

Revista de la Sociedad Mexicana de
Biotechnología
y Bioingeniería A.C.

Año 2023 Volumen 27, Número 3
ISSN 0188-4786



Sociedad Mexicana de
Biotechnología y Bioingeniería



Sociedad Mexicana de
Biotecnología y Bioingeniería

**XX CONGRESO NACIONAL
DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA
IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO**

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



NÚMERO ESPECIAL 40° ANIVERSARIO



Sociedad Mexicana de
Biotecnología y Bioingeniería



Ixtapa Zihuatanejo, México

CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

10 - 15 DE
SEPTIEMBRE 2023

ISSN 0188-4786, revista cuatrimestral publicada por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. incluida en PERIÓDICA, índice de Revista Latinoamericanas en Ciencias (CICH-UNAM), en LATINDEX (Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal), los artículos se encuentran en Google Académico. Certificado de Licitud de Título en trámite y Certificado de Licitud de Contenido en trámite. Reserva de derechos de Título 04-1999-082516265000-101. Los conceptos que en ella aparecen son responsabilidad exclusiva de los autores. Se prohíbe la reproducción total o parcial de su contenido sin previa autorización por escrito del Comité editorial. Toda correspondencia deberá enviarse a Km. 23.5 Carretera Federal México-Cuernavaca, Av. Cipreses s/n, Col. San Andrés Totoltepec, C.P. 14400, Alcaldía Tlalpan, Ciudad de México. o a la siguiente dirección electrónica revista_biotecnologia@smbb.mx.



Comité Organizador

MESA DIRECTIVA

2022 – 2024

Dra. Romina Rodríguez Sanoja

Presidenta

Dr. Luis Bernardo Flores Cotera

Vicepresidente

Dra. Beatriz Ruiz Villafán

Secretaria

Dra. María Dolores Reyes Duarte

Tesorero

Dr. Manuel Alejandro Lizardi Jiménez

Subsecretario

M. en C. Karina Adames Beas

Vocal Profesional

Biol. Teresa Elizabeth Mtz Oropeza

Vocal Estudiante

EDITORA

Dra. María Soledad Córdova Aguilar

UNAM

Co-editor

Dr. Jorge Gracida

UAQ

COMITÉ EDITORIAL

Dra. Aurora Antonio Pérez

Dra. María Eugenia de la Torre Hernández

Dr. Adelfo Escalante Lozada

Dra. Amelia Farrés González Saravia

M. en C. Vanessa Hernández Rodríguez

Dr. Manuel Alejandro Lizardi Jiménez

Dra. Isadora Martínez Arellano

Dra. Silvia Andrea Moreno Mendieta

Dra. Claudia Rodríguez-Almazán

Dra. Beatriz Ruiz Villafán

Dra. Andrea Sabido Ramos

Dra. Elda Patricia Segura Cenicerros

Dra. Virginia Villa Cruz

Formación y edición

Pas. QA Mariana Espinoza Tapia

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



Contenido

BioTecnología, Año 2023, Vol. 27 No. 3

Instrucciones para los autores 7

Editorial

Dra. Romina Rodríguez Sanoja 13

Conjugación de Péptido C9P-FICT específico para HER2 como potencial nanoterapéutico en cáncer
Andrea Alfonseca, Sandeep Panikar, Elder de la Rosa, Pavel Lugo, Tanya Camacho 14

Molecular cloning, expression, and purification of recombinant human PPAR γ in *Escherichia coli*
Dalila Balderas-Rentería, Sonia Montero-Molina, Jorge Solís-Estrada, Verónica Almaguer-Cantú, Katiushka Arévalo-Niño, Xristo Zárate-Kalfopulos, Isaias Balderas-Rentería 28

Evaluación de la actividad antimicrobiana del mucílago extraído de sábila *Aloe vera* L. para su aplicación en productos hortofrutícolas
Andrés Alejandro Damián-Reyna, Margarita Martínez-García, Ana Laura Reyes-Robles, Héctor Guadalupe Moreno-Guerrero, Juan Carlos González-Hernández, Ma. Del Carmen Chávez-Parga, Julián López-Tinoco 40

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

BioTecnología, Año 2023, Vol. 27 No. 3



- Nanopartículas de C-Ficocianina: autoensamblado, actividad antioxidante y estudios de estabilidad**
Moises Galindo-Pérez, Marcia Morales-Ibarría, Dolores Reyes-Duarte,
Andrés Hernández-Arana, José Campos-Terán, Izlia Arroyo-Maya **51**
- Cultivo *in vitro* de *Raphinus raphanistrum*, una planta que puede ser usada en fitorremediación para cadmio**
Claudia Hernández-Salas, Maricela Olarte-Saucedo, Julieta Moreno-Longoria,
Esteban Meza-Lamas, Noria Elia Flores-Treviño **67**
- Actividad antimicrobiana del extracto sólido de *Origanum sp.* y su posible uso como conservador en un producto cárnico**
Luis Enrique Jiménez Camacho, Ángel Alfredo Núñez Vázquez,
Raquel Ortega Muñoz, Jesús Fernando Montiel Aguirre **79**
- Caracterización de la actividad antioxidante y antibacteriana de la tuba guerrerense de *cocos nucifera L.***
Cuahtémoc Pineda, Itzel Rodríguez, Daysi Návez, Aydee Román,
Brian Cárdenas, Fernando Astudillo, Gerardo Huerta **97**
- Implementation of subsurface flow artificial wetlands for the treatment of domestic wastewater in the senu almendros indigenous reserve, municipality of San Juan de Uraba**
Diana Rodríguez Zúñiga, María Elena González Duque,
Kelly Leani Quintero Garcia, Faber Esneider Villa **113**
- Caracterización fenólica, actividad antioxidante y antibacteriana de *Pleurotus albidus***
Oscar Antonio Sánchez-Aguirre, Fabiola Citlaly Elvira-San Juan, Omar Germán
Malagón-Avilés, Régulo Llarena-Flores y Marina Guevara-Valencia **127**

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

BioTecnología, Año 2023, Vol. 27 No. 3



Evaluación del potencial bifidogénico de fructanos de agave y naringina/ β -ciclodextrina sobre *Bifidobacterium longum* BB536
Nathalie Schlienger, Hugo Espinosa, Marisela González, José Daniel Padilla **137**

Evaluación del tratamiento de agua de la acuicultura en un biorreactor air-lift
Adriana Tronco, Joanna Ramírez, Martín Cruz, Jorge Gracida, Rodrigo Melgarejo, Dulce María Palmerín **149**

El papel de la biotecnología en la soberanía alimentaria: diálogo de saberes en comunidades de la Península de Yucatán
Sergio Valdivia-Rivera, Neith Pacheco, Miguel Oliva-Ruiz, Harumi Hernández-Guzmán, Manuel Alejandro Lizardi-Jiménez **162**

Apoptosis inducida por hipertermia magnética en células de cáncer de colon con nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con tetrahidroxiquinona
Michelle Valdovinos, Zaira López, M. Eduardo Cano, Peter Knauth **172**



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Instrucciones para los autores

La revista puede recibir trabajos de investigación original, así como de revisión en los campos de la Biotecnología y Bioingeniería. Todos los manuscritos serán sujetos a revisión por al menos dos miembros del Comité Editorial y deberán contar con una recomendación de aceptación para ser publicados.

Los idiomas en los que se puede publicar en la revista son el español y el inglés.

Los trabajos se escribirán en hoja tamaño carta (21.6 cm x 27.6 cm). Los márgenes aplicados a todo el manuscrito serán de 2.5 cm para los extremos superior e inferior, así como 3 cm de cada lado. Las páginas deberán estar numeradas en la parte inferior y central de cada hoja.

Para evitar errores innecesarios se recomienda usar el corrector de gramática y ortografía del procesador de palabras. Se recomienda que los trabajos completos tengan un máximo de 25 páginas, escritas con un interlineado de 1.5 renglones, incluyendo las tablas y figuras. Las publicaciones en la revista Biotecnología están exentas de costo para los autores.

Cuando corresponda, se recomienda el uso de abreviaturas para referirse a unidades de tiempo (h, min, s), de volumen (l, ml, μ l), de peso (kg, g, mg, μ g), ADN, ARN y otras comúnmente aceptadas en la literatura científica.

Los trabajos de investigación original pueden tocar cualquiera de los diversos campos que cultivan la biotecnología y la bioingeniería, desde aspectos

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

fundamentales hasta sus aplicaciones, incluyendo: Enzimas y Biocatálisis, Microbiología, Biotecnología Agrícola y Vegetal, Biotecnología Marina, Alimentos y bebidas, Biotecnología farmacéutica, Biotecnología Ambiental, Bioingeniería y fermentaciones, Bioenergía y biocombustibles, Biología de sistemas y bioinformática, Biología sintética, Nanobiotecnología y biomateriales, Ingeniería metabólica, Omicas, Bioseguridad y Bioética.

Tanto los trabajos de investigación original como las revisiones deberán apearse al siguiente formato:

1. El título del manuscrito se escribirá en negritas con letra Arial o equivalente tamaño 14. El título deberá estar centrado y ser conciso e informativo. Evite el uso de abreviaciones y fórmulas.
2. El nombre de los autores ocupará los siguientes renglones escribiendo el nombre y primer apellido de cada participante. Se usará letra Arial o equivalente tamaño 12. Los nombres de los participantes deberán estar centrados, señalando con un asterisco el autor responsable de la publicación. En el siguiente renglón con letra itálica Arial del mismo tamaño, se incluirá la dirección postal de la institución de adscripción de los autores, así como la dirección de correo del autor corresponsal. Si el responsable fuera un estudiante, deberá incluir una carta del tutor o director del trabajo autorizándolo.
3. Se deberá añadir un Resumen de no más de 250 palabras en español y el correspondiente *Abstract* en inglés.
4. Se incluirán entre 3 a 6 Palabras clave: que permitan clasificar el artículo en una base de datos. Estas palabras deberán de incluirse en español y en inglés (*Key words*).

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

5. Si el texto inicia con el nombre de algún subtema, éste se pondrá como primera línea en cursivas con letra Arial o equivalente tamaño 10. Después en el siguiente renglón se iniciará el texto descriptivo usando letra Arial o equivalente tamaño 10. El texto deberá ser escrito con un interlineado de 1.5 renglones. Se deberá dejar un espacio de un renglón al inicio de una sección o subtema nuevo. Los géneros y especies deberán escribirse en letras itálicas.
6. Las figuras deberán numerarse con arábigos, correlativamente en orden de aparición en el texto. No se integrarán al texto, sino al final del manuscrito. No obstante, para facilitar el trabajo de edición, se recomienda indicar la ubicación de estas en el momento en que son mencionadas por primera vez en el texto. Las figuras deben incluir un breve título explicativo en la parte inferior de la misma. Si es necesario incluir fotos, éstas se deberán designar como figuras.
7. Las tablas también se numerarán con arábigos ubicados en la parte superior de las mismas e incluirán un breve título explicativo. Las notas en las tablas deberán ser indicadas con letras minúsculas en superíndice. La ubicación de las tablas será señalada en el texto, pero se anexarán en hojas separadas y al igual que las figuras, al final del manuscrito.
8. La información dada como referencias bibliográficas deberá permitir a los lectores llegar con facilidad a la fuente de información original. En el texto del trabajo, las referencias se citan por autor y año entre paréntesis redondos. Por ejemplo: “Martínez & García (1999) han demostrado que...”, o bien, “Datos recientes (Martínez & García, 1999) han demostrado que...”. Si la cita posee varios autores se escribirá como sigue: “Gutiérrez et al. (2003), han demostrado...” O bien: “Datos recientes (Gutiérrez et al., 2003) han demostrado...”

Si la cita es una página de Internet, la dirección URL deberá escribirse completa y entre paréntesis directamente en el texto.

9. La lista de Referencias se deberá escribir con el mismo tipo de letra del texto principal (Arial tamaño 10) y con sangría francesa de acuerdo con el siguiente formato:

Artículos:

Bayegan AH, Clote P (2020) RNAmountAlign: Efficient software for local, global, semiglobal pairwise and multiple RNA sequence/structure alignment. PLoS ONE 15(1): e0227177. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227177>.

Libros:

Ullrich M (2009) Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends. Horizon Scientific Press, Norwich.

Capítulos de libros:

Sánchez S & Demain AL (2009) Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. In: Encyclopedia of Industrial Biotechnology. Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (EIB). Flickinger MC (ed). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ. pp. 396-458.

Patentes:

Fenical WH, Jensen PR & Kwon HC (2009) Polyol macrolide antitumor antibiotics from the marine actinomycete strain CNQ140. US patent 7,521,414.

Congresos y reuniones:

Reyes N, Domínguez RM, Islas I & Solis S (2007) Inducción diferencial por pH y temperatura del complejo pectinolítico producido por células inmovilizadas de



Aspergillus HL. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia Mich. México. OIII-12.

Sitios en internet:

CAZY, Carbohydrate-Active Enzymes Database. (<http://www.cazy.org/>) Tesis de pre y posgrado:

Cárdenas C (2009) Evaluación del uso biotecnológico de la semilla de *Ditaxis heterantha* para la producción de safranal. Tesis Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. pp. 1-78.

Cada autor es responsable de la precisión de las citas que utiliza.

Una vez que ha sido revisado y aceptado su trabajo, los autores deberán enviar una carta de cesión de los Derechos de Autor, de manera que la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería pueda hacer uso del artículo aceptado, o parte de él, con fines de divulgación y difusión de la actividad científica y tecnológica. En ningún caso, dichos derechos afectan la propiedad intelectual que es propia de los autores, para usar la totalidad o parte de ese artículo con fines no lucrativos.

Los trabajos se someten *en línea* en la página electrónica de la Sociedad Mexicana de Biotecnología, en la dirección <https://smbb.mx/publicaciones/publicacion-de-articulo/>.

Al momento de recibirlo, se enviará un acuse de recibo al autor corresponsable. La dirección para mantener comunicación con el editor es: revista_biotecnologia@smbb.mx y mcordovaaguilar11@gmail.com.

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Una vez aceptados, los trabajos son editados y enviados a los autores para su corrección. En esta condición no se permitirán cambios sustanciales en el contenido de estos sin la aprobación del editor en jefe. Una vez aprobadas las modificaciones, el trabajo se publicará **en línea** y podrá ser consultado en la página de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería AC <http://www.smbb.com.mx/>.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



Editorial

La Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería (SMBB) fue fundada en 1982. Desde entonces se ha consolidado como la principal agrupación científica y profesional en el área de la biotecnología en México. Cada dos años realiza el Congreso Nacional, un excelente foro que reúne a expertos y profesionales de diversas áreas temáticas y fomenta la creación de redes y la colaboración entre colegas.

En esta ocasión, del 11 al 15 de septiembre de 2023 en Ixtapa Zihuatanejo, Guerrero se celebra la vigésima edición del Congreso Nacional dentro del marco del 40 aniversario de la SMBB. Por ello se edita un número especial de la **Revista BioTecnología** con 13 manuscritos de trabajos que se presentan en el Congreso. La publicación de este número especial es una excelente forma de compartir y difundir los avances biotecnológicos que se realizan en el país.

Esperamos que este congreso sea un éxito y que siga contribuyendo al avance de la biotecnología y la bioingeniería en México. ¡Felicidades a la SMBB por su continua labor en este campo del conocimiento!

Dra. María Soledad Córdova Aguilar
Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología-UNAM
marisol.cordova@icat.unam.mx

CONJUGACIÓN DE PÉPTIDO C9P-FICT ESPECÍFICO PARA HER2 COMO POTENCIAL NANOTERAPÉUTICO EN CÁNCER

Andrea Alfonseca¹, Sandeep Panikar¹, Elder de la Rosa², Pavel Lugo³, Tanya Camacho^{3*}

¹Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica, CIATEJ, Guadalajara, 44270. ²Universidad La Salle Bajío, León, 37150.

³Investigador por México, Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica, CIATEJ, Guadalajara, 44270. tcamacho@ciatej.mx

Resumen

El receptor HER2 es una proteína transmembranal, asociada al cáncer de mama que se sobreexpresa en alrededor del 30% de los casos. La heterogénea distribución espacial del receptor HER2 en las células tumorales puede representar un problema de penetración que afecta la eficacia terapéutica, sin embargo, los conjugados de anticuerpo con fármaco (ADC) o los conjugados de péptidos con fármaco (PDC) pueden superar este problema siendo una opción de entrega inteligente de fármaco a nivel nanométrico (~100 nm). En este trabajo, se modeló *in silico* el péptido C9P, que fue aislado previamente por nuestro equipo de investigación. Posteriormente, se realizó una conjugación activa por EDC (N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) con isocianato de fluoresceína (FITC) generando la versión llamada C9P-FITC. Empleando microscopía confocal en células que expresan el receptor HER2, se demostró que el péptido C9P-FITC, tiene especificidad, penetración celular. Para ello, se seleccionaron las líneas celulares U87 y SKBR3 que son positivas al receptor HER2. Como control negativo se emplearon las células HBEC que son negativas al receptor HER2. Estas células fueron sembradas por duplicado en cámaras de cultivo celular para microscopía y se pusieron en contacto con el péptido C9P-FITC por 24 horas. En las células U87 y SKBR3 que son positivas a HER2 se encontró fluorescencia asociada a la penetración del péptido C9P-FITC. Sin embargo, en las células U87 el receptor HER2 no se encuentra sobreexpresado, por lo tanto, la fluorescencia asociada a la detección de C9P-FITC fue menor. En cambio, en las células HBEC no hubo detección debido a la ausencia del receptor HER2. El péptido C9P-FITC demostró alta especificidad a HER2, tanto en células de baja expresión o sobreexpresión del receptor. Adicionalmente, se empleó el péptido C9P para conjugarlos en la superficie de puntos cuánticos de carbono (CD) que también se conjugaron con el fármaco cisplatino (CPPD), para generar un nanoterapéutico. Finalmente, se analizó la entrega inteligente de cisplatino por el nanosistema empleando células SKBR3. Nuestros resultados sientan las bases que sustentan la aplicación de C9P como acarreador en la entrega inteligente de fármacos.

Palabras claves: cáncer de mama, péptidos, receptor HER2, nanomedicina

Abstract

HER2 is a transmembrane protein receptor associated with breast cancer, where it is overexpressed in about 30% of cases. The spatial heterogeneous distribution of the HER2 receptor in tumor cells may represent a problem affecting therapeutic efficacy, nevertheless antibody-drug conjugates (ADC) or peptide-drug conjugates (PDC) may overcome this problem. The C9P peptide was previously isolated by our research team. In this manuscript



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



we describe the in silico analysis of C9P. Subsequently, we describe an active conjugation with EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) and fluorescein isothiocyanate (FITC) resulting in C9P-FITC conjugated. Using confocal microscopy and the C9P-FITC peptide the specificity, cell penetration, in HER2-positive cells were demonstrated. For this, two cell lines U87 and SKBR3, which are HER2+ were used. The HBEC cells, which are HER2- were selected as negative control. These cells were seeded in a cell culture chambers for microscopy in duplicate and placed in contact with the C9P-FITC peptide for 24 hours. Both U87 and SKBR3 cells lines were positive for the presence of HER2 and were recognized by the C9P-FITC peptide. However, in U87 cells, the HER2 receptor is not overexpressed; therefore, the fluorescence associated with the detection of C9P-FITC was lower. In contrast, in the HBEC cells used as negative control, there was no detection due to the absence of HER2. The C9P-FITC peptide demonstrated high specificity to HER2 in cells with low expression and those that overexpress the receptor.

Additionally, C9P was used to conjugated in cisplatin-conjugated quantum dots (CDs), generating a nanosystem capable for specific payload delivery. Our nanotherapeutic has cytotoxicity in SKBR3 cells. Our preliminary results lay the basis for applying C9P as a drug carrier.

Keywords: breast cancer, peptide, HER2 receptor, nanomedicine

Introducción

El receptor HER2 es una proteína transmembranal, perteneciente a la familia ErbB o Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR). Estructuralmente, se caracteriza por una región extracelular N-terminal de unión a ligando, un único segmento transmembrana de hélice alfa y una región intracelular de tirosina quinasa. La sobreexpresión de HER2 está asociada con un amplio número de cánceres, incluidos de pulmón, ovario, glioblastoma y mama (Honarvar et al., 2018). El cáncer de mama es el segundo más común en todo el mundo y es más frecuente entre las mujeres. En general, esto lo convierte en la cuarta causa de muerte por cáncer a nivel mundial y en la principal causa de muerte en mujeres (Bray et al., 2018). En

México, el cáncer de mama representa la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres (Ramos-Herrera et al., 2020). Cuando se analizó por amplificación del ADN se ha demostrado que el receptor HER2 está sobreexpresado en aproximadamente el 30% de los cánceres primarios de mama (Honarvar et al., 2018). A pesar del enorme desarrollo tecnológico en diversas disciplinas científicas, la tasa de supervivencia de las pacientes que sufren esta enfermedad es baja, debido principalmente a un diagnóstico tardío y a un pronóstico poco esperanzador.

El receptor HER2 forma heterodímeros con otros receptores de la familia ErbB. Se ha descrito que los heterodímeros que contienen receptores HER2 tienen mayor potencial mitógeno (Honarvar et al., 2018). El



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

cáncer subtipo HER2+ enriquecido se caracteriza por la ausencia de receptores hormonales de estrógeno, progesterona y la sobreexpresión del receptor HER2 (HER2+, E-, PR-, Ki-67>30%) (Altunay et al., 2021).

Se ha propuesto que la expresión del receptor HER2 en la membrana celular podría ser heterogénea, mostrando diferentes patrones de distribución espacial que potencialmente afectan el tratamiento terapéutico, así como la respuesta y evaluación del estado de pacientes con cáncer de mama HER2+. La sobreexpresión de HER2 se asocia con un mayor crecimiento tumoral, una peor respuesta a la quimioterapia tradicional y una disminución de la supervivencia global; por lo tanto, las investigaciones se han centrado en el desarrollo de terapias dirigidas basadas en HER2 (Pallerla et al., 2021).

En general, los anticuerpos monoclonales (mAbs) contra el cáncer han demostrado resultados clínicos ineficientes, lo cual puede estar relacionado a la escasa penetración al centro de los tumores. Esta deficiencia puede estar relacionada con el tamaño de los anticuerpos monoclonales (por ejemplo, 150 kDa para una IgG) (Rhodes and Green, 2018). Una alternativa prometedora es la disminución del tamaño de los anticuerpos, sin perder la capacidad de reconocimiento al antígeno.

Como ejemplos de reducción del tamaño de los anticuerpos, se ha generado diversos formatos por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos sencillos y doble (Fab y F(ab)₂), respectivamente, fragmentos variables de cadena sencilla (scFv). Recientemente, se ha impulsado el desarrollo de los dominios de solo

cadena pesada (sdAbs), por ejemplo, los VHH (dominio variable o nanobody) aislados de camellos, llamas y alpacas y los dominios vNAR (dominio variable de nuevo receptor de antígeno) aislados de tiburones, rayas y quimeras. En este sentido, los péptidos de 6-20 aminoácidos, caracterizados por su bajo peso molecular (660-2,200 Da) y su capacidad de reconocimiento (similar al reconocimiento de los anticuerpos) se pueden emplear para la generación de conjugados péptido fármaco (PDC). Los PDC pueden ofrecer mayores ventajas sobre los anticuerpos monoclonales conjugados, debido a su rápido aclaramiento sistémico, mayor estabilidad y aumento de la tasa de penetración al tumor (Giugliano et al., 2023).

Los PDC podrían representar la próxima generación de dominios conjugados a fármacos, específicamente se han empleado para el direccionamiento activo dirigido a HER2 (Honarvar et al., 2018), mostrando una capacidad superior para optimizar la administración terapéutica en el sitio, penetración tisular o tumoral y eliminación sanguínea mejorada (Panikar et al., 2019).

Entre los fármacos que pueden conjugarse con péptidos se encuentra el cisplatino (CDDP), un agente quimioterapéutico que actúa como alquilante, modificando el ADN y las proteínas celulares para detener la división celular y provocar la muerte de las células tumorales. El cisplatino se utiliza para tratar diversos tipos de cáncer, como el cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de mama y otros. El mecanismo de acción del cisplatino se basa en su



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

capacidad para interferir con la división celular, dado que en su molécula contiene un átomo de platino y dos grupos de cloruro; cuando ingresa en una célula, los grupos de cloruro se disocian en presencia de agua, lo que facilita su inserción en el ADN. La formación de enlaces entre el cisplatino y el ADN produce modificaciones en la estructura de la cadena de ADN, lo que impide su replicación y transcripción (Ghosh, 2019). Estas alteraciones causan la muerte de las células tumorales, lo que se traduce en una reducción del tamaño del tumor. Además, el cisplatino también puede causar daño oxidativo al interactuar con los radicales libres, lo que conduce a la apoptosis (muerte celular programada) de las células tumorales (Tchounwou et al., 2021).

Sin embargo, las células cancerosas han adquirido resistencia al cisplatino después de repetidas administraciones, resultando en el incremento en la recurrencia y fallas en la terapia (Feng et al., 2018). Se ha demostrado que la farmacoresistencia se debe principalmente a la disminución de la internalización celular del cisplatino, que se relaciona con la baja expresión de la proteína transportadora de cobre (Ctr1), un transportador de entrada de cisplatino, dentro de la membrana plasmática de las células cancerosas resistentes al cisplatino (Feng et al., 2018). Se ha demostrado que algunos nanomateriales son prometedores portadores de fármacos para el tratamiento eficaz del cáncer (Ai et al., 2016), debido a que incrementan la internalización del fármaco a través de la endocitosis.

Por lo tanto, es relevante la construcción de nuevos nanosistemas que funcionen como acarreadores estables. Estos nanosistemas terapéuticos (1-100 nm) pueden conformarse por nanopartículas por ejemplo, puntos cuánticos de carbono (CD), nanopartículas de oro (AuNPs), de sílice mesoporoso (MNP) entre otras, que son conjugadas con algún agente terapéutico (por ejemplo, cisplatino) y una proteína específica (anticuerpo, fragmento de anticuerpo, sdAbs, péptido entre otros) a un biomarcador tumoral (por ejemplo, HER2) para el direccionamiento activo que permita realizar la liberación controlada del fármaco específicamente en células cancerígenas.

Los nanoacarreadores de fármacos son biocompatibles, fotoestables, de fácil funcionalización en su superficie y tienen emisión de color dependiente de la longitud de onda de excitación que se emplee (Feng et al., 2017). También han sido útiles en la administración de genes terapéuticos (L. Wang et al., 2014), fotosensibilizadores (Choi et al., 2014) y para imagenología del cáncer (M. Wang et al., 2017) empleando fluorescencia.

Previamente, el péptido C9P aislado por nuestro equipo de investigación reconoce al receptor HER2 y demostró especificidad a células SKBR3 (HER2+) y una mejor entrega inteligente de fármaco (Panikar et al., 2019). En el presente trabajo, se empleó el péptido C9P conjugado con fluoresceína (FITC) para demostrar el reconocimiento específico de células HER2+. Además, el péptido C9P fue conjugado con puntos cuánticos (CD) y cisplatino para generar un



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

nanosistema empleado para demostrar la entrega específica del fármaco en células HER2+, la penetración celular y la distribución heterogénea del receptor HER2 en células SKBR3. Esta estrategia de coadministración en un nanoterapéutico proporciona un prometedor sistema basado en CD para combatir la resistencia del cisplatino en el tratamiento del cáncer.

Metodología.

1.1 Modelado *in silico* del péptido C9P

Se analizó la estructura tridimensional del péptido C9P empleando el software PEP-FOLD3. A partir de PEP-FOLD3 se generaron varias estructuras. Se eligió el modelo con la mejor calidad basado en el valor de MAX Q, que es un criterio referido a la calidad del modelo seleccionado además, se consideró la precisión de la predicción y la conformidad con las restricciones de energía. La TM o Template Modeling score (puntuación de modelado de plantilla) se utilizó para evaluar la similitud estructural entre la estructura predicha y alguna estructura conocida (una plantilla). Una TM de 1 indicara que la estructura predicha es idéntica a la plantilla, lo que se puede considerar como una predicción acercada a la plantilla. La visualización de este modelo se realizó utilizando el software PyMOL (v2.0), que permite una representación gráfica tridimensional de la estructura. Tanto PEP-FOLD3 PyMOL son de libre acceso. Se seleccionó el modelo más estable con MAX Q y TM de 1.

1.2 Conjugación del péptido C9P con FITC

Se conjugaron 500 μg de C9P con FITC (1mg/mL) por conjugación activa mediada por EDC. Para ello se disolvió 1 mg de FITC en 1 mL de DMSO en un tubo y se protegió de la luz con papel de aluminio, después se almacenó en hielo. También se prepararon el tampón de conjugación MES (0.1 M, pH 4.5-5) y la solución de conjugación EDC (1 mg/1 mL). Posteriormente, a 115 μL (500 μg) de péptido, se le agregaron 500 μL de tampón de conjugación, 100 μL de solución de EDC y 25 μg de solución FITC. Se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se leyó a 493 nm y se verificó la emisión de FITC a 520 nm, este procedimiento se realizó antes y después de la conjugación con péptido C9P. Considerando que el péptido C9P tiene un posible sitio de unión con FITC, se estimó que la conjugación fue de en relación 1:1 y se empleó la concentración de péptido para los ensayos en cultivo celular.

1.3 Conjugación del péptido C9P con CD y cisplatino

La conjugación del péptido con CD se realizó por conjugación activa mediada por EDC (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida hidrocloreuro) -NHS (N-hidroxisucinimida). Los CD fueron sintetizados por el grupo de trabajo del Dr. Elder de la Rosa (De la Rosa et al., 2020). Los CD, EDC, NHS, cisplatino se prepararon con PBS 1X a una concentración inicial de 1 mg/mL mientras que el péptido C9P se preparó a una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En un tubo cónico de 10 mL para centrifuga se agregó 1 mL de CD y 1 mL de EDC. La solución se incubó a 300 rpm a

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego, se agregó 1 mL de NHS y se incubó bajo las mismas condiciones, posteriormente se añadió 1 mL de C9P y se incubó nuevamente durante 2 h. El conjugado C9P-CD se concentró con un tubo de ultrafiltración 3 kDa empleando centrifugación. Los concentradores filtraron los componentes no conjugados quedando retenido el C9P-CD. Primero se realizó un prelavado de la cámara de muestra del concentrador con 1 mL de PBS 1X, y se centrifugó a 15,000 xg por 3 min a 4 °C. Posteriormente, se colocó 1 mL de la muestra de conjugación y se centrifugó a 15,000 xg por 2 min a 4 °C, repitiendo este paso 4 veces al tener 4 mL del conjugado. Después, se añadieron 2 mL de PBS 1X para intercambiar los amortiguadores, finalmente se obtuvo 1 mL total del conjugado C9P-CD.

Después, C9P-CD se conjugó con cisplatino por EDC siguiendo la metodología descrita en la conjugación con fluoresceína. El exceso de cisplatino se descartó mediante centrifugación en tubo concentrador de

ultrafiltración de 3 kDa siguiendo la metodología descrita anteriormente. Se obtuvo 1 mL del nanoterapéutico C9P-CD-Cisplatino. Se cuantificó por Micro BCA la concentración de péptido antes y después de la conjugación, comparando con la curva estándar sugerida por el fabricante.

1.4 Análisis de viabilidad celular

Se seleccionaron las líneas celulares adherentes U87 y SKBR3 que son positivas a la presencia del receptor HER2, así como las células HBEC para emplearlas como control negativo. Los medios de cultivo y las especificaciones para su crecimiento se establecieron a partir de la información brindada en el ATCC (American Type Culture Collection: <https://www.atcc.org/>). Se cultivaron en frasco para cultivo celular rectangular de cuello inclinado de 25 cm² (T25). En la Tabla 1, se indican las características principales de cultivo y la intensidad en la expresión del receptor HER2.

Tabla 1: Especificaciones para el cultivo celular

Línea celular	Morfología	Medio de cultivo	Receptores
U87	Células epiteliales de glioblastoma	DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco) alto en glucosa + SFB 10% (Suero Fetal Bobino) + antibiótico 1%	+HER2
SKBR3	Células epiteliales de adenocarcinoma de mama	McCoy's 5a + SFB 10% + antibiótico 1%	+++HER2
HBEC	Células del endotelio microvascular cerebral	DMEM F12 + SFB 10% + antibiótico 1%	-HER2

+HER2: expresión de HER2, +++HER2: sobreexpresión de HER2, -HER2: negativo a HER2

Una vez que alcanzaron un nivel de confluencia superior al 95% con viabilidad celular superior al 95%, las células se tripsinizaron y 100,000 células fueron sembradas por duplicado en cámaras de cultivo celular de 8 pocillos para posterior análisis

microscópico. A las 24 h de incubación, se agregaron 2 µL de la solución del péptido C9P-FITC por duplicado y en cada una de las líneas celulares evaluadas. Para un segundo análisis, sólo se emplearon las células SKBR3, agregando un total de

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

2 μ L del nanosistema terapéutico completo (C9P-CD-Cisplatino) y los controles de conjugación a punto cuántico (C9P-CD) y de péptido conjugado a fluoresceína (C9P-FITC) después de 24 h de incubación en condiciones estándar. Las concentraciones se igualaron a \sim 500 μ g/mL. Este análisis se realizó por duplicado.

Después de 24 h de incubación, se sustituyó en cada pocillo el volumen contenido por el mismo volumen de paraformaldehído al 4% y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente (TA), y luego se volvió a sustituir el contenido por etanol al 50% y se incubó por 30 segundos. Posteriormente, se lavó tres veces con PBS 1X pH 7.4, se secó a TA. Los núcleos se tiñeron con yoduro de propidio (1 mg/mL) durante 1 min.

Finalmente, se realizaron tres lavados con PBS 1X, las cámaras de cultivo se secaron a TA y se les colocó el cubreobjeto. El análisis de la especificidad del péptido C9P conjugado con FITC se realizó en un microscopio confocal Leica modelo DM5500-Q del CIATEJ, teniendo en cuenta los diferentes rangos de excitación/emisión de los fluorocromos utilizados (Tabla 2). El análisis de las células SKBR3 con los nanosistemas terapéuticos, C9P-CD-Cisplatino, C9P-CD y C9P-FITC se realizó por microscopía de fluorescencia (Leica DMI1). Las imágenes se obtuvieron por el modo secuencial, para evitar la interferencia del fondo y se analizaron con Leica LasX Software.

Tabla 2: Rangos de excitación/emisión de los fluorocromos.

Fluorocromos	Longitud de onda de absorción (nm)	Longitud de onda de emisión (nm)
Fluoresceína (FITC)	496	516
Rodamina (TRITC)	540	565
Yoduro de propidio	535	617

1.5 Ensayo en células

El ensayo de Alamar Blue comúnmente se ha utilizado para estudios de viabilidad celular y citotoxicidad, se basa en la detección colorimétrica de la actividad del metabolismo celular a través del reactivo resazurina, que también permite monitorear el entorno reductor de las células vivas. Para este ensayo, se tomaron 5,000 células (100 μ L) de la línea celular SKBR3 (HER2+) cultivadas en frascos de cultivo T25, con viabilidad de 97% y se sembraron en placas de 96 pocillos. A las 24 h, se colocaron por triplicado 50 ng/ μ L de cada uno de los nanosistemas diseñados: 1)

C9P-CD-Cisplatino, como nanosistema terapéutico completo, 2) C9P-CD, como nanosistema sin fármaco, 3) Cisplatino libre como control de muerte celular. Además, se empleó DMSO 20% como control positivo de muerte celular. La concentración de cisplatino empleado corresponde a la DL25 (50 μ g/mL). Después de 24 h de incubación a 37 °C, atmósfera húmeda al 80%, CO₂ 5%, se agregó resazurina a un 10% a cada pocillo y se incubó por 4 h. Resazurina actúa como un aceptor de electrones en la cadena de transporte de electrones, sin interrumpir la transferencia normal de electrones. Tan pronto

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

como acepta electrones, se reduce a color rosa, resultando en resorufina fluorescente. El cambio en el estado reducido se puede mediante la absorbancia a las longitudes de onda de 570 y 600 nm.

Para el análisis de los datos y comparación entre grupos se hizo un Anova de una vía seguida de una prueba de Dunnett en el software GraphPad Prism versión 8.0.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com.

Resultados y Discusión

El modelo estructural del péptido C9P fue seleccionado considerando el modelo más preciso y cercano al modelo de plantilla (MAX Q y TM de 1) para analizar los aminoácidos disponibles con grupos amino para realizar la conjugación con el fluoróforo FITC, con CD y cisplatino. Como se muestra en la Figura 1a, el péptido tiene estructura de alfa hélice y en Figura 1b se muestran las características fisicoquímicas del péptido C9P con un peso molecular de 885 Da, un punto isoeléctrico de 7.85, que se encuentra cercano a un pH fisiológico, además, un índice alifático de 111 que puede asociarse a termoestabilidad.



Figura 1. Análisis *in silico* del péptido C9P. A) Modelo del péptido C9P visualizado por PyMol. B) Tabla características fisicoquímicas del péptido C9P obtenidas con el software CLC DNA Workbench.

