesis de complejos metálicos de bases de Schiff tipo salen, en una sola etapa y a temperatura ambiente. Este tipo de materiales tienen numerosas aplicaciones en catálisis, como inhibidores de crecimiento bacteriano, por su bioactividad, etc. La síntesis tradicional de estos compuestos implica en primera instancia obtener (por calentamiento a reflujo durante 2-3 horas) el ligando orgánico a través de la reacción entre un derivado de salicilaldehído y una diamina (etilendiamina u *orto*-fenilendiamina, habitualmente). Obtenido el ligando orgánico se hace reaccionar con un catión metálico igualmente con calentamiento a reflujo durante 3 horas. En ambos casos los productos de reacción se recuperan por filtración a vacío, obteniéndose rendimientos cercanos al 90%. El método propuesto en este trabajo lleva a cabo la síntesis de los complejos en una sola etapa de reacción a temperatura ambiente, en un tiempo promedio de 30 minutos, con rendimientos superiores al 90%. Se obtuvieron complejos metálicos formados por el ligando salen y saloph y  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  y  $Cu^{2+}$  como cationes metálicos. A las reacciones se les dio un seguimiento por cromatografía en capa fina. Los productos finales fueron analizados por espectroscopia de infrarrojo y de ultravioleta visible. La formación aparente de ácido acético in situ en el medio de reacción es lo que sería responsable de poder llevar a cabo la formación de los complejos en una sola etapa de síntesis. El método propuesto resulta ser eficiente, práctico, rápido en la obtención de los complejos metálicos, obteniendo así una reducción significativa en el consumo energético del proceso y disminuyendo la cantidad de residuos, lo que se encuentra dentro de los principios que enmarca la Química Verde y siguiendo los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la ONU.

### INTRODUCCIÓN

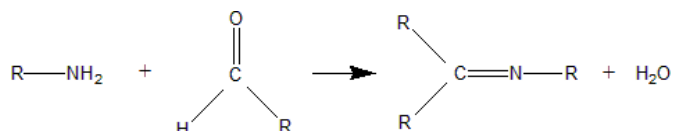
En la actualidad, uno de los mayores desafíos de los químicos de todo el mundo es la creación de nuevos materiales o nanomateriales de manera rápida, eficaz y asequible económicamente, que sean funcionales y que no comprometan de forma negativa al medio ambiente y la salud humana, pues, desde la antigüedad, este había sido un proceso largo, costoso y poco preciso, el cual, amenazaba la evolución y el progreso de los avances tecnológicos de esta industria; es por ello que, debido a sus amplias aplicaciones catalizadoras, los compuestos de coordinación constituyen gran parte de las investigaciones del campo de la química [5].

Las bases de Schiff o iminas, han sido ligandos bastante útiles dentro de la química de coordinación (como los ligandos tipo salen), ayudando en la síntesis y desarrollo de nuevos compuestos estables en su estructura que, además, presentan una gama de propiedades antibacterianas, antiinflamatorias, anticancerígenas, antivirales, antifúngicas, entre otras [1].

### TEORÍA

#### Bases de Schiff

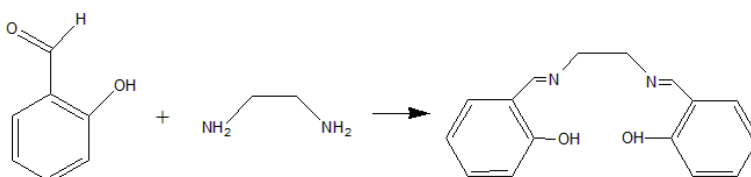
Las bases de Schiff son compuestos orgánicos obtenidos de la reacción entre aminas primarias con aldehídos o cetonas. Estos compuestos contienen un doble enlace carbono-nitrógeno que, al sintetizarlos, se obtienen como producto secundario moléculas de agua, como se puede observar en la reacción de la Figura 1, donde el primer componente es una amina primaria y el segundo es el aldehído o cetona [6][7].



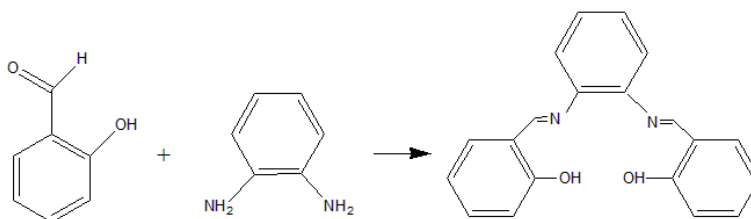
**Figura 7. Síntesis de una Base de Schiff**

### Compuestos de coordinación a partir de bases de Schiff

Los compuestos de coordinación son aquellos formados por un ácido de Lewis y una base de Lewis, es decir, un metal y un donador de un par electrónico, respectivamente; estos donadores se conocen como ligandos, pues se encargan de unir compuestos para la formación de estas estructuras. Un ejemplo común es la familia de los ligandos tipo Salen, pertenecientes a las iminas; estos ligandos resultan de la reacción entre salicilaldehído y etilendiamina (Figura 2), aunque también existen los ligandos tipo Saloph pertenecientes a la misma familia de ligandos Salen, resultantes de la reacción entre salicilaldehído y *orto*-fenilendiamina (Figura 3) [4][7].



**Figura 8. Síntesis de ligando Salen.**



**Figura 9. Síntesis de ligando Saloph.**

### Espectrometría de masas por electroespray

Es una técnica analítica que nos permite esclarecer estructuras químicas y sus propiedades, la espectrometría de masas está basada en la medición de la relación masa-carga ( $m/z$ ) de especies moleculares. La medición de esta relación también nos permite conocer el peso molecular exacto de la molécula. Sólo se requiere una cantidad pequeña de muestra para obtener información por medio de esta técnica [3].

La muestra es ionizada por diversos métodos, como lo es la técnica por electroespray (ESI) u otras que consisten en bombardear la muestra con una corriente de electrones a alta velocidad.

### Espectroscopía Infrarroja (IR)

Esta técnica es capaz de provocar cambios en los movimientos vibracionales de las moléculas a analizar, por medio de la inducción de absorción de la muestra que, depende del tipo de enlaces, grupos funcionales presentes en la misma y su locación.

La espectroscopía infrarroja mide la absorción de luz por una muestra en el intervalo del infrarrojo medio ( $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ ) del espectro electromagnético, correspondiente a cambios en el estado vibracional de las moléculas, estos espectros se representan gráficamente como la energía absorbida en función de la longitud de onda. Cuando estas moléculas absorben energía en esta región, experimentan vibraciones como estiramientos, doblamientos, torsión o balanceo que se reflejan en una o más localizaciones en el espectro y proporcionan información para el análisis de la composición y estructura química de las moléculas [2].

### PARTE EXPERIMENTAL

Para la síntesis de los complejos metálicos, en un matraz redondo de 250 ml se disolvieron 2 mmol de salicilaldehído en 10 ml de etanol, el cual fue agregado mediante goteo lento a un matraz con 1

mmol de o-fenilendiamina disuelta en 10 ml de etanol. A la mezcla en agitación se agregó 1 mmol del metal en cuestión ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) disuelto en 10 ml de etanol. La reacción se mantiene en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. El producto final se recuperó por filtración a vacío. Los rendimientos de la reacción se determinaron sobre el peso del material recuperado, siendo del 98% para el complejo con Cu, del 98% para Ni y del 95% para Mn. En la Figura 4 se observa el esquema de la síntesis de complejos metálicos a partir de ligandos de la familia salen.

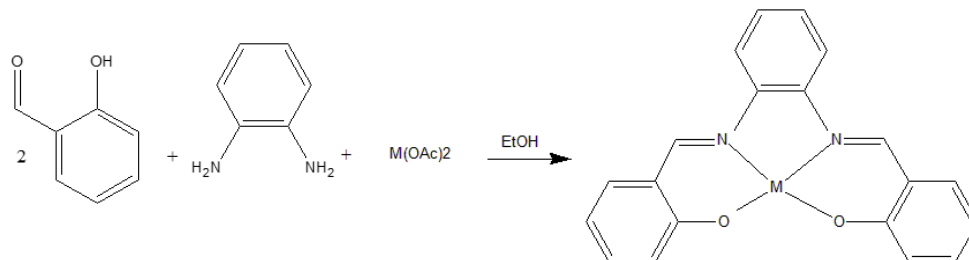


Figura 10. Síntesis de complejos metálicos a temperatura ambiente ( $M = \text{Cu}, \text{Ni}, \text{Mn}$ ).

## RESULTADOS

### Espectroscopía de masas por electroespray

Las Figuras 5, 6 y 7 muestran los espectros de masas por electroespray, de los complejos metálicos de los cationes de  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  respectivamente; donde, en cada una, se aprecia en primera instancia una sola señal sobresaliente, correspondiente al peso molecular del complejo metálico. La aparición de esta única señal, nos indica que la síntesis fue muy eficiente, dando lugar a un producto de reacción puro al no existir más señales en el espectro que nos indiquen que algunos reactivos no reaccionaron o que indiquen la formación de productos secundarios de reacción.

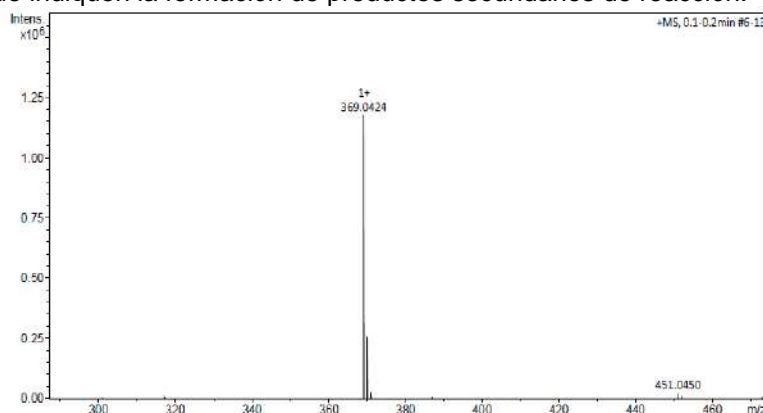


Figura 11. Espectroscopía de masas Mn-saloph.

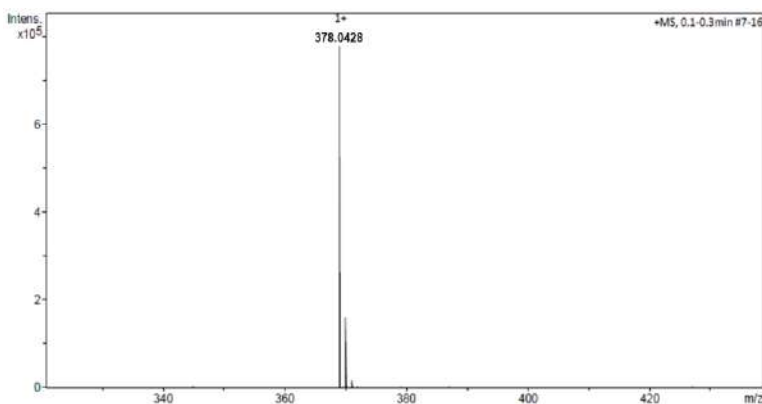
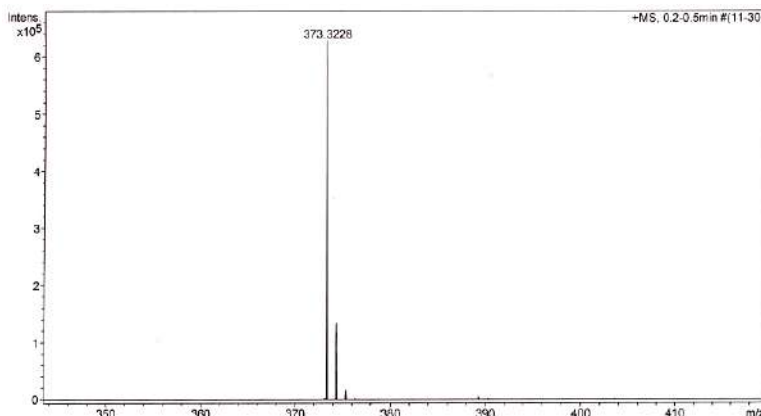


Figura 12. Espectroscopía de masas Cu-saloph.

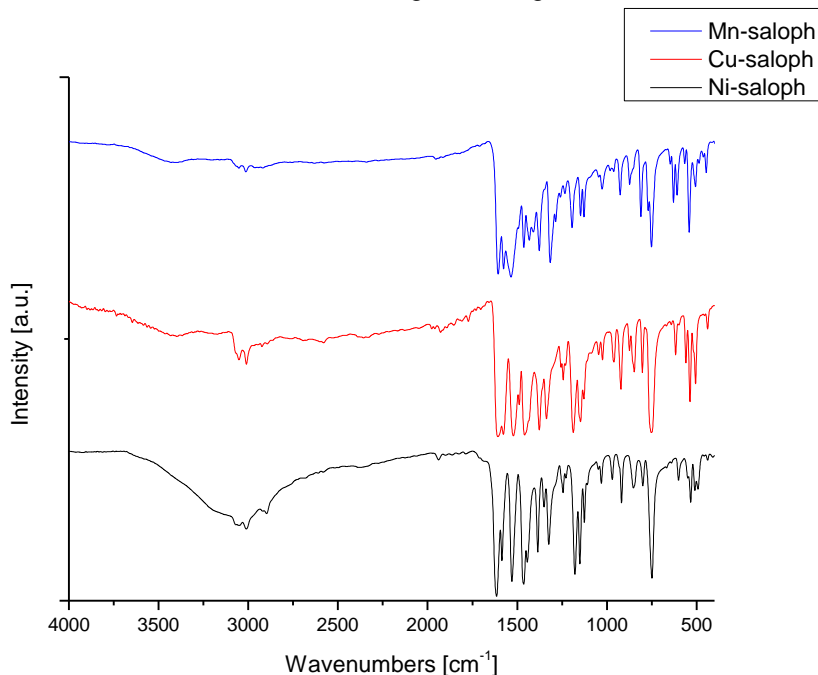




**Figura 13. Espectroscopía de masas Ni-saloph.**

### Espectroscopía Infrarroja (IR)

En la Figura 8, se muestra el espectro IR realizados a los tres complejos metálicos sintetizados con ligando saloph, la caracterización por IR permitió identificar algunas de las bandas más importantes correspondientes a los enlaces del complejo y verificar las presencias de los grupos funcionales como la banda de vibración del enlace C=N correspondiente al grupo imino (característico de la base de Schiff), el cual se encuentra a  $1640\text{ cm}^{-1}$  aproximadamente; también se aprecia una desaparición de la banda de vibración del enlace OH, que se espera en las regiones de  $3300 - 3800\text{ cm}^{-1}$ , lo cual se atribuye a la coordinación del metal con el oxígeno del ligando.



**Figura 14. Espectro de IR de complejo Mn-saloph (azul), Cu-saloph (rojo) y Ni-saloph (negro)**

### CONCLUSIONES

Se lograron sintetizar complejos metálicos con tres distintos cationes metálicos ( $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ ) a partir de bases de Schiff de la familia salen, en una sola etapa, bajo condiciones de temperatura ambiente; el método propuesto resulta ser eficiente, práctico y rápido en la obtención de complejos metálicos, pues la posible formación de ácido acético in situ, en el medio de síntesis, debido a la

reacción de la molécula secundaria de agua (producto secundario obtenido en el proceso de formación de ligando orgánico), con el acetato del metal, es la responsable de poder llevar a cabo la obtención de los mismos en una sola etapa de síntesis, obteniendo así una reducción significativa en el consumo energético del proceso y disminuyendo la cantidad de residuos.