Después, el péptido C9P se conjugó con isocianato de fluoresceína (FITC) debido a que este es uno de los fluoróforos más utilizados en la inmunofluorescencia y citometría de flujo, ya que se puede acoplar a distintos anticuerpos con la ayuda de su grupo isotiocianato reactivo, que se une a los grupos amino, sulfhidrilo, imidazoilo, tirosilo o carbonilo. Igualmente, la conjugación activa mediada por EDC es recomendada debido a que se utiliza para preparaciones de inmunocombinados,

entrecruzamiento de proteínas con ácidos nucleicos y síntesis de péptidos ya que activa el extremo carboxílico del aminoácido para el acoplamiento de aminas primarias, resultando en la formación de un enlace amida (Rizvi et al., 2014). Debido a que sólo se añadió la concentración mínima necesaria de péptido con un exceso de CD (500 µg), el exceso de FITC no unido pasó a través de la membrana del tubo de ultrafiltración. Después de la filtración, la muestra (C9P-FITC) brillaba con un color verde intenso al

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

exponerla a una luz UV (335 nm) lo que indica el éxito en la conjugación. Varios estudios utilizan este método de conjugación para péptidos, por ejemplo, Liu et al., 2012 conjugaron covalentemente un péptido HER2 a microesferas magnéticas monodispersas incrustadas en SiO₂ a través de una reacción mediada por EDC (Liu et al., 2012).

Las células U87 y SKBR3 fueron positivas a la presencia del receptor HER2 pues existe

reconocimiento del péptido C9P-FITC. Sin embargo, en las células U87 el receptor HER2 no se encuentra sobreexpresado como en las células SKBR3. En cambio, en las células HBEC (control negativo) no se observa la detección de HER2 por C9P-FITC (Figura 2). Lo anterior confirma la sobreexpresión de HER2 en SKBR3 y la especificidad del péptido (Panikar et al., 2019).

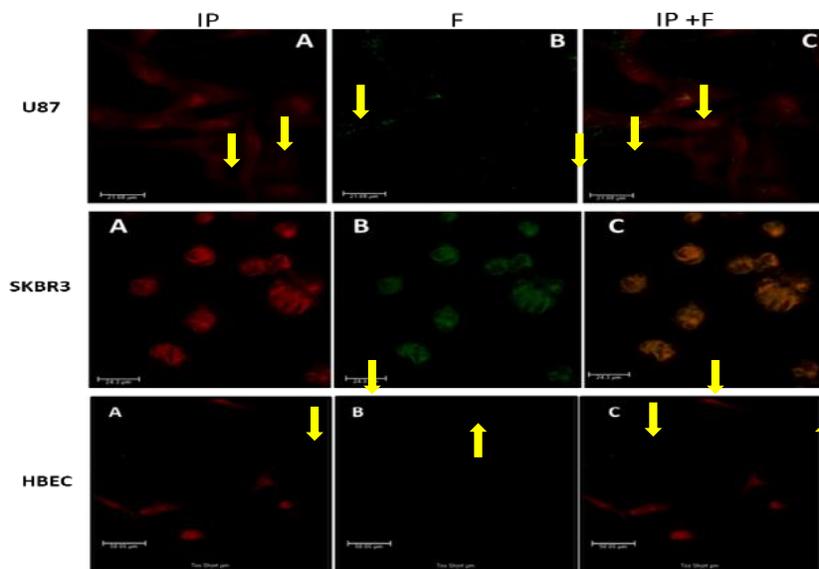


Figura 2. Microscopía confocal de células (40X). En la figura se pueden observar los núcleos marcados con yoduro de propidio (rojo) y el péptido C9P conjugado con fluoresceína (verde). IP: yoduro de propidio, F: fluoresceína. Con flechas amarillas se resaltan los puntos de fluorescencia detectados por la fluorescencia del C9P-FITC.

Según se ha reportado HER2 se expresa hasta en el 80% de los casos de glioblastoma impactando en su malignidad y en la mortalidad temprana de los pacientes (Shen et al., 2019), específicamente, específicamente, en la línea celular U87 se ha reportado la expresión del receptor (Li et al., 2022; Shen et al., 2019).

HER2 como un objetivo anticancerígeno se ha estudiado durante mucho tiempo. Su sobreexpresión juega un papel importante en la patogénesis y progresión del cáncer de mama y otros. Diversos investigadores buscan establecer una administración eficaz y confiable de fármacos, por lo que han desarrollado formulaciones de liposomas decorados con péptido anti-HER2 cargados con doxorubicina



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

(DOX), donde han evaluado la captación celular en las células SKBR3 debido a que estas sobreexpresan HER2 (Zahmatkeshan et al., 2016).

Igualmente, las técnicas de imagen por tomografía por emisión de positrones se encuentran actualmente en ensayos clínicos para un enfoque de diagnóstico de cuerpo completo no invasivo. Aunque los anticuerpos tienen una fuerte especificidad para las lesiones positivas para HER2, se ha demostrado que los péptidos permiten un tiempo más corto desde la inyección hasta la obtención de imágenes y se puede utilizar con isótopos de vida más corta, lo cual podría disminuir la toxicidad. Los péptidos que muestran especificidad para HER2 podrían comenzar a generalizar el desarrollo de técnicas de imagen molecular para cánceres HER2 positivos (Ducharme and Lapi, 2020).

El péptido C9P demostró alta especificidad al receptor HER2, tanto en las células que sobreexpresan el receptor como en aquellas que presentan una baja expresión (SKBR3 vs U87). Para confirmar la entrega de cisplatino en células HER2+, se empleó el nanoterapéutico C9P-CD-Cisplatino por 24 h en las células SKBR3, el resultado se analizó por microscopía de fluorescencia. En el mismo ensayo, se observaron vesículas apoptóticas en las células a las que se le añadió el nanosistema terapéutico completo (C9P-CD-Cisplatino). En cambio, no se observaron estas estructuras en las células tratadas con C9P-CD y C9P-FITC. Ganji, *et al.*, previamente reportó la dosis letal media de cisplatino en las células SKBR3 ($DL_{50}=8 \mu\text{g/mL}$) conjugado a nanopartículas de oro (AuNPs)

(Ganji et al., 2021). Teniendo en cuenta este dato, para los ensayos in vitro se empleó una $DL_{50}=5 \mu\text{g/mL}$ para los diferentes nanosistemas.

Estos resultados soportan la hipótesis de una conjugación eficiente del fármaco y un direccionamiento óptimo del mismo al núcleo celular asociado al direccionamiento activo del péptido C9P (Figura 3). Se ha reportado que los CD tienen gran potencial en el campo de la quimioterapia dirigida y se han explorado ampliamente para la imagenología, así como en la detección y la terapia debido a su alto rendimiento cuántico (entendido como la relación entre el número de moléculas que emiten fluorescencia respecto al número total de moléculas excitadas), baja citotoxicidad, alta solubilidad en agua, buena fotoestabilidad (Dubey et al., 2023). Los CD se han conjugado de manera eficiente con varios medicamentos contra el cáncer como doxorubicina (DOX), protoporfirina IX (PpIX), 5-fluorouracilo, curcumina, gemcitabina, metotrexato (MTX), oxaliplatino y cisplatino (Dubey et al., 2023). Por ejemplo, Dubey et al., 2023 planteó que el conjugado de CDs-fármaco se puede liberar específicamente de manera dirigida mediante el uso de ligandos, y que estos sistemas de administración de fármacos pueden mejorar la eficacia y reducir los efectos secundarios de los tratamientos contra el cáncer. Por otro lado, Feng et al., en el 2016 obtuvieron excelentes resultados al desarrollar CD's para desencadenar la administración de un pro-fármaco de cisplatino (IV) a los tumores a través del medio extracelular circundante y utilizando el péptido de



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

ácido arginil-glicil-aspartico (RGD) como ligando de direccionamiento activo (Feng et al., 2016) y reducir los efectos secundarios de los tratamientos contra el cáncer.

En nuestro ensayo de viabilidad, se estableció un grupo control que representa la condición estándar o de referencia en el experimento y la supervivencia celular en este grupo fue del 100% (Figura 4). Por otro lado, en el grupo tratado con el nanoterapéutico completo C9P+CD+Cisplatino se observó una disminución significativa en la supervivencia celular, ya que solo el 31% de las células sobrevivieron, en cambio, el grupo tratado con C9P-CD donde la supervivencia celular fue del 100%, lo que indica que no hubo diferencias significativas entre este último grupo y el grupo control. Basándose en estos resultados, se puede concluir que la combinación del nanoterapéutico completo C9P+CD+Cisplatino fue citotóxico disminuyendo la supervivencia celular en comparación con el grupo de control y el grupo C9P-CD. Además, existe diferencia estadísticamente significativa en la supervivencia entre el grupo C9P-CD-Cisplatino y el grupo C9P-CD, lo que indica que el nanosistema C9P-CD-Cisplatino es más eficiente al eliminar células a una DL_{50} de 8 $\mu\text{g/mL}$ previamente reportada Ganji et al., 2021.

Los resultados obtenidos en la presente investigación evidencian que el empleo de los nanoacarreadores de fármacos permiten una excelente absorción por parte de las células cancerosas. En nuestro caso, el nanoterapéutico (C9P-CD-Cisplatino) es eficiente asociado a la interacción del péptido C9P con el

receptor HER2. Después, de ser absorbido por las células cancerosas, el cisplatino tuvo efecto citotóxico en el citoplasma y esto se puede corroborar con los resultados de los experimentos de viabilidad celular, donde las células en las que se empleó el nanosistema C9P-CD-Cisplatino mostraron que la captación aumentó lo que pudiera permitir una mayor efectividad en tratamiento de pacientes de cáncer de mama.

Estos resultados constituyen una primera aproximación a la eficacia de los nanoterapéuticos contra células HER2 positivas, demostrando que, aunque aún son necesarios más estudios enfocados en la caracterización de la acción biológica, eficacia y bioseguridad del nanoacarreador, este sigue siendo una alternativa prometedora dentro de la terapia actual.

Conclusiones.

El péptido C9P demostró especificidad y unión al receptor HER2 tanto en el análisis *in silico* como *in vitro*. Adicionalmente, se puede conjugar con FITC sin perder especificidad, demostrando la versatilidad de péptidos de 7 aminoácidos para ser empleados como acarreadores activos de diversas moléculas, por ejemplo, fármacos. Una ventaja adicional es que C9P-FITC logró detectar al receptor HER2 tanto en células que sobreexpresan el receptor (por ejemplo, SKBR3) y en células que lo expresan en menor cantidad (U87). Adicionalmente, el nanoterapéutico diseñado (C9P-CD-Cisplatino) demostró la entrega del fármaco cisplatino en células SKBR3 como resultado el daño nuclear. Estos resultados demuestran que el péptido



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

C9P constituye una alternativa prometedora contra HER2 que podrían impactar en el diagnóstico y ser una opción en la terapéutica del cáncer de mama HER2+.

Agradecimientos. Al CONACYT y al Laboratorio Nacional PlanTECC por el apoyo número 315918.

Referencias bibliográficas

Ai, X., Ho, C. J. H., Aw, J., Attia, A. B. E., Mu, J., Wang, Y., Wang, X., Wang, Y., Liu, X., & Chen, H. (2016). In vivo covalent cross-linking of photon-converted rare-earth nanostructures for tumour localization and theranostics. *Nature communications*, 7(1), 10432.

Altunay, B., Morgenroth, A., Beheshti, M., Vogg, A., Wong, N. C., Ting, H. H., Biersack, H.-J., Stickeler, E., & Mottaghy, F. M. (2021). HER2-directed antibodies, affibodies and nanobodies as drug-delivery vehicles in breast cancer with a specific focus on radioimmunotherapy and radioimmunoimaging. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 48(5), 1371-1389.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.

Choi, Y., Kim, S., Choi, M. H., Ryoo, S. R., Park, J.,

Min, D. H., & Kim, B. S. (2014). Highly biocompatible carbon nanodots for simultaneous bioimaging and targeted photodynamic therapy in vitro and in vivo. *Advanced Functional Materials*, 24(37), 5781-5789.

De la Rosa, E., Ramírez, G., Panikar, S., Camacho, T., Salas, P. S., & López-Luke, T. (2020). Algunas aplicaciones de la nanofotónica en la biomedicina. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, 13(24), 1e-24e.

Dubey, N., Dhiman, S., & Koner, A. L. (2023). Review of Carbon Dot-Based Drug Conjugates for Cancer Therapy. *ACS Applied Nano Materials*, 6(6), 4078-4096.

Ducharme, M., & Lapi, S. E. (2020). Peptide based imaging agents for HER2 imaging in oncology. *Molecular Imaging*, 19, 1536012120960258.

Feng, T., Ai, X., An, G., Yang, P., & Zhao, Y. (2016). Charge-convertible carbon dots for imaging-guided drug delivery with enhanced in vivo cancer therapeutic efficiency. *ACS nano*, 10(4), 4410-4420.

Feng, T., Chua, H. J., & Zhao, Y. (2017). Reduction-responsive carbon dots for real-time ratiometric monitoring of anticancer prodrug activation in living cells. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 3(8), 1535-1541.

Feng, T., Chua, H. J., & Zhao, Y. (2018). Carbon-dot-



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

mediated Co-administration of chemotherapeutic agents for reversing cisplatin resistance in cancer therapy. *ChemNanoMat*, 4(8), 801-806.

Ganji, M., Dashtestani, F., Neghab, H. K., Soheilifar, M. H., Hakimian, F., & Haghirsadat, F. (2021). Gold nanoparticles conjugated L-lysine for improving cisplatin delivery to human breast cancer cells. *Current Drug Delivery*, 18(6), 753-760.

Ghosh, S. (2019). Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic chemistry*, 88, 102925.

Giugliano, F., Carnevale Schianca, A., Corti, C., Ivanova, M., Bianco, N., Dellapasqua, S., Criscitiello, C., Fusco, N., Curigliano, G., & Munzone, E. (2023). Unlocking the Resistance to Anti-HER2 Treatments in Breast Cancer: The Issue of HER2 Spatial Distribution. *Cancers*, 15(5), 1385.

Honarvar, H., Calce, E., Doti, N., Langella, E., Orlova, A., Buijs, J., D'Amato, V., Bianco, R., Saviano, M., & Tolmachev, V. (2018). Evaluation of HER2-specific peptide ligand for its employment as radiolabeled imaging probe. *Scientific reports*, 8(1), 2998.

Li, C., Lin, Q., Hu, F., Bao, R., Cai, H., & Gu, Y. (2022). Based on lapatinib innovative near-infrared fluorescent probes targeting HER1/HER2 for in vivo tumors imaging. *Biosensors and Bioelectronics*, 214, 114503.

Liu, Z., Duan, J.-H., Song, Y.-M., Ma, J., Wang, F.-D.,

Lu, X., & Yang, X.-D. (2012). Novel HER2 aptamer selectively delivers cytotoxic drug to HER2-positive breast cancer cells in vitro. *Journal of translational medicine*, 10, 1-10.

Pallerla, S., Comeau, J., & Jois, S. (2021). Cancer vaccines, treatment of the future: With emphasis on her2-positive breast cancer. *International journal of molecular sciences*, 22(2), 779.

Panikar, S. S., Ramírez-García, G., Vallejo-Cardona, A. A., Banu, N., Patrón-Soberano, O. A., Cialla-May, D., Camacho-Villegas, T. A., & de la Rosa, E. (2019). Novel anti-HER2 peptide-conjugated theranostic nanoliposomes combining NaYF₄: Yb, Er nanoparticles for NIR-activated bioimaging and chemo-photodynamic therapy against breast cancer. *Nanoscale*, 11(43), 20598-20613.

Ramos-Herrera, I. M., Reyna-Sevilla, A., González Castañeda, M. E., Robles-Pastrana, J. D., Herrera-Echauri, D. D., & González-Rivera, C. A. (2020). Cáncer de mama en Jalisco. Análisis espacial de la mortalidad en 2010-2017. *Gaceta médica de México*, 156(6), 542-548.

Rhodes, K. R., & Green, J. J. (2018). Nanoscale artificial antigen presenting cells for cancer immunotherapy. *Molecular immunology*, 98, 13-18.

Rizvi, S. B., Rouhi, S., Taniguchi, S., Yang, S. Y., Green, M., Keshtgar, M., & Seifalian, A. M. (2014).



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Near-infrared quantum dots for HER2 localization and imaging of cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 1323.

Shen, L., Li, H., Bin, S., Li, P., Chen, J., Gu, H., & Yuan, W. (2019). The efficacy of third generation anti-HER2 chimeric antigen receptor T cells in combination with PD1 blockade against malignant glioblastoma cells. *Oncology reports*, 42(4), 1549-1557.

Tchounwou, P. B., Dasari, S., Noubissi, F. K., Ray, P., & Kumar, S. (2021). Advances in our understanding of the molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer therapy. *Journal of experimental pharmacology*, 303-328.

Wang, L., Wang, X., Bhirde, A., Cao, J., Zeng, Y., Huang, X., Sun, Y., Liu, G., & Chen, X. (2014). Carbon dots based two-photon visible nanocarriers for safe

and highly efficient delivery of siRNA and DNA. *Advanced healthcare materials*, 3(8), 1203.

Wang, M., Zhang, K., Dai, X.-X., Li, Y., Guo, J., Liu, H., Li, G.-H., Tan, Y.-J., Zeng, J.-B., & Guo, Z. (2017). Enhanced electrical conductivity and piezoresistive sensing in multi-wall carbon nanotubes/polydimethylsiloxane nanocomposites via the construction of a self-segregated structure. *Nanoscale*, 9(31), 11017-11026.

Zahmatkeshan, M., Gheybi, F., Rezayat, S. M., & Jaafari, M. R. (2016). Improved drug delivery and therapeutic efficacy of PEGylated liposomal doxorubicin by targeting anti-HER2 peptide in murine breast tumor model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86, 125-135.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

MOLECULAR CLONING, EXPRESSION, AND PURIFICATION OF RECOMBINANT HUMAN PPAR γ IN *Escherichia coli*

Dalila Balderas-Rentería¹, Sonia Montero-Molina¹, Jorge Solís-Estrada¹, Verónica Almaguer-Cantú²,
Katiushka Arévalo-Niño², Xristo Zárate-Kalfopulos¹, *Isaías Balderas-Rentería.

¹Universidad Autónoma de Nuevo Leon, School of Chemistry, Laboratory of Molecular Pharmacology, Av. Universidad, S/N, San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon, Mexico, CP 66455.

² Universidad Autónoma de Nuevo Leon, School of Biology, Institute of Biotechnology, Av. Universidad, S/N, San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon, Mexico, CP 66455.

*Corresponding author: Isaías Balderas Rentería, PhD., Universidad Autónoma de Nuevo Leon, School of Chemistry, Laboratory of Molecular Pharmacology.

Telephone: +5283294000 ext 3435 and 6221

E-mail address: isaias.balderasn@uanl.edu.mx

ORCID Corresponding Author: [0000-0001-5428-393X](https://orcid.org/0000-0001-5428-393X)

Abstract

In the presence of an increasing prevalence of obesity, diabetes, and cardiovascular diseases, the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) has emerged as a transcriptional regulator of metabolism whose activity can be modulated by direct binding of small molecules. PPAR γ ligands are still clinically effective antidiabetic drugs, although side effects limit their use. Therefore, to investigate thoroughly the molecular interactions and the relationships between structure, function, and pharmacological properties, it would be desirable the use of full-length PPAR gamma protein. Nonetheless, considerable quantities of active protein are not able to be obtained from the original sources. In this study, a new strategy for human PPAR gamma (hPPAR γ) expression in bacteria was developed using a fusion protein (CusF3H+) for purification with Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC). hPPAR γ was mainly expressed in soluble fraction at a low temperature (25°C) and 0.1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). Protein identity was successfully confirmed by Western blot assay. Our results indicated the viability of using this approach to produce hPPAR γ into *E. coli* Rosetta (DE3), which could be a useful methodology for the study of this protein in *in vitro* assays.

Keywords: Escherichia coli, molecular cloning, peroxisome proliferator - activated receptor- γ (PPAR- γ), protein expression, purification

Clonación molecular, expresión y purificación de la proteína recombinante PPAR γ humana en *Escherichia coli*

Resumen

Ante el incremento en la prevalencia de diabetes, obesidad y enfermedades cardiovasculares, el receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (PPAR γ) ha emergido como un regulador transcripcional clave en el metabolismo cuya actividad puede ser modulada por unión directa con ligandos. Los ligandos de PPAR γ siguen siendo fármacos antidiabéticos clínicamente efectivos, pero los efectos secundarios limitan su uso. Por lo tanto, para continuar investigando las interacciones moleculares y la relación entre la estructura, función y propiedades



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



farmacológicas, sería deseable el uso de la proteína PPAR γ completo. Sin embargo, no es posible obtener cantidades considerables de la proteína activa a partir de la fuente original. Por ello, se desarrolló una nueva estrategia para la expresión de PPAR γ humano (hPPAR γ) en bacterias, empleando una proteína de fusión (CusF3H+) para la purificación por medio de cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC). hPPAR γ se expresó principalmente en la fracción soluble, a temperatura baja (25°C) y con una concentración del inductor isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) de 0.1 mM. La identidad de la proteína fue confirmada satisfactoriamente por medio de Western blot. Estos resultados indican la viabilidad de usar esta estrategia para la producción efectiva de hPPAR γ en *Escherichia coli* Rosetta (DE3), pudiendo ser una estrategia útil para el estudio de la proteína en ensayos *in vitro*.

Palabras clave: Escherichia coli, clonación molecular, receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (PPAR- γ), expresión proteica, purificación

Introduction

Regulation of the glucose and lipid metabolism and even inflammatory stimuli and differentiation of adipose tissue are important properties of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma. This protein belongs to the nuclear hormone receptor superfamily of ligand-activated transcription factors including PPAR α , β/δ , and γ , which cooperatively are responsible for the regulation of diverse metabolism pathways (Desvergne & Wahli, 1999). PPAR γ is one of the main and well-known members of the family due to their close relationship as a pharmacological target in diseases like metabolic syndrome, type 2 diabetes, obesity, inflammation, and cancer (Lehrke & Lazar, 2005; Kersten et al., 2000; Michalik et al., 2004).

To modulate the transcriptional activity of the target genes, PPAR γ requires the assembly with retinoid receptors (RXRs) as heterodimer in response to different synthetic or natural ligands (Forman et al.,

1995; Lehmann et al., 1995; Itoh et al., 2008). Among the natural ligands of PPAR γ are fatty acids and derivatives of eicosanoids, while synthetic ligands include thiazolidinediones, which are used as antidiabetic drugs that improve insulin sensitization. Nevertheless, relevant adverse effects have been reported, so it is important to keep studying the precise molecular interaction of the receptor with their ligands. PPAR γ still remains an attractive target for the development of drugs against diabetes, obesity, and even cancer and inflammatory diseases due to its great plasticity of functions, since it is a nuclear regulator of gene transcription and because it is associated with the metabolism of lipids, carbohydrates, and other molecules. It is relevant to produce the molecule in large quantities for its study in both *in vitro* and *in vivo* models.

For this purpose, it would be necessary to obtain a large amount of protein through a simple and accessible method. To investigate the molecular

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

interactions and the relationship between structure and function, it would be adequate to use full-length human PPAR γ . However, considerable quantities of active protein are not able to be obtained from the original sources. Therefore, it is essential to develop new methods for full-length PPAR γ production. In this study, human PPAR γ (*hPPAR γ*) was cloned in a pET-30a(+)/CusF3H+ plasmid and expressed in *Escherichia coli* Rosetta (DE3) at low temperature. *hPPAR γ* protein was obtained from soluble fractions and purified through Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC). Protein identity was confirmed by western blot analysis.

Materials and Methods

Materials

The Human PPAR gamma (*hPPAR γ*) gene was synthesized by General Biosystem (USA). The *hPPAR γ* gene was cloned into pET-30a(+)/CusF3H+ vector (generated by X. Zarate-Kalfópulos). The *Escherichia coli* Rosetta (DE3), protein molecular weight marker, tryptone, yeast extract, DNase and restriction enzymes were purchased from Promega (USA). The agarose, acrylamide and other chemicals were obtained from Sigma Aldrich (USA). Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was purchased from AG Scientific Inc (USA). The water used in the experiments was ultrapure (18.2 M Ω) from Simplicity UV System, Merck Millipore (USA). Polyclonal rabbit anti-PPAR γ antibody and goat anti-rabbit IgG secondary antibody were purchased from Sigma Aldrich (USA).

Methods

DNA constructs

The *hPPAR γ* gene (NM_138712.3, 1434 bp) was obtained from General Biosystem (USA). *hPPAR γ* gene was amplified by PCR with Platinum SuperFi DNA Polymerase, (ThermoFisher Scientific, USA) and the forward and reverse primers were 5'-CGTCCATGGCTATGACAATGGTTG-3' and 5'-GTCCTCGAGTCTAGTACAAGTCCTTG-3', respectively. The *hPPAR γ* sequence was inserted into the pET-30a(+)/CusF3H+ vector [8] using the sites *NcoI* and *XhoI* of the multiple cloning site (MCS).

hPPAR γ expression

Escherichia coli Rosetta (DE3) pLysS competent cells were transformed with the resulting pET-30a(+)/CusF3H+/hPPAR γ and were allowed to grow in Luria Broth (LB) at 37°C to OD_{600nm} of 0.6. Afterward, 0.1 mM of isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was used overnight at 25°C and 220 rpm to induce protein expression. Two mL cells culture were harvested by centrifugation (24,400 xg for 15 min at 4°C). The cell pellet was dissolved with a binding buffer (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8.0) and lysed with 0.1 mm glass beads (Cat. No. 11079101, Biospec Products, USA). Then, it was centrifuged (48,400 xg for 20 min at 4°C) and protease inhibitors cocktail was added (cOMplete Tablets Protease Inhibitor Cocktail, Mini EASYpack, Roche, Germany). The supernatant and insoluble fraction (dissolved with 100 μ L of 8M urea) were analyzed by SDS-PAGE.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



Protein purification

One liter of bacterial culture medium was collected by centrifugation at 24,400 xg for 15 min at 4°C. Cell pellet was dissolved in 50 mL of binding buffer (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8.0) and lysed using 0.1 mm glass beads in a bead-beater (Biospec Products, USA). The lysate was centrifuged at 48,400 xg for 20 min and at 4°C to obtain clarification, to which a cocktail of protease inhibitors (Roche, Germany) was added. Purification was carried out by Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) using the Äkta Primer Plus FPLC system (GE Healthcare, USA). The clarification was passed through a one mL HisTrap Fast Flow column (GE Healthcare, USA) previously equilibrated with five column volumes (CV) of binding buffer. Subsequently, the column was washed with five CV of the wash buffer (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazole, pH 8.0) until obtaining an absorbance value close to zero. Elution was carried out through a 20% to 100% imidazole gradient with an elution buffer (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 250 mM Imidazole, pH 8.0). Fractions with increased absorbance were analyzed by SDS-PAGE 10% to determine their purity. Moreover, the fractions containing the CusF3H + / hPPAR γ protein were dialyzed against a buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4) to remove excess of imidazole. Finally, samples were concentrated using an Amicon Ultra centrifugal filter (MWCO 30 kDa, Merck-Millipore, USA).

CusF3H+ fusion protein removal

CusF3H+ is a metal-binding protein formed by the addition of three histidine residues at the N-terminus. These residues can bind Ni (II) ions allowing improved purity after affinity chromatography (Vargas-Cortez *et al.*, 2017). The CusF3H+ fusion protein present in the N-terminal region was removed from the hPPAR γ protein by using Enterokinase Max TM (Invitrogen, USA). 0.1 units of enzyme were used in an EkMax buffer (500 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM CaCl₂, 1% Tween 20) for 16 h at 25°C. The digestion product was removed by incubating the reaction with 200 μ L of High Affinity Ni-Charged Resin (GenScript, USA) and analyzed by 10% SDS-PAGE to determine hPPAR γ purity. The obtained samples were dialyzed and concentrated through a buffer exchange (50 mM Tris pH 7.4, 100 mM KCl, 10% Glycerol) using an Amicon Ultra centrifugal filter (MWCO 30 kDa, Merck-Millipore, USA). The hPPAR γ concentration was determined according to the method described by Bradford (Bradford, 1976), with bovine serum albumin as standard.

Western blot assay

The hPPAR γ protein and total lysate of *Escherichia coli* Rosetta (DE3) pLysS (negative control) were transferred from a 10% SDS-PAGE gel to a 0.22 μ m nitrocellulose membrane (Sigma Aldrich, USA) by means of a western blot transfer. Transfer sandwich was immersed in a cold buffer (39 mM Glycine, 48 mM Tris-base and 20% Methanol) and transference was



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



carried out for 90 min and 100 volts. Membrane was stained with a solution of Ponceau Red S (Sigma Aldrich, USA) to corroborate the transfer and the staining was reversed by washing with distilled water. Subsequently, the membrane was incubated with a blocking solution (1X Tris-Buffered Saline (TBS), 0.1% Tween 20 and 5% Fat-free milk) for 1 h and 30 rpm.

The polyclonal rabbit anti-PPAR γ antibody (1:1,000 in TBS-T buffer, 1% fat-free milk and 0.02% sodium azide) was added and incubated for 1 h at 25°C and 30 rpm. Three washes were made with TBS-T buffer and after that, goat anti-rabbit IgG secondary antibody conjugated with alkaline phosphatase (1:10,000) was added and incubated for 1 h at 25°C and 30 rpm. Finally, the membrane was washed with TBS-T buffer for 5 times and the substrate BCIP / NBT (Boehringer Mannheim, Germany) was added until a brown precipitate was developed. The reaction was stopped by washing with distilled water.

Results

Protein expression analysis

The *hPPAR γ* sequence (1434 bp) was obtained from the NCBI database and cloned in pET-30a(+)/CusF3H+. A schematic representation of the obtained vector is shown in Figure 1. CusF3H+ acts as a fusion protein and CusF3H + / *hPPAR γ* was obtained mainly as a soluble protein with an estimated molecular weight of 64 kDa (Figure 2). Induction

conditions were maintained at 0.1 mM IPTG, 25 ° C and 220 rpm overnight (~ 16 hours). In addition, insoluble fractions were also analyzed by SDS-PAGE, and only a small proportion of total protein was present in that fraction (Figure 2, lanes 7-9).

hPPAR γ purification and removal of the CusF3H+ fusion protein

The CusF3H + fusion protein was allowed to purify *hPPAR γ* through nickel metal ion affinity chromatography. Twenty-five elution fractions were obtained in an imidazole gradient and the highest protein elution was obtained at a concentration of 150 mM imidazole. These fractions were visualized through 10% SDS-PAGE (Figure 3). CusF3H + fusion protein binds with high affinity to the chromatographic column and is not showed to come off the column in the washing process (Figure 4).

Western Blot Analysis

The *hPPAR γ* protein identification was corroborated by western blot, showing a positive signal on the nitrocellulose membrane at a weight close to 50 kDa compared to the pre-stained molecular weight marker. Antibodies did not show interaction against the native proteins of the expression system (Figure 5).

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

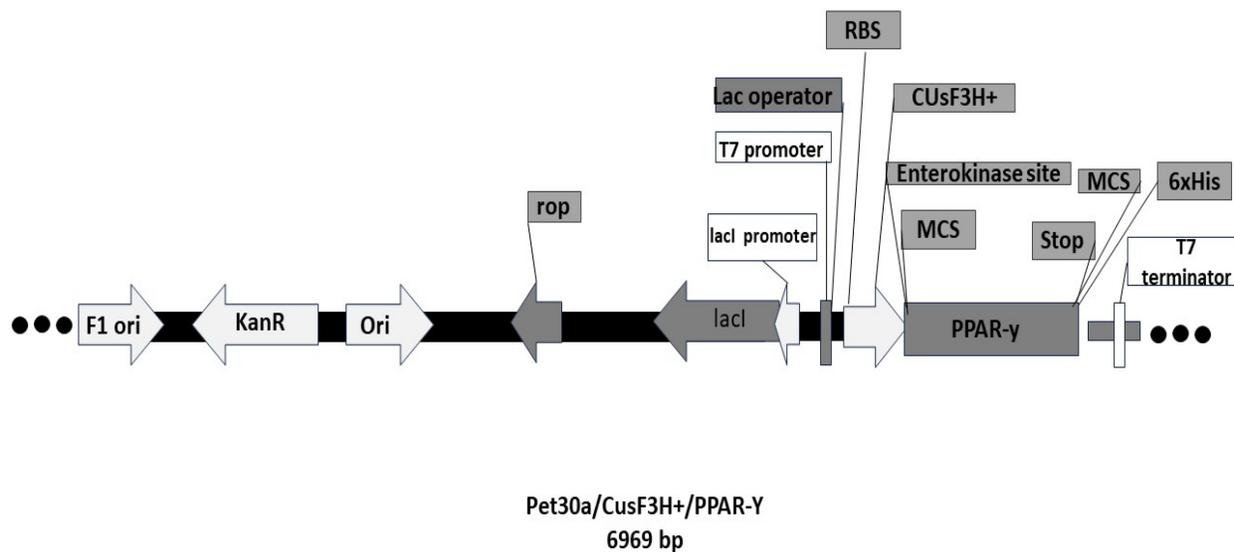


Fig.1 Schematic structure of the pET30(a+)/CusF3H/PPAR γ vector (6963 bp). PPAR γ was inserted into the pET30(a+)/CusF3H+ vector through *NcoI* at the 5' end and *XhoI* at the 3' end.

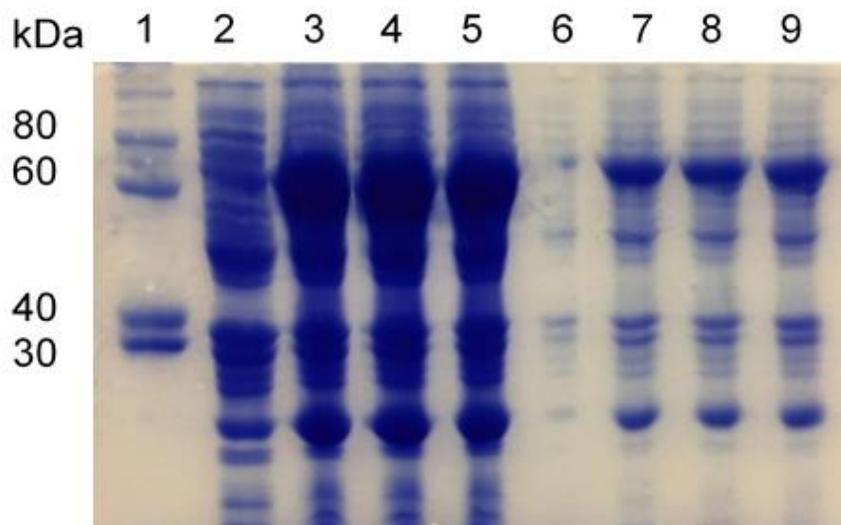


Fig.2 CusF3H+/PPAR γ (64 kDa) analysis expression in 10% SDS-PAGE. Lane 1: Protein MW marker, lane 2: non-induced bacterial culture (soluble fraction), lane 3-5: CusF3H+/PPAR γ protein expression (soluble fraction), lane 6: non-induced bacterial culture (insoluble fraction), lane 7-9: CusF3H+/PPAR γ protein expression (insoluble fraction)

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

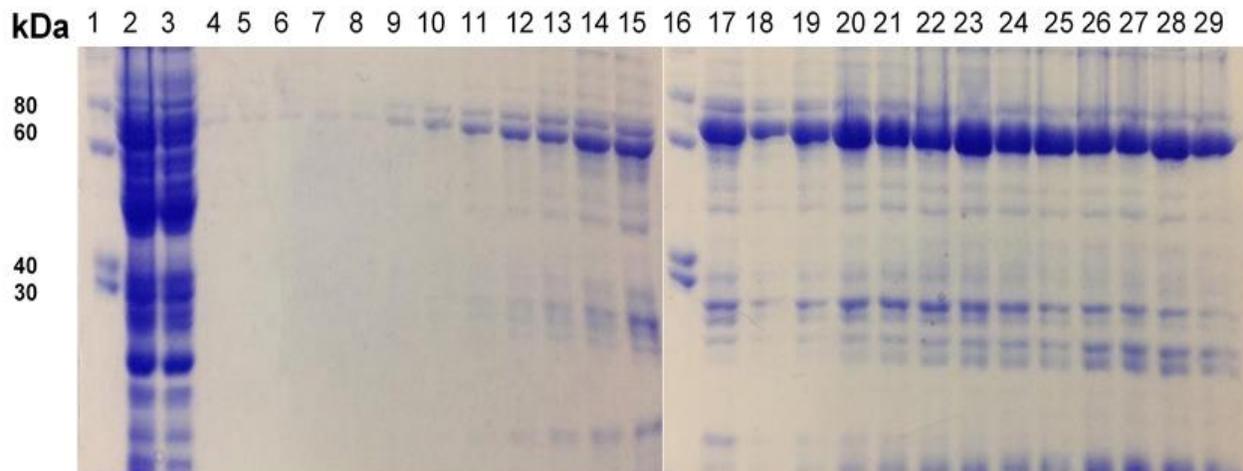


Fig. 3 Elution fractions analysis in SDS-PAGE. Lane 1 and 16: molecular weight marker, lane 2: non-binding fraction, lane 3: wash fraction and lanes 4-29: elution fractions in imidazole gradient

Subsequently, digestion with 0.1 U of enterokinase allowed hPPAR γ protein showing a weight of 54 kDa (Figure 4). Purified protein concentration was 1.8 mg /

mL according to the method described by Bradford, with an r^2 of 0.99 for the bovine serum albumin standard.