En la espectroscopía de masas y la espectroscopía IR, se pudo afirmar la eficiencia de cada síntesis y la correcta formación de grupos funcionales iminos característicos de las bases de Schiff, obteniendo rendimientos iguales o superiores al 95%.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Tulcán Mejía, E. M., Fabian Galindo, J., Pérez Figueredo, C.R. (2021). Síntesis de una base de Schiff a partir de dopamina y cinamaldehído. *Ciencia en Desarrollo*, 12(2), pp. 119-128.
2. Figueroa De Paz, Y. M. (2014). Síntesis y caracterización del metacrilato de plata y su polimerización con radiación gamma [Título profesional, Universidad Autónoma del Estado de México]. [https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/\\_Public/46/130/46130345.pdf](https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/46/130/46130345.pdf)
3. Bando Vázquez, A. Y. (2016). Síntesis, caracterización estructural y evaluación biológica de bases de Schiff fluoradas p-hidroxisustituídas [Título profesional, Escuela Nacional de Ciencia Biológicas, IPN]. <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/25125/BANDO%20V%C3%81ZQUEZ%20ALEJANDRO%20YAIR.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
4. Jiménez Bonilla, D. (2019). Síntesis y caracterización de catalizadores tipo salen con zinc [Título profesional, Universidad Distrital Francisco José De Caldas]. <https://repository.udistrital.edu.co/bitstream/handle/11349/23238/Jim%C3%A9nezBonillaDani2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
5. Contreras, R. R., & Rojas, Y. (2018). Salen's ligands in coordination chemistry. A short review (Ligandos tipo salen en química de coordinación. . .. ResearchGate. [https://www.researchgate.net/publication/327687029\\_Salen's\\_ligands\\_in\\_coordination\\_chemistry\\_A\\_short\\_review\\_Ligandos\\_tipo\\_salén\\_en\\_química\\_de\\_coordinación\\_Una\\_breve\\_revisión](https://www.researchgate.net/publication/327687029_Salen's_ligands_in_coordination_chemistry_A_short_review_Ligandos_tipo_salén_en_química_de_coordinación_Una_breve_revisión)
6. Contreras, R. R. (n.d.). Ligandos tipo salen en química de coordinación. Una breve revisión. <https://www.redalyc.org/journal/5075/507557607011/html/>
7. Importancia biológica de las bases de Schiff - Documentos de Investigación - Ortega ramirez. (n.d.). <https://www.clubensayos.com/Ciencia/Importancia-biol%C3%B3gica-de-las-bases-de-Schiff/5238025.html>

## EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE *MONTANOA TOMENTOSA*, EN LA RESPUESTA A LA PRUEBA DE NADO FORZADO Y ÁREAS HIPOTALÁMICAS DE RATAS MACHO WISTAR

Ma. de Jesús Roviroso Hernández<sup>1</sup>, Juan Francisco Rodríguez-Landa<sup>2</sup>, Blandina Bernal-Morales<sup>2</sup>, Francisco Garcia Orduña<sup>1</sup> y Jonathan Cueto Escobedo<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa CP 91190, Veracruz, México

<sup>2</sup> Laboratorio de Neurofarmacología, Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa CP 91190, Veracruz, México

<sup>3</sup> Departamento de Investigación Clínica y Transnacional, Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Veracruzana, CP 91190, Veracruz, México

[iroviroso@uv.mx](mailto:iroviroso@uv.mx)

### RESUMEN

En la medicina tradicional mexicana, la infusión de *Montanoa tomentosa* (*Mt*), ha sido usada para inducir el parto, tratar problemas reproductivos y cambios de humor en la mujer; por acciones aparentemente similares a las de la hormona oxitocina (OXT). Sin embargo, se desconoce si la administración crónica de *Mt* produce la activación de neuronas hipotalámicas productoras de OXT, así como un efecto de tipo anti-desesperanza, en la prueba de nado forzado. Se utilizaron tres grupos independientes de ratas macho Wistar ( $n=8$ ) que recibieron p.o. agua purificada (Vh), fluoxetina (Flx; 1mg/kg), y *Mt* (50mg/kg), respectivamente por 28 días. En el día 27 de administración cada individuo se evaluó en la prueba de campo abierto (5 min) y una pre-prueba de nado forzado (15 min). 24 horas posterior a la última administración, se les evaluó nuevamente en la prueba de campo abierto (5 min) y nado forzado (5 min). Noventa minutos después de los tratamientos, las ratas fueron eutanizadas y perfundidas para obtener sus cerebros, cortarlos y realizar una doble inmunohistoquímica ir-Fos/OXT, en secciones que incluyen los núcleos paraventricular (NPV) y supraóptico (NSO). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una y dos vías y la prueba *post hoc* de Tukey, con nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ . Ninguno de los tratamientos modificó el número de cuadros cruzados, ni acicalamiento, ni la conducta vertical en el campo abierto. En la prueba de nado forzado ninguno de los tratamientos modificó la latencia a la primera inmovilidad. Respecto al tiempo total de inmovilidad, los grupos Flx y *Mt*, disminuyeron significativamente la inmovilidad con respecto al grupo Vh. En el análisis inmunohistoquímico no hubo diferencias significativas en la activación de neuronas oxitocinérgicas entre los diferentes tratamientos, por lo cual podemos concluir que la administración crónica del extracto acuoso de *M. tomentosa* tiene efectos conductuales similares al fármaco Fluoxetina y esta respuesta parece no estar relacionada a la activación de las neuronas de OTX del NPV y NSO.

### INTRODUCCIÓN

La exposición a periodos prolongados de estrés, y la falta de control o la superación de las capacidades del organismo para responder a estímulos adversos, puede desencadenar desórdenes de ansiedad y depresión (Steptoe y Marmot, 2002). El organismo responde a estos estímulos estresantes con la liberación de hormonas como la adrenalina, noradrenalina, factor liberador de corticotropina (CRF), hormona adenocorticotrópica (ACTH), cortisol en humanos y primates o corticosterona en aves, reptiles, anfibios y pequeños mamíferos como los roedores (Wasser et al., 2000; Sapolsky, 2004; Palme et al., 2005), además de oxitocina (OXT). La OXT regula algunos procesos fisiológicos en el organismo, además a sido considerada una hormona anti-estrés, debido los cambios encaminados a aminorar los estímulos estresantes (Lang et al., 1983; Gibbs et al., 1984). En México el uso de plantas con fines terapéuticos data desde la época prehispánica; tal es el caso de *Mt*. A esta planta se le han atribuido efectos oxitocinérgicos y farmacológicos similares a las que ejerce la OXT, (uterotónica, facilitadora de la secreción de la leche, promotora del parto, dilatadora del cérvix, y abortiva, entre otras). También, el extracto crudo acuoso de *Mt* ejercer sus efectos directamente sobre el Sistema Nervioso Central (Carro-Juárez et al., 2004; 2006). Además, la administración aguda de la infusión de *Mt*, activa las neuronas de OXT y tiene efectos tipo antidepresivos en ratas macho (Lagunes-Merino, et al., 2020). Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo, es explorar el efecto de la administración crónica de la infusión de *Mt* sobre la antidesesperanza, y comparar esos efectos con el antidepresivo Fluoxetina, además identificar si

este efecto está asociado con la activación de neuronas hipotalámicas oxitocinérgicas de ratas macho de la cepa Wistar.

## TEORIA

El estrés es una respuesta inespecífica del organismo a condiciones adversas del ambiente (Selye, 1946), es decir, que el cuerpo reacciona ante cualquier cambio o amenaza que ocurre sobre él, y que puede provenir de fuerzas internas o externas, para tratar de recuperar su homeostasis y protegerse de posibles daños. La respuesta incluye cambios fisiológicos y conductuales que le permite afrontar la situación estresante. Cuando esto sucede, se le considera como un proceso adaptativo que aumenta la supervivencia de los individuos (Charmandari, *et al.*, 2005). Sin embargo, cuando los individuos no pueden controlar los eventos estresantes o superan sus capacidades, entonces ocurre una respuesta exagerada o sostenida en el tiempo que puede dar lugar a alteraciones fisiológicas o psicológicas y desencadenar patologías como la ansiedad y la depresión (Stephoe y Marmot, 2002).

El impacto negativo del estrés depende de diversos factores, como la susceptibilidad de los individuos, la cual, está relacionada con su capacidad para afrontar un estresor y el uso de estrategias de afrontamiento (Mercier, 2003). Por otro lado, se encuentran las características de los estímulos estresantes, que pueden catalogarse de forma cualitativa (naturaleza del estímulo), como cuantitativa (intensidad y duración del estímulo). En este sentido, el estrés agudo puede desencadenar una respuesta intensa, rápida y muchas veces violenta que puede provocar trastornos cardiovasculares, inmunosupresión, patologías gastrointestinales, inhibición del sistema reproductor, entre otros. Sin embargo, si la exposición a un agente estresor es prolongada o excesiva, además de las anteriores también puede inducir al consumo de drogas de abuso, síntomas de ansiedad, y depresión (Nadal y Armario 2010).

La depresión se desarrolla en respuesta al estrés repetido de alta intensidad, lo que provoca una hiperactividad del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA), caracterizada por un estado de ánimo decaído, o la pérdida de interés y/o sensaciones de placer (Remick, 2002). Por otra parte, evidencia clínica y pre-clínica han reportado que la OXT la cual se produce en neuronas de los núcleos hipotalámicos paraventricular (NPV), y supraóptico (NSO), modula la respuesta del eje HPA (Neumann, 2002; Windle et al., 1997), en respuesta a factores estresantes, físicos o psicológicos (Gibbs, 1984; Higuchi et al., 1988; Sanders et al., 1990), para evitar daños al organismo.

La OTX ejerce algunos efectos antidepresivos, a nivel preclínico, dado que se libera en respuesta a estresores como la prueba de nado forzado (NF), (Arletti y Bertolini, 1987). La liberación de OTX no sólo depende de su concentración para estimular su propia secreción, también puede ser promovida por análogos de OXT, y sus receptores, los cuales pueden ser reproducidos por algunos productos naturales (Gruber et al., 2012).

En la medicina tradicional mexicana se han usado diversas plantas para tratar problemas relacionados con el cambio de humor; como *Montanoa tomentosa* (*Mt*), conocida en náhuatl como Cihuapatli (*cihuatl* = mujer, *patli* = medicina o remedio), o Zoapatle (Derbez et al., 1945), la cual está descrita en el *Códice Badiano o Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* (1552), donde destacan recetas tradicionales y prescripciones, La Historia General de las Cosas de Nueva España (Códice Florentino) e Historia Natural de la Nueva España, describe la preparación de una infusión con las hojas de *Mt* que facilita el parto, sirve como agente anticonceptivo y alivia los trastornos del estado de ánimo (Ximenez, 2003).

La literatura reporta que *Mt* ha sido usada como remedio en problemas reproductivos tales como inductor del parto, estimulador del sangrado después del parto, promotor de la menstruación, facilitador de la secreción de leche (Gallegos, 1983), y abortivo (Levine, et al., 1981), efectos similares a los producidos por OXT. Estudios pre-clínicos, reportan que tiene un efecto tipo anti-desesperanza tanto en hembras (Rodríguez-Landa et al., 2018), como en machos (Lagunes-Merino et al., 2020); y se sugiere que este efecto en machos podría estar asociado con la activación de neuronas oxitocinérgicas en NPV y NSO. Sin embargo, se desconoce si *Mt* tiene un efecto protector ante estímulos estresantes de alta intensidad, como es la prueba de nado forzado y puede prevenir se establezca una desesperanza conductual.

## PARTE EXPERIMENTAL

### **Procedimientos éticos**

Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NIH, 2011) y la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar la incomodidad de los animales durante el presente estudio.

### **Animales**

Se utilizaron 39 ratas Wistar macho adultas, con un peso de 250-300 g. Las cuales se alojaron en jaulas de plexiglás (cuatro ratas por jaula) bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h (encendido de la luz a las 7:00 h), a una temperatura promedio de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , con acceso *ad libitum* al agua y alimento.

### **Preparación de la infusión**

*Mt* fue colectada cerca de Tlaxcala, México y autenticada (Thiers, 2016), con número de serie (MT-UATX10). Las hojas que se recolectaron, se secaron durante 20 días y posteriormente se molieron hasta obtener un polvo fino. Se mezcló aproximadamente 1g del polvo en 20mL de agua purificada justo antes del punto de ebullición y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La infusión obtenida se filtró y se mantuvo a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### **Tratamientos**

Los 39 individuos se asignaron a dos condiciones: 24 con nado forzado (NF;  $n=8$ ) y 15 sin nado (s/NF;  $n=5$ ), y se organizaron aleatoriamente en tres grupos independientes para cada condición. Vehículo (Veh, 1 ml/kg de agua purificada); *M. tomentosa* (*Mt*, 50 mg/kg); Fluoxetina (Flx, 1 mg/kg). Todos los grupos recibieron los tratamientos por vía oral a través de una cánula curvada de acero inoxidable, acoplada a una jeringa desechable de 1mL, en un volumen equivalente a 1mL/kg, administrados 30 min antes de las pruebas de comportamiento.

## **Pruebas conductuales**

### **Actividad Locomotora**

Se usó una caja de plexiglás opaco (44 x 33cm), con paredes de 20 cm de altura. Dividida en la base en 12 cuadrados (11 x 11cm). Esta prueba se realizó para descartar posibles cambios asociados a hipoactividad, o hiperactividad de los individuos que pudieran interferir con la interpretación de los resultados de la prueba de nado forzado. Para el registro de esta actividad motora, se colocó una cámara de vídeo digital, por arriba de la jaula para registrar durante 5 min, la conducta de cada rata. Al inicio de la prueba, los animales se colocaron suavemente en una esquina de la caja para evaluar: 1) el número de cuadrados cruzados; es decir, cuando una rata pasó de un cuadro a otro con las cuatro patas o la tercera parte de su cuerpo (Contreras et al., 2001; Rodríguez-Landa et al., 2012), 2) el tiempo dedicado al auto-aseo: incluye todos los comportamientos auto-dirigidos de limpieza desde la cabeza hasta las orejas, las extremidades y la región anogenital (Kalueff y Touhima 2005), y 3) el tiempo dedicado a la exploración; es decir, cuando la rata exploró la jaula en posición vertical sobre sus extremidades traseras. Después de cada prueba, la jaula se limpió con una solución de alcohol al 15% para eliminar el olor de la rata anterior.

### **Prueba de Nado Forzado (NF)**

Se realizó una pre-prueba a todos los sujetos, en la cual se colocó a las ratas individual y suavemente en un estanque de vidrio rectangular (30 cm de ancho, 20 cm de largo, 50 cm de alto) con agua a  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. El nivel del agua se ajustó al tamaño de cada animal, con la finalidad de que solo pueda tocar el fondo del tanque con las puntas de sus patas traseras y mantener la cabeza por encima del nivel del agua. Durante esta sesión, los animales se enfrentan a una situación nueva y amenazadora representada por la inmersión en agua, lo que permite asegurar el desarrollo de la "desesperanza conductual" (Porsolt et al., 1978).

En el día 28, y 30min después de la administración de los tratamientos, los individuos fueron nuevamente evaluados en una sesión de NF durante 5min. Las sesiones fueron videograbadas para registrar: 1) latencia a la primera inmovilidad desde que son colocados en el agua, y 2) tiempo de total de inmovilidad. Considerando la inmovilidad, cuando la rata toca el fondo del estanque, con una

o ambas patas traseras o la cola, o bien cuando permanece flotando, haciendo los movimientos mínimos necesarios para mantener su cabeza en la superficie, pero sin desplazarse en el agua. Al final de la prueba de NF, la rata se devolvió a su caja, y 90min después, cada rata fue eutanizada para extraer sus cerebros y procesarlos por la técnica de inmunohistoquímica.

### ***Inmunohistoquímica***

La activación de las células de OXT en el NPV y el NSO se evaluó mediante la presencia de la proteína Fos, como indicador nuclear de la activación de las células oxitocinérgicas. Las ratas fueron eutanizadas con una sobredosis de pentobarbital sódico, y perfundidas transcardialmente con solución salina al 0.9%, seguida de paraformaldehído al 4%. Los cerebros de los animales se extrajeron inmediatamente, y se crioprotegieron en diluciones seriadas de sacarosa (10%, 20% y 30%). Posteriormente se realizaron cortes coronales de 50  $\mu\text{m}$ , en un criostato. Se colectaron las secciones seriadas y se procedió a realizar la inmunohistoquímica.

Los tejidos se lavaron en PB para eliminar el exceso de aldehídos y luego se expusieron a una solución de peróxido de hidrógeno al 0.5% para eliminar la actividad de la peroxidasa endógena. Posteriormente se colocaron en suero normal al 3% durante 1 hora para bloquear las reacciones no específicas de anticuerpos del tejido. Luego, se incubaron durante 72h a 4°C con un anticuerpo policlonal para Fos, al término, se incubaron en un anticuerpo secundario IgG biotinilado, y por último se incubaron en un complejo abidina-biotina-peroxidasa (ABC), por una hora cada uno, para posteriormente ser revelados con diaminobencidina (DAB) en presencia de sulfato de níquel, cloruro de cobalto y peróxido de hidrógeno, que produjo un precipitado púrpura. En la segunda inmunohistoquímica las secciones se incubaron durante 72h a 4°C con un anticuerpo monoclonal contra OXT. Posteriormente, se expusieron a un anticuerpo secundario IgG biotinilado, y a un complejo ABC, y finalmente se revelaron con DAB y peróxido de hidrógeno, lo que produjo un precipitado citoplasmático marrón. Las secciones se montaron en portaobjetos cubiertos con gelatina, se deshidrataron, y luego se cubrieron con Permount.

### ***Conteo de células***

Para cuantificar las células inmunorreactivas a oxitocina (ir-OXT) y doblemente inmunoreactivas Fos/oxitocina (ir-Fos/OXT) en el NPV y el NSO, los tejidos se examinaron en un microscopio de luz a una magnificación de 10 y 20 aumentos, y fueron contados bilateralmente. La ir-OXT se identificó como un precipitado marrón en el citoplasma, mientras que la ir-Fos/OXT tenían un citoplasma marrón con un núcleo negro.

El NPV y el NSO se examinaron desde el extremo rostral hasta el caudal, siguiendo el Atlas del cerebro de la rata (Paxinos y Watson 2007). Las imágenes se digitalizaron con una cámara digital y se procesaron con un sistema de análisis de imágenes computarizado.

El tamaño de muestra de los seis grupos para el análisis histológico fue de  $n=5$ , para las dos condiciones y tres tratamientos.

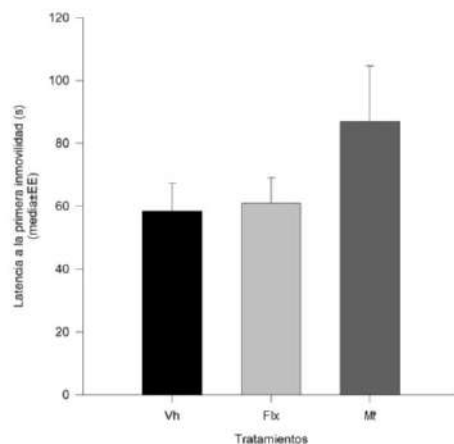
## **RESULTADOS**

### ***Pruebas conductuales***

En la prueba de campo abierto no se encontraron diferencias estadísticas en el número de cuadros cruzados entre los diferentes tratamientos ( $F_{(2,23)}=2.122$ ,  $p=0.145$ ). Tampoco hubo diferencias en los resultados de la conducta de acicalamiento ( $F_{(2,23)}=0.390$ ,  $p=0.682$ ) y la conducta vertical ( $F_{(2,23)}=3.589$ ,  $p=0.166$ ). Datos no mostrados.

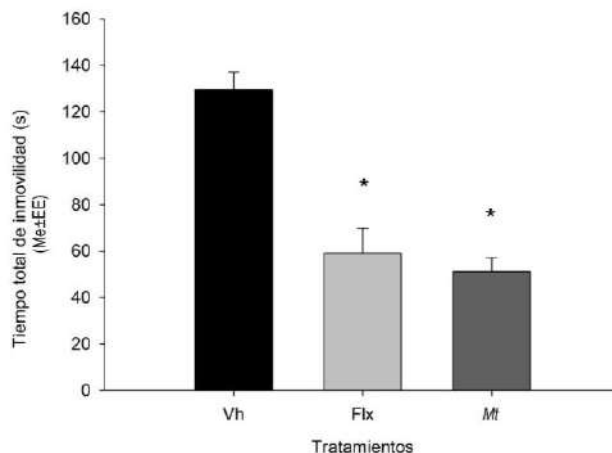
En la prueba de nado forzado, respecto a la latencia a la primera inmovilidad no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $F_{(2,23)}=1.654$ ,  $p<0.215$ ; Fig 1).





**Fig 1.** Latencia a la primera inmovilidad ( $Me \pm EE$ ) en la prueba de nado, La ANOVA de una vía no mostró diferencias entre los diferentes tratamientos: Vehículo (Vh), Fluoxetina (Flx) *Montanoa* (Mt).

En el tiempo total de inmovilidad en la prueba de nado forzado, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ( $F_{(2,23)}=15.453$ ,  $p<0.001$ ; Fig 2). La prueba *post hoc* Kruskal-Wallis mostró que el tiempo total de inmovilidad de los grupos Mt y Flx fue significativamente menor con respecto al grupo Vh ( $p<0.001$ ).



**Fig 2.** Tiempo total de inmovilidad ( $Me \pm DE$ ) en la prueba de nado forzado, entre los diferentes tratamientos: *Montanoa tomentosa* (Mt) y Fluoxetina (Flx), produjeron un tiempo significativamente menor de inmovilidad con respecto al grupo Vehículo (Vh), *post hoc* Kruskal- Wallis  $p<0.050$ .

#### **Activación de células de oxitocina Ir-OT en NSO y NPV**

La activación de células de OXT se contabilizó en los 3 grupos para cada una de las condiciones, con y sin nado forzado. El análisis estadístico no encontró diferencias significativas ( $n=5$ ;  $F_{(5,29)}=1.248$ ,  $p<0.305$ ), en el número total de células de OXT en el NPV, así como en el NSO ( $n=5$ ;  $F_{(5,29)}=3.364$ ,  $p<0.052$ ). Ninguno de los tratamientos modificó el número de neuronas de oxitocina, independientemente de la condición. No se muestran los datos.

En lo que respecta al conteo de células dobles ir-Fos/OT, no se presentan diferencias estadísticamente significativas en el NPV, ( $n=5$ ;  $F_{(5,29)}=2.818$ ,  $p<0.080$ ; Fig 3). ni en el NSO, ( $n=5$ ;  $F_{(5,29)}=0.825$ ,  $p<0.450$ ; Fig 4), por ninguno de los tratamientos, ni las condiciones.

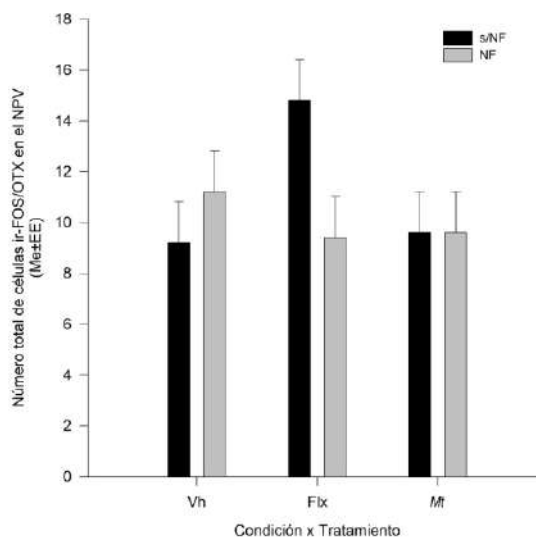


Fig 3. Número de células ir-Fos/OT en el NPV (Me ± EE) de individuos que realizaron la prueba de nado forzado y sin la prueba de nado, entre los diferentes tratamientos: Vehículo (Vh), Fluoxetina (Flx) *Montanoa* (Mt). ANOVA de dos vías.

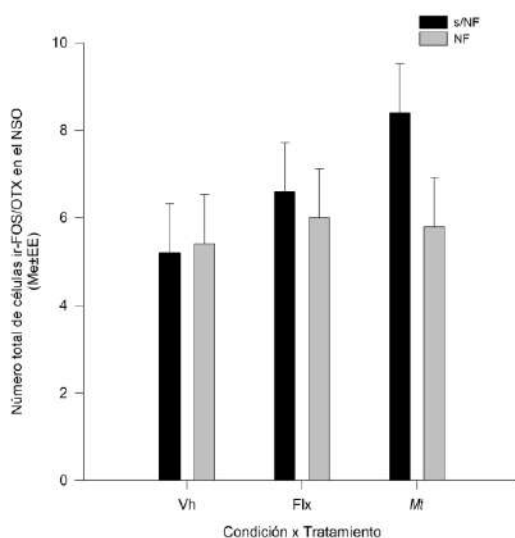


Fig 4. Número de células ir-Fos/OT en el NSO (Me ± EE) de individuos que realizaron la prueba de nado forzado (NF) y sin la prueba de nado (s/NF), entre los diferentes tratamientos: Vehículo (Vh), Fluoxetina (Flx) *Montanoa* (Mt). ANOVA de dos vías.

**CONCLUSIÓN**

La administración oral crónica de la infusión de *M. tomentosa*, ejerce un efecto conductual tipo anti-depresivo en ratas macho sometidas a la prueba de nado forzado, disminuyendo el tiempo total de la inmovilidad, de manera similar al antidepresivo clínicamente efectivo Fluoxetina, aunque no modificó la latencia a la primera inmovilidad. Esta respuesta conductual parece no estar relacionada a la actividad de las células de OXT, por lo que se sugiere que la administración crónica de *Mt* ejerce sus efectos por un mecanismo de acción diferente, en este caso sugerimos serotonina, ya que al estimular constantemente los receptores oxitocinérgicos puede ocurrir su inactivación y por lo tanto interrumpir la producción de OXT en los NPV y NSO.

**BIBLIOGRAFIA**

Arletti R, Bertolini A. (1987). Oxytocin acts as an antidepressant in two animal models of depression. *Life Sci.* 41:725e1730. [SEP]

Carro-Juárez M, Loatón I, Benítez O, Espíritu A. (2006). Pro-ejaculatory effect of the aqueous crude extract of cihuapatli (*Montanoa tomentosa*) in spinal male rats. *J Ethnopharmacology.* 106(1):111-116.

Carro-Juárez M, Cervantes E, Cervantes-Méndez M, Rodríguez-Manzo G. (2004). Aphrodisiac properties of *Montanoa tomentosa* aqueous crude extract in male rats. *Pharmacol Biochem Behav* 78(1): 129-134.

Contreras CM, Rodríguez-Landa JF, Gutiérrez-García AG, Bernal-Morales B. (2001). The lowest effective dose of fluoxetine in the forced swim test significantly affects the firing rate of lateral septal nucleus neurons in the rat. *J Psychopharmacol.* 15:231e236.

Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. (2005). Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol.* 67:259–84.

Derbez J, Pardo E, Del Pozo E. (1945). El cihuapatli, activador de la motilidad uterina. *Bol inst estud med biol.* 3:127e139. [SEP]

Gallegos AJ. (1983). The zoapatle I. A traditional remedy from Mexico emerges to modern times. *Contraception.* 27:211e225. [SEP]

Gibbs DM. (1984). Dissociation of oxytocin, vasopressin and corticotropin secretion during different types of stress. *Life Sci* 35:487-491.

Gruber CW, Koehbach J, Muttenthaler M. (2012). Exploring bioactive peptides from natural sources for oxytocin and vasopressin drug discovery. *Future Med Chem.* 4:1791e1798.

Higuchi T, Honda K, Takano S, Negoro H. (1988). Reduced oxytocin response to osmotic stimulus and immobilization stress in lactating rats. *J Endocrinol* 116:225-230.

Kalueff AV, Touhima P. (2005). Contrasting grooming phenotypes in three mouse strains markedly different in anxiety and activity (129S1, BALB/c and NMRI). *Behav Brain Res.* 160(1):1e10. [SEP]

Lagunes-Merino O, Rodríguez-Landa JF, Caba M, Carro-Juárez M, García-Orduña F, Saavedra-Vélez M, Puga-Olguín A, Roviroso-Hernández MJ. (2020). Acute effect of an infusion of *Montanoa tomentosa* on despair-like behavior and activation of oxytocin hypothalamic cells in Wistar rats. *J Trad Comp Med* 10:45-51.

Lang RE, Heil JWE, Ganten D, Herman K, Unger T, Rascher W. (1983). Oxytocin unlike vasopressin is a stress hormone in the rat. *Neuroendocrinology* 37:314-316.

Levine SD, Hahn DW, Cotter MI, Greenslade FC, Kanojia RM, Pasquale SA, Wachter M, McGuire JL. (1981). The Mexican plant zoapatle (*Montanoa tomentosa*) in reproductive medicine. Past, present and future. *J Reprod Med* 26:524–528.

Nadal R, Armario A. (2010). Mecanismos de susceptibilidad al estrés. *Hipertens riesgo vascular.* 27(3):117-124.

Mercier S, Buguet A, Cespuglio R, Martin S, Bourdon L. (2003). Behavioural changes after an acute stress: stressor and test types influences. *Behavioural Brain Research.* 139(1), 167-175.

Nadal R, Armario A. (2010). Mecanismos de susceptibilidad al estrés. *Hipertens riesgo vascular.* 27(3):117-124.

- Neumann ID. (2002). Involvement of the brain oxytocin system in stress coping: interactions with the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. In: Poulain S, Oliet S, Theodosis D. eds. Vasopressin and Oxytocin: From genes to clinical applications. Prog Brain Res Ed. 139(12):147-16.
- Palme R, Rettenbacher S, Touma C, El-Bahar SM, Möstle E. (2005). Stress Hormones in mammals and birds. Comparative aspects regarding metabolism, excretion and noninvasive measurement in fecal samples. Annual New York Academy of science. 1040:162-171
- Paxinos G, Watson Ch. 2007. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th edition. Academic Press.
- Padersen CA, Ascher JA, Monroe YL, Prange AJ Jr. 1982. Oxytocin induces maternal behavior in virgin female rats. Science 216(4546):648-650.
- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. (1978). Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. Eur J Pharmacol. 47:379e391. <sup>[1]</sup> <sub>[SEP]</sub>
- Remick R. (2002). Diagnosis and management of depression in primary care a clinical update and review. Canadian Medical Association Journal. 167(11) 1253-1260.
- Rodríguez-Landa JF, Cueto-Escobedo J, Flores-Aguilar LA, Rosas-Sanchez GU, Rovirosa-Hernández MJ, García-Orduña F, Carro-Juárez M. (2018). The aqueous crude extract of *Montanoa frutescens* and *Montanoa grandiflora* reduce immobility faster than fluoxetine through GABA<sub>A</sub> receptors in rats forced to swim. J Ev Bas Integ Med 23:1-12.
- Rodríguez-Landa JF, Hernández-López F, Saavedra M. (2012). Involvement of estrogen receptors in the anxiolytic-like effect of phytoestrogen genistein in rats with 12-week postovariectomy. Sci Res (NY). 3:439e446.
- Sanders G, Freilicher J, Lightman SL. (1990). Psychological stress of exposure to uncontrollable noise increases plasma oxytocin in high emotionality women. Psychoneuroendocrinol 15:47-58.
- Sapolsky RM. (2004). Social status and health in humans and other animals. Annual Review of Anthropology. 33:393-418.
- Selye H. (1946). The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. J Clin Endocrinol. 6:117-196.
- Steptoe A, Marmot M. (2002). The role of psychobiological pathways in socio-economic inequalities in cardiovascular disease risk. European Heart Journal. 23:13-25.
- Thiers B. (2016). Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff, New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. [Continuously updated].
- Wasser SK, Brown JL, Cooper K, Crockett CM, Bechert U, Millspaugh JJ, Larson S, Monfort SL. (2000). A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. General and comparative endocrinology. 120:260-275.
- Windle RJ, Shanks N, Lightman SL, Ingram CD. (1997). Central oxytocin administration reduces stress-induced corticosterone release and anxiety behavior in rats. Endocrinol 138:2829-2834.
- Ximenez F. *Quatro libros de la naturaleza y virtudes de las plantas y animales que están recevidos en el uso de medicina en la Nueva España, y la método, y corrección y preperación que para administrarllas se requiere con lo que el doctor Francisco Hernández escribió en lengua latina.* México.: Viuda de Diego López Davalos; 2003. <sup>[1]</sup> <sub>[SEP]</sub>

## CONTENIDO DE HUMEDAD DE LAS PARTES VEGETALES QUE CONSUME *Alouatta palliata* Y SU APORTE HÍDRICO (ESTUDIO PRELIMINAR)

<sup>1</sup>Mariana Morteo-Nava, <sup>2</sup>Rael M. Palestino-Sánchez, <sup>1</sup>Cassandra Velasco-Jácome, <sup>3</sup>Francisco García Orduña, <sup>3</sup>Rubén Mateo-Gutiérrez, <sup>3</sup>María de Jesús Rovirosa Hernández

<sup>1</sup>Facultad de Biología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, 91090, México

<sup>2</sup>Doctorado en Neuroetología, Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, 91000, México

<sup>3</sup>Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, 91000, México  
marianamorteonava@gmail.com

La mayoría de los animales obtienen agua de tres fuentes principales: 1) el agua libre en cuerpos de agua; 2) el agua contenida en los alimentos; y 3) el agua producida durante el metabolismo por la oxidación de compuestos orgánicos que contienen hidrógeno. Se ha reportado que en primates del género *Alouatta* spp. como *A. pigra* y *A. caraya* pueden llegar a consumir agua de algunas fuentes, así como posiblemente adquirirla del alimento, para satisfacer sus demandas hídricas, sin embargo, esto no se ha descrito para el mono aullador de manto (*Alouatta palliata*). Se realizó el trabajo por 3 meses en la comunidad de Mirador Pilapa, Tatahuicapan de Juárez, Veracruz, México. El objetivo del estudio fue determinar si las especies y partes vegetales que más consumen los monos aulladores cumplen con un papel como una estrategia de hidratación. Para comprobarlo se realizó un registro conductual focal animal, por 10 minutos a cada individuo a lo largo de 10 a 12 h de muestreo, por 4 días por mes. Se registró: hora de inicio y final de la alimentación y parte vegetal consumida (fruto maduro, fruto inmaduro, hoja madura, hoja joven, flor, tallo, u otra parte vegetal). Para obtener un estimado del porcentaje de humedad que contienen las partes vegetales que consumen, se realizó la recolecta mensual de 10 g de cada una de estas partes vegetales consumidas por *A. palliata*, siempre que fue posible, del mismo individuo arbóreo, a la misma altura y en un horario similar al que consumieron, eligiendo solo aquellas que correspondieron al 80% de su ingestión. Al coleccionar se registró el peso inicial, para posteriormente llevarlas al laboratorio donde se sometieron a un proceso de deshidratación en una estufa de cultivo a 50°C, y tomando el peso final para conocer el porcentaje de humedad que contenía cada parte vegetal. Además, se registró con un hidrómetro de bolsillo durante la ingesta de las partes vegetales la temperatura. Para poder comprobar si las partes vegetales les estaban dando el aporte hídrico necesario, se realizaron pruebas de la gravedad específica en la orina, esto se hizo con la ayuda de un refractómetro portátil. Se observó que en el mes de julio donde la temperatura promedio (media  $\pm$  DS) fue de  $38 \pm 4$  °C, consumieron hoja y fruto de *Ficus aurea*, los cuales contenían un porcentaje aproximado de humedad de 41.4 % y 23.3 %, respectivamente, y teniendo un valor promedio de la gravedad específica en la orina de  $1.034 \pm 0.020$  g/mL. En el mes de agosto la temperatura promedio fue de  $35 \pm 4$  °C y en septiembre de  $34 \pm 4$  °C, meses en los cuales consumieron fruto de *Tapirira mexicana* con valores de humedad de 55.3 % y 66.6 %, respectivamente, y valores de gravedad específica en orina de  $1.040 \pm 0.016$  g/mL; y  $1.029 \pm 0.016$  g/mL; media  $\pm$  DS, respectivamente. Se observó que, a pesar de los cambios en la temperatura los monos buscan hidratarse a partir de la parte vegetal que más consumen, lo que hace que sus valores de gravedad específica no cambien. Se concluye que esta especie de primate no humano adquiere el agua para mantenerse hidratado del alimento, consumiendo partes vegetales de las especies que le ayudan a mantenerse hidratado.

### INTRODUCCIÓN

La cantidad de agua en un organismo se mantiene estable por medio de los mecanismos fisiológicos, los cuales ayudan a regular la ganancia y pérdida de agua, aunque este equilibrio puede afectarse por la disponibilidad del agua misma, la temperatura ambiental, entre otros factores (Barquera *et al.*, 2008). Siendo la ingesta de agua, una de las actividades más importante de un individuo.

La mayoría de los mamíferos consumen agua de manera directa, sin embargo, en el caso particular del mono aullador probablemente obtiene el agua que requiere en su vida diaria principalmente a

partir de los alimentos que consume, como especie folívora-frugívora que es (Milton *et al.*, 1980; Crockett y Eisenberg, 1987; Kinzey, 1997; Mella *et al.*, 2019), ya que no se ha reportado que descienda del dosel arbóreo para beber el agua libre en el ambiente.

Mantenerse hidratado es muy importante porque el agua es el principal componente del cuerpo (Sánchez *et al.*, 2005). Cumple un gran papel para el bienestar físico y mental; y se encuentra distribuido en el organismo de forma abundante, esparciéndose por todas las células y tejidos de los organismos (Castañeda *et al.*, 2019). Cuando un individuo pierde una gran cantidad de agua, y esta no se restablece, se inicia un proceso de deshidratación (Castañeda *et al.*, 2019), lo cual puede poner en riesgo la salud o supervivencia de cada individuo. Para esto existen varios métodos para saber si un individuo está pasando por un proceso de deshidratación, entre estos se encuentran: la medición en la variación del peso corporal, la colorimetría, gravedad y conductividad específica de la orina y el cálculo de la tasa de sudoración (Gorstistiaga y Ramon, 2014).