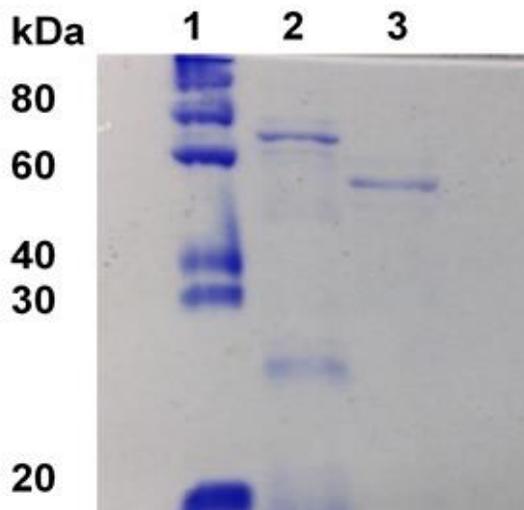


Fig. 4 Analysis of enterokinase digestion in SDS-PAGE. Lane 1: Protein MW marker, lane 2: pooled elution fractions, lane 3: hPPAR γ (54 kDa) after removal of CusF3H $^+$ fusion protein (~10 kDa)



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

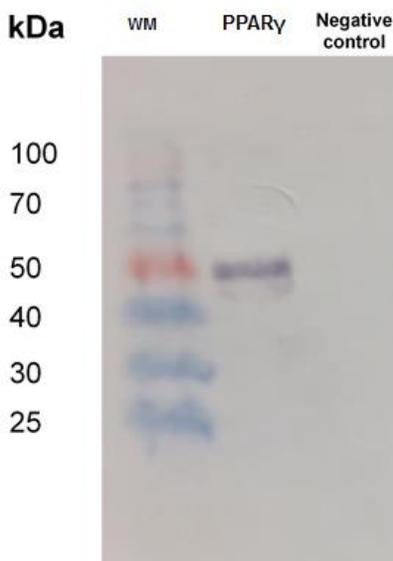


Fig. 5 Western blot analysis. Lane 1: prestained molecular weight marker. Lane 2: hPPAR γ protein (54 kDa). Lane 3: complete protein fraction of *Escherichia coli* Rosetta (DE3) pLysS, negative control.

Discussion

In the present work, hPPAR γ protein was successfully expressed in *Escherichia coli* Rosetta (DE3) at low temperature and purified from soluble fraction through IMAC. Related to cloning, several usage codons were found that were different to those used in bacteria, and for this reason, an improvement in the sequence of the gene was performed. Despite the fact that it is well known that *Escherichia coli* Rosetta (DE3) is capable of using uncommon codons for bacteria, the assurance of a successful expression in making the change of codons in the gene sequence was preferred. We performed several variations in the classical parameters affecting the expression of recombinant proteins, like temperature and time of incubation. We also tried other parameters; however, none of them substantially modified the expression of heterologous

protein. According to other reports, inclusion bodies can be formed when higher temperatures are used for expression conditions (Sanchez de Groot & Ventura, 2006; Hunke & Betton, 2003). The use of low temperatures has been reported to ease proper folding of the expressed proteins and to diminish the formation of inclusion bodies. For this reason, we decided to evaluate the expression at 25 °C, finding a better expression at this temperature rather than at 32-37°C (data not shown).

Literature reports have shown that expression of PPAR γ in prokaryotic systems like *Escherichia coli* strains could demand a change of culture media, using Terrific broth (TB) instead of LB (Li *et al.*, 2010). In spite of the fact that they reported a better expression with TB instead of LB, we do not find significant differences between these two media (data not shown). The main

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

difference between LB and TB is the high concentration of phosphate salts that the latter has, and according to the authors, TB is a suitable media to avoid the formation of inclusion bodies (*Moore et al.*, 1993).

There are few reports about full-length hPPAR γ expression in bacteria, and protein expression was often described to take place mainly in inclusion bodies. Previously, GST- hPPAR γ fusion protein generation was reported in *Escherichia coli* BL21. Induced overexpression was achieved through the addition of 0.2 mM IPTG at room temperature for 2-5 hours, and fusion proteins were purified from the cell pellet using glutathione-Sepharose beads (*Berger et al.*, 1999). Furthermore, *Nagai et al.* 2011 reported hPPAR γ expression as a fusion protein with GST in *Escherichia coli* and was purified using a GSTrap HP column. Temperature and IPTG concentration were not described (*Nagai et al.*, 2011).

Li et al. 2010 reported that hPPAR γ was expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli* BL21. Cells were allowed to grow at 37°C to OD_{600nm} and induced with 0.8 mM IPTG. They obtained 176 mg of PPAR-gamma of at over 99% purity per liter of TB medium [*Li et al.*, 2010]. Moreover, *Kong et al.* 2006 studied PPAR gamma LBD as a fusion to the N-terminus of the g3p protein of filamentous phage of the phage lambda. Fusion protein was expressed in *Escherichia coli* strain BB4 as inclusion bodies at 30°C and after induction with 1 mM IPTG (*Kong & Ma*, 2006).

In addition, bacterial expression of other variants of human PPAR such as PPAR delta have been reported. *Hua et al.* 2009 showed PPAR delta LBD expression in *Escherichia coli* TB1 in the soluble fraction (at 30°C and 0.4 mM IPTG for 6 hours) (*Hua et al.*, 2009). *Velkov*, 2013 reported expression plasmid for human PPAR δ in *Escherichia coli* BL21 (DE3) after IPTG induction at a cell density of 0.6 for 6 hours (*Velkov*, 2013). *Cho et al.* 2006 reported PPAR delta expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3) in LB medium with 1 mM of IPTG at 20°C overnight (*Cho et al.* 2006).

In this study, a new strategy for bacterial human PPAR expression was developed using a fusion protein (CusF3H+) for purification with IMAC. hPPAR γ was mainly expressed in soluble fraction at low temperature (25°C), and protein identity was confirmed by Western blot assay. Our results shown the viability of using this strategy to produce human PPAR gamma in *Escherichia coli* Rosetta (DE3). To conclude, hPPAR γ protein was successfully expressed in *Escherichia coli* Rosetta (DE3) at low temperature and purified from soluble fraction through IMAC. This methodology could be useful for PPAR γ in *in vitro* assays.

Acknowledgements

Authors thanked the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT), for the grant awarded to DBR for supporting this work and Universidad Autónoma de Nuevo León for its facilities and support.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Authors contribution

The experiments were performed by Dalila Balderas-Renteria, Sonia Montero-Molina and Jorge Solis-Estrada. Verónica Almaguer-Cantú supervised the molecular cloning. Katiushka Arevalo-Niño and Xristo Zarate-Kalfopulos supervised protein expression and purification process. Isaías Balderas-Rentería conceived the idea and guided the aim of study. All authors read and approved the final manuscript.

References

Desvergne B. & Wahli W. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocrine Reviews*. 20: 649-88. <https://doi.org/10.1210/edrv.20.5.0380>.

Lehrke M. & Lazar M.A. 2005. The many faces of PPAR gamma. *Cell*, 16: 993-999. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.026>.

Kersten S., Desvergne B. & Wahli W. 2000. Roles of PPARs in health and disease. *Nature*. 25: 421-424. <https://doi.org/10.1038/35013000>.

Michalik L., Desvergne B. & Wahli W. 2004. Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nature Reviews Cancer*. 4: 61-70. <https://doi.org/10.1038/nrc1254>.

Forman B.M., Tontonoz P., Chen J., Brun, R.P., Spiegelman, B.M. & Evans, R.M. 1995. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell*. 83: 803-812.

[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90193-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90193-0).

Lehmann J.M., Moore L.B., Smith-Oliver T.A., Wilkison W.O., Willson, T.M. & Kliewer S.A. 1995. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *Journal of Biological Chemistry*. 270: 12953-12956.

<https://doi.org/10.1074/jbc.270.22.12953>.

Itoh T., Fairall L., Amin K., Inaba Y., Szanto A., Balint B.L., Nagy L., Yamamoto K. & Schwabe J.W. 2008. Structural basis for the activation of PPAR gamma by oxidized fatty acids. *Nature Structural & Molecular Biology*. 15: 924-931.

<https://doi.org/10.1038/nsmb.1474>.

Vargas-Cortez T., Morones-Ramirez J.R., Balderas-Renteria I. & Zarate X. 2017. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli* tagged with the fusion protein CusF3H+. *Protein Expression and Purification*. 132: 44-49.

<https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.01.006>.

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical*



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Biochemistry. 72: 248-254.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

Sanchez de Groot N. & Ventura S. 2006. Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies. FEBS Letters. 580: 6471-6476. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.10.071>.

Hunke S. & Betton J.M. 2003. Temperature effect on inclusion body formation and stress response in the periplasm of *Escherichia coli*. Molecular Microbiology. 50: 1579-1589. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03785.x>.

Li W., Yuan Y., Zheng X., Zhao L., Duan W., Yu Y. (2010). Bacterial expression, refolding, functional characterization, and mass spectrometric identification of full-length human PPAR-gamma. Bioscience Biotechnology Biochemistry, 74, 1173-1180. <https://doi.org/10.1271/bbb.90864>.

Moore J.T., Uppal A., Maley F., Maley G.F. (1993). Overcoming inclusion body formation in a high-level expression system. Protein Expression and Purification, 4:160-163. <https://doi.org/10.1006/prep.1993.1022>.

Berger J., Leibowitz M.D., Doebber T.W., Elbrecht A., Zhang B., Zhou G., Biswas C., Cullinan C.A., Hayes N.S., Li Y., Tanen M. (1999). Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and delta ligands produce distinct biological effects. The Journal

of Biological Chemistry, 274, 6718-6725. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.10.6718>.

Nagai H., Ebisu S., Abe R., Goto T., Takahashi N., Hosaka T., Kawada T. (2011). Development of a novel PPAR gamma ligand screening system using pinpoint fluorescence-probed protein. Bioscience Biotechnology Biochemistry, 75, 100810-1-5. <https://doi.org/10.1271/bbb.100810>

Kong B., Ma W. (2006). Display of aggregation-prone ligand binding domain of human PPAR gamma on surface of bacteriophage lambda. Acta Pharmacologica Sinica, 27, 91-99. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2006.00253.x>.

Hua L., Changqing L., Badong L., Qinxin Z. (2009). Expression, purification and identification of LBD domain of human PPAR delta in *Escherichia coli*. Journal of Medical Colleges of PLA, 24, 76-83.

Velkov T. (2013). Interactions between human liver fatty acid binding protein and peroxisome proliferator activated receptor selective drugs. PPAR Research, Article ID 938401. <https://doi.org/10.1155/2013/938401>.

Cho M., Yoon H., Kang J., Park S., Yang Y., Hong J., Song E., Paik S., Kim S., Yoon D. (2006). A simple method to screen ligands of peroxisome proliferator-activated receptor delta. European Journal of

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Pharmaceutical Sciences, 29, 355-360.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2006.07.003>.

Supplementary information

Furthermore, the chromatogram of the FPLC system followed a typical IMAC purification pattern, where a constant flow of 0.5 mL / min was maintained in all purification steps (Fig S1).

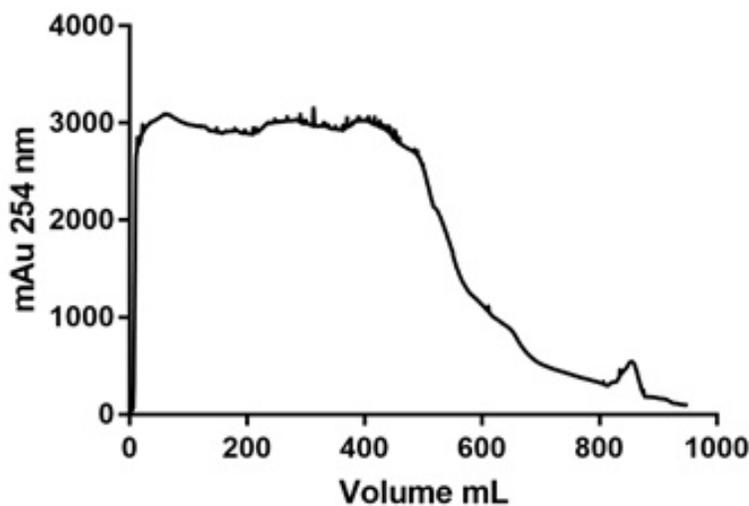


Fig S1. Chromatogram of purification in Äkta Primer Plus FPLC system.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL MUCÍLAGO EXTRAÍDO DE SÁBILA *Aloe vera* L. PARA SU APLICACIÓN EN PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS

Andrés Alejandro Damián-Reyna^a, Margarita Martínez-García^a, Ana Laura Reyes-Robles^a, Héctor Guadalupe Moreno-Guerrero¹, Juan Carlos González-Hernández^b, Ma. Del Carmen Chávez-Parga^c, Julián López-Tinoco^c.

^a TecNM campus Instituto Tecnológico Superior de Puruándiro. División de Ingeniería en Industrias Alimentarias. Puruándiro, 58532, Michoacán, México. andres.damian@itspuruandiro.edu.mx

^b División de Posgrado de la Facultad de Ingeniería Química, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Avenida Francisco J. Múgica SN, Morelia, Michoacán, 58030, MÉXICO.
pandamian@yahoo.com.mx

^c Laboratorio de Bioquímica del Departamento de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Morelia, Avenida Tecnológico#1500, colonia Lomas de Santiaguito, Morelia, Michoacán, 58120, MÉXICO
Palabras clave: Aloe vera, Mucilago, Antimicrobiano

Introducción

Actualmente, hay un creciente interés en los compuestos naturales que muestran actividad microbiciada obtenidos a partir de fuentes biológicas a bajo costo, de manera inocua, con técnicas que puedan ser ejecutadas en corto tiempo (Papetti, 2012; Vollmerhausen et al., 2013) y que ayuden a extender la vida de anaquel de los productos alimenticios (Knorr et al., 2011) como los hortofrutícolas. Esta necesidad de incrementar la vida de anaquel abre un nuevo campo de estudio en la investigación de la extracción, purificación y caracterización de extractos obtenidos dentro de la industria de alimentos (Damián-Reyna et al., 2017).

A pesar de que los microbicidas naturales están ganando interés como alternativa al uso en tratamientos de conservación físicos y químicos, aún existen varias restricciones, cómo su efectividad microbiciada, aceptación por el consumidor y costo de la aplicación de estos agentes que requieren una investigación más intensa (Zhang et al., 2014).

Varios de los compuestos encontrados en plantas, semillas y frutas se han estudiado para probar su resistencia al desarrollo de microorganismos (Bejarano Rodríguez & Centeno Briceño, 2009).

Los agentes antimicrobianos pueden tener acción en los microorganismos de las siguientes formas:

1. Interferencia con la membrana celular entrando a ésta a través de los canales porínicos de la membrana externa donde se unen a las proteínas, debilitando, conduciendo a lisis celular y muerte. Además, en la membrana citoplásmica se difunden causando el derrame del citoplasma hacia el exterior de la célula, resultando así la muerte celular (Hegggers et al., 2002).
2. Interferencia en la síntesis de proteínas: se unen a los ribosomas bloqueando la adherencia del RNA, evitando el crecimiento de la cadena de proteínas. También puede provocar la inserción de aminoácidos erróneos en la proteína o en la interferencia con la capacidad de los aminoácidos para conectarse unos con otros (Álvarez-Ordóñez et al., 2013).
3. Disminución de las actividades enzimáticas, es decir, deterioro de varios sistemas enzimáticos,



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



incluidos aquellos involucrados en la producción de energía y síntesis de componentes estructurales. Una vez que el antimicrobiano cruza la membrana celular, puede interactuar con las enzimas y proteínas causando un flujo contrario de protones a través de ella, afectando así a la actividad celular. Los flavonoides también inhiben enzimas virales importantes, como la transcriptasa inversa y proteasa, y destruyen algunos protozoarios. Sin embargo, su toxicidad en células animales es baja (Havsteen, 2002).

Algunos de los principales temas de estudio son el desarrollo de resistencia a los microbicidas por parte de los microorganismos patógenos, la incorporación homogénea de los compuestos en matrices de alimentos, la extracción a gran escala de fuentes naturales sin perder su funcionalidad, y la autorización de su uso por parte de las agencias reguladoras. Muchos de éstos microbicidas de origen natural son clasificados como “generalmente reconocidos como seguros” (GRAS) para usar en el procesamiento de alimentos, pero su uso en otras líneas comerciales (farmacéutica, cosmética, etc.) involucra una aprobación regulatoria diferente. Los materiales naturales representan un área de oportunidad para la seguridad y conservación de los alimentos, pero aún es necesaria más investigación para optimizar su uso (Juneja et al., 2012; Sarkar & Shetty, 2014).

Los agentes utilizados para inhibir el crecimiento de microorganismos en alimentos y bebidas durante su procesamiento deben ser seleccionados cuidadosamente para no afectar las propiedades organolépticas. La

actividad microbicida de algunos extractos de plantas, incluidos los cítricos (Sandoval-Montemayor et al., 2012), han permitido disminuir el crecimiento o causar la muerte de los microorganismos, incrementando así la calidad y duración de la seguridad de los alimentos. Algunas de sus ventajas son que un mismo extracto puede ser utilizado para diferentes propósitos o contribuir con los tratamientos comúnmente utilizados, generando la base para el desarrollo de nuevas alternativas, más efectivas, menos caras y con menos efectos colaterales que los antibióticos comerciales (Palacios-Espinosa et al., 2011).

Origen e importancia del *Aloe vera*.

El *Aloe vera*, es una planta con alrededor de 360 especies diferentes, pertenece a la familia de las asfodeláceas o liláceas, con hojas perennes en forma de roseta; su tamaño puede alcanzar desde unos cuantos centímetros hasta los 50 cm (Choi & Chung, 2003; Ramachandra & Srinivasa Rao, 2008; Reynolds & Dweck, 1999).

Aloe vera L, posee hojas que contienen una pulpa o parénquima incoloro que forma el gel/cristal del Aloe, el cual representa aproximadamente el 65 a 80% del peso de la planta. Este gel está conformado por carbohidratos que son sintetizados en exceso, agua, minerales y ácido málico almacenado. Los polisacáridos mucilaginosos son los principios activos responsables de la actividad biológica del gel (Boudreau & Beland, 2006; Tai-Nin Chow et al., 2005); en tal sentido, se ha demostrado una cierta actividad

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

antimicrobiana del gel frente a diferentes microorganismos como *Trichophyton mentagrophytes*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* (Ferro et al., 2003; Olaleye et al., 2011).

Respecto a la composición química se ha reportado que la planta de *Aloe vera* está constituida por una mezcla compleja de compuestos como se muestra en la Tabla 1 y que más de 20 de estas sustancias poseen actividades benéficas para la salud (Jia et al., 2008; Pritam & Kale, 2007; Reynolds & Dweck, 1999).

De acuerdo con cifra de la FAO el 37% de los alimentos en México se pierden o desperdician durante la cadena de suministro, esto representa más de 10 millones de toneladas al año, de las cuales alrededor de 40% corresponde a frutas y hortalizas (FAO, 2018), entre ellos se encuentran guayabas, fresas, jitomates, mangos, etc.

México es uno de los principales productores de frutos a nivel mundial, ocupa el primer lugar en producción de aguacate, segundo en limón tercero en fresa y zarzamora, además de un quinto lugar en guayaba, arándano y frambuesa entre otros (INAES, 2017). En México 5.5 millones de personas trabajan en el campo, de los cuales 56% son agricultores y 44% son trabajadores agrícolas de apoyo (peones y jornaleros) (Hablemosdelcampo, 2018). En Michoacán el 20% de la población se dedica al campo, por esta razón es que este proyecto tendrá un impacto positivo en la agroindustria local, beneficiando a los productores de frutas y hortalizas interesados en proporcionar un valor

agregado a sus productos y contribuir a abatir el desperdicio de productos hortofrutícolas.

Metodología

Obtención del mucílago

Para obtener el mucílago de sábila primero se recolectaron las pencas de sábila del huerto que se encuentra en el interior del TecNM campus Instituto Tecnológico Superior de Puruándiro. De las pencas de sábila, se retiraron las impurezas, tales como polvo, telarañas, etc., enseguida se retiraron las espinas y el recubrimiento exterior de las pencas, para obtener la pulpa. Una vez obtenida la pulpa se cortó en trozos de aproximadamente 1cm³, se almacenaron a una temperatura de 4°C, hasta su utilización.

Para el proceso de extracción se dejaron reposar 100 g de trozos de pulpa de sábila en 400 mL de agua destilada durante 90 min. Cada 15 min se hizo un mezclado manual para obtener una mayor cantidad de mucílago.

Posteriormente se llevó a cabo la separación de mucílago de sábila mediante un proceso de tamizado empleando una malla de 0.002 mm, y el mucílago separado se colocó en frascos de vidrio para enseguida ser pasteurizado, para esto, los frascos se colocaron a ebullición en agua, durante 15 min, transcurrido el tiempo se prosiguió a enfriar el mucílago en un recipiente con hielo y agua. Finalmente, el mucílago obtenido se almacenó en refrigeración a 4 °C hasta su utilización.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



Acondicionamiento del mucílago

Una vez obtenido el mucílago de sábila, se colocó en cajas Petri, cada una de ellas con 40 mL de mucílago de sábila, estas se secaron a una temperatura de 104 °F hasta peso constante. Una vez pasado este tiempo, se retiró el mucílago seco de las cajas Petri para someterlo posteriormente a los análisis correspondientes.

Determinación de Grados Brix

Los grados brix se determinaron mediante un refractómetro, utilizando 10 mL del mucílago líquido, del cual se tomó una gota, es decir, de la muestra a analizar, dicha gota se colocó en el refractómetro una vez ya calibrado con agua destilada, por último, se lee el valor arrojado por el dispositivo. El análisis se realizó por triplicado.

Medición de pH

Se tomaron 10 mL de muestra y se colocaron en un vaso de precipitado, al que se introdujo el electrodo de potenciómetro calibrado.

Determinación de Acidez titulable

Se tomaron 10 mL del mucílago en líquido a los cuales se le agregaron 3 gotas de fenolftaleína (indicador), se homogenizó y tituló con una solución de NaOH 0.1 N, hasta que la muestra presentó un cambio de coloración a rosa tenue que permanezca de 15 a 30 segundos, registrando los mL gastados de NaOH. Por último, se realizan los cálculos y se determina el porcentaje de acidez mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Acidez} = V \times N \times \text{Meq} \times 100g$$

Siendo:

V= Volumen de NaOH gastados.

N= Normalidad del NaOH.

Meq= Peso equivalente del ácido predominante en la muestra.

Determinación de Azúcares totales:

La determinación de azúcares totales se realizó mediante el método del fenol-ácido sulfúrico adaptado a microplaca (Masuko et al., 2005). Para esto, primero se realizó una curva de calibración. Se preparó un stock de glucosa, diluyendo 0.01g en un 1 mL de agua destilada, de dicho tubo se tomaron 100 μ L y se colocaron en un nuevo microtubo con 900 μ L para realizar las ocho respectivas diluciones decimales. De cada dilución se tomaron 125 μ L y se añadieron 250 μ L de fenol al 5% y 625 μ L de ácido sulfúrico puro. En seguida las muestras se llevaron a baño maría a una temperatura de 100 °C durante 30 min y después se dejaron enfriar durante 15 min, se midieron a una longitud de 490 nm y a 630 nm. Para las muestras, se pesaron 0.01 g del mucílago de sábila colocándolo en un micro tubo adicionándole 900 μ L de agua destilada, tomándolo como nuestro tubo patrón, en seguida se tomaron 100 μ L del tubo patrón y se le adicionó 900 μ L de agua destilada dejándolo reposar durante 12 h y otro utilizarlo inmediatamente para su lectura sin reposo, transcurrido el tiempo de reposo se coloca en el vortex durante 10 min y en seguida se toman 125 μ L de la muestra es decir el tubo patrón y se le adicionan 25 μ L de fenol al 5% más 625 μ L de ácido sulfúrico

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

puro, después se coloca en baño maría a 100°C durante 30min, se deja enfriar durante 15 minutos y después se toman 300 µL de dicho tubo y se colocan en la microplaca para su posterior lectura a 490 y 630 nm. Mediante la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración se realizaron los cálculos correspondientes.

Determinación de fibra cruda:

La fibra contenida en el mucílago de sábila se determinó por medio del método de fibra bruta y extracto no nitrogenado, este se realizó por triplicado. Primero se pesaron 2 g de muestra desgrasada y se secó en el horno durante 2 h a 100 °C. Después se prepararon 100 mL de una solución de ácido sulfúrico al 0.255 N. En un matraz Erlenmeyer se colocó a ebullición durante 30 min la solución antes mencionada y los 2 g de muestra. Una vez transcurrido el tiempo se retira el matraz y se filtra la muestra con la bomba de vacío utilizando tela de lino o papel filtro. Durante la filtración se realizaron lavados con 500 mL de agua destilada caliente para neutralizar el pH de la solución. Después se procedió a preparar 100 mL de una solución de NaOH 0.313 N y se coloca en ebullición, una vez en ebullición se le agrega la muestra filtrada y se deja durante 30 min, enseguida se realizó el filtrado de la muestra y se le realizaron lavados con agua destilada caliente. Una vez que la muestra se encuentra preparada se colocó en un crisol previamente secado a 110 °C durante 8 h registrando su peso, y se introdujo en el horno a una temperatura de 100 °C durante 90 min en dado caso que la muestra

se encuentre húmeda. Posteriormente el crisol se colocó en la mufla durante 4 h a 550 °C para calcinar la muestra, se apagó la mufla y se dejó enfriar durante 24 h, transcurrido el tiempo de colocó en el desecador y se registró su peso para continuar con la determinación del contenido de fibra cruda aplicando la fórmula correspondiente:

$$\% \text{ Fibra cruda} = \left[\frac{(P_s - P_p) - (P_e - P_{ep})}{M} \right] \times (100)$$

Donde:

Ps= Masa del residuo seco (g).

Pp= Masa del papel filtro (g).

Pep= Masa de la ceniza del papel (g).

M= Masa de la muestra (g).

Pe= Masa de la ceniza (g).

Determinación de humedad:

La humedad se determinó por el método de secado por estufa, el cual consiste en secar durante 24 h a una temperatura de 110 °C los crisoles de porcelana a utilizar pesándolos cada 30 min hasta obtener peso constante, enseguida se midieron 3 g del mucílago de sábila y se colocaron en los crisoles, posteriormente se colocaron en el horno de secado durante 6 h a 105 °C y se fueron pesando los crisoles cada 30 min para obtener peso constante, para después calcular la humedad mediante la siguiente fórmula.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P - P1}{P2} \times 10$$

Donde:

P= Peso del recipiente con la muestra húmeda, en gramos.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

P1= Peso del recipiente con la muestra seca.

P2= Peso de la muestra, en g.

Determinación de cenizas:

Para determinar cenizas del mucílago de sábila se aplicó el método de cenizas en seco. Primero se pesaron 5 g del mucílago seco para colocarlos en el crisol y se realizó un pre-calcinado con un mechero de bunsen hasta que deje de desprender vapores, enseguida se introdujo en la mufla durante 5 h a una temperatura de 500 a 600 °C hasta que las cenizas adquieran un color blanco o gris. Transcurrido dicho tiempo se apagó la mufla y se dejó enfriar la muestra durante 24 h, posteriormente se sacaron los crisoles y se colocaron en un desecador. Por último, se pesó el crisol en la balanza analítica para realizar los cálculos correspondientes aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas} = \left[\frac{(P - p) \times 100}{M} \right]$$

Siendo:

P= Masa del crisol con cenizas (g).

p= Masa del crisol (g).

M= Masa de la muestra (g).

Determinación de proteínas totales:

Las proteínas se determinaron mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), para esto el mucílago de sábila debe estar completamente seco que al triturarlo se obtenga un polvo muy fino.

Primero se realizó una curva de calibración donde se pesó 1 g de seroalbúmina y se colocó en un tubo falcón para después agregarle una solución de acetato

de sodio y se ajustó a un pH de 5 con ácido clorhídrico, al terminar se refrigeró durante 24 h, transcurrido este tiempo se centrifugó a 1500 rpm durante media hora, para finalizar se tomaron las distintas diluciones de la muestra y se agregaron a un tubo Eppendorf al cual se les colocó 200 µL de solución reveladora Bradford y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min para medir la absorbancia a 630 nm obteniendo los puntos para la construcción de la curva de calibración. Para las muestras a analizar se realizaron disoluciones 1:10, tomando 1 g del mucílago de sábila seco previamente triturado en un mortero para después aforarlo a 10 mL con una solución de acetato de sodio pH 5, posteriormente se homogenizó en el vortex y se dejó reposar durante 24 h en refrigeración. Posteriormente, se centrifugó y se añadió 800 µL de ésta en un tubo Eppendorf más 200 µL de solución Bradford. Se leyeron en una microplaca colocando 200 µL por triplicado. Mediante la ecuación de la curva de calibración obtenida se pueden obtener la cantidad de proteína soluble en la muestra.

Determinación del contenido de Grasa:

Para obtener la grasa cruda contenida en el recubrimiento comestible se realizó mediante el método de Soxhlet (Yuharmon et al., 2018), se pesaron 2 g de muestra y se trituró, enseguida se colocó en un cartucho de celulosa el cual se cubrió con algodón la parte superior, posteriormente se pesó el cartucho con la muestra. Después se procedió a montar el equipo Soxhlet sobre una parrilla eléctrica de calentamiento, dentro de la cámara de extracción

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

de gases, una vez montado se tomó el cartucho con pinzas y se colocó dentro del extracto Soxhlet y se adicionaron 300 mL del solvente (éter de petróleo) por la parte superior del refrigerante, se conectaron las mangueras y se inició con el calentamiento del éter de petróleo hasta ebullición y obtener un goteo moderado, la temperatura de la parrilla se tiene que mantener hasta obtener de 3 a 4 reflujos anotando la hora de cada uno de ellos. Al obtener los reflujos se apagó el equipo y se dejó enfriar, el cartucho con la muestra desgrasada se retiró y se colocó en un desecador. Posteriormente, el equipo se rearma para recuperar el solvente y después se desarma. Por último, el matraz balón se somete a un secado para eliminar el éter, se pesa y se realizan los cálculos correspondientes aplicando la fórmula:

$$\% \text{ Grasa cruda} = \frac{m_2 - m_1}{m} \times 100$$

Donde:

m= peso de la muestra.

m1= Peso del matraz solo.

m2= Peso del matraz con grasa.

Microorganismos de prueba

Para este estudio se utilizaron los siguientes microorganismos: *Candida albicans* ATCC 14055, *Candida albicans* ATCC 14066, *Candida guilliermondii*, *Kluyveromyces marxianus* ATCC CIBB-L2029, *Pichia stipitis* ATCC 55376, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC BY4741, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC BY4742, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 292013.

Los microorganismos de prueba se incubaron en caldo nutritivo, hasta alcanzar una absorbancia de 0.100 con longitud de onda de 600 nm, la cual equivale a tener una concentración de 1.5×10^8 UFC/mL (0.5 McFarland). Utilizar la formula:

$$\mu\text{l de cultivo} = \frac{0.1}{A_{\text{cultivo}}} * 1000$$

Pruebas microbidas

Se utilizó el método de la dilución en microplaca para determinar el efecto microbida del mucílago (Damián-Reyna et al., 2017; Gille et al., 2022). Se prepararon las soluciones de prueba de 0 a 100 mg/ml. Se colocaron en una microplaca colocando 5 μl de inóculo más 295 μl de solución de prueba, esto para cada uno de los diferentes microorganismos. Se utilizaron como controles pozos con medio de cultivo sin mucílago, y pozos con solución de prueba sin inóculo. Enseguida se midió la absorbancia a una longitud de onda de 630 nm. La microplaca se incubó por 48 h a 37°C para bacterias y 27°C para mohos y levaduras. Pasando este lapso se midió nuevamente la absorbancia.

Análisis estadístico

Se realizaron tres réplicas y al menos tres experimentos independientes. Los datos se presentarán como el promedio \pm desviación estándar (SD). Los análisis estadísticos serán realizados utilizando STATGRAPHICS Centurion versión XIX (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA). Las diferencias entre los grupos son detectadas mediante



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

ANOVA y prueba de comparación múltiple. Se consideran los valores P menores a 0.05 cómo estadísticamente significativo.

Resultados

Análisis proximal del mucílago.

La bibliografía reporta, para el mucílago de *Aloe vera*, un pH de 4.55 a 6.0, mientras que en este estudio es de 5.93, este pH ácido es debido a la presencia de ácido málico que es el predominante en el mucílago de *Aloe vera* (A. Hernandez et al., 2014). Respecto a los sólidos disueltos de 27 °Brix obtenido y los 10.17 mg/g de azúcares totales, se ha reportado que el principal azúcar presente es la glucosa, en menor proporción la fructosa y no se encuentra sacarosa en el mucílago de *Aloe vera* (A. Hernandez et al., 2014). El contenido de cenizas, que comprende la presencia de minerales como K, Ca, Mg, Zn y Cu, se ha reportado de 13 mg/g (J. Hernandez & Giraldo, 2011) y en este estudio se determinaron 18.53 mg/g. Entre los aminoácidos presentes se encuentran alanina, ácido aspártico, arginina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, tirosina, valina (Domínguez-Fernández et al., 2012), reportándose contenidos de hasta 0.30% (Cabello et al., 2015). Estos valores son muy similares a los obtenidos en este estudio de 0.44%.

Efecto microbicida del mucílago de *Aloe vera* L.

Para la parte del efecto microbiano del mucílago, se obtuvieron mejores resultados en la parte en donde se utilizó la solución de prueba a mayor concentración (100

mg/mL), ya que ahí hubo una inhibición casi del 100% (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Por otra parte, en donde se utilizó solución de prueba a más baja concentración, aun hubo crecimiento de microorganismos.

Al compararse con los resultados obtenidos por Dhaouadi y colaboradores (Dhaouadi et al., 2013) para un extracto de la tuna de *Opuntia ficus-indica*, utilizando el mismo método de evaluación de la proliferación celular determinaron una MIC de 0.6 mg/mL para varias especies de *Staphylococcus* y *Escherichia coli*, y 0.3 mg/mL *Salmonella sp.*, se observó una mayor resistencia al mucílago de *Aloe vera* L., lo que se puede deber a las diferencias en el contenido de los polisacáridos de aproximadamente de 35 a 40 % de arabinosa, 20 a 25% de galactosa y xilosa cada una, y de 7 a 8% de ramnosa y ácido galacturónico cada uno (Gibson, 2013).

Conclusiones.

El análisis proximal del mucílago de sábila *A. vera* L., mostró un contenido de 10.17 mg/mL de azúcares y 4.40 g/mL de proteínas totales, estos resultados son similares a los reportados en la bibliografía.

El mucílago de sábila *A. vera* L. presenta efecto microbicida frente a *Pichia stipitis* ATCC 55376 y *Saccharomyces cerevisiae* BY4741, mientras que los demás microorganismos de prueba no mostraron inhibición, aún a la concentración de 100 mg/mL del mucílago.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Los resultados obtenidos sugieren que el mucílago extraído de sábila *A. vera* L. puede ser usado como antimicrobiano en productos hortofrutícolas.