En el presente estudio nosotros analizamos mediante un refractómetro portátil la gravedad específica de la orina de los monos aulladores de manto, para inferir si se mantienen hidratados a partir de las partes vegetales que consume principalmente de forma mensual, de acuerdo con el incremento de la temperatura ambiental.

## TEORÍA

El volumen total del agua que contiene un individuo en su organismo representa alrededor del 60% de la masa corporal, esta se encuentra distribuida en 3 elementos, el agua intracelular, el agua intercelular y el agua en el espacio vascular (Rojo-Gómez, 2015). En los individuos, el consumo total de líquidos difiere de acuerdo con sus características biológicas y fisiológicas (Nissensohn *et al.*, 2016). El 70% y 80% de agua que se ingiere proviene de las bebidas que se consumen, como el agua directa, del 20 % al 30% proviene de los alimentos y 10% proviene del agua denominada metabólica, como resultado de la oxidación que se produce por el mecanismo de macronutrientes (Jéquier y Constant, 2010).

La mayoría de las especies abastecen sus necesidades hídricas mediante el consumo de agua directamente (Sara-Pinilla, 2020); sin embargo, varias especies obtienen su mayor consumo hídrico a través de los alimentos (Gil-Antuñano, *et al.*, 2009). Como lo son los roedores del desierto, estos al estar en un hábitat donde las sequías son muy prolongadas y el agua es escasa, buscan alternativas para poder abastecer sus necesidades hídricas, teniendo dietas con un gran porcentaje de humedad (Seddiki y Lebailli, 2022). Otro ejemplo, son los artrópodos que habitan en el desierto, que también pasan por una gran escasez de agua (Broza, 1979) es por eso buscan métodos alternos para los días de sequía o incluso cuando su única vía de agua es el rocío de las mañanas; ingiriendo alimentos higroscópicos (aquellos que absorben la humedad o el agua fácilmente del ambiente circundante) que los ayuden a tener un balance hídrico (Broza, 1979). Además, algunos mamíferos comparten este comportamiento de hidratarse principalmente a través de lo que ingieren, consumiendo alimentos que poseen una gran cantidad de agua que los ayude a satisfacer sus necesidades hídricas, como es el caso del antílope y la gacela, ambos individuos pertenecientes al desierto (Taylor, 1968). Buscando sacarle el máximo provecho a las partes vegetales que consumen, siendo así su principal fuente de agua en las sequías (Taylor, 1968).

En los monos aulladores (*Alouatta* spp.) se ha observado con poca frecuencia que beban agua directamente (Carpenter, 1934; Glander, 1975; Moynihan, 1976; Glander, 1978; Bonvicino, 1989; Terborgh, 1983; Bicca-Marques, 1992) algunos autores argumentan que la dieta les proporciona la mayoría de los líquidos que necesitan (Glander, 1978). Sin embargo, hay algunas especies que si se les ha observado ingiriendo agua directamente. Por ejemplo, los monos aulladores pardos (*Alouatta guariba clamitans*), fueron observados ingiriendo agua acumulada en las bromelias y en los huecos de los árboles, y también descendían al suelo para beber de arroyos, ríos y charcos, asociando a esta conducta con las altas temperaturas ambientales, para poder mantener un equilibrio térmico (Chaves *et al.*, 2021).

Existe solo un registro en *A. palliata*, reportado por Glander en (1978). en el cual observa a estos individuos ingiriendo agua que se almacenó en los troncos huecos de los árboles durante la temporada de lluvias. Aunque la mayoría de los estudios en *Alouatta* spp., asocian esta conducta de ingerir agua con el incremento de la temperatura ambiental, como una estrategia para hidratarse



cuando las condiciones ambientales son más cálidas, y posiblemente no se están hidratando adecuadamente a partir de lo que consumen (Dias *et al.*, 2014; Chaves *et al.*, 2021). Es por eso por lo que se sugiere que esta especie cubre sus necesidades hídricas a través de las partes vegetales consumidas, y prefieren ingerir aquellas que tienen mayor porcentaje de humedad para poder mantenerse hidratados.

Existen diversos métodos para poder analizar si un individuo se encuentra hidratado, pero el método más factible es midiendo la densidad en la orina, siendo este un método no invasivo y muy práctico para animales en vida libre (Traviezo-Valles, 2020). La densidad se define como la gravedad específica de cada sustancia comparada con la de un volumen igual de agua destilada a una temperatura específica (Pacheco *et al.*, 2019), siendo así la relación entre el peso de una sustancia contra el peso de un volumen de agua destilada que tiene una densidad específica de 1,000 a una temperatura específica (Tamai *et al.*, 2010).

Se ha asociado la densidad de la gravedad específica a la hidratación de los individuos, puesto que cuando la orina se encuentra más densa, se asocia que el individuo se encuentra deshidratado, caso contrario cuando la orina esta menos densa, Con respecto a la densidad de la orina humana, sus valores normales están entre 1.005 g/mL a 1.030 g/mL, siendo sólo ligeramente más densa que el agua (Traviezo-Valles, 2020); sin embargo, en fauna silvestre los valores de gravedad especifican pueden variar mucho dependiendo de la especie de estudio y el hábitat donde se encuentre, puesto que los valores de gravedad especifican en la orina no son los mismos de un individuo que se encuentra en vida libre a uno de cautiverio (Drake, 2015).

En primates no humanos, se observó que, cuando una especie se encuentra en vida libre puede presentar valores promedios más altos en la gravedad específica de su orina, en comparación de las especies que viven bajo cuidado humano, quienes si tienen disponible agua dentro del cautiverio (Drake, 2015). Se ha mencionado que, las especies con una dieta folívora adquieren el agua principalmente del alimento, y no suelen consumir agua al menos que lo requieran o la dieta no cubra el aporte hídrico necesario (Mella *et al.*, 2019), posiblemente, esto explicaría los rangos más amplios en la especie que vive libre (*A. palliata*), donde sus valores no significan que esté deshidratado, si no, que es un reflejo de aquellas especies que obtienen el agua principalmente del alimento (Drake, 2015). Considerando lo anterior, el objetivo del presente estudio fue analizar si el porcentaje de agua que contienen las partes vegetales que consume *A. palliata* lo mantienen hidratado, conservando la gravedad específica de la orina en los rangos de normalidad.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Área de estudio:

El trabajo se realizó en la comunidad de Mirador Pilapa (18°21' 55.4"N y 94°44' 50.6"W), en un fragmento de selva alta y mediana perennifolia, perteneciente al municipio de Tatahuicapan de Juárez, esta zona pertenece a la región de Los Tuxtlas, al sureste de la Sierra de Santa Marta, Veracruz, México. En nuestra área de estudio se presentan tres zonas térmicas que permiten el desarrollo de los climas cálido, semicálido, y templado. La temperatura oscila de los 17° a los 36° C, teniendo una temperatura promedio anual de 27.4 °C (Christen, 2008).

Esta región se caracteriza por su precipitación cercana a los 5000 mm anuales, donde el mes más seco es superior a los 60 mm. Convirtiendo a esta sierra una de las más lluviosas del país (Soto, 2004). La transformación del paisaje de esta zona es muy marcada, tanto por la ganadería extensiva como por la agricultura, además de grandes incendios forestales, presentándose estos de manera muy frecuente, produciendo esto una contribución fuerte en el proceso de fragmentación y desaparición de varias especies tanto florísticas como de fauna endémica de la zona (Christen, 2008).

### Sujeto de estudio:

*A. palliata* se caracteriza por presentar un pelaje en los costados o manto de coloración café-dorada, algunos individuos presentan manchas rosáceas en las zonas de las palmas y las plantas de los pies. (Urquiza-Hass, 2001). Además, que en esta especie el hueso hioideo es más pequeño que en los demás aulladores (Rowe, 1996). Esta es una especie arbórea de hábitos diurnos, y suelen establecer jerarquías sociales (Goldsmith y Winkler, 1999), de acuerdo con su dieta son denominados folívoros-frugívoros (Crockett y Eisenberg, 1987; Kinzey, 1997). Los individuos adultos

pueden llegar a medir de 55.5 hasta 91.5 cm de largo, con un peso de entre los 4 y 10 kg, aunque los machos pueden duplicar el peso y tamaño corporal en comparación con las hembras (Urquiza-Hass, 2001).

En este estudio se trabajó con un grupo conformado por 10 individuos, de los cuales 4 son machos, 4 hembras, 1 juvenil y 1 infante; aunque el registro sólo se obtuvo de los individuos adultos y juveniles, excluyendo a los infantes, puesto que estos solo consumen leche materna, teniendo  $n=9$ .

#### **Registro conductual:**

Para determinar las partes vegetales que consume *A. palliata* y su posible asociación como una estrategia hídrica, se realizó un seguimiento durante 3 meses (julio, agosto y septiembre de 2022). Mensualmente se registró el comportamiento alimentario de los sujetos de estudio durante cuatro días consecutivos, con un horario de 07:00 a 17:00 h, en un esfuerzo de campo de 10 h.

Para registrar la conducta de alimentación, se utilizó el método de focal-animal (Altmann, 1974), esto consistió en que, cada vez que un mono aullador comenzaba a alimentarse se iniciaba a registrar y seguir por 10 min. En cada uno de los muestreos focales se recopilaron los siguientes datos: hora de inicio y fin de la alimentación, anotando los tipos de alimentos consumidos clasificándolos en: fruto maduro, fruto inmaduro, hoja madura, hoja joven, flor, tallo, y otra parte vegetal; así como la especie vegetal que consumieron.

#### **Recolecta y análisis de orina:**

Para determinar la gravedad específica de la orina, ésta se recolectó colocando plásticos por debajo de donde se encontraban los individuos, o recolectando la muestra salpicada en partes vegetales por medio de la aspiración con una jeringa o pipetas desechables, intentado evitar aquella que estuviera contaminada con tierra o heces. Posteriormente, se ocupó un refractómetro (ATC), para obtener el valor de la gravedad específica de la orina, éste tiene un rango de medición de 1.000-1.070.

#### **Determinación de humedad de las partes vegetales:**

Para determinar el porcentaje de humedad de las partes vegetales que consuman los sujetos de estudio, se realizó una colecta por mes del ochenta por ciento, de las partes vegetales consumidas por *A. palliata*, considerando los métodos de colecta propuestos por Rothman *et al.* (2012), que consiste en coleccionar siempre que se pueda del mismo individuo arbóreo, a la misma altura y en un horario similar al que lo consumieron. Después de recolectar las partes vegetales consumidas, éstas se pesaron en campo para evitar sesgos en su medición.

Se coleccionaron 10 gr de cada parte vegetal, lo cual se consideró como su peso inicial, se almacenaron en bolsas herméticas, para posteriormente ser congeladas hasta su traslado al laboratorio del Instituto de Neurootología, donde se sometieron a un proceso de deshidratación en un horno de secado (VWR internacional) a 50° C por 24 horas hasta que su peso final sea constante. Cuando se obtuvo el peso final, se realizaron los cálculos para obtener la humedad de cada parte vegetal, esto se hizo con la siguiente fórmula:

$$\frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 = \% \text{Humedad}$$

Donde:

Pi = peso inicial

Pf = peso final

#### **Registro de datos ambientales:**

Los datos ambientales se registraron antes de iniciar cada registro conductual, con la ayuda de una estación climática portátil (Kestrel 3000) la cuál registra la temperatura con una precisión de  $\pm 0.5^\circ\text{C}$ .

#### **Análisis estadísticos:**

Para analizar los datos, lo primero que se hizo fue ordenar los datos por medio de tablas de contingencia, donde los registros se ordenaron en promedio para cada mes, junto el 80% de las especies vegetales consumidas por *A. palliata*, el porcentaje de humedad correspondiente para cada una de las partes vegetales, el promedio de la gravedad específica y de la temperatura ambiental. Posteriormente, se realizó una prueba de Shapiro-Wilk para saber si los datos se ajustaban o no a una distribución normal, y poder elegir la prueba estadística correspondiente. Por último, se utilizó la

prueba de correlación de *Pearson* para analizar si existe una asociación entre las variables o no, esto entre el porcentaje de humedad, temperatura ambiental y la gravedad específica.

**RESULTADOS**

Conociendo las limitantes de este estudio preliminar, al solo tener los datos de 3 meses (Tabla 1.) aun así, decidimos analizarlos y ver si existe asociación o no entre las variables. Primero se ordenaron los datos en una tabla de contingencia; posteriormente se realizó una prueba de normalidad Shapiro-Wilk (humedad  $w = 0.98896$   $p \geq 0.9521$ ; Gravedad específica  $w = 0.93172$   $p \geq 0.6046$ ; temperatura ambiental  $w = 0.86337$   $p \geq 0.2725$ ), para determinar qué pruebas estadísticas utilizar.

Posteriormente, se realizó una correlación de *Pearson* entre las variables, realizando la correlación entre el porcentaje de humedad de las partes vegetales y la temperatura ambiental ( $t = -0.21657$ ,  $df = 2$ ,  $p \geq 0.8486$ ,  $r = -0.1513717$ ) (Figura 1), temperatura ambiental con gravedad específica en la orina ( $t = -0.88235$ ,  $df = 2$ ,  $p \geq 0.4707$ ,  $r = -0.5293385$ ) (Figura 2) y por último la gravedad específica de la orina con el porcentaje de humedad de las partes vegetales ( $t = -1.1207$ ,  $df = 2$ ,  $p \geq 0.3789$ ,  $r = -0.6210678$ ) (Figura 3).

MES	ESPECIE	PARTE VEGETAL	% HUMEDAD	G.E.	TEMPERATURA °C
Julio	<i>Ficus aurea</i>	Fruto	41.4	1.034	30
Julio	<i>Ficus aurea</i>	Hoja joven	23.3	1.034	30
Agosto	<i>Tapirira mexicana</i>	Fruto maduro	32.5	1.041	28
Septiembre	<i>Tapirira mexicana</i>	Fruto maduro	55.3	1.029	29

Tabla 1. Valores promedio del porcentaje de humedad de las partes vegetales que representaron el 80%, de la gravedad específica en la orina de *A. palliata*, y de la temperatura ambiental por mes

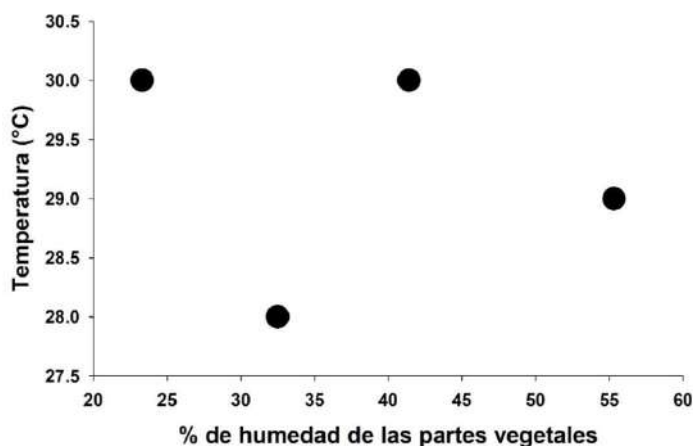


Figura 1. Correlación de *Pearson* entre y la temperatura ambiental y el porcentaje de humedad de las partes vegetales consumidas ( $t = -0.21657$ ,  $df = 2$ ,  $p \geq 0.8486$ ,  $r = -0.1513717$ ).

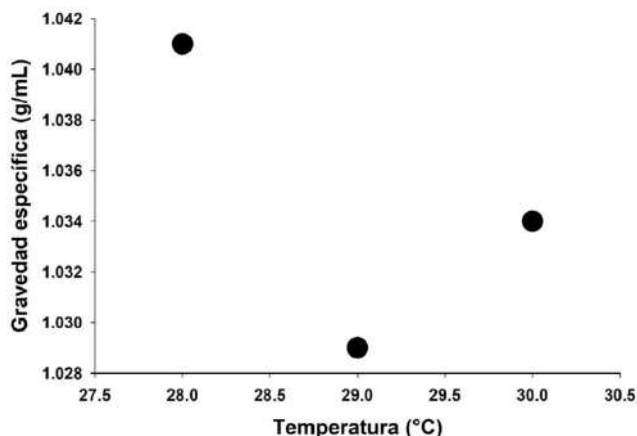


Figura 2. Correlación de *Pearson* entre la temperatura ambiental y la gravedad específica de la orina ( $t = -0.88235$ ,  $df = 2$ ,  $p \geq 0.4707$ ,  $r = -0.5293385$ ).

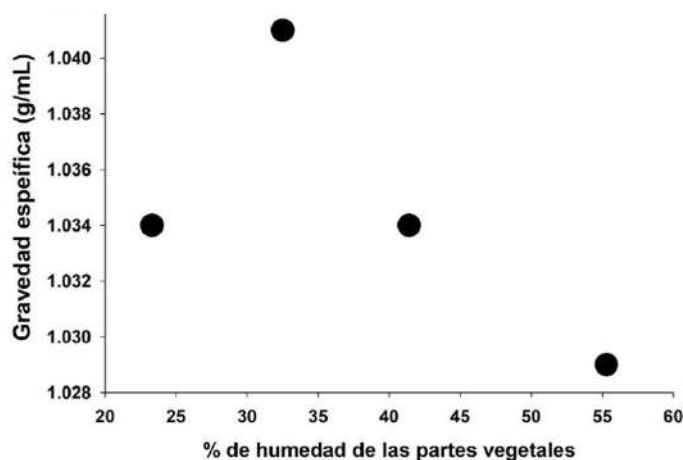


Figura 3. Correlación de *Pearson* entre el porcentaje de humedad de las partes vegetales consumidas y la gravedad específica de la orina ( $t = -1.1207$ ,  $df = 2$ ,  $p \geq 0.3789$ ,  $r = -0.6210678$ ).

### CONCLUSIONES

De acuerdo con los pocos meses que se presentan en este trabajo preliminar, y teniendo en cuenta la limitación que conlleva dar una correcta interpretación a los pocos resultados aquí propuestos. Se puede concluir que, a nivel descriptivo, cuando los monos aulladores consumen partes vegetales con un mayor porcentaje de humedad, los valores de la gravedad específica en su orina presentan valores más bajos, lo que se interpretaría como que, los monos aulladores si seleccionan su alimento como un posible método para hidratarse. Porque, en el mes de septiembre la parte vegetal que consumieron fue la que presentó el mayor porcentaje de humedad, haciendo que, la gravedad específica fuera más baja en comparación de los otros dos meses, donde las condiciones ambientales y su dieta varió.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. J. Altmann, "Observational study of behavior: sampling methods." *Behaviour*, 1974, vol. 49, no 3-4, p. 227-266.
2. S. Barquera; L. Hernandez-Barrera; M. L. Tolentino; J. Espinosa; S. W. Ng; J. A. Rivera; B. M. Popkin *et al.* "Energy intake from beverages is increasing among Mexican adolescents and adults." *The Journal of nutrition*, 2008, vol. 138, no 12, p. 2454-2461.
3. J. Bicca-Marques, "Drinking behavior in the black howler monkey (*Alouatta caraya*)." *Folia Primatologica*, 1992.
4. R. Bonvicino, "Ecologia e comportamento de *Alouatta belzebul* (Primates: Cebidae) na mata atlântica." *Rev Nordest Biol*, 1989, vol. 6, p. 149-179.
5. M. Broza, "Dew, fog and hygroscopic food as a source of water for desert arthropods." *Journal of Arid Environments*, 1979, vol. 2, no 1, p. 43-49.
6. R. Carpenter, "A field study of the behavior and social relations of howling monkeys." *Comparative psychology monographs*, 1934. C. R. Taylor, "Hygroscopic food: a source of water for desert antelopes?" *Nature*, 1968, vol. 219, no 5150, p. 181-182.
7. V. Castañeda; A. F. C. Saldívar; D. R. R. Hernández; Y. A. Martínez; R. A. Moreno; M. J. Daniel; A. Aragón, "PRINCIPALES FUENTES DE HIDRATACIÓN EN POBLACIÓN MEXICANA: CASO CDMX. *Urbana*, 2019, vol. 3, no 2.7, p. 2.0.
8. O. M. Chaves; V. B. Fortes; G. P. Hass; R. B. Azevedo; K. E. Stoner; J. C Bicca-Marques, "Flower consumption, ambient temperature and rainfall modulate drinking behavior in a folivorous-frugivorous arboreal mammal." *Plos one*, 2021, vol. 16, no 2, p. e0236974.
9. A. Christen, "La diversidad alfa, beta y gamma de la mastofauna en la Sierra de Santa Marta, Veracruz, México." *avances*, 2008, p. 103.
10. M. Crocket; J. F. Eisenberg, "Howlers: variations in group size and demography." *Primate societies*, 1987, p. 54-68.
11. P.A.D. Dias; A. Rangel-Negrín; A. Coyohua-Fuentes; D. Canales-Espinosa "Factors affecting the drinking behavior of black howler monkeys (*Alouatta pigra*)." *Primates*. 2014.
12. P. Drake, "Species differences in urinary specific gravity of various nonhuman primates." 2015.
13. N. P. Gil-Antuñano Z. M. Zenarruzabeitia; A. M. R. Camacho, "Alimentación, nutrición e hidratación en el deporte." *Consejo Superior de Deportes*, 2009.
14. E. Glander, "Habitat description and resource utilization: A preliminary report on mantled howling monkey ecology." *Socioecology and psychology of primates*, 1975, p. 37-57.
15. K. E. Glander, "Howling monkey feeding behavior and plant secondary compounds: a study of strategies." *The ecology of arboreal folivores*, 1978, p. 561-573. B. Meir, "Dew, fog and hygroscopic food as a source of water for desert arthropods." *Journal of Arid Environments*, 1979, vol. 2, no 1, p. 43-49.
16. S. Z. Goldsmith; L. Winkler, "Shifting social dynamics in a group of mantled howler monkeys (*A-palliata*) on the Island of Ometepe, Nicaragua". En *AMERICAN JOURNAL OF PHYSICAL ANTHROPOLOGY*. DIV JOHN WILEY & SONS INC, 605 THIRD AVE, NEW YORK, NY 10158-0012 USA: WILEY-LISS, 1999. p. 137-137.

17. E. Gorstistiaga; O. Ramon, "Adaptaciones al clima y al horario de Pekín 08." *Comite Olimpico Español. Comisión Medica*, 2014.
18. E. Jéquier; F. Constant, "Water as an essential nutrient: the physiological basis of hydration." *European journal of clinical nutrition*, 2010, vol. 64, no 2, p. 115-123.
19. W. Kinzey, "New World primates: ecology, evolution, and behavior." New York: Aldine de Gruyter, 1997.
20. V. Mella; C. McArthur; M. B. Krockenberger; R. Frend; M. S. Crowther, "Needing a drink: rainfall and temperature drive the use of free water by a threatened arboreal folivore." *PLoS One*, 2019, vol. 14, no 5, p. e0216964.
21. K. Milton; P. J Van Soest; J. B. Robertson, "Digestive efficiencies of wild howler monkeys." *Physiological Zoology*, 1980, vol. 53, no 4, p. 402-409.
22. M. Moynihan, "The New World Monkeys." 1976.
23. M. Nissensohn; *et al.* "Beverage consumption habits and association with total water and energy intakes in the Spanish population: findings of the ANIBES study." *Nutrients*, 2016, vol. 8, no 4, p. 232.
24. F. Pacheco; H. Caraballo; L. Castillo, "¿Tira reactiva o refractómetro? un análisis comparativo en la medición de la densidad urinaria." *Rev Facultad Med*, 2019, vol. 42, no 2, p. 41-48.
25. Rojo-Gómez, "El agua en nutrición animal: fisiología, requerimientos e implicaciones prácticas en granja." 2015.
26. J. M. Rothman; C. A. Chapman; P. J. Van Soest, "Methods in primate nutritional ecology: a user's guide." *International Journal of Primatology*, 2012, vol. 33, p. 542-566.
27. N. Rowe, "Pictorial guide to the living primates." Pogonias press, 1996.
28. C. Sánchez; P. López; E. Pichardo, "Agua". *Recomendaciones de Ingestión de Nutrimientos para la Población Mexicana*, 2005. Editorial Panamericana, Tomo 1.
29. M. A. Sara Pinilla, "Efecto del estrés calórico den la reproducción bovina." 2020.
30. S.Seddiki,; N.Lebaili, "Effect of hydration on renal activity in a deserticole rodent, Gerbillus tarabuli, subjected to a water-rich diet." *Ukrainian Journal of Ecology*, 2022, vol. 12, no 6, p. 47-55.
31. M. E. Soto, "El Clima." Pp. 195-200, in Los Tuxtlas. El paisaje de la sierra. (Guevara S., J. Laborde y G. Sánchez-Rós, eds.).2004 Instituto de Ecología/Unión Europea. Xalapa, Veracruz.
32. A. Tamai *et al.*, "Strong electron correlations in the normal state of the iron-based FeSe 0.42 Te 0.58 superconductor observed by angle-resolved photoemission spectroscopy." *Physical review letters*, 2010, vol. 104, no 9, p. 097002.
33. C. R. Taylor, Hygroscopic food: a source of water for desert antelopes?. *Nature*, 1968, vol. 219, no 5150, p. 181-182.
34. J. Terborgh. "Five New World primates: a study in comparative ecology." Princeton University Press, 1983.



35. L. E. Traviezo-Valles, "Densidad de la orina ¿1025 o 1,025 g/ml?" *Revista de la Facultad de Medicina Humana*, 2020, vol. 20, no 4, p. 758-760.
36. H. T. R. Urquiza, "Aporte nutricional de frutos *Ficus perforata* (pulpa, semillas y materia animal) consumidos por monos aulladores (*Alouatta palliata mexicana*)." 2001. Tesis Doctoral. Tesis licenciatura, UNAM: México.

## ANÁLISIS DE LAS ESPECIES DE MURCIÉLAGOS EN LOS TIPOS VEGETACIÓN DE PUEBLA, MÉXICO

Bárbara Vargas-Miranda<sup>1</sup>, Esteban Vieyra-Vargas<sup>2</sup>, Rocío Zárate-Hernández<sup>1</sup>, Claudia Ballesteros-Barrera<sup>1</sup> y Angélica Martínez-Bernal<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias de la Salud. <sup>2</sup>Licenciatura en Biología. <sup>3</sup>Departamento de Biología. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina A.P. 55-535, Ciudad de México 09340, México.

Correo de contacto: bvm@xanum.uam.mx

### RESUMEN

El estado de Puebla está ubicado en un área zoogeográfica importante, presenta una topografía compleja, con grandes y extensas elevaciones que favorecen la existencia de varios tipos básicos de vegetación. Se registran cinco tipos de vegetación: Bosque Mesófilo de Montaña (BMM), Bosque de Coníferas y Encinos (BCE), Bosque Tropical Perennifolio (BTP), Bosque Tropical Caducifolio (BTC) y Matorral Xerófilo (MX). La vegetación está relacionada con la distribución y abundancia de las especies animales. Las especies de murciélagos interactúan con el tipo de vegetación, debido a las condiciones ambientales que ahí se encuentran, por la disponibilidad del tipo de alimento y refugio. El objetivo de este trabajo fue conocer el grado de similitud de la presencia de las especies de murciélagos en los diversos tipos de vegetación de Puebla. Se obtuvieron registros de colecta en línea (SNIB y GBIF) y de la literatura. Posteriormente se realizó un análisis de la información con la intención de conocer las localidades de colecta en el estado y los registros en los tipos de vegetación con las localidades obtenidas. Se analizó la presencia y ausencia de las especies en los distintos tipos de vegetación y además se aplicó el índice de similitud de Sørensen para conocer las especies de murciélagos que comparten los tipos de vegetación. Los resultados mostraron el registro de 42 especies en el MX, en el BTP (40), BCE (33) y BMM (23). La mayor similitud fue entre MX-BCE (75%) compartiendo 28 especies, BCE-BMM (68%) compartiendo 19 especies y BTP-BCE (66 %) compartiendo 24 especies. En el caso de la mayor similitud de especies entre MX-BCE, esto podría explicarse debido a que comparten la distribución de algunas especies y debido a su capacidad de vuelo de los murciélagos, pueden desplazarse de un ambiente a otro cercano, como ejemplos tenemos a las especies, *Desmodus rotundus* y *Diphylla ecaudata* cuya distribución es por ser hematófagos de ganado y aves respectivamente, *Artibeus intermedius* y *Sturnira lilum* son especies frugívoras, *Myotis keaysi*, *M. velifera* y *Tadarida brasiliensis* son especies insectívoras. Además, entre estos dos tipos de vegetación que comparten la mayor cantidad de especies entre sí, puede ser producto de la cercanía geográfica entre ambos tipos de vegetación, ya que es factible que especies que habitan el MX se trasladen al BCE en busca de alimento, como es el caso de las especies insectívoras, que se encuentran en mayor proporción entre estos ambientes. Los tipos de vegetación que hay en el estado de Puebla son decisivos en el patrón de la distribución y diversidad de los murciélagos, pues responden a la estructura de las comunidades vegetales.

### INTRODUCCIÓN

En el estado de Puebla convergen dos zonas biogeográficas, la Neártica y Neotropical, por lo que es una zona de transición de ambas faunas. Además, presenta un relieve de cadenas montañosas compleja, como son la Planicie Costera del Golfo, Eje Volcánico Transversal, Cuenca del Balsas, Oaxaca Tehuacanense, y una pequeña porción al norte de estado, denominada Zacatecana (Ramírez-Pulido y Castro-Campillo, 1992).

Debido a esta topografía variada, con grandes y extensas elevaciones, permite la existencia de varios tipos básicos de vegetación: Bosque Mesófilo de Montaña (BMM), que pertenece a la Sierra Madre Oriental y se localiza al norte del estado. Bosque de Coníferas y Encinos (BCE), está localizado en la Sierra Madre Oriental y el Eje Volcánico Transversal, en la parte media del estado y donde se ubica la cadena montañosa como parte del Pico de Orizaba, el Popocatepetl e Iztaccíhuatl. Bosque Tropical Perennifolio (BTP) que se ubica al norte del estado, en lo que es parte de la Llanura Costera del Golfo. El Bosque Tropical Caducifolio (BTC) se localiza en la región de la Cuenca del Balsas. El Matorral Xerófilo (MX) está en la región Oaxaca-Tehuacanense, parte del Eje Volcánico Transverso y Cuenca del Balsas, el cual varía entre matorral crasicaule, chaparral y mezquital. Además, presenta dos pequeñas áreas de vegetación Acuática y Subacuática en la parte centro de

Puebla (VAS) (INEGI, 1987; Rzedowski, 1992).

Dentro de la clase Mammalia, el segundo orden más abundante en el mundo son los quirópteros, tanto en especies, como en número de ejemplares, lo que nos permite evaluar y cuantificar la diversidad en un área determinada. La vegetación está relacionada con la distribución y abundancia de las especies animales, esta relación que existen entre sus poblaciones y el medio ambiente es posible encontrar ciertos patrones de diversidad en relación con el hábitat, y dado que tienen la capacidad de vuelo, les permite desplazarse con relativa facilidad de un ambiente a otro.

Las especies de murciélagos interactúan con el tipo de vegetación, debido a las condiciones ambientales que ahí se encuentran, así como la disponibilidad del tipo de alimento y refugio. Así mismo, Pianka (1979), menciona que la vegetación es un factor determinante para la presencia de especies de animales dado su preferencia por los lugares con mayor vegetación, por lo que se podía pensar que en los climas tropicales se encuentran un mayor número de nichos ecológicos disponibles para las diferentes especies, sin embargo, son menos numerosas en vegetación de climas templados, donde en estas áreas se encuentra una menor disponibilidad de recursos para las especies que lo explotan.

Por lo tanto, debido a que la distribución y diversidad de las especies de murciélagos está estrechamente relacionado con la vegetación (Vargas-Miranda et al., 2008), y dado que en el estado de Puebla hay una alta gama heterogeneidad ambiental, en este trabajo se consideró estudiar la diversidad de murciélagos en los tipos de vegetación que ahí imperan y ver si la variación ambiental determina los patrones de distribución de los murciélagos, considerando que hay especies que se distribuyen en más de un ambiente. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue conocer el grado de similitud de la presencia de las especies de murciélagos en los diversos tipos de vegetación de Puebla.

## METODOLOGÍA

Los registros de las especies se obtuvieron de bases de datos digitales públicas: Sistema Nacional de Información sobre la Biodiversidad de México (SNIB, <https://www.snib.mx/>) The Global Biodiversity Information Facility (GBIF, <https://www.gbif.org/>) Vernet (<http://vertnet.org/>) Bell Museum of Natural History, University of Minnesota (BMNH, <https://www.bellmuseum.umn.edu/mammals/>), y se anexó información de literatura consultada (Ramírez-Pulido et al., 1995; Vargas-Miranda et al., 2008). Las bases de datos que se compilaron fueron depuradas eliminando los registros duplicados, los que no tenían información correspondiente a localidad y sin coordenadas. En caso de contar con localidades estas fueron verificadas y georreferenciadas por medio de Google Earth, además las localidades fueron comparadas con los mapas de distribución conocida por cada especie publicados en distintas fuentes (Hall, 1981; Vargas-Miranda et al., 2008; Ceballos, 2014).

La vegetación está presente con características muy variadas, desde el matorral xerófilo que es característico de lugares secos, hasta los bosques tropicales perennifolios y caducifolios típico de lugares con mucha humedad, encontrando como intermedios al bosque mesófilo de montaña y al bosque de coníferas y encinos.

Para los tipos de vegetación, se siguieron las obras de Rzedowski (1988; 1992); INEGI (1987); Flores y Geréz (1994). Se realizó un análisis de la información con la intención de conocer las localidades de colecta en el estado y los registros en los tipos de vegetación.

Para visualizar las localidades y crear los mapas de localidades de colecta, la información fue organizada para cada especie. Se utilizó un Sistema de Información Geográfica (QGIS Desktop 3.10.9 con soporte GRASS 7.8.3) se intersecaron las localidades obtenidas con una cobertura digital del estado (INEGI, 2021) y se cuantificaron los registros. Se utilizó el índice de similitud de Sørensen para conocer las especies de murciélagos que comparten los tipos de vegetación, este índice se calculó con datos de presencia-ausencia y cuyo resultado oscila entre 0 y 1, donde S=1 o próximo a este valor, significa que son similares mientras que S=0 expresa diferencia.

$$S_{j,k} = \frac{2a}{2a + b + c}$$

Donde:

S representa la afinidad entre localidades  $j$  y  $k$

$a$  número de especies comunes

$b$  el número de especies que se encuentran en  $j$  pero no en  $k$

c el número de especies que se encuentran en  $k$  pero no en  $j$ .

Se tomó en cuenta la línea crítica imaginaria del 66.66%, que mencionan Sánchez y López (1988), donde los valores del índice de similitud calculados, que están por debajo de esta línea muestran dos faunas distintas o no emparentadas y si los valores están por arriba de la línea crítica las faunas son las mismas o son consideradas como una sola.