Referencias

- Álvarez-Ordóñez, A., Carvajal, A., Arguello, H., Martínez-Lobo, F. J., Naharro, G., & Rubio, P. (2013). Antibacterial activity and mode of action of a commercial citrus fruit extract. *Journal of Applied Microbiology*, 115(1), 50–60. <https://doi.org/10.1111/JAM.12216>
- Arthur Gibson. (2013). *Cactus primer. First Harvard University Press Paperback Edition*, 196–1999.
- Bejarano Rodríguez, R. J., & Centeno Briceño, S. J. (2009). Extracto de Citrus limon para el control de aflatoxinas y hongos aflatoxigénicos en alimentos concentrados para pollos de engorde producidos en Venezuela. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(1), 57–61. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562009000100012&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Boudreau, M. D., & Beland, F. A. (2006). An evaluation of the biological and toxicological properties of *Aloe barbadensis* (miller), *Aloe vera*. *Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, 24(1), 103–154. <https://doi.org/10.1080/10590500600614303>
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Cabello, E. D., Molina, G. M., Torres de la Cruz, V. M., Núñez, M. A., Verde, M. J., Martínez de Villareal, L. E., & Rivas, C. (2015). Actividad antimicrobiana del extracto proteico de hojas de *Aloe vera*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 46(1), 41–46. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext_plus&pid=S1870-01952015000100041&lng=es&tlng=es&nrm=iso
- Choi, S., & Chung, M. H. (2003). A review on the relationship between aloe vera components and their biologic effects. *Seminars in Integrative Medicine*, 1(1), 53–62. [https://doi.org/10.1016/S1543-1150\(03\)00005-X](https://doi.org/10.1016/S1543-1150(03)00005-X)
- Damián-Reyna, A. A., González-Hernández, J. C., Maya-Yescas, R., de Jesús Cortés-Penagos, C., & del Carmen Chávez-Parga, M. (2017). Polyphenolic content and bactericidal effect of Mexican Citrus limetta and *Citrus reticulata*. *Journal of Food Science and Technology*, 54(2), 531–537. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2498-7>
- Dhaouadi, K., Raboudi, F., Funez-Gomez, L., Pamies, D., Estevan, C., Hamdaoui, M., & Fattouch, S. (2013). Polyphenolic Extract of Barbary-Fig (*Opuntia ficus-indica*) Syrup: RP-HPLC-ESI-MS Analysis and Determination of Antioxidant, Antimicrobial and Cancer-Cells Cytotoxic Potentials. *Food Analytical Methods*, 6(1), 45–53. <https://doi.org/10.1007/S12161-012-9410-X>
- Domínguez-Fernández, R. N., Arzate-Vázquez, I., Chanona-Pérez, J. J., Welti-Chanes, J. S., Alvarado-González, J. S., Calderón-Domínguez, G., Garibay-Febles, V., & Gutiérrez-López, G. F. (2012). El gel de *Aloe vera*: estructura, composición química, procesamiento, actividad biológica e importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(1), 23–43. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382012000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- FAO. (2018). *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. <http://www.fao.org/home/es/>
- Ferro, V. A., Bradbury, F., Cameron, P., Shakir, E., Rahman, S. R., & Stimson, W. H. (2003). In Vitro Susceptibilities of *Shigella flexneri* and *Streptococcus pyogenes* to Inner Gel of *Aloe barbadensis* Miller.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47(3), 1137.
<https://doi.org/10.1128/AAC.47.3.1137-1139.2003>

Gille, E., Macovei, I., & Miron, A. (2022). Essential oils and their components as sensitizers of multidrug resistant bacteria. *Evidence-Based Validation of Herbal Medicine: Translational Research on Botanicals*, 797–810.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85542-6.00030-5>

Hablemosdelcampo. (2018). *Agricultura Moderna :: ¿Quiénes trabajan en el campo mexicano?*
<https://www.hablemosdelcampo.com/quienes-trabajan-en-el-campo-mexicano/>

Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, 96(2–3), 67–202.
[https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(02\)00298-X](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(02)00298-X)

Heggors, J. P., Cottingham, J., Gusman, J., Reagor, L., McCoy, L., Carino, E., Cox, R., & Zhao, J. G. (2002). The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent: II. Mechanism of action and in vitro toxicity. *Journal of Alternative and Complementary Medicine (New York, N. Y.)*, 8(3), 333–340.
<https://doi.org/10.1089/10755530260128023>

Hernandez, A., Ibieta, S. R., Habana, L., Habana, L., Biol, L., & Habana, L. (2014). *Desarrollo de una leche fermentada probiótica con jugo de Aloe vera* Development of a probiotic fermented milk with Aloe vera juice. XXXV(1), 81–98.

Hernandez, J., & Giraldo, J. (2011). *ESTUDIO BROMATOLÓGICO Y MICROBIOLÓGICO AL MUCILAGO DE Aloe vera Y FERTILIDAD DE LOS SUELOS DE CULTIVOS DE LOS MUNICIPIOS DE GUÁTICA Y MISTRATÓ DEL DEPARTAMENTO DE RISARALDA*. INAES. (2017). *Las mejores frutas se cultivan en México | Instituto Nacional de la Economía Social | Gobierno | gob.mx*. Sagarpa.
<https://www.gob.mx/inaes/es/articulos/las-mejores-frutas-se-cultivan-en-mexico>

Jia, Y., Zhao, G., & Jia, J. (2008). Preliminary evaluation: The effects of Aloe ferox Miller and Aloe

arborescens Miller on wound healing. *Journal of Ethnopharmacology*, 120(2), 181–189.
<https://doi.org/10.1016/J.JEP.2008.08.008>

Juneja, V. K., Dwivedi, H. P., & Yan, X. (2012). Novel natural food antimicrobials. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 381–403.
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV-FOOD-022811-101241>

Knorr, D., Froehling, A., Jaeger, H., Reineke, K., Schlueter, O., & Schoessler, K. (2011). Emerging technologies in food processing. In *Annual review of food science and technology* (Vol. 2, pp. 203–235). Annual Reviews.
<https://doi.org/10.1146/annurev.food.102308.124129>

Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S. I., & Lee, Y. C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, 339(1), 69–72.
<https://doi.org/10.1016/J.AB.2004.12.001>

Olaleye, M., Olaleye, M., & Bello-Michael, C. (2011). Comparative antimicrobial activities of aloe vera gel and leaf. *African Journal of Biotechnology*, 4(12), 1413–1414. <https://doi.org/10.4314/ajb.v4i12.71436>

PALACIOS-ESPINOSA, F., ESCOBEDO-HINOJOSA, W., & ROMERO, I. (2011). PANORAMA ACTUAL DEL ESTUDIO DE LAS PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTI-Helicobacter pylori. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 14(1), 51–61.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43219047006>

Papetti, A. (2012). Isolation and characterization of antimicrobial food components. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 23, Issue 2, pp. 168–173).
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.09.001>

Pritam, A., & Kale, P. G. (2007). Alteration in the antioxidant potential of Aloe vera due to fungal infection. *Plant Pathology Journal*, 6(2), 169–173.
<https://doi.org/10.3923/PPJ.2007.169.173>

Ramachandra, C. T., & Srinivasa Rao, P. (2008). Processing of Aloe Vera Leaf Gel: A Review.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 3(2), 502–510.
<https://doi.org/10.3844/AJABSSP.2008.502.510>

Reynolds, T., & Dweck, A. C. (1999). Aloe vera leaf gel: a review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 68(1–3), 3–37. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00085-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00085-9)

Sandoval-Montemayor, N. E., García, A., Elizondo-Treviño, E., Garza-González, E., Alvarez, L., & Del Rayo Camacho-Corona, M. (2012). Chemical composition of hexane extract of *Citrus aurantifolia* and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of some of its constituents. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 17(9), 11173–11184.
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES170911173>

Sarkar, D., & Shetty, K. (2014). Metabolic stimulation of plant phenolics for food preservation and health. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5(1), 395–413. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-FOOD-030713-092418>

Tai-Nin Chow, J., Williamson, D. A., Yates, K. M., & Goux, W. J. (2005). Chemical characterization of the immunomodulating polysaccharide of Aloe vera L. *Carbohydrate Research*, 340(6), 1131–1142.
<https://doi.org/10.1016/J.CARRES.2005.02.016>

Vollmerhausen, T. L., Ramos, N. L., Dzung, D. T. N., & Brauner, A. (2013). Decoctions from *Citrus reticulata* Blanco seeds protect the uroepithelium against *Escherichia coli* invasion. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(2), 770–774.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.09.050>

Yuharmon, N. A. S., Mohamed, N. M., Chong, F. K., & Cheong, K. Y. (2018). Scanning electron microscopy of soxhlet extracted aloe vera gel for electrolyte application. *Journal of Physics: Conference Series*, 1123(1).
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/1123/1/012070>

Zhang, W., Jiang, S., Qian, D., Shang, E. X., & Duan, J. A. (2014). Determination of metabolism of neohesperidin by human intestinal bacteria by UPLC-Q-TOF/MS. *Chromatographia*, 77(5–6), 439–445.
<https://doi.org/10.1007/S10337-014-2625-9/METRICS>

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

NANOPARTÍCULAS DE C-FICOCIANINA: AUTOENSAMBLADO, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

Moises Galindo-Pérez¹, Marcia Morales-Ibarría¹, Dolores Reyes-Duarte¹, Andrés Hernández-Arana², José Campos-Terán¹, Izlia Arroyo-Maya^{1*}

¹ Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa, Santa Fe Cuajimalpa, C.P. 05348, México.

² Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Iztapalapa CDMX, 09340, México.

Correo electrónico: iarroyo@cua.uam.mx

Resumen

La tendencia actual para la obtención de productos farmacéuticos y alimenticios requiere el uso de materiales naturales, biodegradables y/o amigables con el ambiente. La C-ficocianina derivada de *Desertifilum tharense* UAM-C/S02 ha demostrado poseer alta actividad antioxidante, además, presenta diferentes actividades biológicas y puede servir como colorante natural. Sin embargo, se degrada fácilmente debido a los cambios en las condiciones ambientales. Para evitar la degradación de la C-ficocianina y mejorar su vida útil, se requiere su encapsulación directa en nanopartículas biopoliméricas. Por lo que el objetivo de este trabajo fue desarrollar y caracterizar nanopartículas de proteína de suero de leche (WPI) y pectina para la encapsulación de C-ficocianina. Asimismo, se evaluó su actividad antioxidante medida por ABTS y DPPH y su estabilidad frente al almacenamiento y a los cambios de pH y temperatura. Los resultados mostraron que las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina tuvieron tamaños de partícula de 463 nm con índice de polidispersidad de 0.2, potencial zeta de -39 mV y una eficiencia de encapsulación del 87%. La actividad antioxidante medida por ABTS y DPPH fue 4.9 y 2.2 veces menor que la del extracto libre, respectivamente, indicando la protección de los grupos antioxidantes de la C-ficocianina. Durante 70 días de almacenamiento no se evidenciaron cambios importantes en la coloración. La estabilidad de las nanopartículas frente al pH fue máxima a un pH de 4.0. A temperaturas de calentamiento menores de 60 °C se pueden mantener las características de la C-ficocianina. Por lo tanto, el método de autoensamblado usando WPI y pectina fue adecuado para integrar, proteger y estabilizar a la C-ficocianina, lo que hace posible su aplicación tecnológica en diferentes áreas de interés tales como salud y alimentos.

Palabras clave: nanotecnología, microalgas, c-ficocianina, ABTS, DPPH, estabilidad

Abstract

The current trend for obtaining pharmaceutical and food products requires the use of natural, biodegradable, and/or environmentally friendly materials. C-phycoerythrin derived from *Desertifilum tharense* UAM-C/S02 has shown to possess high antioxidant activity. Additionally, it exhibits various biological activities and can serve as a natural dye. However, it degrades easily due to changes in environmental conditions. To prevent the degradation of C-phycoerythrin and enhance its shelf life, its direct encapsulation into biopolymeric nanoparticles is required. Therefore, the objective of this study was to develop and characterize whey protein isolate (WPI) and pectin



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



nanoparticles for the encapsulation of C-phycoerythrin. In addition, their antioxidant activity was measured by ABTS and DPPH assays, and their stability against storage and changes in pH and temperature were evaluated. The results showed that C-phycoerythrin/WPI-pectin nanoparticles had particle sizes of 463 nm with a polydispersity index of 0.2, a zeta potential of -39 mV, and an encapsulation efficiency of 87%. The antioxidant activity evaluated by ABTS and DPPH was 4.9 and 2.2 times lower than that of the free extract, respectively, indicating the protection of the antioxidant groups of C-phycoerythrin. During 70 days of storage, no significant changes in coloration were observed. The stability of the nanoparticles against pH was maximum at a pH of 4.0. C-phycoerythrin characteristics can be maintained at heating temperatures below 60 °C. Therefore, the self-assembly method using WPI and pectin was suitable for integrating, protecting, and stabilizing C-phycoerythrin, making its technological applications in different areas of interest such as health and foods.

Key words: nanotechnology, microalgae, C-phycoerythrin, ABTS, DPPH, stability

Introducción

Las proteínas derivadas de microalgas como las ficocianinas, dentro de las cuales destaca la C-ficocianina, han ganado interés debido a sus propiedades benéficas para la salud. La estructura tridimensional de la C-ficocianina incluye a las subunidades α y β , ambas con estructura de α -hélice y pesos moleculares entre 10-19 kDa y 14- 21 kDa, respectivamente (Ashaolu et al., 2021). Puede presentarse en cuatro formas estructurales diferentes, monomérica trimérica, hexamérica y decamérica dependiendo de las condiciones externas como el pH, la fuerza iónica y la concentración de proteínas (Chen et al., 2022; Romay et al., 2003). Tiene un componente no proteico llamado ficocianobilina que actúa como un grupo cromóforo y es responsable de su color.

Una de las características distintivas de la C-ficocianina es su color azul brillante con diferentes

tonalidades, lo que la hace apta para ser utilizada como colorante natural en una gran diversidad de alimentos (Kuddus et al., 2015). Dentro de la actividad biológica que poseen este tipo de proteínas, resalta su capacidad para actuar como agentes antiinflamatorios, antidiabéticos, inmunomoduladores, antioxidantes e inducir la apoptosis de células cancerosas (Patel et al., 2022). Recientemente se ha caracterizado la cepa *Desertifilum tharense* UAM-C/S02 respecto a su producción de biomasa, fijación de CO₂ y producción de C-ficocianina, donde se observó que la C-ficocianina purificada tiene una elevada capacidad antioxidante (Hernández-Martínez et al., 2023).

Sin embargo, la C-ficocianina puede degradarse debido a diversos factores fisicoquímicos, por ejemplo, cambios de temperatura, pH, presencia de oxígeno, etc. (Yuan et al., 2022), lo cual limita sus aplicaciones

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

tecnológicas tanto en el campo de la salud como de alimentos. A temperaturas inferiores de 45 °C la C-ficocianina no presenta cambios importantes; sin embargo, al incrementarse la temperatura, su vida media disminuye exponencialmente (Adjali et al., 2022). También las modificaciones del pH, tanto alcalinos como ácidos, producen la desnaturalización de la proteína (Li et al., 2022b). La exposición de la C-ficocianina a los espectros ultravioleta y visible, también generan cambios conformacionales que son influenciados por la longitud de onda y la intensidad de la luz (Yuan et al., 2022). Los cambios que ocurren en la C-ficocianina por efecto de las modificaciones de las condiciones ambientales, tienen un impacto negativo en sus propiedades funcionales y tecnológicas.

La nanotecnología es una alternativa para la estabilización fisicoquímica de este tipo de proteínas. Los sistemas nanoparticulados incluyen a las partículas sólidas, los liposomas, los sistemas coloidales, las fibras, los dendrímeros, etc., que son capaces de atrapar, integrar o encapsular física o químicamente a las proteínas. La característica principal de estos sistemas es su tamaño (1-1000 nm) y pueden proteger a la C-ficocianina y mejorar su estabilidad física y química. Además son plataformas que pueden generar una liberación controlada de la C-ficocianina, potencializando sus propiedades funcionales (Li et al., 2022a).

Por lo que este trabajo presenta los resultados obtenidos de la preparación y caracterización de nanopartículas de C-ficocianina derivada de

cianobacterias (*Desertifilum tharense* UAM-C/S02). Específicamente, se evaluaron las propiedades físicas (tamaño, índice de polidispersidad, morfología y carga superficial), químicas (actividad antioxidante, porcentaje de inhibición de radicales libres y eficiencia de encapsulación) y su estabilidad (frente al pH y a la temperatura) de las nanopartículas ensambladas a partir de C-ficocianina con otras proteínas (WPI) y carbohidratos (pectina).

Materiales y métodos

Materiales

La proteína aislada de suero de leche (WPI) se adquirió de Davigco Foods International Inc. La pectina cítrica (alrededor de 80% de grado de metoxilación) se adquirió de Sigma-Aldrich®. La C-ficocianina fue extraída de *Desertifilum tharense* UAM-C/S02 de acuerdo con el protocolo descrito por Hernández-Martínez et al. (2023). Todos los demás reactivos utilizados fueron grado analítico.

Preparación de las nanopartículas de WPI-pectina y C-ficocianina/WPI-pectina

Las nanopartículas de WPI-pectina (sin C-ficocianina) fueron fabricadas mediante el método de complejación iónica propuesto por Arroyo-Maya & McClements (2015), con algunas modificaciones. Brevemente, se prepararon soluciones *stock* de WPI y pectina a una concentración de 1 y 0.5% (p/v), respectivamente, en agua Mili-Q® y con agitación magnética a 500 rpm. Ambas dispersiones fueron mezcladas hasta una

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

concentración final de 0.5% de WPI y 0.25% de pectina. La mezcla resultante fue calentada a 90 °C usando un baño de agua (BM-40T, BG-PRONALAB, México) por 5 minutos para provocar la desnaturalización y agregación de las proteínas globulares. Después, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se ajustó el pH a 4.0 usando HCl 0.1 M, provocando el autoensamblaje de las nanopartículas. La dispersión fue almacenada en refrigeración a 2.5 °C.

Las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina fueron preparadas siguiendo la misma metodología con la diferencia que después del proceso de calentamiento y enfriamiento de la mezcla de WPI-pectina, se agregaron 5 mL de C-ficocianina (0.45 mg/mL) bajo agitación magnética por 10 min. Finalmente, el pH de la dispersión fue ajustado a 4.0 con HCl 0.1 M y las nanopartículas fueron almacenadas en refrigeración.

Caracterización de las nanopartículas

Tamaño de partícula (TP) e índice de polidispersidad (IPD)

El TP y el IPD de los nanosistemas con y sin C-ficocianina fueron determinados mediante la técnica de dispersión dinámica de luz usando un Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, R.U.). Antes de la medición, cada dispersión de nanopartículas fue diluida 10 veces con agua Mili-Q®. El TP e IPD se midieron por triplicado.

Potencial zeta (ζ)

La carga superficial de las nanopartículas de cada sistema fue obtenida por el movimiento electroforético de las partículas en dispersión usando un Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, R.U.). Similarmente, antes de la medición las dispersiones fueron diluidas 10 veces. Las mediciones se realizaron por triplicado.

Eficiencia de encapsulación (%EE)

El %EE fue determinado mediante la cuantificación de la C-ficocianina no encapsulada. Para este propósito, una alícuota C-ficocianina/WPI-pectina fue centrifugada (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Germany) a 10000 rpm por 20 min. Posteriormente se midió la absorbancia del sobrenadante obtenido a las longitudes de onda de 280 (proteína), 620 (C-ficocianina) y 650 nm (aloficocianina) usando un espectrofotómetro (Evolution 300 UV-visible Spectrophotometer, Thermo Fischer, EE. UU.). La concentración de C-ficocianina fue calculado usando el coeficiente de extinción molar descrito por Soni et al., (2006), con la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de C - ficocianina (mg mL}^{-1}\text{)} = \frac{(OD_{620} - 0.7 OD_{650})}{7.38} \quad (1)$$

Y el %EE fue calculado como sigue:

$$EE (\%) = \frac{[C\text{-ficocianina}_{Total}] - [C\text{-phycoyanin}_{sobrenadante}]}{[C\text{-ficocianina}_{Total}]} \quad (2)$$



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Las determinaciones del %EE se hicieron por triplicado.

Actividad antioxidante de las nanopartículas de WPI-pectina y C-ficocianina/WPI-pectina

Actividad antioxidante medida con 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6 ácido sulfónico (ABTS)

El radical catiónico ABTS^{•+} se generó mezclando una solución de ABTS (7 mM) con persulfato de potasio (concentración final de 2.45 mM) en agitación magnética durante 12 horas. La solución se diluyó con etanol hasta obtener una absorbancia de 0.70 a una longitud de onda de 734 nm (Evolution 300 UV-visible Spectrophotometer, Thermo Fischer, EE. UU.). Después, se tomaron 950 µL de esta solución, se mezclaron con 50 µL de la muestra (nanopartículas de WPI-pectina, C-ficocianina/WPI-pectina o el extracto de C-ficocianina) y se agregaron 1000 µL de etanol. Posteriormente, se realizó la incubación de la mezcla durante 30 min a 25 °C en la oscuridad y se midió la absorbancia a 734 nm. Para el sistema blanco se omitió la adición de la muestra, y se adicionaron 50 µL de etanol.

Los resultados fueron expresados en función a la capacidad antioxidante equivalente al Trolox[®] (TEAC, por sus siglas en inglés). Para este fin se determinó la disminución de la absorbancia del radical ABTS en función de la concentración de Trolox[®] (0-300 µM), calculándose el % de inhibición de la siguiente manera:

$$\% \text{ de inhibición} = \left[1 - \left(\frac{A_F}{A_0} \right) \right] \times 100 \quad (3)$$

Donde A_F es la absorbancia medida a las diferentes concentraciones de Trolox[®]; y A_0 es la absorbancia del sistema blanco (0 µM). Finalmente, se construyó una curva patrón del % de inhibición en función de la concentración de Trolox[®] ($y = 0.209x - 0.268$; $R^2 = 0.995$). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Actividad antioxidante medida por el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

Para evaluar la actividad antioxidante medida por el método de DPPH, se preparó una solución de DPPH (100 mM) en etanol y se colocó en la oscuridad durante 2 h. Las determinaciones se realizaron en un tubo forrado con aluminio para evitar su exposición a la luz se adicionaron 790 µL de etanol, 185 µL de la muestra (nanopartículas de WPI-pectina, C-ficocianina/WPI-pectina o el extracto de C-ficocianina) y 600 µL de la solución de DPPH. La mezcla se mantuvo en la oscuridad durante 30 min a 25 °C. Pasado este tiempo, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm (Evolution 300 UV-visible Spectrophotometer, Thermo Fischer, EE. UU.). Las mediciones se hicieron por triplicado.

Estabilidad de las nanopartículas de C-ficocianina encapsulada durante el almacenamiento



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



Para evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento en la degradación de la C-ficocianina se comparó la degradación de la C-ficocianina nanoencapsulada en función de una solución acuosa de C-ficocianina a la misma concentración, que fueron almacenadas a 4 °C durante 70 días. Se determinó la concentración del extracto acuoso a los 0, 18 y 70 días. Los resultados fueron expresados como media y desviación estándar de tres repeticiones. Además, se registró el aspecto visual mediante fotografías.

Estabilidad de las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina frente a los cambios del pH

Para evaluar la estabilidad de las nanopartículas frente a las modificaciones del pH, se determinó variando el pH (2-9) de un lote de nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina usando HCl (0.1 M) o NaOH (0.1 M). cada dispersión se caracterizó de acuerdo con su TP, IPD y ζ usando un Zetasizer Nano-ZS como se mencionó anteriormente.

Estabilidad térmica de las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina

La estabilidad térmica de las nanopartículas con C-ficocianina se determinó de la siguiente manera: se diluyeron 5 mL de dispersión de nanopartículas con agua Mili-Q® acidificada (pH de 4.0). La mezcla se colocó a diferentes temperaturas (20, 40, 60, 80 y 90 °C) en un baño de agua con control de temperatura durante 60 min. Después cada una de las dispersiones

sometidas a tratamiento térmico fueron evaluadas en términos del TP, ζ y su apariencia visual.

Análisis estadístico

Todas las mediciones se realizaron por triplicado y los datos fueron expresados como el promedio y la desviación estándar. Para evaluar la significancia, se realizó un análisis estadístico ANDEVA y las diferencias entre medias se determinaron con una prueba de Tukey por medio del software estadístico Minitab® (versión 17, Minitab® Inc., Pensilvania, EE. UU.).

Resultados y discusión

Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de WPI-pectina y C-ficocianina/WPI-pectina

Tamaño de partícula, índice de polidispersidad potencial zeta y eficiencia de encapsulación

En condiciones de neutralidad y después del calentamiento, se exponen los grupos cargados negativamente del núcleo de la β -lactoglobulina del WPI y los grupos carboxilato del ácido galacturónico de la pectina. Cuando el pH es ajustado (pH=4.0), las proteínas de WPI externan las cargas positivas y la pectina sus cargas negativas, lo que produce interacciones electrostáticas (Salminen & Weiss, 2014) capaces de atrapar a la C-ficocianina. La **Tabla 1** muestra las características fisicoquímicas de las nanopartículas fabricadas con WPI y pectina como

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

biopolímeros y la C-ficocianina como material encapsulante.

Los TP de los nanosistemas biopoliméricos variaron entre 350 y 470 nm siendo significativamente ($p < 0.05$) más grandes las nanopartículas de C-ficocianina que las nanopartículas sin carga. Estas diferencias son atribuibles a las interacciones entre la C-ficocianina y los biopolímeros usados. Las proteínas del WPI puede fuertemente interactuar con la estructura α -helicoidal de la C-ficocianina (Zhang et al., 2021) produciendo una alta eficiencia de encapsulación (%EE $\approx 87\%$), al mismo tiempo, los grupos carboxilo de la pectina interactúan con los grupos positivos del WPI y la C-ficocianina, en consecuencia el tamaño de partícula incrementa.

Las nanopartículas de WPI-pectina y C-ficocianina/WPI-pectina presentaron un IPD por debajo de 0.3. El análisis ANDEVA no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$). Las nanopartículas biopoliméricas preparadas tienen un comportamiento monomodal con una distribución de tamaños estrecha y con una clara tendencia al tamaño de partícula promedio.

También la **Tabla 1** muestra la carga superficial medida por el ζ de las nanopartículas de WPI-pectina con y sin C-ficocianina. El ζ para las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina fue mucho mayor que el ζ de las nanopartículas de WPI-pectina. El análisis ANDEVA mostró diferencias estadísticamente significativas entre los sistemas, lo que es atribuido a las interacciones entre la C-ficocianina, las proteínas del WPI y la pectina, disminuyendo la cantidad de grupos cargado negativamente en la superficie de las partículas y con ello el aumento en el valor del ζ .

La carga negativa es producto de los grupos carboxílicos del ácido galacturónico de la pectina que son exhibidos durante la fabricación de las nanopartículas y contribuyen a la carga promedio del sistema (Kotchabhakdi & Vardhanabhuti, 2020). Además, la carga promedio de la superficie de las partículas es menor a los -20 mV, esto indica que los nanosistemas preparados tienen una buena estabilidad física, dado que las nanopartículas tienen una menor tendencia a agregarse o a flocular debido a las fuerzas electrostáticas repulsivas encontradas en la superficie de las partículas (Gülseren et al., 2012).

Tabla 1: Características fisicoquímicas de las nanopartículas de WPI-pectina y C-ficocianina/WPI-pectina

Sistema	TP (nm)	IPD	ζ (mV)	EE (%)
Nanopartículas de WPI-pectina	356.82 \pm 8.47 ^a	0.22 \pm 0.01 ^a	-39.62 \pm 1.75 ^a	----
Nanopartículas de C-Ficocianina/WPI-pectina	463.23 \pm 4.02 ^b	0.20 \pm 0.01 ^a	-24.50 \pm 0.90 ^b	87.29 \pm 0.55

^{a,b} Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



Actividad antioxidante de las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina

La evaluación de la actividad antioxidante de las nanopartículas de C-ficocianina es importante para establecer el efecto del proceso de fabricación sobre la conservación de las propiedades funcionales de los compuestos encapsulados. La **Figura 1** muestra las actividades antioxidantes determinadas con los radicales ABTS (**Figura 1a**) y DPPH (**Figura 1b**).

La **Figura 1a** representa la actividad antioxidante de las nanopartículas de WPI-pectina con y sin C-ficocianina y el extracto de C-ficocianina, medidos por la metodología de ABTS y expresados como equivalente a Trolox®, donde se muestra que el extracto libre (no encapsulado) de la C-ficocianina presenta la mayor actividad antioxidante, alcanzando valores de 319 ± 6.85 TEAC. Las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina y WPI-pectina tuvieron valores de capacidad antioxidante de 65.34 ± 13.36 y 17.72 ± 10.34 , respectivamente. El análisis estadístico ANDEVA presentó diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

La **Figura 1b** muestra la actividad antioxidante determinada por DPPH de las nanopartículas comparadas con el extracto no encapsulado. En este caso las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina tuvieron un % de inhibición de 27.99 ± 5.08 y las nanopartículas de WPI-pectina de 12.66 ± 4.01 , mientras que, el extracto de C-ficocianina tuvo el mayor % de inhibición (61.69 ± 2.64). El análisis

estadístico ANDEVA también presentó diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

La actividad antioxidante mostrada para las nanopartículas de WPI-pectina es debido a que el WPI está compuesto principalmente por β -lactoglobulina que ha demostrado una actividad antioxidante dependiente de la concentración, siendo capaz de inhibir al radical catiónico ABTS producto de la presencia de aminoácidos con actividad antioxidante como Tyr, Lys, Arg, Cys, Met e His; y péptidos antioxidantes como YVEEL, MHIRL, y WYSLAMAASDI (Hernández-Ledesma et al., 2008; Zhang et al., 2013), que componen a la proteína.

Por otra parte, las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina tienen una actividad antioxidante mayor a las nanopartículas de WPI-pectina, pero inferior al extracto libre. De acuerdo con investigaciones previas, la proteína C-ficocianina extraída de la cepa *Desertifilum tharense* UAM-C/S02 presentó una inhibición del radical ABTS del 100% (Hernández-Martínez et al., 2023). Sin embargo, la reducción en la capacidad antioxidante de las nanopartículas conteniendo C-ficocianina es atribuido a que la C-ficocianina quedó atrapada casi por completo en el interior de las nanopartículas (%EE $\approx 87\%$); por lo tanto, los grupos que producen la actividad antioxidante en la C-ficocianina quedan enmascarados por los biopolímeros, atenuando su actividad.

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

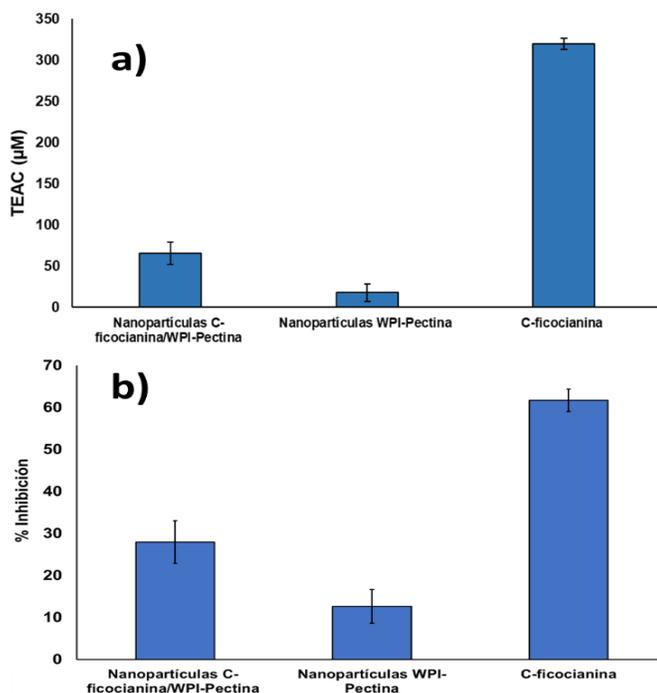


Figura 1: Actividad antioxidante de las nanopartículas y el extracto de C-ficocianina. a) actividad antioxidante medida por ABTS; b) actividad antioxidante medida por DPPH

Estabilidad de las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina en almacenamiento

Diversas aplicaciones de las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina en múltiples áreas requieren que las proteínas tengan buena estabilidad física, es decir, que no sufran fenómenos de inestabilidad coloidal y que la C-ficocianina mantenga sus propiedades físicas, químicas y funcionales por largos periodos de tiempo. Por ejemplo, como aditivo colorante en alimentos se requiere que el color azul de la C-ficocianina permanezca durante toda la vida útil del producto. La **Figura 2** muestra las características visuales de la C-ficocianina en dispersión acuosa

comparada con las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina almacenadas en refrigeración durante 70 días.

En el almacenamiento la dispersión acuosa de C-ficocianina se degradó en un tiempo relativamente corto. En el día 18 se perdió el 90% de la C-ficocianina, y para el día 70, hubo una pérdida del 100% de la proteína, lo que indica que la degradación de la C-ficocianina ocurre a una velocidad elevada, disminuyendo sus aplicaciones tecnológicas y sus propiedades funcionales.

Por otra parte, la C-ficocianina nanoencapsulada con WPI-pectina como biopolímeros, mostró una menor

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

velocidad de degradación, ya que el color azul permaneció a lo largo de los 70 días de almacenamiento, mejorando con ello, las propiedades funcionales y tecnológicas de la C-ficocianina. Por lo tanto, se demostró que la nanotecnología y en particular la nanoencapsulación es una herramienta

muy útil para proteger a los compuestos bioactivos sensibles a las condiciones ambientales. Además, las nanocápsulas de C-ficocianina/WPI-pectina se pueden fabricar y almacenar durante 70 días para una multitud de aplicaciones incluyendo productos farmacéuticos, cosméticos y alimenticios.

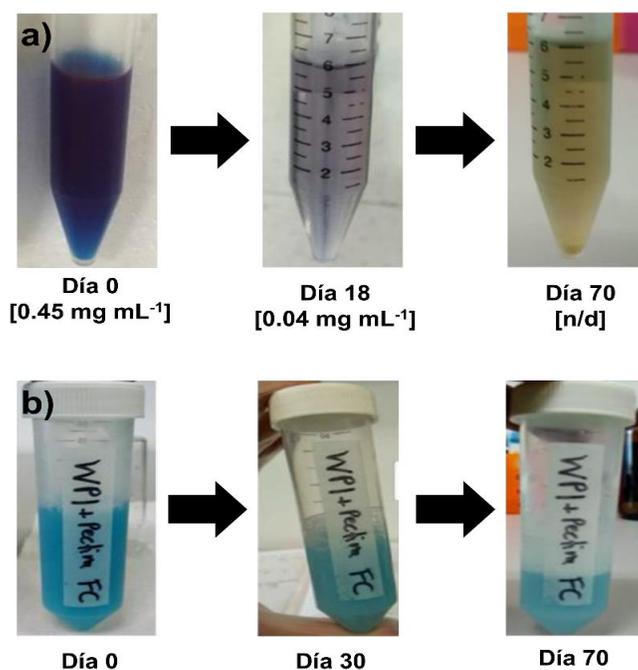


Figura 2: Aspecto visual de: a) dispersión acuosa de la C-ficocianina y b) nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina durante 70 días en almacenamiento refrigerado

Estabilidad de las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina frente a variaciones del pH

Los estudios de estabilidad de las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina frente a cambios en la acidez o alcalinidad del medio, son indispensables dadas las diferentes aplicaciones tecnológicas en las áreas farmacéutica y alimentaria. La **Tabla 2** muestra

el comportamiento en el TP, PDI y ζ de las nanopartículas de WPI-pectina cargadas con C-ficocianina sometidas a variaciones en las condiciones del pH. El análisis estadístico ANDEVA mostró un efecto significativo ($p < 0.05$) del pH sobre las características fisicoquímicas de las nanopartículas.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



El TP disminuyó con el aumento del pH desde 462 a 272 nm a pH de 2.0 y 9.0, respectivamente, encontrando los valores más pequeños a un pH entre 4.0 y 5.0. El IPD decreció desde 0.42 a 0.22 a valores de pH de 2.0 y 4.0, respectivamente. Luego aumenta gradualmente a medida que el pH se incrementa hasta un valor máximo de 9.0, mostrando una alta variabilidad en las mediciones, producto de la alta inestabilidad de las nanopartículas en condiciones alcalinas.

A valores de pH por arriba de 5.5, todos los polímeros se encuentran cargados negativamente, a medida que se incrementa el pH se producen los efectos de descomplejación de la nanoestructura promovidos por la repulsión electrostática entre los biopolímeros y la C-ficocianina; por lo tanto, se genera una alta variabilidad en los tamaños de las partículas y en el IPD. Este efecto también ha sido observado por Arroyo-Maya & McClements (2015), en nanopartículas de antocianinas/WPI-pectina evaluadas a diferentes condiciones de pH, donde se demostró que con el incremento en el valor de pH se provoca la agregación de las nanopartículas debido a la descomplejación entre la WPI y la pectina, por lo tanto, se obtiene una mayor variación en el TP.

El ζ de las nanopartículas de C-ficocianina muestra un comportamiento descendente, encontrándose los valores más cercanos a cero cuando la acidez del medio es muy baja. A medida que se incrementa el valor del pH, decrece la carga superficial de las nanopartículas; por consiguiente, el ζ disminuye. Este

comportamiento es atribuido a los biopolímeros utilizados para fabricar las nanopartículas, por un lado, las proteínas del WPI y la C-ficocianina presentan una alta cantidad de cargas positivas en condiciones ácidas (a un pH inferior a su punto isoeléctrico), mientras que, a valores de pH superiores al punto isoeléctrico, exhiben mayoritariamente cargas negativas. Por otro lado, la cantidad de grupos carboxilo disociados en la pectina es baja a pH ácidos o por debajo del pK_a (≈ 3.5), cuando el pH aumenta, se favorece la disociación de los grupos carboxilo y se provoca la formación de grupos carboxilatos con cargas negativas (Salminen & Weiss, 2014). También, cuando el pH es mayor a 5.0 todos los biopolímeros presentan cargas negativas, generando el fenómeno de descomplejación y contribuyendo a la disminución del ζ .