## RESULTADOS

Se analizaron 1,139 ejemplares, que fueron registrados en 364 localidades del Estado de Puebla. La mayor parte de los ejemplares se encuentran en la Colección de Mamíferos de la UAMI. Se han registrado en el mundo más de 1,300 especies de murciélagos y México es hogar de 138 de ellas, los ejemplares examinados en este trabajo pertenecen a 66 especies que constituyen el 47.8% de la fauna de quirópteros existentes en el país y a seis de las ocho familias residentes en la República Mexicana. De las 66 especies, dos son de embalonúridos (3 %), cuatro de mormópidos (6 %), 29 de filostómidos (44 %), un natálido (2 %), 24 especies de vespertiliónidos (36 %) y seis molósidos (9 %). En el estado se encuentran dos especies (4 %) endémicas de México, *Corynorhinus mexicanus* y *Rhogeessa alleni*.

Los resultados mostraron el registro de 42 especies en el MX, en el BTP (40), BTC (37), BCE (33), BMM (24). De acuerdo con las obras de Rzedowski (1988; 1992); INEGI (1987); Flores y Geréz (1994), y de acuerdo con las coordenadas, en el mapa mostró que dos registros de *Desmodus rotundus* y *Platyrrhinus helleri*, caen en vegetación acuática y subacuática. La mayor similitud fue entre MX-BCE (75%) compartiendo 29 especies, BCE-BMM (58%) compartiendo 19 especies y BTP-BCE (66 %) compartiendo 24 especies.

El índice de similitud de Sørensen, con el que se decide si dos faunas de diferentes ambientes son similares, muestra que pueden reconocerse un grupo formado por BTP, MX, BCE y BMM entre áreas tropicales húmedas, y áreas de menos humedad o ambientes secos (Figura 1).

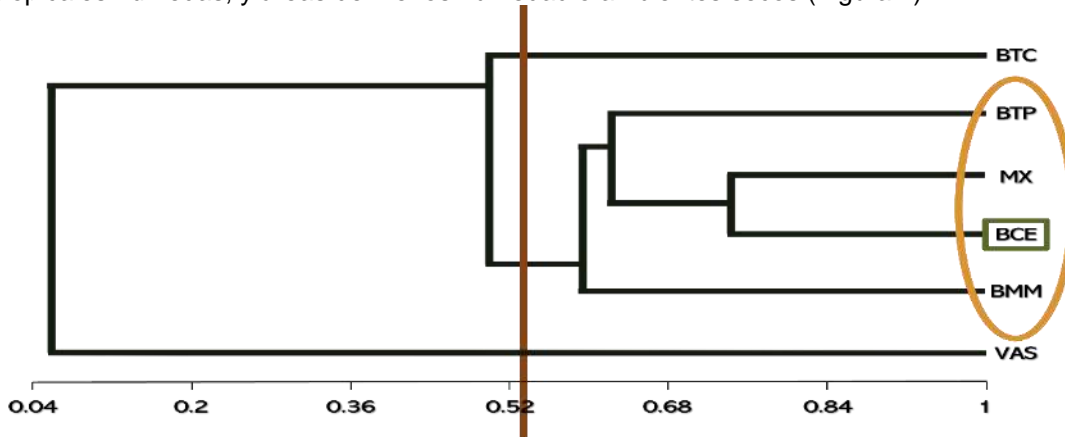


Figura 1. Dendrograma que muestra el índice de similitud de Sørensen indicando la línea de corte del 66.66%

En el caso de la mayor similitud de especies entre MX-BCE, esto podría explicarse debido a que comparten la distribución de algunas especies y dado su capacidad de vuelo de los murciélagos, pueden desplazarse de un ambiente a otro cercano, como ejemplos tenemos a las especies, *Desmodus rotundus* y *Diphylla ecaudata*, que son hematófagos de ganado y aves respectivamente, *Artibeus intermedius* y *Sturnira lilium* son especies frugívoras, *Myotis keaysi*, *M. velifera* y *Tadarida brasiliensis* son especies insectívoras. Además, entre estos dos tipos de vegetación que comparten la mayor cantidad de especies entre sí, puede ser producto de la cercanía geográfica entre ambos tipos de vegetación, ya que es factible que especies que habitan el MX se trasladen al BCE en busca de alimento, como es el caso de las especies insectívoras, que se encuentran en mayor proporción entre estos ambientes.

En relación con la selección del hábitat, se encontró que existen especies que pueden estar presentes en ambientes particulares, como ejemplo 21 % de las especies se localizaron en un sólo tipo de vegetación, como ejemplo *Balantiopteryx io*, o están las que habitan en más de un

ecosistema, 35% en dos (*Micronycteris megalotis*), 12% en tres (*Lasiurus cinereus*), 18%, en cuatro (*Diphylla ecaudata*) y 14% en todos los tipos de vegetación presentes en el estado (*Anoura geoffroyi*) (Tabla 1).

Las diferencias generales con las otras localidades podrían estar relacionadas con la diferencia de climas y vegetaciones que se encuentran en ellas (Rzedowski, 1978). Sin embargo, la poca afinidad que pueden tener en conjunto estas comunidades se debe a que hay especies de murciélagos como es el caso de *Anoura geoffroyi*, *Artibeus lituratus*, *Choeronycteris mexicana*, *Glossophaga soricina*, *Leptonycteris yerbabuenae*, *Mormoops megalophylla*, *Pteronotus parnellii*, *Sturnira parvidens* y *Tadarida brasiliensis*, que fueron colectados en los cinco tipos de vegetación.

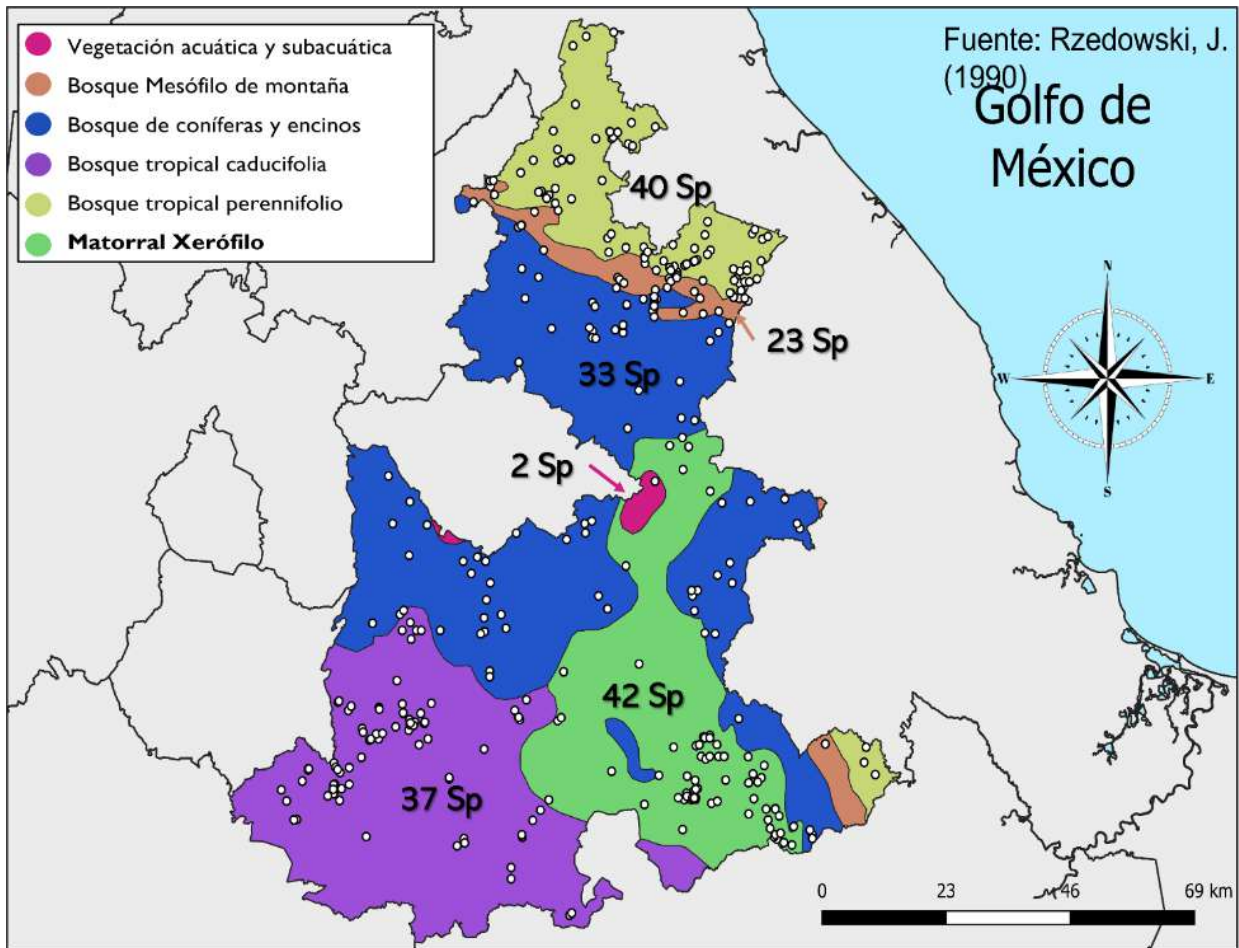


Figura 2. Mapa con los tipos de vegetación según Rzedowski, 1992 y las localidades de colecta de las especies de murciélagos en el estado de Puebla, México.

Los murciélagos en el estado de Puebla contienen el 47.8% de las especies de murciélagos mexicanos en tan solo 1.72 % del territorio de la República Mexicana, confirma que este estado contiene un elevado interés en lo que se refiere a distribución y presencia de especies consideradas en general escasas, sobre todo aquéllas cuya distribución es más frecuente en la parte sur de México (Vargas-Miranda *et al.*, 2008).

Los tipos de vegetación que hay en el estado de Puebla son decisivos en el patrón de la distribución y diversidad de los murciélagos, pues responden a la estructura de las comunidades vegetales. Con lo anterior se deduce que hay especies de murciélagos que están limitadas a ciertos tipos de vegetación particulares, debido a las condiciones ambientales que en ellas se encuentran, o bien se adecuan a los microhábitats que se crean debido a la disponibilidad de alimento o bien cubren la mayor parte de las necesidades que la especie necesita, pero al mismo tiempo se encontró que las



especies generalistas, como es el caso de *Glossophaga soricina*, fue colectada en los cinco tipos de vegetación o el caso de *Pteronotus parnellii* que se colectó en cuatro de los cinco tipos de vegetación. Así como en la riqueza de especies en cuanto a los diferentes ambientes vegetales, en este caso se puede decir que la distribución de las especies en los diferentes ambientes es posible a causa de selección de hábitat y alimento, o bien, la densidad de murciélagos en un hábitat está controlada principalmente por la cantidad de alimento y refugios disponibles, por lo que esta relación es importante ya que determina la diversidad de especies.

Tabla 2. Especies presentes en cada tipo de vegetación BCE: Bosque de coníferas y encinos, BMM: Bosque mesófilo de montaña, BTC: Bosque tropical caducifolio, BTP: Bosque tropical perennifolio, MX: Matorral xerófilo, VAS: Vegetación Acuática y Subacuática.

Especie	BCE	BMM	BTC	BTP	MX	VAS
<b>Familia Emballonuridae</b>						
<b>Subfamilia Emballonurinae</b>						
<i>Balantiopteryx io</i>				o		
<i>Balantiopteryx plicata</i>	o		o		o	
<b>Familia Phyllostomidae</b>						
<b>Subfamilia Micronycterinae</b>						
<i>Micronycteris megalotis</i>			o		o	
<i>Micronycteris microtis</i>			o		o	
<b>Subfamilia Desmodontinae</b>						
<i>Desmodus rotundus</i>	o	o	o	o	o	o
<i>Diphylla ecaudata</i>	o	o		o	o	
<b>Subfamilia Phyllostominae</b>						
<i>Anoura geoffroyi</i>	o	o	o	o	o	
<i>Choeronycteris mexicana</i>	o	o	o	o	o	
<i>Glossophaga leachii</i>			o	o		
<i>Glossophaga morenoi</i>			o			
<i>Glossophaga soricina</i>	o	o	o	o	o	
<i>Leptonycteris nivalis</i>	o		o		o	
<i>Leptonycteris yerbabuenae</i>	o	o	o	o	o	
<i>Musonycteris harrisoni</i>			o			
<i>Artibeus hirsutus</i>			o			
<i>Artibeus jamaicensis</i>	o		o	o	o	
<i>Artibeus lituratus</i>	o	o	o	o	o	
<i>Carollia perspicillata</i>		o		o		
<i>Carollia sowelli</i>		o		o		
<i>Carollia subrufa</i>				o		
<i>Centurio senex</i>	o	o		o	o	
<i>Chiroderma salvini</i>	o		o	o	o	
<i>Chiroderma villosum</i>				o		
<i>Dermanura azteca</i>	o	o		o	o	
<i>Dermanura phaeotis</i>				o		
<i>Dermanura tolteca</i>		o	o	o		
<i>Macrotus waterhousii</i>			o		o	
<i>Platyrrhinus helleri</i>				o		o
<i>Sturnira hondurensis</i>	o	o	o	o		
<i>Sturnira parvidens</i>	o	o	o	o	o	
<b>Familia Mormoopidae</b>						
<i>Mormops megalophylla</i>	o	o	o	o	o	
<i>Pteronotus davyi</i>			o	o		
<i>Pteronotus parnellii</i>	o	o	o	o	o	
<i>Pteronotus personatus</i>			o			
<b>Familia Natalidae</b>						
<i>Natalus mexicanus</i>			o	o		
<b>Familia Molossidae</b>						



**Subfamilia Molossinae**

<i>Molossus rufus</i>			o	o	
<i>Molossus sinaloae</i>			o		
<i>Nyctinomops aurispinosus</i>					o
<i>Nyctinomops macrotis</i>	o				o
<i>Promops centralis</i>			o		

**Subfamilia Tadarinae**

<i>Tadarida brasiliensis</i>	o	o	o	o	o
------------------------------	---	---	---	---	---

**Familia Vespertilionidae**

**Subfamilia Myotinae**

<i>Myotis albescens</i>	o	o			
<i>Myotis californicus</i>	o	o		o	o
<i>Myotis ciliolabrum</i>	o			o	o
<i>Myotis elegans</i>	o			o	
<i>Myotis keaysi</i>	o	o		o	
<i>Myotis nigricans</i>	o		o	o	o
<i>Myotis thysanodes</i>				o	o
<i>Myotis velifer</i>	o	o		o	o
<i>Myotis yumanensis</i>			o	o	o

**Subfamilia Vespertilioninae**

<i>Corynorhinus mexicanus</i>	o		o	o	o
<i>Corynorhinus townsendii</i>	o				o
<i>Enchisthenes hartii</i>	o			o	
<i>Eptesicus furinalis</i>				o	
<i>Eptesicus fuscus</i>	o	o	o		o
<i>Idionycteris phyllotis</i>	o				o
<i>Lasiurus blossevillii</i>	o		o		o
<i>Lasiurus cinereus</i>	o	o			o
<i>Lasiurus ega</i>				o	o
<i>Lasiurus intermedius</i>					o
<i>Lasiurus xanthinus</i>				o	o
<i>Nycticeius humeralis</i>					o
<i>Rhogeessa alleni</i>			o		o
<i>Rhogeessa gracilis</i>			o		o
<i>Rhogeessa parvula</i>					o
<i>Rhogeessa tumida</i>		o	o		

**CONCLUSIONES**

Puebla es un estado muy importante debido a su ubicación en dos áreas zoogeográfica y a su topografía compleja, se presentan varios tipos básicos de vegetación: Bosque Mesófilo de Montaña (BMM), Bosque de Coníferas y Encinos (BCE), Bosque Tropical Perennifolio (BTP), Bosque Tropical Caducifolio (BTC) y Matorral Xerófilo (MX). Los tipos de vegetación en el estado de Puebla son decisivos en el patrón de la distribución y diversidad de los murciélagos, pues responden a la estructura de las comunidades vegetales y los que comparten la mayor cantidad de especies entre sí, puede ser producto de la cercanía geográfica. El Matorral Xerófilo, es donde se encontró mayor número de registros. La mayor similitud de especies fue entre MX-BCE. Se encontró que existen especies que se localizaron en un sólo tipo de vegetación, y otras en más de un ecosistema.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. B. Vargas-Miranda, J. Ramírez-Pulido y G.J.C. González, Murciélagos del Estado de Puebla, México. *Revista Mexicana de Mastozoología (Nueva Época)*. 2008. 12, 1 (ene. 2008), 59–112. DOI:https://doi.org/10.22201/ie.20074484e. 2008. 12.1.47.
2. E. R. Pianka, *Evolutionary ecology*. Harper and Row, Publ. New York. 1979. 356 pp.
3. E.R. Hall. *The Mammals of North America*. 2 vol. John Wiley and Sons, Nueva York. 1981. 1:xv + 1–600 + 90.

4. G. Ceballos (ed.). *Mammals of Mexico*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, 2014. 974 pp. ISBN 13:978-1-4214-0843-9,
5. INEGI. *Síntesis Geográfica, Nomenclátor y Anexo Cartográfico del estado de Puebla, México*. 1987.
6. J. Ramírez-Pulido y A. Castro-Campillo. *Regiones y Provincias Mastogeográficas de México. Hoja IV. 8. 8. en: Atlas Nacional de México. Sección Naturaleza. Subsección Biogeografía*. Instituto de Geografía UNAM. 1992.
7. J. Ramírez-Pulido, J.A. Castro-Campillo y B. Vargas Miranda, *Registros adicionales de*
8. J. Rzedowski, *Vegetación de México*. Limusa. México, D.F., México. 1988. 395 p.
9. J. Rzedowski. *Vegetación de México*. Limusa, México. D.F., México. 1978. 432 p.
10. J. Rzedowski. *Vegetación Potencial. Atlas Nacional de México*. Sección Naturaleza, Instituto de Geografía, UNAM, 1992. IV. 8.2.
11. murciélagos del Estado de Puebla, México. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia*
12. *Natural*, 1995. 46:179–204.
13. O. Flores y P. Geréz, *Biodiversidad y conservación en México: vertebrados, vegetación y uso del suelo*. México: unam/Conabio. 1994. 439 pp.
14. O. Sánchez y G. López, *A theoretical analysis of some indices of similarity as applied to biogeography*. *Folia Entomol. Mex.* 1988. 75: 119-145.

## AISLAMIENTO DE LEVADURAS DE *CRYPTOCOCCUS SPP* A PARTIR DE EXCRETAS DE PALOMAS UBICADAS EN EL CALLEJÓN DEL ROMANCE DE MORELIA, MICHOACÁN

<sup>1</sup> Judith Ayala García, <sup>1</sup> Patricia Yazmín Figueroa Chávez, <sup>2</sup> Brenda Romero Ayala, <sup>1</sup> Daniela Romero Ayala.

<sup>1</sup> Facultad de Químico Farmacobiología - Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo,

<sup>2</sup> Facultad de Ingeniería Química - UMSNH.

Correo: [qfbjudithayala@hotmail.com](mailto:qfbjudithayala@hotmail.com)

### RESUMEN

La criptococosis es una enfermedad fúngica oportunista causada por algunas especies del género *Cryptococcus*, se considera una zoonosis. *Cryptococcus neoformans* es un hongo encapsulado, que se disemina por la inhalación de esporas que se encuentran en el polvo y heces de aves. Emmons en 1955 aisló *C. neoformans* de deposiciones de palomas urbanas (*Columba livia*). Las levaduras permanecen en excreciones de palomas hasta más de dos años. Los excrementos al pulverizarse vehiculan levaduras de 1-2 micras de diámetro y acapsuladas. Esta levadura puede infectar a pacientes inmunodeprimidos. El objetivo de la investigación fue aislar *Cryptococcus spp* a partir de heces de paloma. Es un estudio descriptivo transversal, la metodología consistió en analizar 44 excretas de paloma con consistencia seca. Se pesaron y se observaron con tinta china levaduras en estado anamorfo o mitospórico, posteriormente se inocularon alícuotas en caldo BHI para su enriquecimiento y se sembraron en medios más específicos como el medio Niger y agar Sabouraud con Cloranfenicol en condiciones de incubación de 5 a 7 días a 37°C el primero y a temperatura ambiente el medio Niger para favorecer la expresión de la enzima feniloxidasas. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: Después del periodo de incubación de los medios se evaluó la morfología colonial macroscópica observándose en el medio Sabouraud con Cloranfenicol colonias de color blanco-amarillento (semejante a leche condensada), aspectos brillantes y ligeramente mucoides. En medio Niger colonias marrón de claro a intenso, por producción de feniloxidasas y microscópica de ambos medios las tinciones negativas revelaron la presencia de levaduras capsuladas. La distribución del aislamiento de *Cryptococcus spp* de las muestras fue en promedio de 36%. En medio Sabouraud con Cloranfenicol fue de 38.6% y en medio Niger el 34% y de acuerdo con la sumatoria de los datos se obtuvo un aislamiento del 72.6%, en cuanto a la prueba estadística aplicada se obtuvo en p valor de 0,006 es decir mayor al p valor de 0,005, por lo que no hay diferencia significativa en el aislamiento de *Cryptococcus spp* en los medios de cultivo.

Se comprueba que el aislamiento de *Cryptococcus spp* puede lograrse exitosamente a partir de las heces de paloma en medios poco selectivos como el medio Sabouraud con Cloranfenicol y el Niger. La presencia de la levadura en palomas del área urbana de Morelia representa un riesgo potencial a la salud pública sobre todo en personas inmunosuprimidas.

### INTRODUCCION

La criptococosis es una enfermedad infecciosa sistémica de curso subagudo o crónico producida por levaduras patógenas encapsuladas del género *Cryptococcus* principalmente especies del *Cryptococcus neoformans* Complex y *Cryptococcus gattii* Complex. <sup>(1)</sup> Las levaduras presentan una cápsula compuesta por polisacáridos, visible con tinta china en las preparaciones en fresco. <sup>(2)</sup> El hongo levaduriforme puede causar micosis oportunista en función del estado inmunológico del paciente. Algunas variedades tienen una distribución mundial y han demostrado predilección por lugares contaminados con excrementos de aves, especialmente de palomas (*Columba livia*). <sup>(3)</sup>

Esta micosis oportunista, causa afección del sistema nervioso central en pacientes inmunodeprimidos e inmunocompetentes, y se adquiere por la inhalación de las esporas del hongo, pequeñas levaduras encapsuladas y probablemente también basidiosporas, presentes en el medio ambiente. Las infecciones por este hongo son causa importante de morbilidad y mortalidad. Actualmente esta enfermedad micótica se clasifica entre las tres infecciones oportunistas más importantes que conducen a la muerte en pacientes infectados con el virus de VIH. <sup>(4)</sup> La criptococosis tiene una prevalencia del 3% en América y Europa, y de 20-35 % en África, afectando a ambos sexos, es más frecuente en individuos entre los 30 y 60 años de edad, principalmente debilitados e

inmunosuprimidos. Las formas clínicas más frecuentes son la meningitis y la meningoencefalitis; en algunos casos puede suceder con diseminación a otros órganos.

La paloma urbana juega un papel importante como portadora de hongos patógenos, Emmons en 1955 aisló *C. neoformans* de las excreciones de palomas urbanas (*Columba livia*), siendo el primero en establecer la relación existente entre el microorganismo y las heces de estas aves. <sup>(5)</sup> Diversos investigadores han demostrado que las deposiciones de paloma son un importante reservorio de *C. neoformans*. <sup>(5)</sup> La relación entre la levadura y las heces de paloma se fundamenta en la elevada capacidad de supervivencia del microorganismo en estos sustratos, aun desecados e insolados, convirtiéndolas en potenciales fuentes de infección <sup>(6)</sup> en las áreas urbanas densamente pobladas; se ha demostrado que éstas levaduras también pueden sobrevivir y replicarse en las amebas de vida libres y en los gusanos del suelo. <sup>(7)</sup>

Es trascendental conocer el reservorio de *Cryptococcus spp* en áreas con alta densidad de población como medida de prevención dado su impacto en la salud pública. La ciudad Morelia cuenta con numerosos monumentos arquitectónicos en su centro histórico mismos en los que las palomas urbanas han anidado y sus excretas al aire libre representan un importante foco de infección para la población en general y representando un mayor riesgo para aquellas personas inmunosuprimidas o inmunocomprometidas, por lo que es de interés para la implementación de medidas de control sanitarias enfocadas a reducir la posibilidad de transmisión de la enfermedad a la población.

## TEORIA

La criptococosis es una enfermedad infecciosa grave que puede afectar a sujetos inmunocompetentes, pero se manifiesta principalmente en pacientes inmunodeprimidos. <sup>(6)</sup> Algunas variedades de este hongo, que tiene una distribución mundial, han demostrado predilección por lugares contaminados con excrementos de aves, especialmente de palomas (*Columba livia*). <sup>(3)</sup> Este padecimiento también es conocido como torulosis, enfermedad de Busse-Buschke, blastomicosis europea o enfermedad señal. <sup>(1)</sup>

La infección afecta inicialmente los pulmones generando posterior diseminación hacia la piel y vísceras <sup>(1)</sup> y tiene predilección por el sistema nervioso central. Afecta a pacientes inmunodeprimidos e inmunocompetentes, y se adquiere por la inhalación de las esporas del hongo, pequeñas levaduras anamorfias encapsuladas y probablemente también basidiosporas, presentes en el ambiente. <sup>(4)</sup> Se ha descrito que se causada por levaduras oportunistas patógenas principalmente *Cryptococcus neoformans* y *C. gatti* que se recientemente se han reubicado filogenéticamente en dos complejos principales *Cryptococcus neoformans* complex y *Cryptococcus gatti* complex. <sup>(1)</sup> Existe evidencia de que *C. neoformans* afecta en especial a los pacientes inmunosuprimidos, mientras que cepas de *C. gattii* lo hacen más con los inmunocompetentes. La habilidad del *C. gattii* de desarrollar la enfermedad en los individuos con sistemas inmunes completamente funcionales parece venir de su capacidad para una rápida replicación en los fagocitos, antes que la respuesta inmune adaptativa pueda ser activada. <sup>(7)</sup>

Estudios realizados con aislamientos de *C. neoformans* han permitido establecer que ciertos factores de virulencia como la cápsula, la presencia de las enzimas fenoloxidasa, fosfolipasa y el crecimiento a 37 °C contribuyen a la patogénesis de la enfermedad. Adicionalmente, existen evidencias sobre otras características como la producción de proteasas y otras enzimas extracelulares que podrían estar asociadas con la virulencia. No obstante, se desconoce cómo se regulan estas características fenotípicas y de qué manera su expresión regula el fenotipo virulento. <sup>(8)</sup>

*Cryptococcus neoformans* puede aislarse de cítricos, de la leche de vaca y la principal fuente de infección es el guano de diferentes especies de aves de estrecha convivencia con el ser humano como las palomas, pichones, gallinas y otras. Los aislamientos más frecuentes pueden realizarse en gallineros, palomares, atrios de iglesias, edificios y sitios urbanos en los que habitan estas aves que son hospederos y vectores indirectos que mantienen la viabilidad de las levaduras. Las palomas albergan en el intestino a la levadura que es poco virulenta dadas las condiciones de temperatura corporal que oscila entre los 40 a los 42 °C que aunado a la acción del sistema inmunológico se evita que las palomas desarrollen la enfermedad <sup>(1)</sup>; el pH alcalino, el alto contenido de sales, compuestos nitrogenados como la creatinina, las purinas, xantinas, ácido úrico y la urea en las excretas se favorece el desarrollo y supervivencia de la levadura en el medio ambiente por varios meses. <sup>(5)</sup>

La paloma es un animal inofensivo y uno de los que tiene mayor contacto con los humanos, no obstante, son potenciales transmisores de enfermedades en todo el mundo. Esta especie de paloma porta 60 diferentes organismos patógenos, de los cuales, cinco son transmitidos a seres humanos con regularidad. Entre esos cinco, el complejo de especies *Cryptococcus neoformans* (conformado por *C. neoformans sensu stricto*, anteriormente conocido como *C. neoformans var. grubii* y por *C. neoformans*, anteriormente *C. neoformans var. neoformans*) ocupa actualmente el segundo lugar en frecuencia. <sup>(9)</sup>

Las aves sirven como un reservorio potencial de infección en humanos, la cual no sucede por la transmisión directa con aves sino más bien de la exposición a los organismos en el medio ambiente. Por lo tanto, no se considera una zoonosis. Estudios realizados en otros países y ciudades revelan la importancia de realizar control sanitario de las palomas, consideradas potenciales plagas transmisoras de múltiples enfermedades entre ellas la criptococosis. <sup>(4)</sup>

El estudio de la ecología de este hongo levaduriforme se ha dificultado debido a que no se conocen con exactitud su hábitat primario ni su ciclo reproductivo en el ambiente, por lo cual también se desconocen algunos aspectos de la fisiopatología de la enfermedad que ocasiona, como son la naturaleza de la partícula infecciosa y el momento de adquisición de la infección con respecto al desarrollo de la sintomatología. <sup>(7)</sup>

La zona del Centro Histórico de la ciudad de Morelia, se encuentra poblada por una importante cantidad de palomas que anidan en diversas construcciones como edificios y viviendas. El Callejón del Romance es una calle que es uno de los atractivos turísticos del Centro Histórico de Morelia, consta de casas y fuentes de cantera. Las palomas anidan en diversos puntos de esta calle y sus excretas al aire libre representan un importante foco de infección para la población en general y representando un mayor riesgo para aquellas personas inmunosuprimidas o inmunocomprometidas.

Es trascendental conocer el reservorio de *Cryptococcus spp* en áreas con alta densidad de población como medida de prevención y para la implementación de medidas de control sanitarias enfocadas a reducir la posibilidad de transmisión de la enfermedad a la población.

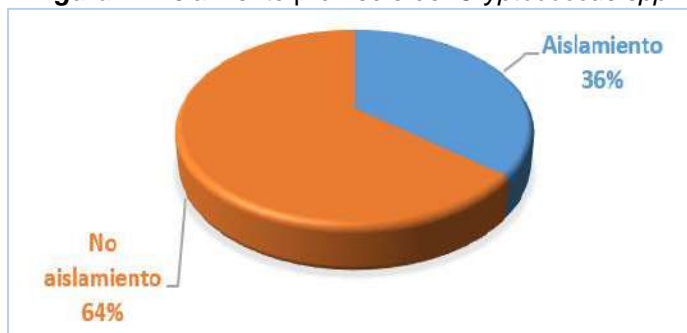
## PARTE EXPERIMENTAL

El presente es un estudio descriptivo-transversal. La metodología consistió en recolectar un total de 44 excretas deshidratadas de paloma que se llevaron para su procesamiento al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de QFB-UMSNH. Las muestras se hidrataron y mezclaron con solución salina estéril, el contenido se pasó a tubos de ensaye para centrifugar a 3500 rpm por 5 minutos. A partir de las muestras se hicieron tinciones negativas con tinta china en las que se observaron levaduras acapsuladas de *Cryptococcus spp*; posteriormente, se inocularon alícuotas en caldo BHI para su enriquecimiento, a partir de éstos se hicieron resiembras por duplicado en los medios de cultivo Sabouraud con Clorafenicol y Niger llevando a incubación a 27 °C el primero y a 27 °C el segundo por 3 a 5 días. Después del periodo de incubación, se evaluó la morfología microscópica macroscópica y de las colonias. Las tinciones negativas mostraron la presencia de levaduras con desarrollo de cápsula; en medio Sabouraud con Clorafenicol las colonias presentaron un color blanco-amarillento, aspecto brillante y de consistencia mucoide característica y en algunas placas las colonias fueron color blanco-amarillentas, secas y opacas. En medio Niger hubo crecimiento colonial color marrón de claro a intenso a consecuencia de melamina por la estimulación de la enzima feniloxidasa y en ambos medios las tinciones negativas revelaron la presencia de levaduras capsuladas.

## RESULTADOS

Las muestras que se procesaron fueron en total 44; después del periodo de incubación en los medios de cultivo de Sabouraud con Cloranfenicol y medio Níger, se evaluó el crecimiento obtenido en los medios de cultivo. Se encontraron colonias sugestivas de *Cryptococcus spp* en 16 de las 44 muestras que se sembraron, lo que corresponde al 36% tal como se observa en la *Figura 1*.

**Figura 1.** Aislamiento promedio del *Cryptococcus spp*.



*Nota:* El porcentaje de aislamientos corresponde a aislamientos en medios Sabouraud y Níger que se procesaron en el laboratorio en los cuales se obtuvo un crecimiento colonial compatible con cepas de *Cryptococcus spp*.

Fuente: Elaboración propia de las muestras tratadas en el Laboratorio de Microbiología QFB-UMSNH.

Para favorecer el crecimiento del *Cryptococcus spp*, deberán emplearse medios de cultivo específicos. En el medio de Sabouraud con Cloranfenicol se lograron aislar colonias de *Cryptococcus spp* en 17 de las muestras que corresponden a un 38.6% del total. La recuperación de microorganismos depende de varios factores como el periodo y la temperatura de incubación. En la *Figura 2* se describen los resultados del crecimiento de las muestras.

En la *Imagen 1* se observa el crecimiento colonial característico de *Cryptococcus spp* con colonias blancas-amarillentas que llega a simular la leche condensada (A) y colonias marrón oscuras en medio Níger por la producción de melamina.

**Imagen 1.** Crecimiento colonial de *Cryptococcus spp* en medio Sabouraud con Cloranfenicol.

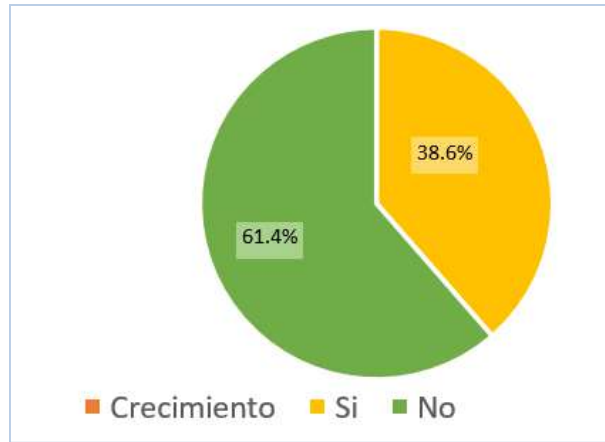


*Nota:* Colonias de *Cryptococcus spp* en medio Sabouraud con Cloranfenicol.

Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Microbiología QFB-UMSNH.

**Figura 2.** Crecimiento en medio Sabouraud con Cloranfenicol





Fuente: Elaboración propia de las muestras tratadas en el Laboratorio de Microbiología QFB-UMSNH.

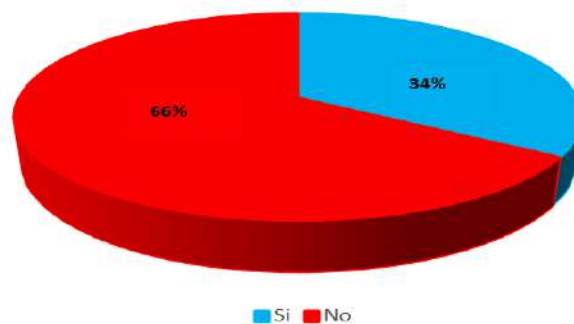
En el medio Niger se obtuvo crecimiento característico de colonias marrón claro a oscuras en 15 de las 44 muestras, lo que representa un porcentaje de recuperación del 34%. En la *Figura 2*, se representa el resultado de crecimiento obtenido en este medio de cultivo. En la *Imagen 2*, se muestran las colonias características de color marrón claro a oscuras lo cual indican la presencia de la enzima feniloxidasasa compatible con *Cryptococcus spp.*

**Imagen 2.** Crecimiento en medio Niger.



Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Microbiología QFB-UMSNH.

**Figura 3.** Crecimiento en medio Níger.



Fuente: Elaboración propia de las muestras tratadas en el Laboratorio de Microbiología QFB-UMSNH.