La apariencia visual de las nanopartículas a diferentes valores de pH se muestra en la **Figura 3**. A un pH de 4.0 el sistema nanoestructurado presenta una apariencia más turbia que a valores de pH por arriba o por debajo donde las dispersiones se muestran traslúcidas con una evidente separación de fases. Esto es debido a que a un pH de 4.0, todos los componentes, tanto proteínas como el polisacárido, interaccionan fuertemente entre sí y logran un sistema con buena estabilidad; mientras que, a valores de pH diferentes de 4.0, la estabilidad de las dispersiones es menor como producto de los cambios de las cargas superficiales de las biomoléculas y los efectos de la descomplejación del WPI y la pectina.

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Tabla 2: Cambios en el tamaño, IPD y potencial zeta de las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina a diferentes condiciones de pH

Muestra	TP (nm)	IPD	ζ (mV)
pH 2	462.30 \pm 25.73 ^a	0.46 \pm 0.05 ^a	-2.56 \pm 0.55 ^a
pH 3	530.00 \pm 12.31 ^a	0.51 \pm 0.03 ^a	-7.57 \pm 0.30 ^b
pH 4	211.57 \pm 5.28 ^b	0.22 \pm 0.07 ^b	-14.20 \pm 0.75 ^c
pH 5	193.27 \pm 3.00 ^b	0.28 \pm 0.02 ^c	-26.77 \pm 0.64 ^d
pH 6	208.40 \pm 19.07 ^b	0.41 \pm 0.03 ^d	-32.20 \pm 3.10 ^e
pH 7	255.77 \pm 12.63 ^b	0.45 \pm 0.04 ^d	-30.00 \pm 1.90 ^e
pH 9	271.93 \pm 116.51 ^b	0.55 \pm 0.20 ^e	-35.63 \pm 1.99 ^f

^{a,b,c,d,e,f} Las letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas.



Figura 3: Estabilidad física de las nanodispersiones de C-ficocianina/WPI-pectina a diferentes condiciones de pH

Estabilidad térmica de las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina

La **Figura 4** muestra el aspecto visual de las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina sometidas a diferentes temperaturas (0 a 90 °C) durante 60 min. A bajas temperaturas (0 y 20 °C) los sistemas presentaron un aspecto turbio con una coloración azul intenso por la conservación de las

propiedades de la C-ficocianina. Cuando se aumenta la temperatura, la coloración azul desaparece gradualmente. En el sistema con calentamiento a 40 °C se observó una ligera degradación de la C-ficocianina; mientras que, a 60 °C existe una mayor degradación de la proteína, pero se mantiene un ligero color azul en la dispersión. A la temperatura de calentamiento de 80 °C se degrada la C-ficocianina casi en su totalidad, observándose en la imagen un

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

ligero tono azul en el sistema. Finalmente, para la temperatura de calentamiento a 100 °C hay una pérdida total del color azul de la C-ficocianina.

De acuerdo con diferentes estudios, la degradación de la C-ficocianina es prácticamente nula o muy bajas a temperaturas inferiores a los 45 °C. Mientras que, a temperaturas más altas, la velocidad de degradación térmica está directamente relacionada con el aumento de la temperatura (Adjali et al., 2022; Antelo et al., 2008). Resultados similares fueron reportados por

Braga et al. (2016), para nanofibras cargadas con C-ficocianina, donde se encontró un aumento en la vida media y una disminución significativa en la tasa de degradación térmica de la proteína.

Estos resultados demuestran que la integración de la C-ficocianina en las nanoestructuras de WPI-pectina puede ayudar a preservar sus propiedades físicas, químicas, sensoriales y funcionales en productos que requieran algún tratamiento térmico durante su producción, por ejemplo, los alimentos pasteurizados.



Figura 4: Apariencia visual de las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-Pectina después del tratamiento térmico durante 60 min a diferentes temperaturas

Conclusiones

La técnica de autoensamblado por medio de complejación electrostática usando WPI y pectina como biopolímeros es útil para la obtención de sistemas nanométricos, monodispersos, estables y es capaz de incorporar moléculas solubles en agua como la C-ficocianina con alta eficiencia. Además, la nanoencapsulación enmascaró los grupos antioxidantes de la C-ficocianina, disminuyendo su

actividad antioxidante, pero protegiendo a la biomolécula.

Con respecto a la estabilidad, las nanocápsulas de C-ficocianina no presentaron diferencias considerables en la coloración durante 70 días de almacenamiento refrigerado, manteniendo con ellos sus propiedades físicas, químicas, sensoriales y funcionales. También se observó la máxima estabilidad a un pH de 4.0 donde existe una excelente integración entre los



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

componentes de las nanopartículas. Finalmente, con la nanoencapsulación se lograron mantener las características de la C-ficocianina frente a diferentes condiciones de calentamiento.

Por lo tanto, la nanoencapsulación usando WPI y pectina como biopolímeros encapsulantes es de gran utilidad para proteger a diferentes compuestos como la C-ficocianina, lo que hace posible su aplicación tecnológica en diversas áreas de interés como la farmacéutica, cosmética y alimenticia.

Agradecimientos

Galindo-Pérez agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca posdoctoral otorgada.

Referencias

Adjali A, Clarot I, Chen Z, Marchioni E & Boudier A (2022) Physicochemical degradation of phycocyanin and means to improve its stability: A short review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 12(3): 406–414. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2021.12.005>.

Antelo FS, Costa JAV & Kalil SJ (2008) Thermal degradation kinetics of the phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochemical Engineering Journal* 41(1): 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.03.012>.

Arroyo-Maya IJ & McClements DJ (2015) Biopolymer nanoparticles as potential delivery systems for anthocyanins: Fabrication and properties. *Food Research International* 69: 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.005>.

Ashaolu TJ, Samborska K, Lee CC, Tomas M, Capanoglu E, Tarhan Ö, Taze B & Jafari SM (2021) Phycocyanin, a super functional ingredient from algae; properties, purification characterization, and applications. *International Journal of Biological Macromolecules* 193: 2320–2331.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.064>.

Braga ARC, Figueira FS, Silveira JT, Morais MG, Costa JAV & Kalil SJ (2016) Improvement of thermal stability of C-phycocyanin by nanofiber and preservative agents. *Journal of Food Processing and Preservation*. 40(6): 1264–1269.

<https://doi.org/10.1111/jfpp.12711>.

Chen H, Qi H & Xiong P (2022) Phycobiliproteins—A family of algae-derived biliproteins: Productions, characterization and pharmaceutical potentials. *Marine Drugs*. 20(7): 1–21.

<https://doi.org/10.3390/md20070450>.

Gülseren I, Fang Y & Corredig M (2012) Complexation of high methoxyl pectin with ethanol desolvated whey protein nanoparticles: Physico-chemical properties and encapsulation behaviour. *Food and Function*. 3(8): 859–866. <https://doi.org/10.1039/c2fo10235h>.

Hernández-Ledesma B, Recio I & Amigo L (2008) β -Lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Amino Acids*. 35(2): 257–265.

<https://doi.org/10.1007/s00726-007-0585-1>.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Hernández-Martínez I, González-Resendiz L, Sánchez-García L, Viguera-Ramírez G, Arroyo-Maya IJ & Morales-Ibarria M (2023) C-phycoerythrin production with high antioxidant activity of a new thermotolerant freshwater *Desertifilum tharense* UAM-C/S02 strain. *Bioresource Technology*. 369: 128431. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128431>.

Li Y, Li X, Liang ZP, Chang XY, Li FT, Wang XQ & Lian XJ (2022a) Progress of microencapsulated phycoerythrin in food and pharma industries: A review. *Molecules*. 27(18): 5854. <https://doi.org/10.3390/molecules27185854>.

Li Y, Zhang Z & Abbaspourrad A (2022b) Improved pH stability, heat stability, and functionality of phycoerythrin after PEGylation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 222: 1758–1767. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.261>.

Kotchabhakdi A & Vardhanabhuti B (2020) Formation of heated whey protein isolate-pectin complexes at pH greater than the isoelectric point with improved emulsification properties. *Journal of Dairy Science*. 103(8): 6820–6829. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17745>.

Kuddus M, Singh P, Thomas G & Ali A (2015) Production of C-phycoerythrin and its potential applications. In: *Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and Applications*. Gupta V,

Tuohy MG, O'Donovan A & Lohani M (eds). John Wiley & Sons, Reino Unido, 283-299.

Patel SN, Sonani RR, Roy D, Singh NK, Subudhi S, Pabbi S & Madamwar D (2022) Exploring the structural aspects and therapeutic perspectives of cyanobacterial phycobiliproteins. *3 Biotech*. 12(9): 1–15. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03284-2>.

Romay C, González R, Ledón N, Ramirez D & Rimbau V (2003) C-phycoerythrin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory, neuroprotective effects. *Current Protein and Peptide Science*. 4(3): 207–216. <https://doi.org/10.2174/1389203033487216>.

Salminen H & Weiss J (2014) Effect of pectin type on association and pH stability of whey protein-pectin complexes. *Food Biophysics*. 9(1): 29–38. <https://doi.org/10.1007/s11483-013-9314-3>.

Soni B, Kalavadia B, Trivedi U, & Madamwar D (2006) Extraction, purification and characterization of phycoerythrin from *Oscillatoria quadripunctulata* – Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. *Process Biochemistry*. 41(9): 2017–2023. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.04.018>.

Yuan B, Li Z, Shan H, Dashnyam B, Xu X, McClements DJ, Zhang B, Tan M, Wang Z & Cao C (2022) A review of recent strategies to improve the physical stability of phycoerythrin. *Current Research in Food Science*. 5: 2329–2337. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.11.019>.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Zhang QX, Wu H, Ling YF & Lu RR (2013) Isolation and identification of antioxidant peptides derived from whey protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and Q-TOF MS. *Journal of Dairy Research*. 80(3): 367–373.

<https://doi.org/10.1017/S0022029913000320>.

Zhang S, Zhang Z, Dadmohammadi Y, Li Y, Jaiswal A & Abbaspourrad A (2021) Whey protein improves the stability of C-phycoerythrin in acidified conditions during light storage. *Food Chemistry*. 344: 128642.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128642>.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

CULTIVO *in vitro* DE *Raphinus raphanistrum*, UNA PLANTA QUE PUEDE SER USADA EN FITORREMEDIACIÓN PARA CADMIO

Hernández-Salas, Claudia*¹; Olarte-Saucedo, Maricela²; Moreno-Longoria, Julieta²; Meza-Lamas, Esteban¹; Flores-Treviño, Noria Elia¹

Autor de correspondencia: Julieta Moreno Longoria (julietalex@hotmail.com)

¹Unidad Académica de Enfermería, de la Universidad Autónoma de Zacatecas

²Unidad Académica de Ciencias Químicas, de la Universidad Autónoma de Zacatecas

Resumen

La contaminación del suelo con metales pesados (MPs) es un grave problema ambiental y de salud pública. El impacto causado por exposición prolongada a MPs resulta alarmante. Para solucionar este existe la fitorremediación, la cual utiliza plantas para el saneamiento de suelos. Desarrollar un cultivo *in vitro* de *Raphanus raphanistrum*. Se determinó la concentración de cadmio (Cd) por Espectroscopia de Absorción Atómica en tejido vegetal y suelo. Para el desarrollo del cultivo *in vitro*, se llevó a cabo la desinfección de semillas y para la etapa de germinación se usó el medio Murashigue y Skoog. Después se pasó a la etapa de multiplicación, donde se tuvieron diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal (RCV), así como diferentes tratamientos para el enraizamiento. La planta presentó altas concentraciones de Cd, 4.69 de factor de bioconcentración (FBC). El porcentaje de germinación fue del 100%. En la etapa de multiplicación se obtuvieron mejores resultados en el tratamiento 7, mientras que en la etapa de enraizamiento el tratamiento 3 generó mejores resultado. En la etapa de aclimatación el 100% de las plantas sobrevivieron. La fitorremediación es una técnica que puede ser usada para recuperar sitios contaminados con MPs en el Estado de Zacatecas, ya que existen plantas que han sido identificadas como plantas que acumulan altas concentraciones de MPs, específicamente la planta *Raphanus raphanistrum*, ya que presentó un FBC de 4.69 para Cd y además puede ser cultivada *in vitro* para su propagación.

Palabras clave: Raphinus raphanistrum, fitorremediación, cultivo in vitro.

Abstract

Soil contamination with heavy metals (MPs) is a serious environmental and public health problem. The impact caused by prolonged exposure to PMs is alarming. To solve this, there is phytoremediation, which uses plants for soil sanitation. Develop an *in vitro* culture of *Raphanus raphanistrum*. The concentration of cadmium (Cd) was determined by Atomic Absorption Spectroscopy in plant tissue and soil. For the development of the *in vitro* culture, seed disinfection was carried out and the Murashigue and Skoog medium was used for the germination stage. Afterwards, the multiplication stage was carried out, where different treatments with plant growth regulators (RCV) were used, as well as different treatments for rooting. The plant presented high concentrations of Cd, 4.69 bioconcentration factor (BCF). The germination percentage was 100%. In the multiplication stage, better results



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



were obtained in treatment 7, while in the rooting stage, treatment 3 generated better results. In the acclimatization stage, 100% of the plants survived. Phytoremediation is a technique that can be used to recover sites contaminated with PMs in the State of Zacatecas, since there are plants that have been identified as plants that accumulate high concentrations of PMs, specifically the *Raphanus raphanistrum* plant, since it presented a BCF of 4.69 for Cd and can also be cultivated in vitro for its propagation.

Key words: Raphanus raphanistrum, phytoremediation, in vitro culture.

Introducción

La minería es una de las principales causas de la contaminación ambiental por MPs, se debe al mal manejo de los "jales mineros", lo que ocasiona problemas de contaminación en estados como Zacatecas, San Luis Potosí, Guerrero y Sonora. Como resultado de la explotación minera, se genera continuamente gran cantidad de residuos o jales. Estos se caracterizan generalmente por presentar concentraciones muy elevadas de diversos elementos potencialmente tóxicos que pueden ser tóxicos (Sánchez-López et al. 2017). La contaminación de los suelos tiende a generar serios problemas a la salud humana y al balance local de los ecosistemas (Doležalová et al., 2019).

Los MPs son considerados según la tabla periódica como elementos químicos de alta densidad (mayor a 4 g/cm^3), masa y peso atómico por encima de 20 y son tóxicos en concentraciones bajas. Algunos de estos elementos son Aluminio (Al), berilio (Be), Cobre (Cu), Hierro (Fe), Manganeseo (Mn), Cadmio (Cd), Mercurio (Hg), plomo (Pb), entre otros. Estudios sobre su concentración en suelos con uso agrícola son importantes debido a que puede generar efectos negativos en la salud humana (Cherian 2005).

Los MPs ocupan el quehacer del hombre en diversas ramas, por lo que no es de extrañar la prevalencia de enfermedades asociadas a estos elementos químicos y a sus compuestos. Las vías fundamentales de entrada de estos químicos al organismo, son las vías dérmicas, por ingestión y por inhalación. La exposición a algunos metales pesados ha sido asociada a una gran variedad de efectos adversos sobre la salud, incluyendo el cáncer. Aunque algunos elementos son esenciales para los humanos, pueden ser peligrosos a altos niveles de exposición. Otros MPs resultan muy nocivos al no ser degradados fácilmente de forma biológica, ya que no poseen funciones metabólicas específicas para los seres vivos (García-García et al., 2015).

La fitorremediación es un tratamiento in situ o ex situ que consiste en aprovechar el potencial de especies vegetales capaces de absorber, acumular, volatilizar, estabilizar o metabolizar diversos contaminantes, en este caso, metales pesados presentes en el suelo (Lozada-Ayala, 2020). La fitorremediación es un método de descontaminación de suelos y de ambientes acuáticos que consiste específicamente en el uso de plantas para remover contaminantes

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

del medio en el que estas se desarrollan; también es conocida como fitolimpieza o fitocorrección. En el caso de su aplicación en suelos el uso de plantas resulta en una técnica que ofrece ventajas, ya que los MPs son tomados del suelo a través de los tejidos corticales de las raíces gracias a la similitud con algunos micronutrientes especiales, adoptando el sistema simplástico o apoplástico hasta llegar a los vasos del xilema, y acumularse en diferentes partes de la planta. Dentro del campo de la fitorremediación hay numerosas áreas: Fitoestabilización, fitovolatilización, fitodegradación, fitoextracción, rizofiltración, rizodegradación y fitorestauración además del uso que se puede hacer de las plantas como barreras protectoras y capas vegetales (Sarwar, 2017).

La fitorremediación representa una tecnología alternativa rentable, viable y sustentable para la restauración de ambientes y efluentes contaminados que ha ganado mucha atención y aceptación en los últimos años por su enfoque ecológico (Shah, 2020). Las especies vegetales que son capaces de acumular en sus tejidos altas cantidades de elementos metálicos (Ni, Cu, Co, Cr, Mn y Zn, entre otros) se denominan hiperacumuladoras (González, *et al.*, 2020).

El descubrimiento de especies de plantas hiperacumuladoras ha revolucionado la tecnología de fitorremediación ya que estas plantas tienen una capacidad innata para absorber el metal en niveles 50-500 veces mayor que plantas promedio. Las primeras plantas hiperacumuladoras caracterizadas son

miembros de las familias Brassicaceae y Fabaceae. El entorno de las plantas hiperacumuladoras revela la necesidad de impulsar mayores conocimientos multidisciplinarios que aumenten la rentabilidad y eficacia de dichas plantas: sus aplicaciones son interesantes en muchas áreas, y particularmente importantes en la protección del ambiente (Lasat, 2000).

Para saber si una planta es hiperacumuladora se debe conocer el factor de bioconcentración (FBC), el cual se refiere a la relación entre la concentración de un metal que hay en la planta y su concentración en el suelo y se utiliza como una medida de la eficiencia de acumulación de metales. Los valores mayores a 1 indican que las especies son potencialmente acumuladoras, es decir, que la planta está almacenando y acumulando el metal evaluado en sus tejidos. Además, cuando este valor es mayor a 10 se identifica a la planta como hiperacumuladora (Torres-Saavedra, 2018).

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica biotecnológica que comprende el mantenimiento de plantas o componentes de estas en condiciones ambientales controladas, ausencia de microorganismos asociados, nutrición muchos aspectos del desarrollo agrícola y la investigación vegetal (Suárez, 2020). Debe considerarse como una herramienta capaz de predecir lo que pueda ocurrir a nivel de planta, desarrollando modelos que faciliten el conocimiento de los mecanismos metabólicos y de tolerancia de los contaminantes que funcionan en las



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

plantas. Básicamente, el uso del cultivo *in vitro* en estudios de fitorremediación se centra en tres aspectos: i) estudios fundamentales del metabolismo de contaminantes; ii) selección de variantes somaclonales con mayor capacidad de fitorremediación; iii) desarrollo de plantas transgénicas con elevada capacidad de fitorremediación (Doran, 2009).

Objetivo

Determinar el factor de bioconcentración (FBC) para cadmio y desarrollo de cultivo *in vitro* de *Raphanus raphanistrum*, una planta que puede ser usada para fitorremediación.

Materiales y métodos

Se llevó a cabo la colecta de la planta y semillas de la especie *Raphanus raphanistrum*, la cual se encontraba presente en campos agrícolas de Lampotal Vetagrande Zacatecas. La colecta de esta especie vegetal se realizó durante el mes de abril del año 2019 para su identificación taxonómica en el herbario de la Unidad Académica de Agronomía de la Universidad Autónoma de Zacatecas. La determinación de Cd en muestras de suelo y tejido vegetal de la especie en estudio se realizó en el laboratorio de Análisis Especiales de la Unidad Académica de Ciencias Químicas de la misma Universidad. Las muestras se analizaron por el método establecido: (NMX- AA- 051-SCFI- 2016) de Espectrometría de Absorción Atómica con soluciones estándar certificadas para este elemento. Se determinaron por duplicado. Se tomaron

alícuotas de 50 a 100 ml de agua en un matraz de aforo y se acidularon con H_2NO_3 . Para determinar Cd las muestras se leyeron en un equipo de Absorción Atómica marca Perkin Elmer Modelo 2380. Se llevó a cabo la determinación del FBC, el cual consistió en dividir la concentración de Cd presente en la raíz de la planta sobre la concentración total en el suelo.

Para el desarrollo del cultivo *in vitro* las semillas se colectaron durante el mes de septiembre del mismo año y se procedió a relizar el cultivo *in vitro* en el laboratorio de cultivos vegetales. Para llevar a cabo la desinfección de semillas se utilizó el método de Murashigue & Skoog (1962), dicho procedimiento consistió en lavar el material con detergente, enjuagar con agua de la llave y enseguida con agua destilada. Posteriormente, en campana de flujo laminar se colocó en una solución de etanol al 70% durante 1 min, luego enjuagadas con agua desionizada estéril y puestas en una solución al 10% (p/v) de hipoclorito de sodio comercial de 20-30 min.

Una vez desinfectadas las semillas de la planta en estudio, se llevó a cabo la transferencia de las semillas al medio de cultivo. Se colocaron de 3-5 semillas en un recipiente de vidrio que contenía medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con: tiamina-HCl $1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$; mio-inositol $100\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ piridoxina-HCl $0.5\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$; nicotinamida $0.5\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$; glicina $2\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$; sacarosa $30\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$; agar $8\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, 6-bencilaminopurina (BAP) $1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$; el pH se ajustó a 5.7 y se esterilizó a 121°C por 15 min y enseguida se llevó al cuarto de incubación en donde se mantuvieron a una temperatura promedio de $25 \pm 3^\circ\text{C}$, con una



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



intensidad lumínica de $50 \pm 5 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con un foto periodo de 16 hrs luz por 8 hrs de oscuridad. Una vez obtenidas las plántulas, éstas fueron usadas para la fase de multiplicación, donde se tuvieron diferentes tratamientos con RCV con la finalidad de obtener un gran número de plántulas en un corto periodo de tiempo (tabla 1). Se utilizaron explantes que se obtuvieron en la fase de germinación de aproximadamente de 3-4 cm y se realizaron subcultivos. Para esto, los brotes de la etapa anterior se colocaron en una placa de Petri estéril y dentro de

la campana de flujo laminar, con ayuda de un bisturí y pinzas estériles se realizaron los cortes para obtener brotes por separado, una vez realizados los cortes, fueron colocados en medio de cultivo MS, suplementado con RCV para la regeneración de más brotes. Se evaluó la cantidad de nuevos explantes obtenidos a partir de cada explante inicial. Éste fué evaluado visualizando en la campana de flujo laminar la cantidad de brotes por explante (Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

Tabla 1. Tratamiento con RCV para evaluar el número de brotes por explante

Tratamiento	Medio nutritivo	BA (mg/l)	AIB (mg/l)
T ₁	MS	0	0
T ₂	MS	2	0
T ₃	MS	4	0
T ₄	MS	6	0
T ₅	MS	0	0.2
T ₆	MS	2	0.2
T ₇	MS	4	0.2
T ₈	MS	6	0.2
T ₉	MS	0	0.4

Con el propósito de inducir un sistema radical vigoroso, se probarán 3 diferentes tratamientos: 1) MS 1X sin RCV, 2) MS 0.5X sin RCV y 3) MS 1X con 0.5 mg·l⁻¹ de AIB. En el proceso de enraizamiento se evaluaron las siguientes variables: el número de raíces por explante y la longitud de la raíz (Pérez Molphe-Balch, *et al.*, 1999). En esta etapa fueron consideradas 20 vitroplantas con un sistema radicular bien desarrollado. Para esta fase, las plantas fueron

extraídas de los medios de cultivo eliminando completamente el agar de las raíces de las plántulas, enseguida se transplantaron de manera individual en vasos de plástico que contenían sustrato de una mezcla de peat most, agrolita y vermiculita. Para este procedimiento el sustrato fué humedecido con agua corriente. Los vasos con las plántulas se cubrieron con una bolsa plástica transparente ligando al vaso para evitar perder humedad. La cubierta plástica se perforó



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

diariamente durante 15 días con la finalidad de obtener una adaptación al medio ambiente.

Resultados

La planta *Raphanus raphanistrum* fue identificada taxonómicamente en el herbario de la Unidad Académica de Agronomía de la Universidad Autónoma de Zacatecas, la cual pertenece a la familia Brassicaceae y al género *Raphanus*, se conoce como rábano, rábano picante o rábano silvestre. Es una planta con más de 10 centímetros de altura, hojas ásperas, muy divididas con irregulares lóbulos donde el apical puede ser el más grande. Las flores son blanquecinas con violeta bien marcado venas, desarrolla estrangulamientos entre cada una de las semillas dándole una forma particular y florece casi todo el año. La planta colectada en los campos agrícolas de Lampotal, Veta Grande Zacatecas (figura 1), presentó un alto valor de FBC para Cd: 4.69 ppm, cabe señalar que la planta fue fraccionada en hoja, tallo y raíz como se puede observar en la figura 2 para determinar la concentración de Cd en cada una de las fracciones, y como se puede ver en la tabla 2, las cantidades en cada una de las fracciones son diferentes. En cuanto al porcentaje de germinación se obtuvo del 100% en un tiempo de 25 días y no hubo contaminación, las plantas de 30 días en medio de cultivo las podemos ver en la figura 3. De las plantas

generadas se obtuvieron explantes que fueron cultivados en el medio nutritivo MS suplementado con la combinación de la citocinina BA y la auxina AIB. Los resultados obtenidos demuestran la heterogeneidad de la multiplicación de brotes en los distintos tratamientos, así como dentro del número de repeticiones de cada tratamiento. De esta etapa de multiplicación se obtuvieron mejores resultados en el tratamiento 7 ($4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BA y $0.2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ AIB) (tabla 3), pues generó las plantas con mayor cantidad de brotes (figura 4).



Figura 1. *Raphanus raphanistrum* en campo agrícola de Lampotal Veta Grande Zacatecas

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



Figura 2. Fracciones de hoja, tallo y raíz de *Raphinus raphanistrum*

Tabla 2. Concentración de Cd en diferentes tejidos de *Raphanus raphanistrum*

TEJIDO VEGETAL	Cd (ppm)
HOJA	26.4141
TALLO	31.87997
RAÍZ	18.41882
TOTAL	76.71289

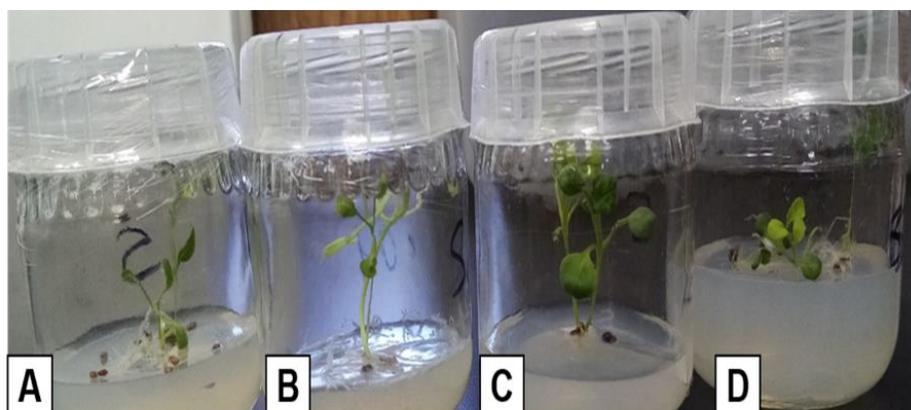


Figura 3. Etapa de germinación de *Raphinus raphanistrum*

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Tabla 3. Número de brotes por repetición con cada uno de los tratamientos con los diferentes reguladores de crecimiento.

RCV	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T1	1	2	1	2	3	3	2	1	3	1
T2	3	3	4	4	1	1	3	4	3	4
T3	2	5	5	4	5	4	2	4	3	3
T4	1	3	3	3	4	4	2	4	5	3
T5	2	3	2	2	2	2	2	1	2	2
T6	4	5	4	5	2	5	6	3	2	6
T7	4	2	5	6	5	5	6	4	6	5
T8	6	6	5	4	6	6	5	7	5	5
T9	4	1	3	2	5	3	4	2	2	2

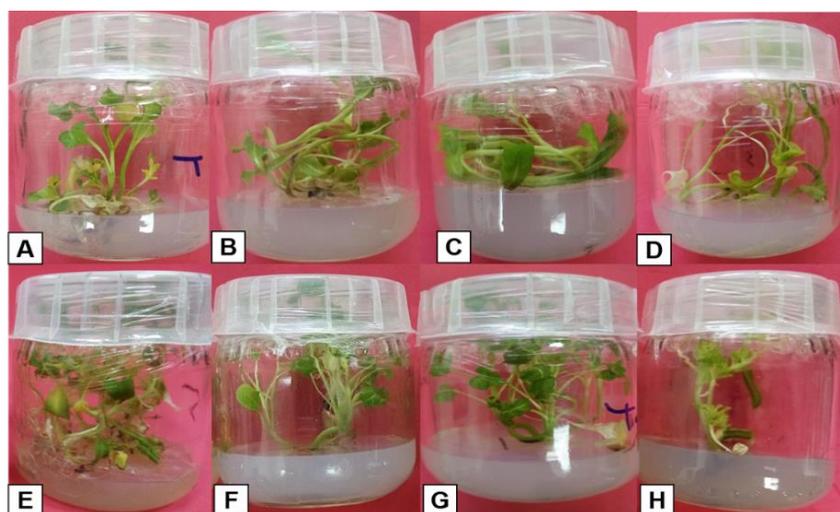


Figura 4. Diferentes tratamientos con RCV de *Raphanus raphanistrum*

Para la etapa de enraizamiento se consideraron tres tratamientos (MS 1X sin RCV, MS 0.5X sin RCV, MS 1X+0.5 AIB) y se seleccionaron como explantes las plantas más vigorosas, las cuales provenían del tratamiento T₇. Las plantas fueron segmentadas de aproximadamente 4 cm y colocadas en el medio de cultivo, empleando 10 repeticiones por tratamiento. Los resultados se registraron después de 15 semanas

de iniciada esta etapa. Las raíces se observaron en todos los tratamientos de manera muy heterogénea en cuanto al tamaño y cantidad. Los resultados obtenidos de este proceso se indican en la tabla 4. El tratamiento 3 generó la mayor cantidad de raíces, así como raíces más largas y vigorosas, lo cual se puede observar en la figura 5. En la etapa de aclimatación el 100% de las plantas sobrevivieron (figura 6).

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Tabla 4. Número de raíces de las vitroplantas por repetición en cada tratamiento.

Tratamiento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MS 1X	8	6	4	3	6	4	6	5	3	6
MS 0.5X	17	15	11	10	8	10	15	13	15	11
MS 1X+ 0.5 AIB	12	16	18	16	14	11	18	16	17	15



Figura 5. Raíz de *Raphinus raphanistrum* con el tratamiento 3 de la etapa de enraizamiento



Figura 6. Aclimatación de *Raphinus raphanistrum*

Discusión

Hoy en día, la contaminación con MPs a consecuencia

de la industria minera es una problemática ambiental que vivimos a nivel mundial y que requiere atención



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



emergente. Muchas investigaciones fundamentan la capacidad de los distintos organismos para acumular, atenuar o degradar diversos tipos de contaminantes. Por ello, la fitorremediación es una alternativa para poder solucionar esta problemática ambiental. Recientemente, se ha demostrado que la utilización de plantas puede ser una estrategia para solucionar el problema de la contaminación por MPs. Estas plantas pueden responder con bastante rapidez a los niveles de metales fitotóxicos en los suelos. Las plantas con estas características suelen encontrarse en estos sitios, tal como la especie *Raphanus raphanistrum*, la cual fue encontrada en los campos agrícolas de Lampotal Vetragrande Zacatecas y que mediante ciertos estudios se comprobó que es una planta con un alto FBC para Cd, ya que tiene un valor alto (4.69 ppm) y pudiera usarse con fines de fitorremediación. Esta misma especie de planta ha demostrado ser hiperacumuladora de plomo, tal y como lo demostró Pino-Vallejo et al., 2021.

Así como esta planta existen otras, por ejemplo Flores-Tavison et al. (2003) reportaron algunas especies que crecen en suelos contaminados por arsénico en Chihuahua, México. Carrillo y González-Chávez (2006) reportaron a *Polygonum aviculare* L. y a *Jatropha dioica* como acumuladoras de zinc. Armienta et al. (2008) registró a *Prosopis leavigata* L. y *Acacia farnesiana* (L.) Willd., en suelos ricos con arsénico en Zimapán, Hidalgo. En base a lo anterior, resulta interesante poder propagar esta especie con la finalidad de recuperar sitios contaminados con MPs,

en este estudio el cultivo *in vitro* de esta planta se obtuvo con éxito, ya que se llegó hasta la etapa de aclimatación con excelentes resultados. Esto puede dar pie a una propagación de la planta con la finalidad de remediar los sitios de Lampotal, Vetragrande Zacatecas. Cabe señalar que la propagación *in vitro* permite también evaluar de una manera más sencilla y controlada la capacidad de respuesta de las plantas ante diversos factores de estrés, por ejemplo la presencia de MPs. Esto debido a que los mismos pueden ser incorporados al medio de cultivo en cantidades precisas con el fin de analizar la respuesta de la planta ante los mismos ([Di Lonardo et al., 2011](#); [Ashrafzadeh y Leung, 2015](#)).

Conclusión

La contaminación por MPs es un grave problema a nivel mundial, sin embargo, existen técnicas de biorremediación que pueden ayudar a solucionar esta problemática, tal es el caso de la fitorremediación, la cual es una técnica que puede ser usada para recuperar sitios contaminados con MP, ya que estas plantas toleran altas concentraciones de estos metales. Se pudo observar que *Raphanus raphanistrum* es una especie de planta que presenta un FBC de 4.69 para Cd y además puede ser cultivada *in vitro* para su propagación. El desarrollo de cultivo *in vitro* de *Raphanus raphanistrum* es viable, por lo que consideramos que podría propagarse esta especie vegetal y ser usada para fines de investigación, ya que se encuentra en campos agrícolas de Lampotal, Vetragrande, Zacatecas, una zona que reporta altas



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

concentraciones de MPs. En base a la respuesta de la planta, podría confrontarse de manera *in vitro* ante otros MPs para ver su comportamiento bajo condiciones controladas.

Referencias bibliográficas

- Armienta MA, Ongley LK, Rodríguez R, Cruz O, Mango H, Villaseñor G (2008) Arsenic distribution in mesquite (*Prosopis laevigata*) and huizache (*Acacia farnesiana*) in the Zimapán mining area, México. *Geochemistry: Exploration, Environment, Analysis* 8: 1-7. doi:<https://doi.org/10.1144/1467-7873/07-144>
- Ashrafzadeh S, Leung D M W (2015) In Vitro breeding of heavy metal-resistant plants: A review. *Horticulture, Environment and Biotechnology* 56(2):131-136. doi:<https://doi.org/10.1007/s13580-015-0128-8>
- Carrillo-González R, González-Chávez MCA (2006) Metal accumulation in wild plants surrounding mining wastes. *Environmental Pollution* 144: 84-92. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.01.006>
- Cherian SO (2005). Transgenic plants in phytoremediation: recent advances and new possibilities. *Environmental Science & Technology* 39: 9377-9390. doi:<https://doi.org/10.1021/es051134l>
- Di Lonardo S, Capuana M, Arnetoli M, Gabrielli R. y Gonnelli C. (2011) Exploring the metal phytoremediation potential of three *Populus alba* L. clones usign an in vitro screening *Environmental Science and Pollution Research*. 18:82-90. doi:<https://doi.org/10.1007/s11356-010-0354-7>.
- Doležalová, H.; Mihočová, S.; Chovanec, P.; Pavlovský, J. 2019. Potential Ecological Risk and Human Health Risk Assessment of Heavy Metal Pollution in Industrial Affected Soils by Coal Mining and Metallurgy in Ostrava, Czech Republic. *International journal of environmental research and public health* 16(22): 4495.
- Doran P (2009) Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: incentives and limitations. *Biotechnol. Bioeng.*, 103:60-76. doi:<https://doi.org/10.1002/bit.22280>
- Flores-Tavison E, Alarcón-Herrera MT, González ES, Olgún EJ (2003) Arsenic tolerating plants from mine sites and hot springs in the semi Arid region of Chihuahua, México. *Acta biotechnol* 23: 113-119. doi:<https://doi.org/10.1002/abio.200390016>
- García-García N, Pedraza-García J, Montalvo J, Martínez M, Leyva J (2015) Evaluación preliminar de riesgos para la salud humana por metales pesados en las bahías de Buenavista y San Juan de los Remedios, Villa Clara, Cuba. *Revista Cubana de Química*, 24(2):126-35.
- González A, Reyes Fernández D, Rodríguez Alonso R, Menéndez Álvarez E. (2020). Plantas que acumulan metales, su importancia. *Leucocroton havanensis* Borhidi hiperacumuladora de



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

níquel. *Revista De Investigaciones De La Universidad Le Cordon Bleu*, 6(2), 7-18.

<https://doi.org/10.36955/RIULCB.2019v6n2.001>

Lasat MM (2000) Phytoextraction of metals from contaminated soil: a review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. *Journal Hazardous Substance Research* 2: 1-25. doi: <https://doi.org/10.4148/1090-7025.1015>

Lozada-Ayala, A.C. (2020). Fitorremediación como alternativa para la remoción de metales pesados en el recurso suelo en Colombia. Universidad de Cundinamarca.

<https://repositorio.ucundinamarca.edu.co>

Murashige T, Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.

Pérez Molphe B, Ramírez- Malagón E, Núñez Palenius HG. (1999). *Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales*. (1ra. ed.). Universidad Autónoma de Aguascalientes, México.

Pino Vallejo MV, Román Latorre AM, Haro Robayo MP, Andrade Orozco AP, Perugachi Cahueñas NP (2021). Tratamiento de lodos contaminados con plomo utilizando la especie vegetal *Raphanus Raphanistrum*. *Revista de Investigación TALENTOS*, 8(2), 68-77.

Sánchez-López AS, González-Chávez MCA, Carrillo-González R (2017). Absorber, Inmovilizar o atrapar: Funciones de las plantas en las remediaciones de sitios contaminados por elementos potencialmente tóxicos. *Agroproductividad*, 10(4): 80-86. doi:<https://doi.org/10.1002/abio.200390016>

Sarwar N, Imran M, Rashid M, Ishaque W, Asif M, Matloob A, Hussain S (2017) Chemosphere Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: Modifications and future perspectives. *Chemosphere* 171: 710–721. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.116>

Shah, V., & Daverey, A. (2020). Phytoremediation: A multidisciplinary approach to clean up heavy metal contaminated soil. *Environmental Technology and Innovation*, 18, 100774. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100774>

Suarez-Padrón I E (2020). Cultivo de tejidos vegetales. Fondo Editorial Universidad de Córdoba, Cra. Torres Saavedra, A. M. (2018). Factor de bioconcentración y traslocación de especies altoandinas para suelos contaminados con metales pesados provenientes de la planta concentradora de Mesapata, en condiciones de invernadero, 2015 – 2016. Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo, 2018, Huaraz. <http://repositorio.unasam.edu.pe/handle/UNASAM/2110>



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO SÓLIDO DE *Origanum sp.* Y SU POSIBLE USO COMO CONSERVADOR EN UN PRODUCTO CÁRNICO

Luis Enrique Jiménez Camacho*, Ángel Alfredo Núñez Vázquez, Raquel Ortega Muñoz, Jesús Fernando Montiel Aguirre.

Depto. de Biología, Facultad de Química, C.U., U.N.A.M., Coyoacán, 04510 Ciudad de México,
enrique.p5@hotmail.com

Resumen

Las enfermedades transmitidas por los alimentos son uno de los problemas económicos y de salud pública más frecuentes en la población; la presencia de microorganismos patógenos en alimentos está considerada como una de las principales causas de enfermedades gastrointestinales. La carne puede ser frecuentemente el vehículo de tox infecciones alimentarias como consecuencia de una deficiente calidad higiénico-sanitaria. La cantidad y tipos de microorganismos presentes en un producto alimenticio puede ser utilizados para juzgar la seguridad microbiológica y calidad del producto. Por ello, ha aumentado la demanda de alimentos saludables empleando técnicas alternativas de procesamiento y conservación de alimentos. Los vegetales generan un interés creciente en los alimentos, ya que contienen compuestos activos que pueden actuar como antimicrobianos y al incorporarlos en un alimento, aumentarían la vida de almacenamiento, vida de anaquel y la seguridad alimentaria. En el presente estudio se determinó la actividad antibacteriana del extracto de tallos y hojas de la planta *Origanum sp.* empleando acetato de etilo como disolvente. Dicho extracto fue incorporado en muestras de carne molida de res con la finalidad de determinar la inhibición que puede generar en 3 grupos microbianos (bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales y mohos/levaduras). Dicho análisis se realizó de acuerdo con lo estipulado en las Normas Oficiales Mexicanas. Finalmente, se obtuvo una disminución significativa en la concentración de microorganismos, corroborada por la disminución en el conteo de UFC/g de muestra y un análisis estadístico. Por lo tanto, el extracto de *Origanum sp.* podría emplearse como un conservador en algunos productos cárnicos.

Palabras clave: extracto antimicrobiano, inhibición bacteriana, conservador de alimentos

Abstract

Foodborne diseases are one of the most frequent economic and public health problem in human population. The presence of pathogenic microorganisms in food is considered one of the main causes of gastrointestinal diseases. Meat can be a vehicle for food poisoning as a consequence of poor hygienic-sanitary quality. The quantity and types of microorganisms present in a food product can be used to judge the microbiological safety and quality of the product thus, the demand for healthy foods using alternative food processing and preservation techniques has increased. Plants are generating increasing interest in food as they contain active compounds that could act as antimicrobials and their incorporation into food would increase shelf life and food safety. In the present study the



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



antibacterial activity of the extract of stems and leaves of *Origanum* sp. using ethyl acetate as a solvent was used. This extract was incorporated into ground beef samples to determine the inhibition, if any, it could generate in 3 microbial groups (mesophilic aerobic bacteria, total coliforms, and molds/yeasts) in accordance with the provisions of the Official Mexican Standards. A significant decrease in the concentration of microorganisms was observed as measured by the decrease in the CFU/g sample count and a statistical analysis. Therefore, the extract of *Origanum* sp. could be used as a preservative in some meat products.

Key words: Antimicrobial extract, microbial inhibition, food preserver

Introducción

Durante las últimas décadas las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) han sido uno de los problemas económicos y de salud pública que se presentan con más frecuencia en la vida cotidiana de la población. Los peligros causales de las ETA pueden provenir de las diferentes etapas que existen a lo largo de la cadena alimentaria, desde la producción primaria, hasta la mesa. Las ETA son aquellas enfermedades de carácter infeccioso o tóxico, causadas por agentes (biológicos, químicos o físicos) que penetran al organismo usando como vehículo un alimento (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud [FAO et al.], 2016).

Independientemente del origen de la contaminación, una vez que este alimento llega al consumidor puede ocurrir un impacto en la salud pública y un severo daño económico a los establecimientos dedicados a su preparación y venta (FAO et al., 2016). Aunque existe un gran avance en la limitación de la contaminación de

los alimentos por patógenos, cierta contaminación es inevitable y debe controlarse (Doyle y Beuchat, 2007). Los microorganismos están respondiendo y adaptándose constantemente a sus entornos e intervenciones en la inocuidad de los alimentos por lo que el mantenimiento de la inocuidad requiere de un esfuerzo continuo (Doyle y Beuchat, 2007). La presencia de microorganismos patógenos en el suministro de alimentos está considerada como una de las principales causas de enfermedades gastrointestinales en los Estados Unidos. Sin embargo, se desconoce el alcance exacto del problema debido a la falta de gravedad de los casos y a que solo una pequeña fracción de la gastroenteritis asociada a alimentos se informa a las autoridades médicas (Buchanan, 1986).

En los últimos años se ha generado un interés internacional por mejorar la calidad microbiológica y seguridad de los alimentos. Sin embargo, para evaluar la eficacia de cualquier estrategia es necesario conocer el estado microbiológico del producto (Vanderlinde et al, 1998.). Por ello, los criterios microbiológicos se utilizan para distinguir entre



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

productos, prácticas de procesamiento y manipulación de alimentos aceptables e inaceptables. Cuando estos criterios se aplican adecuadamente, pueden ser un medio útil para garantizar la inocuidad y calidad de los alimentos lo que a su vez eleva la confianza del consumidor (Doyle y Beuchat, 2007).

En el caso de alimentos cárnicos se han puesto en práctica diversos programas. En Estados Unidos de América se han establecido requisitos aplicables a los establecimientos de carnes y aves para reducir la aparición y la cantidad de microorganismos patógenos en productos cárnicos y avícolas. Estos requisitos constan principalmente de la implementación de procedimientos operativos estándar de saneamiento (POE de saneamiento), pruebas microbiológicas periódicas, establecimiento de estándares de rendimiento de reducción de patógenos y la implementación de un programa de análisis de peligros y puntos críticos de control (APPCC) (United States Department of Agriculture [USDA], 1996). Mientras que, en México, los rastros municipales operan bajo la dirección del municipio y la Secretaría de Salud verifica los canales y sus partes mediante la aplicación de actas de verificación basadas en la normatividad vigente (Hernández et al. 2007).

La carne puede ser el vehículo de toxoinfecciones alimentarias como consecuencia de una deficiente calidad higiénico-sanitaria durante el sacrificio de los animales debido al contacto de la carne con materia fecal y polvo, o de una contaminación durante el proceso de elaboración de productos cárnicos (Hernández et al., 2007).

Existen factores intrínsecos (microbiota natural, actividad y contenido de agua, presencia de antibióticos, disponibilidad de nutrientes, pH) y extrínsecos (condiciones de almacenamiento distribución y exhibición -que consideran la temperatura y condiciones atmosféricas-) que determinan la microbiología de la carne (McDonald, 1999).

Es ampliamente documentado la participación de bacterias en el deterioro de productos cárnicos aun en bajas temperaturas. Este tipo de productos inicialmente contienen una microbiota diversa, pero al aumentar el deterioro aumenta la concentración de cierto tipo de microorganismos. (Jay et al., 2003; Ayres, 1960)

Las bacterias identificadas con mayor frecuencia en enfermedades asociadas a productos cárnicos de origen vacuno son *Salmonella spp*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus* e incluso *Escherichia coli* O157:H7. Esta última aumentó después de uno de los brotes de intoxicación alimentaria más conocidos en Estados Unidos en 1993 (Vanderlinde et al, 1998.). Las cantidades y tipos de microorganismos presentes en un producto alimenticio puede ser utilizados para juzgar la seguridad microbiológica y calidad del producto, por lo que la seguridad está determinada por la presencia o ausencia de microorganismos patógenos o sus toxinas (Doyle y Beuchat, 2007).

Los diferentes microorganismos indicadores pueden sugerir la presencia de microorganismos patógenos y un posible origen de la contaminación microbiológica.

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Los microorganismos indicadores han sido utilizados en la evaluación de los procesos de plantas cárnicas incluyendo recuentos de mesófilos aerobios, coliformes totales (Brown et al., 2000; Gill et al., 1998).

El aumento de la demanda de alimentos saludables ha llevado a muchos cambios en la calidad y seguridad de los alimentos y en la conformación actual de los ingredientes y/o componentes alimentarios. Los alimentos procesados con un mínimo de aditivos y tratamiento térmico son una tendencia creciente entre los consumidores. Esto ha llevado a la explotación de técnicas alternativas de procesamiento y conservación de alimentos (Juneja et al., 2012).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud alrededor del 80% de los habitantes del planeta cubren principalmente sus necesidades de atención primaria de salud con medicamentos tradicionales, destacando el uso de plantas (Akerlele, 1993). Los productos naturales, principalmente obtenidos de plantas, se han utilizado durante mucho tiempo como fuente de agentes terapéuticos en todo el mundo y para tratar muchas enfermedades potencialmente mortales debido a infecciones bacterianas (Newman et al., 2003; Clardy y Walsh, 2004).

Las plantas son una fuente prometedora de agentes antimicrobianos con un interés creciente en los alimentos totalmente naturales o libres de aditivos y conservadores químicos (Valtierra et al., 2010). Por lo tanto, los productos derivados de plantas, como los

aceites esenciales (EO), contienen compuestos activos que pueden actuar como antimicrobianos que, al incorporarlos en un alimento, prolongarían la vida de almacenamiento, la vida de anaquel y la seguridad alimentaria y, de esta manera, reemplazar los conservadores químicos y obtener productos de etiqueta verde (Zhou et al., 2010).

Protecta One' y 'Protecta Two' son extractos de hierbas mezclados producidos por *Bavaria Corporation* en Estados Unidos y están clasificados como aditivos alimentarios. Aunque el fabricante no da a conocer los contenidos específicos de los extractos, probablemente contienen uno o más EOs (Cutter, 2000).

Los aceites esenciales (EOs) son líquidos aceitosos aromáticos obtenidos a partir de materia vegetal como las hojas, flores, ramas, semillas frutos, raíces, etc. Van de Braak (1999, como se citó en Burt, 2004) indica que el método más empleado para la producción comercial de los aceites esenciales es la destilación por arrastre de vapor.

La farmacología, la microbiología médica y clínica, la fitopatología y la conservación de alimentos son campos en los que se pueden aplicar los aceites esenciales, Sin embargo, no se ha estudiado por completo la composición química de los aceites aplicados, ya que para su análisis detallado principalmente se emplea cromatografía de gases y espectrometría de masas (Daferera et al., 2000).



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



La diferencia en el perfil organoléptico de un EO es evidencia de una diferencia en las sustancias que son obtenidos por extracción con un disolvente y aquellos que son obtenidos por destilación por arrastre de vapor (Burt, 2004). De acuerdo con esto, al realizar una maceración las sustancias y/o compuestos que se obtienen son aquellos que comparten la misma polaridad que el disolvente y de este último, al ser evaporado, se obtiene un extracto sólido, mientras que al realizar una destilación por arrastre de vapor se obtienen compuestos que son altamente volátiles.

Los métodos de extracción pueden influir en las propiedades antimicrobianas ya que de acuerdo con lo reportado por Packiyasothy y Kyle (2002, como se citó en Burt, 2004), los extractos de algunas plantas utilizando hexano como disolvente tienen una mayor actividad antimicrobiana que los EO obtenidos por destilación por arrastre de vapor.

Dentro de los obstáculos de la etnofarmacología para la purificación de los principios activos se incluyen el aislamiento y caracterización de moléculas bioactivas en el extracto, aislamiento de compuestos bioactivos o la estandarización de extractos de plantas. Además, el fraccionamiento de los extractos produce con frecuencia una reducción o pérdida de actividad biológica por descomposición del compuesto o pérdida de efectos sinérgicos entre los constituyentes de los extractos (Cos et al., 2006).

Teniendo en cuenta la gran cantidad de sustancias que conforman a un EOs y a un extracto, lo más probable es que su actividad antibacteriana no se deba a un mecanismo en específico, sino que existen varios mecanismos (Carson et al., 2002).

Una característica importante en los EOs es en su carácter hidrofóbico que les permite introducirse entre los lípidos de la membrana celular bacteriana, perturbando las estructuras celulares. De acuerdo a lo reportado por Carson et al. (2002), se generan lesiones que aumentan la permeabilidad de la membrana y afectan la capacidad de la membrana para osmorregular adecuadamente a la célula (pérdida de material citoplasmático). También se han sugerido mecanismos en donde los hidrocarburos (incluyendo a compuestos fenólicos) contenidos en EOs y extractos de plantas podrían actuar sobre las membranas citoplasmáticas. Estos se basan en la acumulación de estas sustancias en la bicapa lipídica y la posibilidad de ocasionar distorsiones en la interacción lípido-proteína. También es posible una interacción directa de los hidrocarburos con las secciones hidrofóbicas de las proteínas interfiriendo en la regulación o síntesis de componentes estructurales de la célula (Juven et al., 1994).

La mayoría de los investigadores necesitan la concentración mínima inhibitoria como una medida del rendimiento antibacteriano de los aceites esenciales. Sin embargo, la definición de concentración mínima inhibitoria difiere entre publicaciones y este es un

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

obstáculo para realizar la comparación entre estudios (Burt, 2004). Por otro lado, la dosis necesaria para una actividad antimicrobiana eficaz a menudo supera la aceptación organoléptica (Juneja et al., 2012).

Objetivo general:

Determinar la actividad antimicrobiana del extracto de *Origanum sp.* en carne molida de res.

Objetivos particulares

- Producir inhibición bacteriana y fúngica en carne molida de res, empleando el extracto de *Origanum sp.*
- Identificar la inhibición que genera el extracto de *Origanum sp.* en microorganismos indicadores (mesófilos aerobios y coliformes totales).
- Observar la actividad antimicrobiana de 2 concentraciones del extracto *Origanum sp.* en carne molida de res.

Materiales y Metodología:

- Preparación del extracto de *Origanum sp.*

Se realizó la selección y recolección de hojas y tallos de la planta *Origanum sp.*, la cual fue cultivada en un invernadero privado al sur de la Ciudad de México. La materia vegetal recolectada fue deshidratada durante 7 días en un lugar con ausencia de luz y humedad, con una temperatura constante de 25 °C. Posteriormente, se depositó la materia vegetal seca en un contenedor de vidrio color ámbar seguido de la adición de un litro de acetato de etilo destilado y se dejó macerar durante tres días con agitación constante. Al término de este

periodo se separó mediante filtración la materia vegetal y el extracto orgánico. Este último fue concentrado (eliminación del disolvente) mediante evaporación a presión reducida empleando el equipo Büchi Rotavapor R-114. Finalmente, el extracto concentrado se depositó en un vial de vidrio ámbar y se introdujo en un horno a 27°C durante tres días hasta llevarlo a peso constante (eliminación total del disolvente). Al extracto sólido obtenido se le aplicó un proceso de granulación para la obtención de partículas de un tamaño homogéneo.

- Evaluación de actividad antimicrobiana

Se tomó una muestra representativa de carne molida de una carnicería local (sur de la Ciudad de México). Se depositaron 10 gramos de muestra en cada una de tres bolsas de plástico estériles de cierre hermético.

A la primera bolsa se le depositó 0.1 g de extracto sólido, a la segunda se le depositó 1.0 g y a la tercera bolsa no recibió ningún tratamiento con el extracto con la finalidad de emplearlo como una muestra control. Posteriormente, las muestras fueron almacenadas en refrigeración a 4°C durante 5 días. Al término de este periodo se les realizó un análisis microbiológico de acuerdo con las Normas Oficiales Mexicanas (NOM). La preparación de las muestras se realizó conforme a la NORMA Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. A cada bolsa se adicionó un volumen de 90 mL de solución reguladora de fosfatos estéril y posteriormente se introdujeron en un homogeneizador peristáltico (Stomacher) durante 2 minutos. Se permitió la



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

sedimentación en cada bolsa y la capa superior de la suspensión se transfirió por separado a un matraz estéril de 125 mL (dilución primaria o 10^{-1}).

Adicionalmente se prepararon 4 diluciones decimales a partir de la disolución primaria (10^{-2} a 10^{-5}); para cada dilución se transfirió 1 mL de la dilución anterior en un tubo de ensayo con 9 mL de solución amortiguadora de fosfatos estéril.

Para la evaluación de la actividad microbiológica se emplearon los métodos estipulados por la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa; Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa, y la Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

Los procedimientos de las tres normas son similares, por lo que cada análisis se realizó por duplicado y se transfirió 1 mL de las diluciones anteriormente preparadas en cajas de Petri estériles y se agregó 15 mL de su respectivo medio de cultivo; Agar tripton-glucosa-extracto de levadura (TGEA) para mesófilos aerobios, Agar Bilis Rojo Violeta (RVBA) para coliformes totales y Agar Dextrosa Papa (PDA) acidificado con ácido tartárico para mohos y levaduras.

Una vez adicionado el medio de cultivo, se homogeneizó con la muestra con 6 movimientos de izquierda a derecha, 6 de arriba abajo, 6 en sentido y 6 en sentido contrario de las manecillas de reloj. Una vez solidificado el medio de cultivo, en el caso de las cajas inoculadas para la cuenta de coliformes totales, se adicionó una sobre capa de 4 mL de RVBA.

Finalmente, los medios de cultivos inoculados fueron sometidos a incubación. En el caso de bacterias se incubaron a 37°C durante 36 horas y en el caso de mohos y levaduras se incubó a 25°C durante 5 días. Al final de este periodo se realizó el conteo de unidades formadoras (UFC).

Resultados y Discusión

De acuerdo con el análisis microbiológico realizado, se observó que el extracto de *Origanum sp.* disminuye la concentración de microorganismos en las muestras analizadas. De acuerdo a las figuras 1 – 6 (pág. 13 - 14) la inhibición de bacterias mesófilas aerobias y mohos/levaduras fue notoria a simple vista desde la dilución primaria. Sin embargo, en el caso de los coliformes totales, la inhibición únicamente fue perceptible durante el conteo de UFC en las cajas que contienen la dilución más alta, ya que de acuerdo con las figuras 7 – 12 (pág. 15 - 16) la inhibición no fue notoria a simple vista desde la dilución primaria.

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



Figura 1. Crecimiento de Bacterias mesofílicas aerobias en muestra control, dilución (primaria) 10^{-1} .



Figura. 2. Crecimiento de bacterias mesofílicas aerobias en muestra adicionada con 0.1 g de extracto / 10 g de muestra , dilución 10^{-1} .



Figura. 3. Crecimiento de bacterias mesofílicas aerobias en muestra adicionada con 1.0 g de extracto / 10 g de muestra , dilución 10^{-1} .

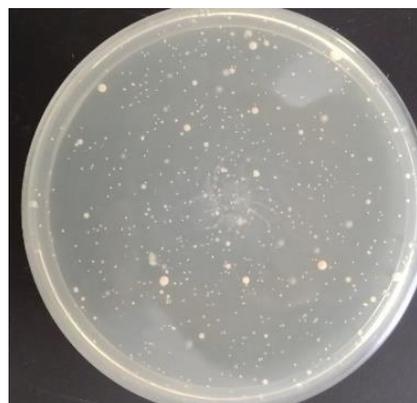


Figura 4. Crecimiento de mohos y levaduras en muestra control, dilución (primaria) 10^{-1} .

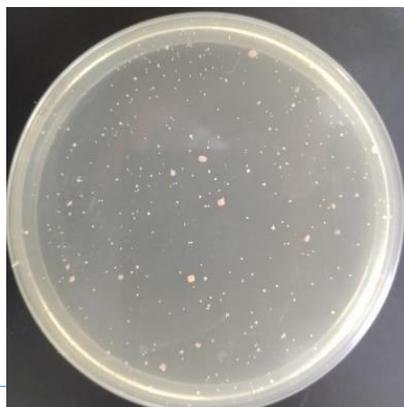


Figura 5. Crecimiento de mohos y levaduras en muestra adicionada con 0.1 g de extracto / 10 g de muestra , dilución (primaria) 10^{-1} .



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

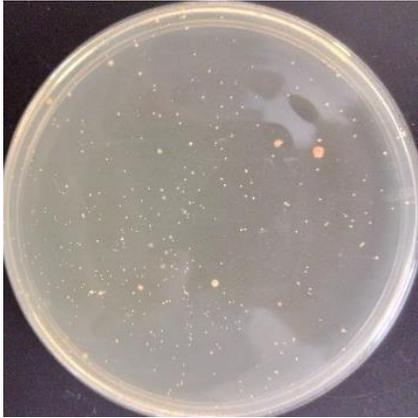


Figura 6. Crecimiento de mohos y levaduras en muestra adicionada con 1.0 g de extracto / 10 g de muestra , dilución (primaria) 10^{-1}



Figura 7. Crecimiento de coliformes totales en muestra control, dilución (primaria) 10^{-1} .

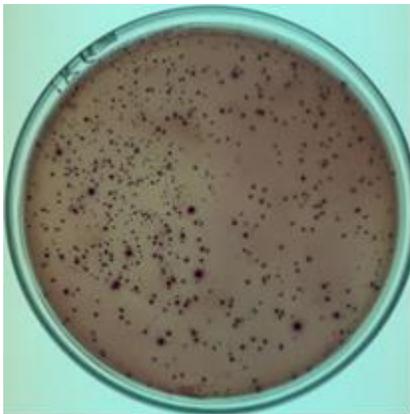


Figura 8. Crecimiento de coliformes totales en muestra adicionada con 0.1 g de extracto / 10 g de muestra, dilución (primaria) 10^{-1} .



Figura 9. Crecimiento de coliformes totales en muestra adicionada con 1.0 g de extracto / 10 g de muestra, dilución (primaria) 10^{-1} .

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

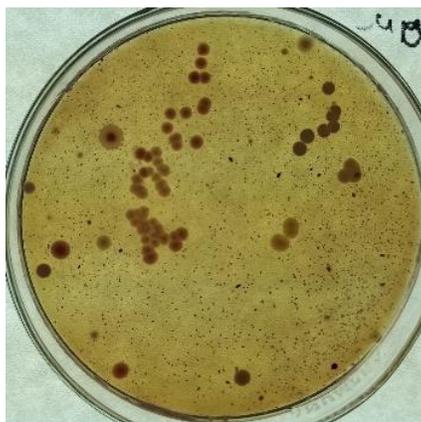


Figura 10. Crecimiento de coliformes totales en muestra control, dilución 10^{-4} .

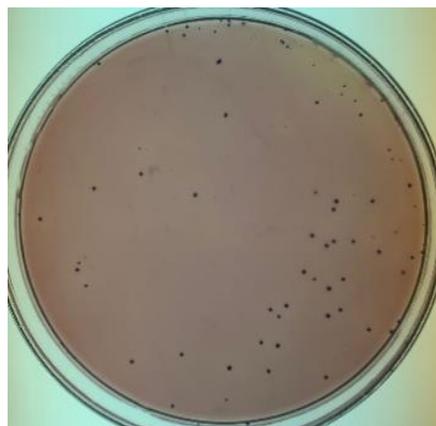


Figura 11. Crecimiento de coliformes totales en muestra adicionada con 0.1 g de extracto / 10 g de muestra, dilución 10^{-4} .

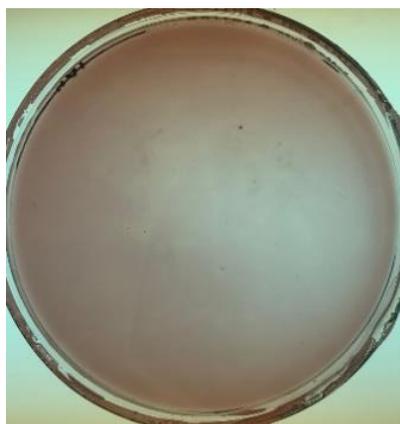


Figura 12. Crecimiento de coliformes totales en muestra adicionada con 1.0 g de extracto / 10 g de muestra, dilución 10^{-4} .

En la tabla 1 (pág.20) se registró que la concentración más alta del extracto (1.0 g de extracto / 10g de carne molida) disminuyó el orden de magnitud en la cantidad

de UFC, es decir, disminuyó la cantidad de microorganismos de millones ($>10^6$ UFC) a miles e incluso centenas ($<10^5$ UFC),

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Tabla 1: Concentración de bacterias mesofílicas aerobias presentes en las muestras analizadas de carne molida de res.

g de extracto / 10 g de muestra	UFC / g de muestra Coliformes totales en placa en agar bilis rojo violeta, incubadas a 35 ± 1.0 °C /36 h.	UFC / g de muestra de bacterias mesofílicas aerobias en placa de agar triptona-glucosa-extracto de levadura, incubadas a 35 ± 1.0 °C /36 h:	UFC / g de muestra de Mohos y Levaduras en placa en agar papa dextrosa acidificado incubadas a 25 ± 1.0 °C / 5 días
0	12×10^7 "valor estimado"	22×10^6	98×10^2
0.1	71×10^6 "valor estimado"	1 3×10^6	29×10^2
1	10×10^6	28×10^5	67×10^1

Por otro lado, se observó que al aumentar la concentración del extracto de *Origanum sp.*, la concentración de los 3 grupos de microorganismos analizados disminuyó significativamente. De acuerdo con el análisis estadístico mediante la prueba de Tukey (figuras 13 – 15 [pág. 17 - 18]), se determinó que la inhibición de los microorganismos provocada por la concentración más alta del extracto (1.0 g de extracto / 10 g de carne molida) es significativa con respecto a la muestra control. Sin embargo, el análisis estadístico no determinó una inhibición significativa de coliformes totales empleando la concentración más baja del extracto (0.1 g de extracto / 10g de carne

molida), es decir, que se requiere una concentración alta del extracto para generar la inhibición de este grupo microbiano y este grupo es menos susceptible (figura 13 [pág. 17]). En el caso de los mohos y levaduras, el análisis estadístico sugiere que no se produce una inhibición significativa entre las concentraciones del extracto utilizadas, pero sí con respecto al control (figura 14 [pág. 17]). Es decir, que este grupo microbiano es altamente sensible al extracto y por lo tanto solo se requiere de una concentración baja del mismo para generar inhibición, incluso una inhibición total. (figura 16 – 18 [pág. 19]).

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Muestra	N	Media	Agrupación
Control	2	1194	A
0.1 g de extracto	2	713.5	A
1.0 g de extracto	2	99.5	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

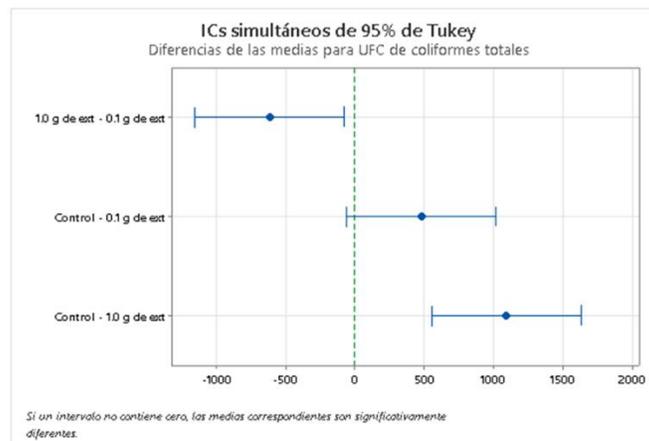


Figura 13. Comparaciones en parejas de Tukey para el análisis de coliformes totales.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Muestra	N	Media	Agrupación
Control	2	98.0	A
0.1 g de extracto	2	29.0	B
1.0 g de extracto	2	4.00	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

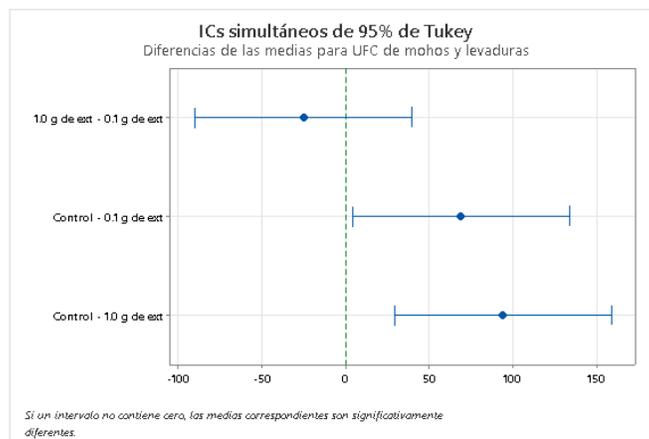


Figura 14. Comparaciones en parejas de Tukey para el análisis de mohos y levaduras.

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Muestra	N	Media	Agrupación
Control	2	217.5	A
0.1 g de extracto	2	133.5	B
1.0 g de extracto	2	28.00	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

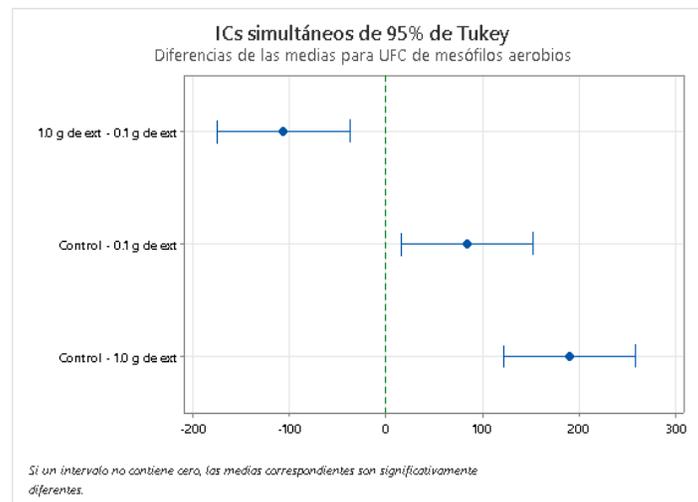


Figura 15. Comparaciones en parejas de Tukey para el análisis de mesófilos aerobios

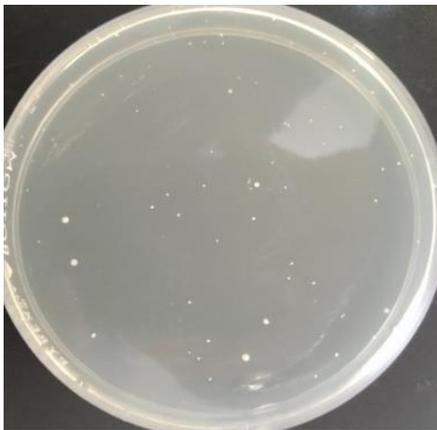


Figura 16. Crecimiento de mohos y levaduras en muestra control, dilución 10^{-3} .

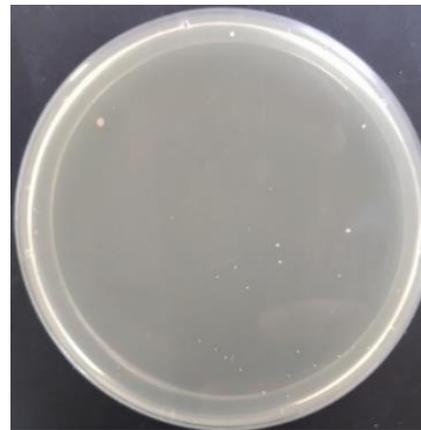


Figura 17. Crecimiento de mohos y levaduras en muestra adicionada con 0.1 g de extracto / 10 g de muestra, dilución 10^{-3} .

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

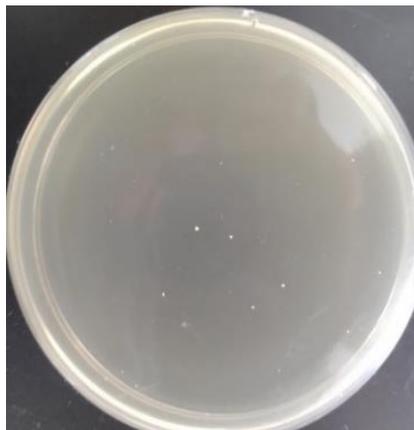


Figura 18. Crecimiento de mohos y levaduras en muestra adicionada con 1.0 g de extracto / 10 g de muestra, dilución 10^{-3} .

Finalmente, el análisis estadístico referido a las bacterias mesofílicas aerobias (figura 15 [pág.18]) indica que la inhibición provocada por la concentración más alta del extracto (1.0 g de extracto / 10g de carne molida) es significativamente mayor que la inhibición provocada por la concentración más baja del extracto (0.1 g de extracto / 10 g de carne molida).

La Norma Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2018 establece las disposiciones y especificaciones sanitarias que deben cumplir los productos cárnicos procesados y los establecimientos dedicados a su proceso. Dicha NOM indica que los productos objeto de esta Norma, deben cumplir con los siguientes límites microbiológicos: figura 19 (pág. 20).

Productos	Tipo de Microorganismos	Criterio microbiológico			
		n	c	m	M
Productos cárnicos cocidos listos para el consumo, y crudos listos para el consumo	Mesófilos aerobios*	5	3	100 UFC/g	10000 UFC/g
	<i>Escherichia coli</i>	5	3	<3 NMP/g	<10 NMP/g
	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	Ausente en 25g	-
	<i>Salmonella</i> spp	5	0	Ausente en 25g	-
Productos cárnicos precocidos y crudos no listos para el consumo	<i>Escherichia coli</i> **	5	3	500 UFC/g	5000 UFC/g
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7***,1	5	0	Ausente en 25g	-

Figura 19. Criterios microbiológicos para productos cárnicos de acuerdo a la NOM -213-SSA1-2018



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



En este análisis se puede afirmar que de acuerdo con estas especificaciones de la NOM -213-SSA1-2018, inicialmente la carne tenía una mala calidad microbiológica. Sin embargo, al emplear el extracto de *Origanum sp.* se logró que la muestra de carne se aproximara al límite microbiológico máximo permitido de bacterias mesofílicas aeróbicas. Con los resultados obtenidos el extracto de *Origanum sp.* podría ser empleado como un conservador de alimentos. Sin embargo, se requieren profundizar los análisis sensoriales para que pudiera ser empleado como tal.

Durante las últimas décadas se ha generado un debate sobre el uso de antibióticos como promotores de crecimiento en animales destinados al consumo humano, ya que esta práctica promueve la resistencia en bacterias (Witte, 1998). Aunque la determinación de bacterias multiresistentes no fue un objetivo en este estudio, Jiménez et al. (2019) reportó previamente que el extracto de *Origanum sp.* es capaz de inhibir el crecimiento de bacterias multiresistentes a antibióticos como: *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus sp.*, *Serratia marcescens* y *Acinetobacter haemolyticus*.

La complejidad de los productos naturales puede provocar un interés decreciente en la industria, por lo que de acuerdo con Cos et al. (2006) es fundamental el papel de la investigación en la exploración y evaluación prolongada de productos naturales.