En la *tabla 1*, se muestran los resultados del análisis estadístico de los datos de los medios de cultivo en los que se sembraron las muestras. Se obtuvo un p valor de 0.006 este resultado es mayor al p valor de 0.005, por lo tanto, no hay diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento de *Cryptococcus spp* en los diferentes medios de cultivo de Sabouraud con Cloranfenicol y el medio Níger, ya que ambos se pueden utilizar para el aislamiento de este microorganismo.

**Tabla 1.** Tratamiento estadístico de los medios de cultivo.

	Muestras relacionadas				gl	Sig. (bilateral)	
	Media	Desviación típ.	Error típ.de la media	95% Intervalo de confianza			
				Inferior			Superior
Medio Sabouraud - Medio Níger	0.408	0.33493	0.4737	0.5031	0.3128	44	0.006

Fuente: Elaboración propia de las muestras tratadas en el Laboratorio de Microbiología QFB-UMSNH.

## CONCLUSIÓN

Se pudo comprobar la presencia de levaduras de *Cryptococcus spp* en muestras de deposiciones de palomas urbanas del Callejón del Romance. El aislamiento de *Cryptococcus spp* puede lograrse exitosamente a partir de las heces de paloma en medios poco selectivos como el medio Sabouraud con Cloranfenicol y el Níger. Los resultados reflejan que las palomas del área urbana de Morelia son portadoras importantes de especies de *Cryptococcus spp*, lo que representa un riesgo potencial a la salud pública.

## REFERENCIAS

1. Araiza J, Tejeda-Olán O, et.al. Criptococosis. Asociación Mexicana de Micología Médica, A.C. 2022.
2. Ancona C, Barrón Y. Neurocryptococcosis: Demographic, Clinical and Paraclinical Characteristics in a Case Series Study. *Dermatología Cosmética Médica y Quirúrgica*. 2023 Marzo; 21(1).
3. Huamán A, Béjar V, Sáez G, et.al. *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas (*Columba livia*) en Lima Metropolitana. *Revista Medica Herediana*. ; 29(2).
4. Vallejo D, Benavides C, Chaves C, et.al. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas (*Columba livia*) en el casco urbano del municipio de Pasto, Colombia. *Revista Biosalud*. 2016; 15(1): p. 62-71.
5. Rosario I, Acosta B, Colom F. La paloma y otras aves como reservorio de *Cryptococcus spp*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2008;(25): p. 13-18.
6. Degarbo S, Ampuero A, et.al. *Cryptococcus neoformans*: frecuencia de aislamiento en heces de paloma de paseos públicos de Mendoza. <http://repositorio.umaza.edu.ar/handle/00261/2333?show=full>.
7. Hurtado S, Quintero P. Criptococosis meníngea. *Acta Neurológica Colombiana*. 2021; 37 (1): p. 90-100.

8. Huérfano S, Cepero C, Castañeda E. Caracterización fenotípica de aislamientos ambientales de *Cryptococcus neoformans*. *Biomédica*. 2003 septiembre; 23(3).
9. Funes G, Mata C, Jaikel D, et.al. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en excrementos de paloma de Castilla (*Columba livia*) provenientes de lugares públicos de El Salvador. *Acta Médica Costarricense*. 2022; 64(1).

## LAS CÉLULAS MADRE, UN EJEMPLO DE LA REACTANCIA PSICOLÓGICA PARA SOBREVIVENCIA

María del Carmen Navarro Maldonado<sup>1</sup> y Demetrio Alonso Ambriz García<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.  
[deme@xanum.uam.mx](mailto:deme@xanum.uam.mx)

### RESUMEN

A muchos nos cuesta especial esfuerzo obedecer, seguir las normas establecidas, o las indicaciones de un superior y peor aún, de un similar. Ésta es una condición fisiológicamente normal conocida en la psicología como reactancia y, al igual que otros términos, por ejemplo, el de “estrés”, han sido tomados de la física, donde su significado es el de oposición al paso de la corriente eléctrica alterna. Por otro lado, las células madre, representadas en prácticamente todas las células nucleadas del cuerpo, tienen el potencial de desarrollo para la regeneración y, aún más, para la construcción de un organismo completo (totipotencialidad), situación aprovechada para el proceso conocido como clonación de individuos. En un experimento reciente, cultivamos células de piel de colibrí, cuyo cadáver había sido congelado durante cinco meses sin usar crioprotectores. Las células madre (fibroblastos) en dicho cultivo, comenzaron su pronto desarrollo (deriva celular a los 7 días) y recuperaron su actividad metabólica demandando gran cantidad de nutrientes (cuatro veces más que las células de mamífero), alcanzando una confluencia del 50%. Mostrando así que cada célula tiene un potencial de vida, mucho más allá de lo que podríamos llamar “muerte”, es decir esa capacidad (reactancia) de oposición a lo establecido y que posibilita la sobrevivencia celular o incluso del individuo.

### INTRODUCCIÓN

En un mundo transdisciplinario, no es extraño que los conocimientos se muevan entre diferentes campos de especialización. Así la Física ha aportado importantes conceptos que la Biología ha utilizado en la adaptación a nuevos comportamientos no descritos. Por ejemplo, uno de los primeros, el del Stress, fue Hans Selye en 1930, quien lo tomó de la Física para resumir su propuesta de “Síndrome General de Adaptación” y de ahí hacia la Psicología. Posteriormente, encontramos el término de Resiliencia, empleado desde 1940 por René Spitz y Anna Freud, sobre niños internados en orfanatos que habían sufrido traumas durante la Segunda Guerra Mundial. Denotando un re “salto” o salto. Finalmente tenemos el término de Reactancia, que en la Física es la oposición al paso de la corriente alterna y en la Psicología es una reacción emocional en contradicción directa a reglas establecidas.

### TEORÍA

Las células madre, no han sido dadas por la madre. Fueron las primeras formadas en el inicio del desarrollo por el propio individuo. Se reconoce como la primera manifestación de una nueva vida, la aparición de un nuevo componente genético con potencial de desarrollo. Ello ocurre en el proceso denominado singamia (etimológicamente sin-con, gamos-uniión o matrimonio), es decir, en el momento en que los gametos masculino y femenino dejaron de ser entes individuales, y se fusionaron para conformar un nuevo organismo, con el mencionado potencial de desarrollo, que ahora es denominado cigoto. Este embrión pasó por un proceso de división celular complejo, la segmentación, conformando así las primeras células madre embrionarias cuya descendencia serán todas las células que conformarán al nuevo organismo. Algunas células permanecerán como células madre, dispuestas en el momento requerido para conformar de nuevo otras células especializadas de funcionalidad complementaria para la óptima sobrevivencia.

Por otro lado, la reactancia, también conocida como la no capacidad de obediencia (etimológicamente ob-sobre, audire=escuchar, cia=cualidad), o de no ir con la corriente o modo establecido, provee de alternativas individuales que pueden ser de mayor impacto para la sobrevivencia. Este ejemplo recién lo vivenciamos a partir de resultados experimentales hace poco más de un año, donde, como material biológico para deriva de células madre (fibroblastos), utilizamos una biopsia de tejido epitelial de la pechuga de un pequeño colibrí, que había sido mantenido en congelación

durante 5 meses, sin utilizar una preparación o sustancias especiales para dicho almacenamiento. En la deriva celular, los fibroblastos de colibrí crecieron adecuadamente e incluso sorprendió que mientras células similares procedentes de otros mamíferos domésticos y silvestres, con las cuales tenemos experiencia en el laboratorio, se les proporcionaba medio nutritivo cada 6 o 7 días, las de colibrí pedían ser alimentadas cada día, indicando con ello, la alta actividad metabólica que caracteriza a estos organismos. Es por ello que, dichas células madre de colibrí, procedentes de un organismo fallecido meses antes, nos hicieron reflexionar sobre la reactancia y las implicaciones que puede tener para la sobrevivencia de un organismo (Figura 1).



Figura 1. La reactancia es la forma de no ir con la corriente establecida.  
Tomado de: <https://atlaspsicologostrescantos.com/>

Las células madre, son células indiferenciadas con la capacidad de poder diferenciarse en el momento requerido y en el tipo celular necesitado por el organismo. No es de sorprender que muchos de nosotros hemos tenido diferentes episodios, donde nuestros cuerpos nos han mostrado su potencial de reparación o regeneración de diversas partes del mismo. Estas células, desde luego que son mayor en número y en actividad fisiológica, conforme el organismo es más joven, pero a pesar de ello existen aún en organismos seniles. El estilo de vida y el ambiente también tienen una participación decidida sobre su número y funcionalidad. Así, en las distintas edades del organismo, están presentes y dispuestas para reparar o regenerar partes de este, dependiendo de la especie y situación particular. Es bien conocido el caso del ajolote, donde es capaz de reparar partes de su cuerpo que otros organismos no estamos capacitados para hacerlo, como una extremidad completa, razón por la cual han y siguen siendo, motivo de gran investigación en varios laboratorios del mundo. Por otro lado, las Ciencias, están dedicadas a su desarrollo particular, pero a pesar de ello, los conocimientos alcanzados por una pueden ser de gran trascendencia para la otra. Así, el desarrollo de la Física en distintos momentos y campos específicos ha permitido dar a conocer a otras Ciencias eventos que han sido adoptados. Por ejemplo, el término estrés, fue inicialmente utilizado por la Física para denotar un evento de transformación de un material por la presión que ejercían fuerzas de su entorno, hasta lograr deformarlo. Cuando Hans Selye, investigador austriaco presentó resultados de investigación en ratas bajo tratamiento que presentaban una deformidad de las glándulas suprarrenales, en un foro biológico especializado, ante lo complejo del evento estudiado, decidió utilizar ese término de la Física: stress, para denotar que la acción sobre las glándulas suprarrenales había sido debido a presiones del sistema, sin precisar, ni vislumbrar lo trascendente de lo que estaba encontrando. El término stress fue rápidamente aplicado a distintos procesos biológicos pero también fue utilizado por la Psicología para describir lo que sucede en situaciones complejas, donde la mente resulta presionada y, en consecuencia, hay efectos sobre la conducta de los individuos, de modo tal, que hoy día en la Biología y en la Psicología, es recurrente el uso de la palabra stress, e incluso en este último campo del conocimiento, es reconocida como un trastorno de gran trascendencia en la población mundial actual. Otro término que inició su aplicación en la Física es el de resiliencia, para indicar que un material que ha sido transformado por la presión de fuerzas externas y cercanas a él tiene la capacidad de recuperar su forma original, dependiendo de los elementos que lo conforman y las interacciones con el entorno. Así, este término también es aplicado posteriormente en la Biología y en la Psicología, para indicar la capacidad de un organismo

que, siendo sometido a presiones del entorno, tiene la capacidad de contender con ella y recuperarse. Hoy día el estudio de la resiliencia en el campo de la Psicología es de sumo interés puesto que el ambiente en el que ocurre el desarrollo de gran parte de la población, en especial la más vulnerable, pareciera ser no necesariamente el más favorable, por lo que sorprenden los casos de personas que, habiéndolo sufrido, presentan luego una condición de resiliencia o restablecimiento, así como el que otros organismos no logren hacerlo y sufran permanentemente de esas presiones ambientales.

Finalmente, otro de los términos de la Física que ha sido tomado por otros campos del conocimiento disciplinar es la Reactancia. Este término tiene el significado de un material que recibe una señal o presión determinada, la asimila y en consecuencia regresa al ambiente una diferente, una modificada. Así el ejemplo más adecuado es el de una balastra, que, en el pasado cercano, era necesaria para las lámparas fluorescentes. Dicho elemento recibía la energía del suministro, y solo transmitía una pequeña parte de éste al tubo o lámpara fluorescente, que era más que suficiente para el buen funcionamiento del sistema. De este modo, la Reactancia en la Psicología y Ciencias de la Conducta, acota a la llegada de un estímulo del exterior que no es devuelto en el mismo sentido o magnitud. Parte del tema de Reactancia en la Psicología, ha llevado a entender el por qué a algunas personas les cuesta particularmente acatar órdenes, recomendaciones u obedecer. En el trasfondo de ello, está la libre decisión y criterio del individuo, que de manera reactante considera que las cosas son mejores de otra manera, que de la forma recomendada o solicitada.

## MÉTODO

Se tomó una biopsia de piel (3mm<sup>2</sup>) del área de la pechuga de un Colibrí (*Trochilidae spp*), de un ejemplar con muerte accidental por impacto en ventana y congelado durante 5 meses. Se lavó con agua destilada, jabón quirúrgico. Permaneció en inmersión en cloro al 2% durante 5 minutos, se lavó de nuevo con agua destilada y finalmente se transportó al laboratorio en un vial con solución salina. Al finalizar el lavado, la muestra se mantuvo en refrigeración hasta el día siguiente. Las biopsias fueron transportadas al laboratorio, donde en campana de flujo laminar, se limpió el tejido de restos de pluma e impurezas utilizando unas pinzas de relojero, tijeras de córnea y bisturí previamente desinfectados. Se lavó tres veces con 2 ml de PBS. Al finalizar los lavados, el tejido se dividió en dos fragmentos para realizar dos métodos de deriva: el mecánico y el enzimático. En el método mecánico se colocó en caja Petri de 3.5 cm de diámetro y se realizaron cortes del tejido con ayuda de un bisturí, distribuyendo los fragmentos en la caja Petri, donde además se colocaron 3 ml de medio de cultivo (DMEM, In vitro S.A.), 30 µl EGF (Epidermal Growing Factor, Sigma) y 50 µl de antibiótico (Antibac-Antifun, In vitro S.A.). Al finalizar, permanecieron en incubación a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, por 7 días. En el método enzimático se colocó la parte de biopsia en tubo eppendorf, se le agregó colagenasa (I y II, 16 mg) a cada tubo y 1 ml de PBS. Después el tubo eppendorf se colocó dentro de un tubo de ensayo con agua y se dejó en el oscilador dentro de la incubadora por 60 minutos a 37°C. Posteriormente se sacaron los tubos y se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos. Al terminar, cada tubo fue llevado a la campana de extracción para poder quitar el sobrenadante y rescatar el botón, que fue sembrado en caja Petri de 3.5cm de diámetro con el medio DMEM y suplementos ya descritos.

## RESULTADOS

El cultivo primario de células de piel de colibrí, cuyo cadáver permaneció durante cinco meses en congelación sin algún agente criopreservante, fue exitoso con el método enzimático (Figura 2), lográndose llegar al estado de confluencia al 50%. Con lo que se demuestra que las células madre pueden tener una vida latente prolongada y en relación con la reactancia, es decir, el sentido contradictorio con lo que marca la norma o la lógica, esto es, que un cadáver tenga el total de sus células muertas, luego de un tiempo prudente, para que esto ocurra. En el tiempo de desarrollo del cultivo, las células de colibrí (fibroblastos) tuvieron necesidad de consumir nutrientes (Medio DMEM con 10% de SFB), hasta cuatro veces más seguido que células de mamífero en condiciones similares y sin presentar contaminación microbiana durante el cultivo. Importante es mencionar que, en ocasiones, el mal manejo de la inteligencia emocional y espiritual puede acabar en agotamiento, razón. Por lo cual, la reactancia puede ser un elemento importante (Reza et al., 2022) para evitar dicho agotamiento o incluso alguna otra situación que se considere amenazante. Sin embargo, la reactancia en otro ámbito se sabe que es contraria a los posibles efectos benéficos, por ejemplo: la



adherencia a tratamientos médicos del sujeto (Abreu y Alfonso, 2019). Por ello es por lo que su análisis es de importancia para comprender algunos procesos de toma de decisiones y la posible progresión del sujeto. En el presente trabajo algunas células epiteliales (fibroblastos o células madre) demostraron que pueden permanecer vivas durante un tiempo prolongado *post mortem* y responder eficazmente durante las condiciones de cultivo *in vitro*. Con apoyo de biotecnologías reproductivas es posible usar dichas células madre y aprovechar su característica de totipotencialidad, sin embargo, en situación natural, faltaría dilucidar ¿cuál es la razón de dicha vida latente? ¿Será acaso, el potencial de la reactancia de las células madre ante la eminencia de la muerte?



Figura 2. Fibroblastos de colibrí a 6 días de cultivo (10X, cortesía de Biol. Roberto Carlos Quijano).

## CONCLUSIÓN

Las células madre nos acompañan siempre durante nuestra vida y algunas de ellas en particular, pueden tener la condición de reactancia, incluso después de la muerte del organismo depositario, y con ello estar dispuestas a seguir con la vida, como queriendo indicar que la muerte no es total en el organismo y que algunas de sus células tienen información necesaria para que a pesar de ese evento poder continuar con la vida.

## BIBLIOGRAFÍA

1. L. García Abreu, Leticia; Alfonso Mohamed, Nayara (2019) Relación entre la reactancia psicológica y la adherencia al tratamiento contraceptivo hormonal oral. Tesis de Grado Universidad de La Laguna, España 20pp
2. R. Misuraca y F. Ceresia (2020) Psychological Reactance as an explanation of Italians' resistance to observe the safety measures during COVID-19 outbreak. Revista de Ciencias Sociales (RCS). FCES – LUZ Vol. XXVI, No. 4, 2020, pp. 15-22
3. P. Reza, Y. Nouroddin, A. Asieh C. y M. S. Tabatabayeeyand (2022) Interacción de reactancia psicológica, agotamiento e inteligencia espiritual: Un caso de profesorado iraní de inglés como lengua extranjera. Revista de Psicodidáctica 27: 76–85

# EDITORAS

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



CONAHCYT  
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES  
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



CENTRO DE INVESTIGACIONES  
EN ÓPTICA, A.C.



9 786078 821280

ISBN TOMO I  
BIOLOGÍA Y QUÍMICA



9 786078 821273

ISBN OBRA COMPLETA  
INVESTIGACIONES Y DESARROLLOS  
TECNOLÓGICOS EN MÉXICO