Referencias

Akerele, O. (1993). Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. Foro mundial de la salud; 14(4) : 390-395

<https://apps.who.int/iris/handle/10665/47707>

Ayres, J.C. (1960). The relationship of organisms of the genus *Pseudomonas* to the spoilage of meat, poultry and eggs. *Journal of Applied Bacteriology* 23, 471 – 486.

Brown, M.H., Gill, C.O., Hollingsworth, J., Nickelson, R., Seward, S., Sheridan, J.J., Stevenson, T., Sumner, J.L., Theno, M.D., Osborne, W.R., Zink, D. (2000). The role of microbiological testing in systems for assuring the safety of beef. *Int J Food Microbiol.* 2000 Dec 5;62(1-2):7-16. doi: 10.1016/s0168-1605(00)00408-6. PMID: 11139024.

Buchanan, R.L., Whiting, R.C., 1986. Processed meats as a microbial environment. *Food Technology.* 40. 134, 136 -138.

Burt, S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *Int J Food Microbiol.* 1;94(3):223-53. doi: 10.1016/j.jfoodmicro.2004.03.022. PMID: 15246235.

Carson, C. F., Mee, B. J., Riley, T. V. (2002). Mechanism of Action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(6), 1914–1920. doi:10.1128/AAC.46.6.1914-1920.2002.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Clardy, J., Walsh, C. (2004). Lessons from natural molecules. *Nature*. 16;432(7019):829-37. doi: 10.1038/nature03194. PMID: 15602548.

Cos, P., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V., Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *J Ethnopharmacol*. 19;106(3):290-302. doi: 10.1016/j.jep.2006.04.003. Epub 2006 Apr 18. PMID: 16698208.

Cutter, C.N., (2000). Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* associated with beef. *Journal of Food Protection* 63 (5), 601 – 607.

Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G. (2000). GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J Agric Food Chem*.48(6):2576-81. doi: 10.1021/jf990835x. PMID: 10888587.

Doyle, M.P., Beuchat, L.R. (2007). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (3ª ed.). ASM Press, 1752 N St., N.W., Washington, DC 20036-2904, U.S.A. http://students.aiu.edu/submissions/profiles/resources/onlineBook/v2c6N6_Food_Microbiology_Fundamentals_and_Frontiers.pdf

Gill, C.O., Deslandes, B., Rahn, K., Houde, A., Bryant, J., (1998). Evaluation of the hygienic performances of

the processes for beef carcass dressing at 10 packing plants. *J. Appl. Microbiol*. 84, 1050–1058.

Hernández, S., Estrada, A., Sanchez, I., Castro, J., Roman, A., Santos, E. (2007). Condiciones microbiológicas en el proceso del sacrificio en un rastro municipal del Estado de Hidalgo, México. *Vet Méx* 2007; 38:187-195.

Jay, J.M., Vilai, J.P., Hughes, M.E. (2003). Profile and activity of the bacterial biota of ground beef held from freshness to spoilage at 5-7 degrees C. *Int J Food Microbiol*. 15;81(2):105-11. doi: 10.1016/s0168-1605(02)00189-7. PMID: 12457584.

Jiménez, L. E., Núñez, Á. A., Ortega, R., López, F. A., y Montiel, J. F. (2019). Actividad antibacteriana de extractos de plantas de uso alimentario y medicinal. Congreso Internacional “CUCCAL” “Sobre Inocuidad, Calidad Y Funcionalidad De Alimentos Y Servicios”. Sociedad Mexicana de Inocuidad y Calidad para Consumidores de Alimentos. Ciudad de México, 27 de noviembre de 2019, pág 410 - 416.

Juneja, V.K., Dwivedi, H.P., Yan, X. (2012). Novel natural food antimicrobials. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 381–403. doi:10.1146/annurev-food-022811-101241.

Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F., Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

action of thyme essential oil and its active constituents., 76(6), 626–631. doi:10.1111/j.1365-2672.1994.tb01661.x.

McDonald, K., Sun, D.W. (1999). Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* 52: 1-27.

Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M. (2002). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod*;66(7):1022-37. doi: 10.1021/np030096I. PMID: 12880330.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. (2016). Manual para manipuladores de alimentos, Alumno.
<https://www.fao.org/3/i7321s/i7321s.pdf>

Packiyasothy, E.V., Kyle, S. (2002). Antimicrobial properties of some herb essential oils. *Food Australia* 54 (9), 384 – 387. Secretaría de Gobernación, Diario Oficial de la Federación. (1994). *Norma Oficial Mexicana. NOM-092-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de Bacterias Aeróbicas en Placa.*
https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4886029&fecha=12/12/1995#gsc.tab=0

Secretaría de Gobernación, Diario Oficial de la Federación. (1994). *NORMA Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la*

cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4881226&fecha=13/09/1995#gsc.tab=0

Secretaría de Gobernación, Diario Oficial de la Federación. (1994). *Norma Oficial Mexicana. NOM-113- SSA1-Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.*
http://diariooficial.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4869711&fecha=22/02/1995#gsc.tab=0

Secretaría de Gobernación, Diario Oficial de la Federación. (2018). *NORMA Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2018, Productos y servicios. Productos cárnicos procesados y los establecimientos dedicados a su proceso. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.*
https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5556645&fecha=03/04/2019#gsc.tab=0

United States Department of Agriculture. (1996). *Systems Pathogen reduction: Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems; Final Rule.* USA Federal Regulation.
<https://www.fsis.usda.gov/policy/federal-register-rulemaking/federal-register-rules/pathogen-reduction-hazard-analysis-and>

Valtierra, D., Heredia, N.L., García, S., Sánchez, E. (2010). Reduction of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry skin by fruit extracts. *Journal of Food Protection* 73(3):477-482.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Van de Braak, S.A.A.J., Leijten, G.C.J.J. (1999). Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, p. 116.

Vanderlinde, P.B., Shay, B., Murray, J. (1998). Microbiological quality of Australian beef carcass and frozen bulk packed beef. Food Protection Magazine, 61(4), 437–443. doi:10.4315/0362-028x-61.4.437.

Witte W. (1998) Medical consequences of antibiotic use in agriculture. Science. 13;279(5353):996-7. doi: 10.1126/science.279.5353.996. PMID: 9490487.

Zhou, G.H., XU, X.L., Liu, Y. (2010). Preservation technologies for fresh meat—A review. Science. 86: 119-128.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIBACTERIANA DE LA TUBA GUERRERENSE DE *COCOS nucifera L.*

Cuauhtémoc Pineda^{1*}, Itzel Rodríguez¹, Daysi Navez¹, Aydee Román¹, Brian Cárdenas¹,
Fernando Astudillo², Gerardo Huerta¹

Laboratorio de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo,
México, 2 Programa de Biología de Sistemas y Biología Sintética, Centro de Ciencias Genómicas,
Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México.

cuauhtemoc.pineda@hotmail.com

Resumen

La Tuba es una bebida fermentada obtenida de la palma de coco. En México se produce en Colima, Michoacán y Guerrero. Su consumo se relaciona con el buen funcionamiento del organismo debido a su composición (azúcares, aminoácidos y minerales), microbioma (bacterias ácido lácticas y ácido acéticas) y propiedades antioxidante y antibacteriana. El objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad antioxidante y antibacteriana de los sobrenadantes producidos por bacterias aisladas de la Tuba Guerrerense. Se fermentó Tuba comercial y tradicional en dos matraces, 100 mL de medio Tuba a temperatura ambiente y 35 h con agitación constante. Se aislaron cepas mediante difusión de placa en agar Tuba a 30°C por 24 h. Del comercial se aislaron 16 cepas Gram negativas. Al sobrenadante se evaluó la actividad antioxidante mediante los ensayos DPPH, ABTS y cromatografía de capa. De la Tuba tradicional, se aislaron 45 cepas, 86% Gram negativas. A partir del sobrenadante se evaluó la actividad antibacteriana. El 31.3% de las cepas aisladas de Tuba comercial presentaron actividad antioxidante. Mientras que de la Tuba tradicional los porcentajes de cepas con actividad antibacteriana fueron: el 73.3% para *Enterococcus faecalis*, 44.4% para *Escherichia coli ATCC 25922*, 48.8% para *Pseudomonas Aeruginosa* y 8.8% para *Staphylococcus aureus ATCC 25923*, 9 cepas inhibieron a tres cepas de interés clínico. Se estableció un medio cultivo a base de Tuba para promover el crecimiento de la diversidad de bacterias. Las bacterias aisladas de la Tuba presentaron inhibición a bacterias de interés clínico.

Palabras clave: Tuba, Antioxidante, Antibacterial, Bacterias ácido acéticas, Bacterias ácido lácticas

Abstract

Tuba is a fermented drink obtained from coconut palm. In Mexico it is produced in Colima, Michoacán and Guerrero. Its consumption is related to the proper functioning of the organism due to its composition, sugars, amino acids and minerals among others. Microbiome; lactic acid bacteria and acetic acid. And activity; antioxidant and antibacterial. The objective of this study was to evaluate the antioxidant and antibacterial capacity of the supernatants produced by bacteria isolated from the Guerrerense's Tuba. Tuba commercial and traditional was fermented in two flasks, 100 mL of medium, room temperature and 35 h with constant stirring. Strains were isolated by plaque diffusion on Tuba agar at 30 ° C for 24 h. From the comercial Tuba, 16 Gram-negative strains were isolated. The supernatant was evaluated for antioxidant activity by DPPH, ABTS and layer chromatography assays. From the traditional Tuba, 45 strains were isolated, 86% Gram negative. From the supernatant,



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



antibacterial activity was evaluated. 31.3% of the commercial Tuba strains isolates showed antioxidant activity. While, of the traditional Tuba, the percentages of strains with antibacterial activity were: 73.3% for *Enterococcus faecalis*, 44.4% for *Escherichia coli* ATCC 25922, 48.8% for *Pseudomonas Aeruginosa* and 8.8% for *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, 9 strains inhibited three strains of clinical interest. A Tuba-based culture medium was established to promote the growth of bacterial diversity. The bacteria isolated from the Tuba presented inhibition to bacteria of clinical interest.

Key words: Tuba, Antioxidant, Antibacterial, Acetic acid bacteria, Lactic acid bacteria

Introducción

La palma de coco (*Cocos nucifera* L.) es una especie de palmera de la familia *Arecaceae* nativa de Asia. Presenta una estructura monocotiledónea de tipo maderable, su altura es de hasta 30 m en su etapa adulta (Olher, 1999). La inflorescencia es interfoliar de ramificación simple; las flores normalmente se encuentran en grupos de tres y su fruto es una semilla de gran tamaño (Guevara y Jáuregi, 2008). De la savia de las inflorescencias se obtienen diferentes productos como jarabes de azúcares, que algunas veces se hacen fermentar para producir una bebida fermentada (Rogelio, 2006). La fermentación se lleva a cabo por un conjunto de reacciones químicas a partir de carbohidratos y ciertos microorganismos, principalmente bacterias y levaduras (Galvis, 2009). En la fermentación alcohólica, los monosacáridos y disacáridos son transformados en etanol y dióxido de carbono con la regeneración del cofactor NAD⁺ (Nielsen et al., 2003).

La Tuba

La Tuba es una bebida fermentada proveniente de las Filipinas, fue introducida por primera vez en México

por los españoles en la costa del pacífico, actualmente se produce en los estados de Colima, Michoacán y Guerrero. Esta bebida se produce mediante un proceso de fermentación natural de la savia de la palma, puede ser de la inflorescencia, del tallo o del exudado del fruto de la palma (Chandrasekhar et al., 2012). Su color pardo a blanquecino es debido al desarrollo de microorganismos, los cuales desencadenan la fermentación después de 5 h de ser cosechada (Pérez et al., 2016).

Para la elaboración de la Tuba, la inflorescencia de la palmera deberá estar cubierta por la espata, posterior a ello se realiza un doblar y se sujeta firmemente con un lazo para que tenga el menor movimiento posible; se procede a realizar una incisión colocando un recipiente limpio debajo, tras esto, la savia se va colectando en el recipiente. Esta savia es recuperada dos veces al día, por la mañana y al atardecer (Granados y López, 2002). La savia puede ser consumida recién colectada o después de su fermentación. Los consumidores de esta bebida la toman por su sabor y porque culturalmente se asocia a una bebida de valor nutricional que contribuye a resolver problemas gastrointestinales y parasitarios



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



(Brambila, 2006). Asimismo, este derivado ayuda al buen funcionamiento del organismo ya que contiene azúcares, minerales, aminoácidos, vitamina C y fósforo, esta característica benéfica para la salud humana se ha atribuido a la probable actividad antibacteriana y antioxidante del endocarpio del fruto (Cortázar et al., 2010).

Actividad antioxidante

Actualmente diversas enfermedades se asocian con un exceso de radicales libres con los que estamos en contacto en el ambiente, debido a que estos desestabilizan el funcionamiento del metabolismo; como el tabaquismo, el alcoholismo y la contaminación atmosférica (Ansari, 1996). Los radicales libres (RL) actúan como aceptores finales de electrones dentro del metabolismo celular, lo que permite la producción de energía. Sin embargo, a altas concentraciones causan efectos indeseables a la célula, provocan reacción en cadena que desestabilizan las rutas metabólicas funcionales (Urbina-Bonilla, 2008). Los RL se encuentran presentes tanto en las células de un organismo como en el ambiente y con el tiempo, estos oxidan todos los compuestos biológicos por medio de sus metabolitos reactivos. Causan la oxidación y peroxidación de lípidos, la desnaturalización de proteínas y la despolimerización de polisacáridos. También alteran el ADN, rompen las membranas celulares, inactivan enzimas, interfieren con la inmunogenicidad y provocan carcinogénesis (Ansari, 1996). Los antioxidantes funcionan como estabilizadores de los radicales libres, además estas

moléculas inhiben la peroxidación de los lípidos (Khasraf et al., 2003). Forman parte de los alimentos que se consumen diariamente, previenen los efectos adversos causados por especies reactivas sobre las funciones fisiológicas humanas. Las propiedades antioxidantes no solo se estudian por sus interacciones químico-biológicas sino por su función para prevenir el deterioro oxidativo que afecta a los componentes celulares (Urbina-Bonilla, 2008; Serrano et al., 2006). Los análisis metagenómicos y bioinformático de la Tuba han demostrado que en esta existen microorganismos relacionados con la síntesis de vitaminas, terpenoides y compuestos fenólicos que pueden contribuir con la capacidad antioxidante de la Tuba (Astudillo-Melgar et al., 2019). Existen varios ensayos de actividad antioxidante rápidos y consistentes, sin embargo, cada uno de ellos presenta sus ventajas y desventajas, No hay un único método que defina totalmente la eficacia antioxidante de un compuesto, mezcla o alimento, por lo cual se recomienda el uso de más de un método para determinar la capacidad antioxidante de una muestra en lugar de un enfoque unidimensional. Los métodos más comunes y fiables son los ensayos de DPPH y ABTS; éstos han sido modificados y mejorados en los últimos años (Krishnaiah et al., 2011).

Actividad antimicrobiana

La pared celular protege la integridad anatomofisiológica de la bacteria y soporta su gran presión osmótica interna (mayor en las bacterias Gram positivas). La ausencia de esta estructura



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



condicionaría la destrucción del microorganismo, inducida por el elevado gradiente de osmolaridad que suele existir entre el medio y el citoplasma bacteriano. Los antibióticos pueden inhibir la síntesis de la pared celular, su mecanismo de acción se realiza cuando la bacteria está en crecimiento activo, y para su acción bactericida requieren que el medio en que se encuentre la bacteria sea isotónico o hipotónico, lo que favorece el rompimiento celular cuando la pared celular se pierde o se desestructura. Suelen ser más activos sobre las bacterias Gram positivas por su mayor riqueza en peptidoglucano. En general, son poco tóxicos por actuar selectivamente en una estructura que no está presente en las células humanas. La síntesis de la pared celular se desarrolla en 3 etapas, sobre cada una de las cuales pueden actuar diferentes compuestos: la etapa citoplásmica, donde se sintetizan los precursores del peptidoglucano; el transporte a través de la membrana citoplásmica, y la organización final de la estructura del peptidoglucano, que se desarrolla en la parte más externa de la pared (Calvo y Martínez, 2009).

Microorganismos con actividad antibacteriana

Existen microorganismos que han tomado un papel muy importante en los alimentos por su considerable contribución al valor agregado que dan a un producto, gracias a las propiedades metabólicas que poseen. Un ejemplo de ello, son las bacterias ácido lácticas que desempeñan un papel importante en la industria alimentaria. Este grupo está compuesto de un gran número de géneros incluyendo *Lactococcus*,

Lactobacillus, *Enterococcus*, *Leuconostoc* entre otras. Entre sus funciones destacan, la formación de sabor ácido, formación de aroma, gelificación de la leche y la inhibición de organismos patógenos. Se han encontrado presencia de bacteriocinas, que son sustancias antimicrobianas, estas pueden ser sintetizadas por varios microorganismos, pero las que son sintetizadas por bacterias ácido lácticas tiene un gran potencial para ser utilizadas como bioconservadores (Parra-Huertas, 2010). Cepas como *Enterococcus malodoratus* y *E. mundtii* fueron aisladas de bebidas fermentadas típicas de México, como tepache y pulque, donde se encontró presencia de bacteriocinas, su actividad fue ensayada contra diversas cepas patógenas como *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*. Se obtuvieron pruebas positivas para la inhibición de las cepas patógenas, teniendo mejor resultados contra *Klebsiella pneumoniae* (Pérez-Villanueva et al., 2016). Por otra parte, las bacterias ácido lácticas pueden producir componentes inhibitorios de otros microorganismos, dentro de los que se pueden encontrar patógenos y de descomposición (Olvera-García et al., 2015). Los extractos de la fibra de la cáscara de *Cocos nucifera L.* han sido utilizados en la medicina tradicional en el noreste de Brasil para el tratamiento de la diarrea y la artritis. Las fracciones de dichos extractos han mostrado actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (Esquenazi et al., 2002). En estudios realizados con extracto alcohólico de cascara de *Cocos nucifera* se



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



demonstró actividad antibacteriana contra patógenos orales comunes como bacterias cariogénicas (Maji et al., 2014). En un estudio reciente sobre la diversidad bacteriana y la dinámica de población durante la fermentación de la Tuba se reportó que los géneros de bacterias que más predominan en esta bebida en el tiempo 35 h fueron *Fructobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Gluconacetobacter*, *Sphingomonas*, *Vibrio* y algunos géneros de la familia *Enterobacteriaceae*. La dinámica de la población tuvo una tendencia similar en Tuba fermentada en condiciones controladas pero con un porcentaje diferente en las abundancias de OTU (Unidad Taxonómica Operativa); se observó una disminución del género *Vibrio* y un aumento de las bacterias del género ácido láctico (BAL), las bacterias del género ácido acético (BAA) y algunas proteobacterias como *Sphingomonas* a lo largo del tiempo de fermentación. Para comprender la funcionalidad de la comunidad bacteriana en la fermentación de Tuba, se utilizó el software PICRUST para predecir los perfiles metagenómicos de las muestras. Se obtuvieron características funcionales de los 3 niveles de KEGG (Nivel 1: funciones celulares generales, Nivel 2: Funciones específicas, es decir, metabolismo de carbohidratos, y Nivel 3: Vía asociada con una función específica). Para analizar genes específicos relacionados con funciones de relevancia biotecnológica. Teniendo en cuenta las 328 funciones registradas en KEGG. Se encontró que las 19 funciones más abundantes se asociaron con el metabolismo de carbohidratos, vitaminas,

aminoácidos, antibióticos y biosíntesis de moléculas antioxidantes (Astudillo-Melgar et al., 2019)

En la fermentación de la Tuba se han encontrado altos niveles de bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias ácido acéticas (BAA). Un importante atributo de las BAL es su capacidad de producir compuestos antimicrobianos denominados bacteriocinas de origen proteico producidos por síntesis ribosomal. Las bacteriocinas tienen un amplio espectro de actividad, mecanismos de acción, pesos moleculares, y propiedades fisicoquímicas (Pérez-Villanueva et al., 2016). Dependiendo de la región, las bebidas alcohólicas tradicionales preparadas a partir de jugo de palma, se les conoce como “vino de palma” son conocidas por varios nombres, los microorganismos responsables de este tipo de fermentación son *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Acetobacter aceti* (Tamang et al., 2016). El descubrimiento del genoma de microorganismos cultivables y no cultivables procedentes de alimentos fermentados naturalmente, permite la identificación de diversos grupos bacterianos funcionales de interés biotecnológico mediante la expresión del ARNm en un sustrato particular además de la detección del nivel de ADN (Díaz y Wachter. 2003).

Actualmente, diversos países reconocen la importancia del potencial genético de cepas obtenidas a partir de las fermentaciones de alimentos y bebidas tradicionales, sin embargo, muchas de ellas siguen desconocidas. En México la investigación acerca del potencial genético de la Tuba aún es escaso, por lo



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

que conocer más acerca de estas cepas es un elemento crucial para la preservación del patrimonio cultural. En el presente estudio se aislaron bacterias presentes durante la fermentación de la Tuba comercial y tradicional para evaluar la actividad antioxidante y antimicrobiana de los metabolitos producidos.

Metodología

Obtención de la Tuba y preparación de medio Tuba

Se recolectaron muestras de Tuba de palma de *Cocos nucifera L.* del municipio de Acapulco, Guerrero, México. Una muestra de Tuba Tradicional de 1.5 L y una muestra de Tuba comercial de 2 L. La Tuba tradicional se obtuvo de la localidad de Poza Zanja en abril del 2018. Ambas muestras fueron transportadas y almacenadas en recipientes previamente esterilizados a 4°C hasta su uso. Se diseñó y probó un nuevo medio denominado “medio Tuba” para el aislamiento de cepas de Tuba, éste se preparó diluyendo la tuba en agua estéril en una relación 1:10 y se agregó agar estéril hasta alcanzar una concentración de 15 g/L en placas de Petri.

Métodos analíticos

La concentración de azúcares reductores de la Tuba comercial y tradicional se evaluaron mediante el método DNS (Abdel et al., 2018) y la concentración de proteína se evaluó mediante el método de Bradford (Javeed et al., 2023). En el caso de la Tuba tradicional se realizaron las evaluaciones a 4 tratamientos

diferentes: Tuba estéril, Tuba estéril diluida (1:10), Tuba sin esterilizar y Tuba sin esterilizar diluida (1:10).

Fermentación de la Tuba

Se colocaron 100 mL de Tuba tradicional en un matraz Erlenmeyer por triplicado y se almacenaron muestras a las 12 h, 24 h y 35 h de fermentación en crioviales con glicerol a -70°C. El resto de la solución se centrifugó a 8000 rpm por 10 min para separar al sobrenadante de las células. El sobrenadante se utilizó para los ensayos de antagonismo. Por otro lado, se fermentó 100 mL de Tuba comercial en un matraz Erlenmeyer por duplicado durante 24 h y 35 h a 30 °C y 100 rpm. A cada matraz se muestreó 800 µL a las 24 h y 35 h y se almacenaron en crioviales con glicerol al 80% a -70°C por triplicado para conservar la diversidad bacteriana de la Tuba. El sobrenadante se utilizó para evaluar la actividad antioxidante.

Aislamiento y caracterización de microorganismos de la Tuba

Se aislaron los microorganismos de la tuba tradicional a las 35 h de fermentación y los de tuba comercial a las 24 h y 35 h. Los crioviales se descongelaron lentamente y homogenizaron, de cada uno se tomó una muestra de 100 µL de Tuba y se realizaron diluciones 1:10, 1:100 y 10 a 10⁻⁵ para la Tuba tradicional y comercial respectivamente. Se incubó la Tuba tradicional a 30°C x 12 h en el medio Tuba, y la Tuba comercial a 30°C x 24 h en el medio Tuba y medio tuba con ketoconazol (2 µg/mL). Posteriormente se agregó 1 mL de agua destilada con



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



la finalidad de separar a los microorganismos de diferentes morfologías. Posteriormente se hizo una resiembra en cajas Petri con medio Tuba a 30°C x 24 h. Los microorganismos aislados de la Tuba Tradicional se utilizaron para la evaluación de la actividad antimicrobiana y los de la Tuba comercial para la actividad antioxidante. Las características microscópicas y macroscópicas de las cepas aisladas se determinaron mediante tinción Gram (Aquiahuatl y Pérez, 2004).

Cepas patógenas

Se seleccionaron a los microorganismos *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa* como microorganismos patógenos para evaluar la actividad antimicrobiana de las cepas aisladas. Las cepas patógenas fueron provienen del cepario de la Universidad Autónoma de Guerrero, estas se recuperaron en diferentes medios de cultivo: agar bilis esculina con azida, agar MacConkey, agar cetrimida y agar TSA.

Determinación de la actividad antibacteriana

Se evaluó la actividad antibacteriana de la Tuba fermentada con 24 h y 35 h mediante ensayos de susceptibilidad de bacterias patógenas, colocando una asada de los cultivos patógenos en 3 mL de medio LB en caldo, se incubó durante 18 h a 35 °C, para obtener una concentración bacteriana correspondiente al estándar 0.5 de MacFarland ajustado a una densidad óptica de 600 nm de acuerdo

al CLSI. Después se colocó el sobrenadante obtenido de la Tuba fermentada a 24 h y 35 h. Se utilizaron 40 µL de sobrenadante en discos de papel y 80 µL en un pocillo hecho previamente en el agar, como control positivo se utilizó cloro (4.0-6.0%). Las cajas se incubaron 24 h a 37°C para posteriormente analizar los halos de inhibición formados.

Evaluación de actividad antioxidante de la Tuba comercial

La actividad antioxidante se determinó mediante ensayos DPPH, ABTS y cromatografía en capa fina (CCF) a partir de los sobrenadantes de los cultivos bacterianos aislados de la Tuba comercial. Primero se cultivaron las cepas en 10 mL de medio Tuba líquido a 30 °C durante 24 h, posteriormente se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 min para recuperar los sobrenadantes. Inicialmente se evaluó por CCF de manera cualitativa, para ello se colocaron 3 mL de sobrenadante con ácido ascórbico (1 g/L) en láminas de sílice y se sumergieron en DPPH. Como control se utilizó Tuba comercial estéril. Posteriormente sobre una placa de gel sílice de 5 cm de espesor se colocaron 5 µL de sobrenadante a intervalos de 1 µL en el centro de la placa dejando 1 cm de espacio entre cada muestra y la placa, posteriormente se cubrió con DPPH y se observó la presencia o ausencia de halos. Para los ensayos de actividad antioxidante (DPPH y ABTS) se realizaron diluciones seriadas de los sobrenadantes recuperados 1:10, 1:100 y 1:1000. Se utilizaron placas de 96 pozos y se colocaron 50 µL de la muestra total y 50 µL de sus diluciones por triplicado

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

en cada placa. Se utilizó Tuba comercial estéril como control negativo y ácido ascórbico como control positivo. Posteriormente se agregaron 150 μ L de DPPH a cada muestra en una placa y 150 μ L de ABTS en una placa diferente, ambas placas fueron incubadas durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Al término de la incubación, cada placa se introdujo a un fotómetro de microplacas de 96 pozos para medir su longitud de onda (λ), se determinó una $\lambda = 545$ nm y 735 nm para el DPPH y el ABTS, respectivamente.

Resultados y Discusión

Caracterización del sustrato

Se caracterizó el contenido de azúcares reductores, proteínas y pH de la Tuba tradicional y de la Tuba comercial. así como de los medios de cultivo elaborados a partir de las dos muestras de Tuba (Tabla 1). El pH de todas las muestras fue de 5.0, únicamente la Tuba tradicional presentó un pH más ácido de 4.0. La concentración de proteína en todos los casos fue menor a 1 g/L, mientras que la concentración de azúcares fue superior en la Tuba comercial en comparación con la Tuba tradicional, sin embargo, ambas presentan valores muy cercanos a 50 g/L cuando la Tuba tradicional se esteriliza. Los medios de cultivo de cada Tuba se utilizaron para aislar microorganismos, así como para determinar las condiciones de crecimiento, consumo de azúcares y producción de metabolitos.

Tabla 1. Caracterización de Tuba comercial y tradicional.

Muestra	Azúcares (g/L)	Proteínas (g/L)	pH
Tuba tradicional	35.90	0.23	4.0
Tuba tradicional estéril	50.60	0.40	5.0
Medio Tuba (tradicional)	5.15	0.04	5.0
Tuba comercial	51.30	0.60	5.0
Medio Tuba (comercial)	6.30	0.05	5.0

Aislamiento de microorganismos de la Tuba tradicional y comercial

Se realizaron diluciones seriadas de 10^0 a 10^{-5} de la muestra de Tuba comercial y de la tradicional a las 35 h de fermentación. Posteriormente se plaquearon 100 μ L de la dilución en los medios Tuba respectivos con ketoconazol (2 ppm) para evitar el crecimiento de hongos. Se obtuvo una población bacteriana de $9.8 \times$

10^6 UFC/mL de las cuales se aislaron 98 colonias con características morfológicas distintas para la Tuba comercial y una población de 4×10^5 UFC/mL de la Tuba tradicional de las cuales se aislaron y seleccionaron 45 cepas diferentes (9 Gram + y 39 Gram -) (Tabla 2). La mayoría de las cepas caracterizadas son de tipo cocos y Gram negativas, estos resultados son opuestos a los reportados por

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Salgado et al., (2016), donde aislaron de Tuba fermentada principalmente Gram + (60%). La diferencia de resultados puede deberse al tiempo de cosecha de las cepas ya que *Salgado et al.*, (2016)

aislaron cepas de Tuba fermentada por apenas 12 h y 24 h, un tiempo mucho menor a realizado en este estudio de 35 h, en una fermentación principalmente de tipo acética.

Tabla 2. Caracterización morfológica de las bacterias aisladas de la Tuba comercial y la Tuba tradicional

Característica		Comercial	Tradicional
		(%)	
Morfología	Cocos	87.5	100
	Cocobacilos	12.5	0
Tinción	Gram-	100	100
Forma	Circular	68.75	56
	Puntiforme	5.25	44
	Irregular	25	0
Elevación	Convexa	87.5	0
	planoconvexa	12.5	100
Margen	Entero	100	100
Color	Blanco	31.3	100
	Beige	25	0
	Amarillo	37.5	0
	Naranja	6.2	0
Superficie	Lisa	100	100
Consistencia	Suave	100	100
Producción de CO ₂	Negativo	100	ND
Aspecto	Húmedo	ND	100

Análisis cualitativo y cuantitativo de la actividad antioxidante de la Tuba comercial

La actividad antioxidante se observó por la presencia de pequeños halos de inhibición con los extractos de las cepas CAB02, CAB04, CAB05, CAB08, CAB10, CAB12, CAB14, CAB16, tomando como referencia los controles positivos: P1 (Tuba palmera 1), P2 (Tuba

palmera 2), TSE (Tuba sin esterilizar), TSE N (Tuba sin esterilizar nueva), AC ASC (ácido ascórbico). Por medio de CCF se determinó que 7 cepas presentaron actividad antioxidante, mientras que los ensayos de ABTS y DPPH permitieron identificar a 4 y 16. Se realizaron los ensayos de CCF, ABTS y DPPH para determinar actividad antioxidante de las cepas

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

aisladas de la Tuba comercial, el ensayo con mayor sensibilidad fue DPPH, debido a que permitió identificar actividad antioxidante en 16 cepas, mientras que con ABTS y CCF coincidió la actividad antioxidante en sólo 4 y 7 cepas respectivamente. De acuerdo al ensayo por DPPH, las cepas con mayor actividad antioxidante fueron CAB06, CAB13 y CAB10 con un porcentaje de inhibición mayor al 18%, mientras que por medio del ensayo con ABTS, sólo CAB08 y CAB16 mostraron porcentajes de inhibición mayores al 17%. De los anteriores todos mostraron actividad antioxidante mediante CCF con excepción de CAB06 y CAB13. Para identificar de manera global a las cepas que presentaron mejores resultados con las tres técnicas de evaluación de actividad antioxidante se evaluó un promedio ponderado de los resultados en las tres evaluaciones con las 16 cepas que mostraron actividad de acuerdo a la ec.1

$$\varphi = \left(CCF_x + \frac{ABTS_x}{ABTS_{Max}} + \frac{DPPH_x}{DPPH_{Max}} \right) \div 3$$

Donde CCF_x es la actividad antioxidante de la cepa x medida por CCF, $ABTS_x$ es la actividad antioxidante de la cepa x evaluada por el ensayo ABTS, $ABTS_{Max}$ es la actividad antioxidante máxima de las 16 cepas evaluadas, $DPPH_x$ es la actividad de la cepa x por el ensayo DPPH y $DPPH_{Max}$ es la actividad antioxidante máxima de las 16 cepas evaluadas. Las tres cepas con mejores resultados por las tres técnicas para la evaluación de actividad antioxidante fueron CAB16, CAB08 y CAB05.

Las diferencias entre los resultados con los ensayos DPPH y ABTS pueden deberse a la diferencia de los metabolitos producidos por las cepas, la interacción cruzada extracto-radical (Prior et al., 2005), a la sensibilidad y selectividad del método dado que el radical ABTS es catiónico mientras que el radical DPPH es neutro (Sánchez-Moreno, 2002; Schlesier et al., 2002).

La actividad antioxidante identificada puede deberse a la presencia de bacterias productoras de vitaminas, antibióticos y antioxidantes. Astudillo et al., (2019), identificó bacterias con estas características, identificadas como *Leuconostoc*, *Gluconacetobacter*, *Sphingomonas*, *Vibrio* y principalmente *Fructobacillus*, en muestras de Tuba comercial mediante un estudio bioinformático. De los metabolitos bacterianos con mayor capacidad para depurar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno son los terpenos y los carotenoides, como la enzima 15-cis-fitoeno sintetasa junto con los tocoferoles, ácido ascórbico, flavonoides, antocianinas y ácidos fenólicos (Carranco et al., 2011). Otro metabolito con capacidad antioxidante producido por bacterias son los pigmentos, estos compuestos presentan diversas aplicaciones con valor agregado como los colorantes sintéticos (Liu y Nizet, 2009). Asker et al., (2007) obtuvieron un pigmento amarillo de *Sphingomonas TDMA-16* y reportaron actividad antioxidante del mismo. En el presente estudio se observaron pigmentos amarillos y naranjas en las bacterias CAB16, CAB13, CAB05, CAB06 y CAB08, lo

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

cual indica un potencial uso de estos compuestos como antimicrobianos y antioxidantes.

Tabla 3. Actividad antioxidante de las cepas asiladas de la Tuba comercial

Cepa	Capa fina	DPPH (%)	ABTS (%)	Φ
CAB16	1.0	17.4	17.0	88.3
CAB08	1.0	12.5	18.6	84.2
CAB05	1.0	17.1	6.1	68.3
CAB10	1.0	18.1	0.0	58.8
CAB02	1.0	17.1	0.0	57.4
CAB14	1.0	15.6	0.0	55.3
CAB12	1.0	15.3	0.0	54.9
CAB04	1.0	9.3	2.3	50.5
control +	1.0	1.9	2.2	39.9
CAB06	0.0	23.7	0.0	33.3
Control -	1.0	0.0	0.0	33.3
CAB13	0.0	19.3	0.0	27.1
CAB09	0.0	16.8	0.0	23.6
CAB01	0.0	16.5	0.0	23.2
CAB11	0.0	16.5	0.0	23.2
CAB03	0.0	15.6	0.0	21.9
CAB07	0.0	15.6	0.0	21.9
CAB15	0.0	15.0	0.0	21.1

Actividad antibacteriana de sobrenadantes de Tuba tradicional

Se realizaron ensayos de antagonismo contra cuatro cepas de interés clínico; *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923 con

sobrenadantes de Tuba fermentada (35 h). Se determinó que el sobrenadante de la Tuba fermentada inhibió el crecimiento bacteriano de las 4 cepas patógenas. Los halos de inhibición más grandes se observaron en *E. faecalis* y *P. aeruginosa*, (**Fig 1**) con tamaños de los halos ≥ 10 mm y 15 mm con muestras

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

de 40 μ L y 80 μ L de sobrenadante de Tuba fermentada respectivamente. Mientras que con *S. aureus* y *E. coli* sólo se observaron inhibiciones al usar 80 μ L y 40 μ L de sobrenadante de Tuba respectivamente, en ambos casos los halos no superaron los 10 mm de tamaño. De las 40 cepas aisladas de la Tuba tradicional, el 82.5% fue capaz de inhibir en algún grado el crecimiento de *E. faecalis*, seguido con un 55% y 50% de inhibición de crecimiento de *P. aeruginosa* y *E. coli*, respectivamente. *S. aureus* fue el patógeno que mayor resistencia presentó a la actividad antibacteriana de la Tuba tradicional ya que sólo el 10% de las cepas logró inhibir su crecimiento. Se identificó a 9 cepas capaces de inhibir de manera individual el crecimiento de 3 cepas patógenas (**Fig 2**). La actividad antibacteriana observada puede deberse a la producción de bacteriocinas. Las bacteriocinas son sustancias que inhiben el crecimiento de diferentes bacterias debido a que son capaces de formar poros en la membrana celular de las bacterias, lo que promueve efectos de apoptosis, otros mecanismos reportados son la

inhibición de la síntesis de la pared celular, de la síntesis de proteínas y del metabolismo bacteriano. Las bacteriocinas son compuestos son estables a diferentes niveles de pH y temperatura (Heredia et al., 2015). Heredia et al., (2017) reportaron que las bacteriocinas nisina y pediocina son capaces de inhibir el crecimiento de *S. aureus* en alimentos. Pérez et al., (2016) reportaron los mismos efectos de las bacteriocinas enterocina y nisina contra cepas de *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes* y *E. coli*. De la Fuente et al., (2015), ha reportado la presencia de estos metabolitos en extractos de Tuba fermentada. Otros compuestos que pueden ser responsables de la actividad antibacteriana son la producción de enzimas, estas intervienen en diversos procesos biológicos tales como la digestión, el recambio de proteínas y la defensa contra bacterias patógenas (Runeberg-Roos et al., 1998).

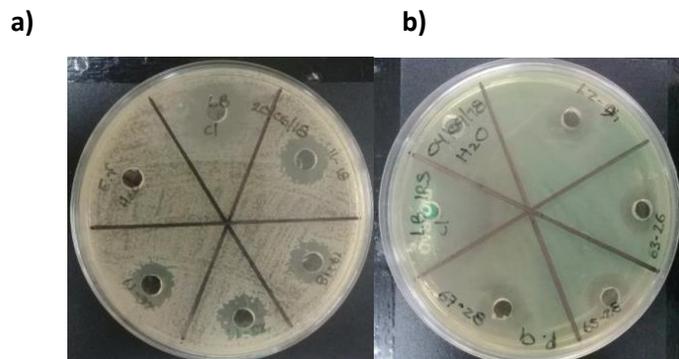


Fig 1. Halos de inhibición de crecimiento para a) *E. faecalis* y b) *P. aeruginosa*, utilizando sobrenadantes de cultivos bacterianos aislados de Tuba tradicional Guerrerense.

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

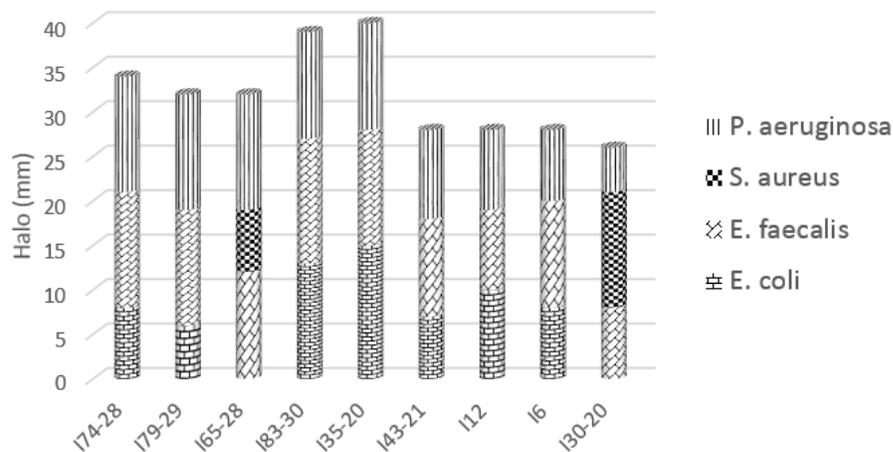


Fig 2. Ensayo de antagonismo de cepas aisladas de Tuba tradicional y bacterias patógenas.

Conclusiones

La concentración de azúcares y proteínas en los medio Tuba, tradicional y comercial, permitieron el crecimiento y desarrollo de bacterias con propiedades antioxidantes y antibacterianas. Cuarenta cepas de bacterias aisladas de la Tuba tradicional mostraron actividad antibacteriana contra cuatro cepas de interés clínico y 9 de ellas inhiben el crecimiento de *E. faecalis*, *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa*. Se aislaron 16 cepas de bacterias Gram negativas a partir de Tuba comercial. Los metabolitos extracelulares de las cepas CAB16, CAB13, CAB06, CAB05 y CAB08 aisladas de la Tuba mostraron la mayor capacidad antioxidante mediante los ensayos de DPPH, ABTS y CCF. Los resultados obtenidos pueden ser de importancia biotecnológica para el diseño de tratamientos contra molestias estomacales.

Referencias

- Abdel AZ, Mohamed A, Sara I (2018) 2-Aminoethanaminium 2-(ethoxycarbonyl)-4,6-dinitrophenolate as a greener route in reducing sugar quantification. MethodsX. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.05.017>.
- Ansari K. (1996) Free radical induced diseases. J Indian Med Assoc 94(6), pp.238–239.
- Aquihuatl RM & Perez CM (2004) Manual de prácticas de Microbiología General. Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México 21- 123.
- Asker D, Beppu T, Ueda K (2007) *Sphingomonas japsi* sp. nov., a novel carotenoid-producing bacterium isolated from Misasa, Tottori, Japan. Int J Syst Evol Microbiol. 57(7), pp.1435-1441.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Astudillo MF, Ochoa LA, Utrilla J, Huerta G. (2019). Bacterial diversity and population dynamics during the fermentation of palm wine from Guerrero Mexico. *Front Microbiol.* 22 (10), pp.531.

Brambila J (2006) El umbral de una agricultura nueva. Universidad Autónoma de Chapingo y Colegio de Postgraduados. primera edición. Montecillos, Estado de México. p. 319.

Calvo J, Martínez L (2009) Mecanismos de acción de los antimicrobianos. En *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (44-52). Santander, España.

Carranco ME, Calvo MC, Pérez F (2011) Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Arch Latinoam Nutr.* 61(3) pp.233-241.

Chandrasekhar K, Sreevani S, Seshapani P, Pramodhakumari J (2012) A Review on palm wine. *Int J Biol Sci*, 2(1), pp. 33–38.

Cortázar M, Flores R, Fuentes I (2010) Proceso productivo de la tuba de coco: una alternativa económica para los cococultores del sureste mexicano. Comité Editorial del CIRSE. Primera Edición. Campo Experimental Chetumal, Quintana Roo. Folleto para Productores Núm. 1. Serie INIFAP p. 43.

De la Fuente-Salcido NM, Villarreal-Prieto JM, Díaz León MA, García Pérez AP (2015) Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Rev Mex Cienc Farm* 46 (2).

Díaz Ruiz G, Wachter Rodarte C (2003) Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista latinoamericana.* pp. 30-40.

Esquenazi D, Wigg MD, Miranda MM, Rodriguez HM, Tostes JB, Rozental S, da Silva AJ, Alviano CS (2002) Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera L.* (Palmae) husk fiber extract, 10, pp. 647-52.

Galvis M (2009) Estudio del proceso de fermentación de glucosa para la producción de bioetanol a partir de levaduras nativas. Tesis de Licenciatura no publicada. Bucaramanga, Colombia: Universidad Industrial de Santander.

Granados D & López G (2002) Manejo de la palma de coco (*Cocos nucifera L.*) en México. México. Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. 1(8), pp. 39-48.

Guevara L, Jáuregui D (2008) Anatomía Floral De *Cocos nucifera L.* (Arecaceae, Arecoideae). *Acta Bot Venez*, 31(1), pp. 35–48.

Heredia-Castro P, Méndez-Romero J, Hernández-Mendoza A, Acevedo-Félix E, González-Córdoba AF, Vallejo-Córdoba B (2015) Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin like inhibitory substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from artisanal Mexican cheese. *Journal of Dairy Science* Vol. 98 No. 12.

Heredia-Castro P, Hernández-Mendoza A, González-Córdoba A, Vallejo B (2017) Bacteriocinas de bacterias



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*. Vol. 42, No. 6.

Javeed AT, Sheikh M, Rasy FCW & Nighat UN (2023) Chapter 20 – To estimate protein by Bradford assay. *Basic Life Science Methods*, 20, pp. 83-86.

Khassaf M, McArdle A, Esanu C, Vasilaki A, McArdle F, Griffiths RD (2003) Effect of vitamin c supplements on antioxidant defence and stress proteins in human lymphocytes and skeletal muscle. *J Physiol*. 549(2), pp. 645–652.

Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R (2011) A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod Process*. 89 (3), pp. 217– 233.

Liu G, Nizet V (2009) Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trend Microbiol*, 17(9), pp. 406-413.

Maji J, Cyriac M, Pai V, Varghese I, Shantaram M (2014) Antimicrobial properties of *Cocos nucifera* (coconut) husk: An extrapolation to oral health. *J Nat Sci Biol Med*. 5(2), pp. 359-364.

Nielsen J, Villadsen J, Lidén G (2003) *Bioreaction Engineering Principles*. New York. Plenum Publisher.

Oler JG (1999) *Modern coconut management: palm cultivation and products*. Gran Bretaña: Intermediate Technology Publications. p. 458.

Olvera-García M, Serrano-Maldonado C, Quirasco M (2015) Detección de proteínas con actividad

antibacteriana producidas por bacterias ácido lácticas. 2019, de Sitio web: https://www.researchgate.net/publication/280568781_Deteccion_de_Proteinas_con_Actividad_Antibacteriana_Producidas_por_Bacterias_Acido_Lacticas.

Parra-Huertas RA (2010) Review. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Facultad de ciencias agropecuarias*. 8(1), pp. 94-105.

Pérez-Villanueva MP, Vázquez-García A, De la Fuente-Salcido NM, Barboza Corona JE (2016) Optimización de la producción y actividad antimicrobiana de bacteriocinas sintetizadas por cepas aisladas de bebidas fermentadas mexicanas. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), pp. 269-274.

Prior RI, Wu X, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agri Food Chem*, 53, pp. 4290–4302.

Rogelio F (2006) *Alternativas tecnológicas del cocotero de Asia-Pacífico, ventaja competitiva para el cocotero de México*. Tesis de doctorado publicada. Colima, Mexico: Universidad de Colima.

Runeberg-Roos P, Saarma M (1998) Phytapsin, a barley vacuolar aspartic proteinase, is highly expressed during autolysis of developing tracheary elements and sieve cells. *Plant J*. 15, pp. 139-145.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Sánchez-Moreno C (2002) Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Tech Int*, 8, pp.121-137.

Schlesier K, Harwat M, Bohm V, Bitsch R (2002) Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radic Res*. 36, pp. 177-187.

Serrano M, López M, Sainz T (2006) Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 37(4), pp. 58-68.

Tamang JP, Watanabe K, Holzapfel WH (2016) Review: Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-28.

Urbina-Bonilla, A. (2008). Nuevo papel de los radicales libres en el ejercicio: ¿otra paradoja?. *Colom méd*. 39(3), pp. 266-275.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

IMPLEMENTATION OF SUBSURFACE FLOW ARTIFICIAL WETLANDS FOR THE TREATMENT OF DOMESTIC WASTEWATER IN THE SENU ALMENDROS INDIGENOUS RESERVE, MUNICIPALITY OF SAN JUAN DE URABA

Implementación de humedales artificiales de flujo subsuperficial para el tratamiento de aguas residuales domésticas en el Resguardo Indígena Senú los Almendros, municipio de San Juan de Urabá.

Diana Rodríguez Zúñiga^{1*}, María Elena González Duque², Kelly Leani Quintero Garcia³, Faber Esneider Villa³

⁽¹⁾Facultad de Ciencias Químicas, Universidad autónoma de Coahuila, Blvd. V. Carranza s/n. Col. República Oriente C.P.25280 Saltillo, Coah. México}

⁽²⁾Facultad de ciencias de la salud, Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, Carrera 78 # 65-46 Bloque Patrimonial - Piso 1, C.P. 050034 Medellín, Antioquia, Colombia

⁽³⁾Facultad de arquitectura e ingeniería, Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, Carrera 78 # 65-46 Bloque Patrimonial - Piso 1, C.P. 050034 Medellín, Antioquia, Colombia

Abstract

Artificial wetlands are eco-technologies that allow the purification of domestic wastewater generated in decentralized areas. This type of biological treatment does not require specialized staff for its maintenance. It is low cost, and it adapts to the environmental conditions where it is implemented. In this type of system, the development of microorganisms occurs, which are attached to the filter bed and the rhizosphere of the plants. These are responsible for the removal of organic matter and pathogenic microorganisms. This work presents a field pilot study, which was carried out for five families belonging to the Senú Almendros Indigenous Reserve, municipality of San Juan de Uraba, Antioquia, Colombia. The design and construction of the artificial wetland were performed according to the methodology proposed by the EPA 2000. The artificial wetland was designed as follows: 2 m long, 1.5 m wide, and 0.6 m deep; ¾ inch gravel was used as a filter bed and *Heliconia psittacorum* as a macrophyte with a planting density of 2 seedlings/m². The treatment system was monitored during nine samples, by evaluating: bioindicators of fecal and process contamination, COD, BOD₅, turbidity, pH, conductivity, temperature, and redox potential. During the nine months of operation, the artificial wetland treatment system showed an average removal efficiency of operation of 61, 70, 77, 94, 95 % for turbidity, BOD₅, COD, fecal coliforms, and total coliforms, respectively. These results show how artificial wetlands allow the efficient removal of pollutants in wastewater.

Key words: Artificial Wetland, Biological Treatment, Organic Matter, Bioindicators, Wastewater

Resumen

Los humedales artificiales son ecotecnologías que permiten depurar las aguas residuales domésticas generadas en zonas descentralizadas. Este tipo de tratamiento biológico no requiere personal especializado para su mantenimiento. Es de bajo coste, y se adapta a las condiciones ambientales donde se implanta. En este tipo de



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



sistema se produce el desarrollo de microorganismos que se fijan al lecho filtrante y a la rizosfera de las plantas. Estos son los responsables de la eliminación de la materia orgánica y de los microorganismos patógenos. Este trabajo presenta un estudio piloto en campo, que se realizó para cinco familias pertenecientes al Resguardo Indígena Senú Almendros, municipio de San Juan de Urabá, Antioquia, Colombia. El diseño y construcción del humedal artificial se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por la EPA 2000. El humedal artificial se diseñó de la siguiente manera: 2 m de largo, 1,5 m de ancho y 0,6 m de profundidad; se utilizó grava de $\frac{3}{4}$ de pulgada como lecho filtrante y *Heliconia psittacorum* como macrófita con una densidad de siembra de 2 plántulas/m². El sistema de tratamiento fue monitoreado durante nueve meses, evaluando: bioindicadores de contaminación fecal y de proceso, DQO, DBO₅, turbidez, pH, conductividad, temperatura y potencial redox. Durante los nueve meses de funcionamiento, el sistema de tratamiento de humedales artificiales mostró una eficiencia media de eliminación del 61, 70, 77, 94, 95 % para turbidez, DBO₅, DQO, coliformes fecales y coliformes totales, respectivamente. Estos resultados muestran cómo los humedales artificiales permiten eliminar eficazmente los contaminantes presentes en las aguas residuales.

Palabras clave: Humedal artificial, tratamiento biológico, materia orgánica, bioindicadores, agua residual

Introduction

According to the United Nations World Water Development Report, 80% of the wastewater produced in the world is discharged into aquatic ecosystems without prior treatment (United Nations, 2021a); in addition, global water stress due to climate change has led to a shortage of drinking water, which has motivated the scientific community to seek sustainable alternatives for the treatment and reuse of wastewater as an alternative water resource for different industrial and agricultural uses (WWAP, 2021). UNESCO, (2020) highlights how the treatment of organic matter present in wastewater could reduce greenhouse gas emissions and how the reuse of treated wastewater could reduce the amount of energy consumed in water extraction and purification processes, thus contributing to climate change mitigation.

The simulation of natural heterotrophic and highly productive systems, such as artificial wetlands, which are also called biofilters, are considered biologically diverse ecosystems that can remove inorganic and organic pollutants, toxic waste, pathogenic microorganisms, suspended solids, and nutrients, such as nitrogen and phosphorus (Jehawi et al., 2020; Khalifa et al., 2020; Sbahi et al., 2020). Several studies have shown biological oxygen demand (BOD₅), chemical oxygen demand (COD), and total suspended solids (TSS) removal efficiencies of up to 99.70 %, respectively, by using subsurface flow constructed wetlands in order to treat domestic wastewater (Al-Ajalín et al., 2020; Chand et al., 2021).

Artificial wetlands have been described as ecotechnologies that allow the elimination of emerging pollutants, such as pharmaceuticals, personal care



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



products, nanomaterials, and food additives among others; thus causing a great impact on aquatic ecosystems (Miller Gil & Fábrega Duque, 2022). Another of the great features of artificial wetlands is their capacity to efficiently eliminate biological organisms. They are able to eliminate up to 97 % of the total number of bacteria (*E. coli*), viruses, protozoa, and helminths (Adrados et al., 2018; Sgroi et al., 2018; Shingare et al., 2019).

Plants play the most important role in artificial wetlands because they are responsible for the elimination of pollutants, either through solid retention, nutrient absorption, pollutant transformation or degradation, through synergy with microorganisms. In rhizomes, their roots function as an adhesion surface for biofilm-forming, facilitating aerobic degradation, as they release oxygen to the rhizosphere and the substrate, in addition to the adsorption of nutrients (Decezaró et al., 2018; Henny et al., 2022; Khalifa et al., 2020).

Plants commonly used to treat various wastewaters in constructed wetland systems include *Canna indica*, *Typha* sp., *Pragmites australia*, *Cyperus* sp., *Ipomoea aquatica*, and *Iris* sp. (Decezaró et al., 2018; Henny et al., 2022; Herazo et al., 2021; Khalifa et al., 2020; Moreira & Dias, 2020). However, few studies have been conducted on artificial wetland systems with ornamental plants, such as *Heliconia psittacorum* for wastewater treatment. This type of macrophytes increases the aesthetics of the treatment system, and it has been reported to contribute to the removal of BOD₅, phosphates and total coliforms: 71.64, 50.92

and 99.67 %, respectively (Cao et al., 2022; Kant Bhatia et al., 2022).

Artificial wetlands are proposed as a method that is easy to implement, affordable to maintain and appropriate for rural areas where the installation of a sewage system is not feasible (Miller Gil & Fábrega Duque, 2022; Wu et al., 2020). Artificial wetlands have been contemplated in the United Nations (UN) Millennium Ecosystem Assessment as an alternative to mitigate the effects of climate change and water availability in the world, by mitigating environmental and health problems in vulnerable populations, such as children and the elderly, due to the consumption or handling of contaminated water (United Nations, 2021b). Therefore, the objective of this study was to design and implement an artificial wetland with horizontal subsurface flow for the treatment of domestic wastewater generated by five families belonging to the Senu Almendros Indigenous Reserve, municipality of San Juan de Uraba, Antioquia, Colombia.

Materials and Methods

Description of the study area

The Senu Almendros Indigenous community is located approximately 5 km west of the town of San Juan de Uraba in the department of Antioquia, Colombia. It is in the extreme north of the department, in the lower part of the San Juan de Uraba river. At an altitude of 3 m above sea level, with an average temperature of 28 °C.

The Senu Almendros Indigenous community lacks wastewater treatment systems. The inhabitants opt for



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

By considering equation 2, the volume to be mixed of the eight-point samples was determined to obtain a final volume of 2 L of composite sample.

$$V_i = \frac{(Q_i * V)}{(Q_p * n)} \quad \text{Equation 2.}$$

Where,

V_i = Volume of each aliquot

V = Total volume to be made up (2 L)

n = Number of aliquots taken (8)

All samples were stored at 4 ± 2 °C, by ensuring the integrity and chain of custody of all samples.

Design and construction of treatment system

The method implemented in this study consisted of a primary treatment system composed of a grease trap, a plastic tank with a 2-inch inlet and outlet, and fittings arranged to retain the grease on the surface. Since it is less dense than water; the water then passes to the septic tank, which is a plastic container with a closed chamber where the wastewater is temporarily deposited with a hydraulic retention time of at least 24 h.

The post-treatment is carried out by means of an up flow anaerobic filter FAFA, which consists of a tank with a false bottom, where there is filtering material with a biofilm formed by anaerobic bacteria whose function is to perform a biological filtration, by eliminating most of the residual organic matter. The

liquid phase coming from the septic tank is directed toward the bottom of the FAFA and then rises slowly through the filtering material and flows to the outside until it reaches the artificial wetland.

A horizontal subsurface flow artificial wetland unit (length: 2 m; width: 1.5 m; depth: 0.6 m; slope: 1 %) was designed according to the specifications of the EPA 2000 manual (USEPA, 2000). The main features of the system are presented in Table 1.

The artificial wetland was constructed in concrete and waterproofed, with a capacity of 2 m³. The inlet zone was 0.70 m long, and the outlet zone was 0.5 m long. For these zones, coarse gravel of more than 5 cm in diameter was used to facilitate the distribution and collection of wastewater. In the treatment zone, ¾ inch gravel was used.

In the artificial wetland, *Heliconia psittacorum* was planted as a phyto-purifying macrophyte. The seedlings were obtained from the same region and were planted at a density of 2 seedlings/ m², the soil present at the root of the plants was carefully removed to avoid clogging the system.

The hydraulic retention time obtained in the design of the artificial wetland was 7 days, which is in line with that described by Delgadillo et al., (2010), which indicates that the hydraulic retention time for the design of subsurface flow wetlands ranges from 4 to 15 days, with a typical value of 7 days. Figure 2 shows a schematic diagram of the treatment train implemented in the Indigenous Reserve.

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Table 1. Hydraulic system characteristics.

Design parameters	Value	Unit	Symbol
BOD ₅ of raw wastewater	500	mgO ₂ / L	BOD ₅
Percentage of BOD _m at the outlet of the pretreatment system	30	%	%
BOD ₅ at the outlet of the pretreatment system gO ₂ / L	0.150	gO ₂ / L	BOD ₅
Average design flow rate	0.3	m ³ /day	
Average wastewater temperature	29	°C	T
Depth of filter media	0.6	m	Dm
Depth of water layer	0.5	m	Dwo
Boundary surface organic load	12.2	Gbod/ m ² dia	OLRlim
Wetland surface	4	m ²	A
Surface hydraulic load	8	cm/d	qs
K _{clean} for a diameter of 2-3 cm in diameter	100000	m/d	K _{clean}
Hydraulic conductivity initial treatment zone (1 % de K _{clean})	1000	m/d	Ki
Hydraulic conductivity final treatment zone (10 % de K _{clean})	10000	m/d	Kf
dhi (10 % of the medium depth)	0.060	m	dhi
Area of initial treatment zone (30 % of treatment zone area)	1	m ²	-
Minimum wetland width	0.105	m	Wm
Wetland length	2.0	m	L
Total width	1.5	m	Wt
Hydraulic retention time	7.4	days	RTH
Slope at bottom of bed	1	%	-

Collection of wetland plants and their adaptability

Emergent plants of *Heliconia psittacorum* were collected in a nearby area of the Indigenous Reserve. After collection, they were properly washed to remove

any debris adhering to them. The pseudotalli were cut at 10 cm from the base and the rhizomes were divided into sections with one to two stems. All roots, stems, and dead leaves were removed, and disinfected, by

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

immersing them in fungicide solution. The rhizomes were planted in black bags with organic fertilizer obtained from compost, in the following four weeks, the

development of new roots and shoots was observed. After four months, seedlings were obtained for transplanting to the artificial wetland.

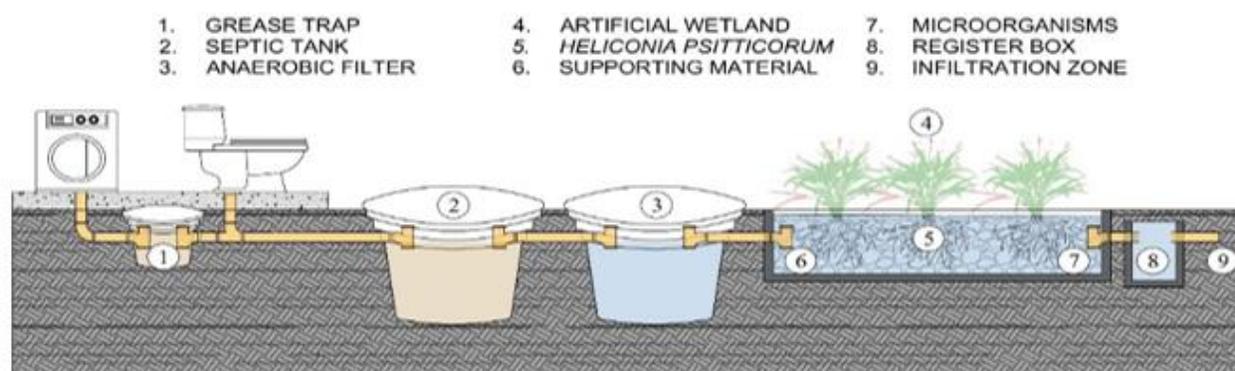


Figure 2. Schematic diagram of the pilot scale treatment train

Water quality analysis

Water quality sampling was performed according to the instructions for wastewater sampling of the Institute of Hydrology, Meteorology, and Environmental Studies (IDEAM, 2007). To evaluate water quality and treatment performance, the HACH Sension+pH kit was used to measure parameters, such as: pH, oxidation-reduction potential, conductivity, and temperature. Turbidity was measured by using the HF Scientific Micro Tpw portable turbidity meter. For the analysis of physicochemical variables, such as BOD₅ the SM 5210B-4500-OH luminescence technique was used. For COD, the measurement was performed, by using the closed reflux colorimetric method. Total and fecal coliforms were evaluated, by using the most probable

number (MPN) method, by using Fluorocult LMX broth incubated for 24 h at 37 °C.

Data analyses

Removal efficiency (RE) were calculated based on the following.

$$RE = \frac{C_{in} - C_{out}}{C_{in}} * 100\% \text{ Equation 3.}$$

Where,

C_{in} and C_{out} is the influent and effluent concentrations, respectively.

Results and Discussion

Determination of the wastewater flow generated by the indigenous community

It was determined that the families have a daily discharge of 300 L of water regarding showers,

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

cisterns, laundry, and general cleaning. The data collected during the pre-sampling days allowed us to determine that Friday corresponded to the day with the highest wastewater flow generation. It was observed that on that day, laundry was done in the home, which was reflected in a continuous volumetric flow, especially between 8:00 a.m. and 15:00 p.m. Greater discharges were observed at 9:00 a.m., 12:00 p.m., and 2:00 p.m., since during these periods, the

inhabitants of the township performed food preparation and household cleaning activities. Figure 3 shows the results obtained in the pre-sampling day. It should be noted that these values cannot be taken as a reference for all discharge days during the treatment process. They represent the general behavior of daily wastewater discharges by the community in the Indigenous Reserve.

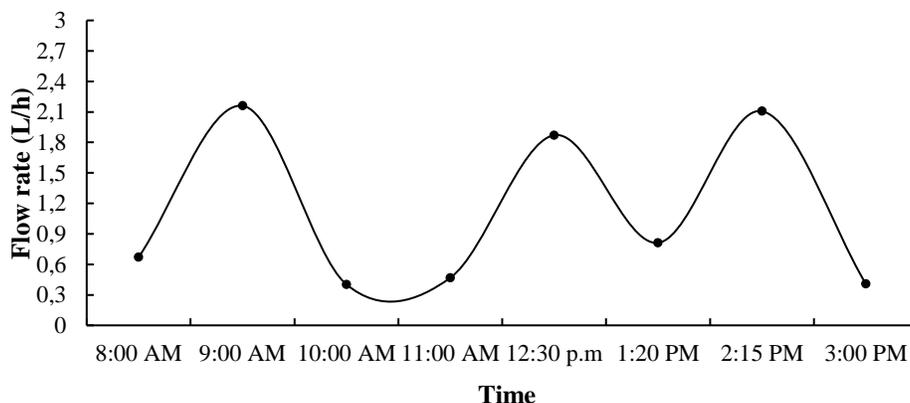


Figure 3. Average flow of wastewater generated in the family belonging to the Senu Los Almendros Indigenous reservation, Montecristo, San Juan de Uraba.

The discharges received by the treatment system are composed of wastewater from the bathroom, which mainly contains a mixture of water, soap, urine and feces, and wastewater from the kitchen, consisting of a mixture of water, soap, and fats.

Physicochemical and microbiological characterization of untreated wastewater

The biological oxygen demand (BOD₅) of the raw wastewater was 109 mgO₂/ L and the chemical oxygen

demand (COD) concentration was 300 mgO₂/ L. Quantification of total coliforms gave a result of 4.5x10⁹ NMP/ 100 mL and for *E. coli* it was 1.4x10⁹ NMP/ 100 mL. The results obtained from the initial characterization of the raw domestic wastewater illustrate the overall inlet water quality for the entire experiment, by showing the effect of the pretreatment system consisting of a grease trap, septic system, and anaerobic filter on the removal of contaminants from the wastewater. Physically, the domestic wastewater

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

from the Indigenous Reserve was characterized by a gray color, with a turbidity of 113 NTU. The solid material was composed of a mixture of feces, food particles, toilet paper, fats, oils, soap, salts, and detergents.

After pretreatment (consisting of the septic tank and the FAFA system), the presence of solids and grease in the wastewater was reduced. Turbidity, BOD₅, and COD removal efficiencies of 63, 64, and 58 %, respectively, were obtained, by indicating that the pretreatment system effectively fulfilled its function of eliminating settleable solids, organic matter, and grease, by demonstrating the importance of a pretreatment system prior to an artificial wetland to avoid obstructions or damage to the wetland. The

pretreatment system removes organic matter that could negatively impact the wetland's ability to effectively treat wastewater.

In the absence of a pretreatment system, the effectiveness of the wetland could be reduced or even completely compromised. The accumulation of solid materials could lead to clogged pipes, decreased oxygen levels, and increased stress on the wetland ecosystem. In general, the use of a pretreatment system prior to a constructed wetland is crucial to maintain the efficiency and integrity of the wetland treatment process (Shingare et al., 2019). Table 2 shows the average values for physicochemical and microbiological parameters during the monitoring of the treatment system.

Table 2. Average values of physicochemical and microbiological parameters in nine months of operation of the treatment train.

Parameter (units)	Influent	Wetland Inlet	Wetland Outlet	Percentage of removal
pH (Unit. pH)	7.32	7.01	7.22	
Temperature (°C)	28	28	28	
BOD ₅ total, by luminescence (mgO ₂ / L)	109	95	38	82
Conductivity (µs)	940	711	1032	
Potential redox (mV)	271	228	14.1	
Turbidity (NTU)	190	80	41	78
COD total, (mgO ₂ / L)	309	279	121	84
Total coliforms (NMP)	4.0 x10 ⁹	4.0 x10 ⁸	1.4 x10 ⁵	99
Fecal coliforms (<i>E. coli</i>) (NMP)	3.3 x10 ⁷	3.3 x10 ⁵	2.5x10 ³	97

During the operation time, variations were observed in the pollutant loads of the wastewater entering the wetland, even so, the designed system was very

effective in the removal with values of 82 % for BOD₅ and 84 % for COD, 78, 99, and 97 % for turbidity, total coliforms and fecal coliforms (*E. coli*) respectively.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



Shukla et al., (2021) achieved a removal efficiency between 78-79 % for BOD₅ and COD also Moreira & Dias, (2020) report how wetlands have been shown to consistently remove pollutants, with average removal efficiencies of 93 % for COD, and 70 % for BOD₅, results that coincide are in line with those obtained in this study. Herazo et al., (2021) demonstrated in his study that an artificial wetland cultivated with *Heliconia latispatha* had an efficient removal of pollutants such as COD by 69 %.

The removal of organic matter in the treatment system is accomplished by a combination of natural processes such as sorption, where contaminants of various structures and chemical compositions interact differently within the wetland substrate and may experience adsorption at different rates; it has been reported that the low water velocity along gravel, as a support material in the artificial wetland promotes sedimentation and adsorption of solid materials (Overton et al., 2023).

Miller Gil & Fábrega Duque, (2022) in their study reported that wetlands constructed with *Tanner Grass* (*Brachiaria arrecta*) were not efficient in the elimination of coliform bacteria. In contrast, the present study achieved a removal of fecal and total coliforms in the order of 4 logarithmic units, which is attributed to the hydraulic retention time. The results obtained under the current research have shown a satisfactory treatment for the elimination of organic matter, settleable solids, turbidity, total coliforms, and *E. coli*. The quality of the effluent treated in the wetland

complies with the maximum limit values allowed by the discharge regulations established (Resolution number 0631 of 2015) of the Ministry of Environment and Sustainable Development in Colombia.

In this sense, artificial wetland systems constitute a promising and sustainable solution for rural sanitation, with the potential to provide access to adequate and equitable sanitation and hygiene to several people, by reducing impacts on the environment and supporting recycling and safe reuse of wastewater, as expressed by the UN. Sustainable Development Goal 6, Targets 3 and 4 (Moreira & Dias, 2020).

Within the artificial wetland, it was observed during the first 4 weeks that the *Heliconia psittacorum* seedlings presented chlorosis and wilting of the leaves; while after 8 weeks they increased linearly in size and for the following 14 weeks, the presence of inflorescences and a gradual increase of daughter seedlings was observed. At 18 weeks, a total coverage of the wetland area by plants was observed, which indicated the adaptation to the concentration of organic matter that entered the wetland, by contributing to the formation of a microhabitat and the subsequent elimination of pollutants.

Heliconia psittacorum showed growth with an increase in shoot height and number of new seedlings, by suggesting that the plant has a high tolerance to domestic wastewater. The most important role of plants in wetland systems is pollutant removal, solids



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



retention, nutrient uptake, transformation, and degradation of pollutants through root synergy with microorganisms and biofilm (Henny et al., 2022).

Very few studies have been conducted on wetland systems, by using *Heliconia* sp. for the treatment of domestic wastewater. This pilot study allowed us to determine the effectiveness of this genus in the treatment of rural domestic wastewater.

Conclusions

This study demonstrated the significant role of played by artificial wetlands in the treatment of wastewater in decentralized areas, as well as their environmental importance in the reduction of organic load from domestic activities, such as laundry, kitchen washing, and sanitary uses. The treatment systems used in this project (grease trap, septic system, and anaerobic filter) were efficient when it came to eliminating organic components; likewise, the use of *Heliconia psittacorum* allowed an increase in the removal of BOD₅, COD, and turbidity.

The parameters evaluated showed a representative decrease of 61, 70, 77, 94, 95 % for turbidity, BOD₅, COD, fecal coliforms (*E. coli*), and total coliforms, respectively. These results showed the percentage efficiency of artificial wetlands for the treatment of raw water, in addition to their ease of operation, low cost, and adaptability to environmental conditions. Finally, they provided a positive architectural and landscape impact on the environment where they were implemented; by qualifying this system with an

enormous potential for the solution of sewage treatment in the place where they are generated.

Recommendations

In subsequent studies, it is suggested that this type of system be monitored for a longer period to validate the efficiency of this treatment and the removal of pollutants over time.

It is also recommended that a polishing treatment be carried out on the effluent of the artificial wetland to eliminate fecal and total coliforms for the reuse of this type of water in rural communities.

Further studies should include the evaluation of the bioaccumulation of contaminants in the *Heliconia psittacorum* plant, the evaluation of the biofilm formed, and other bioindicator organisms, such as algae, protozoa, and metazoa.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Institucion Universitaria Colegio Mayor de Antioquia for financing this project and especially the Health Sciences, Architecture and Engineering Faculties for the loan of laboratory facilities, equipment, and staff. The support of the community belonging to the Senú Indigenous Reserve is highlighted throughout the development of this project.

Gratitude also goes to Carlos Andrés Hernández, Luisa Fernanda Rodriguez, Diego Andrés Hoyos, Daniela Herrera, Daniel Suarez, and Joan Amir Arroyave, for constant support in the design, construction, and monitoring of the treatment system.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- Adrados B, Arias CA, Pérez LM, Codony F, Bécares EB, & Morató J (2018) Comparison of removal efficiency of pathogenic microbes in four types of wastewater treatment systems in Denmark. *Ecological Engineering* 124. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.09.013>
- Al-Ajalín FA, Idris M, Abdullah SR, Kurniawan, SB & Imron MF (2020) Effect of wastewater depth to the performance of short-term batching-experiments horizontal flow constructed wetland system in treating domestic wastewater. *Environmental Technology and Innovation* 20. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101106>
- Cao X, Jiang L, Zheng H, Liao Y, Zhang Q, Shen Q, Mao Y, Ji F & Shi D (2022) Constructed wetlands for rural domestic wastewater treatment: A coupling of tidal strategy, in-situ bio-regeneration of zeolite and Fe(II)-oxygen denitrification. *Bioresource Technology* 344(126185). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126185>
- Chand N, Suthar S & Kumar K (2021) Wastewater nutrients and coliforms removals in tidal flow constructed wetland: Effect of the plant (*Typha*) stand and biochar addition. *Journal of Water Process Engineering* 43(102292). <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102292>
- Decezaro ST, Wolff DB, Araújo RK, Faccenda HB, Perondi T & Sezerino PH (2018) Vertical flow constructed wetland planted with *Heliconia psittacorum* used as decentralized post-treatment of anaerobic effluent in Southern Brazil. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 53(13). <https://doi.org/10.1080/10934529.2018.1530106>
- Delgadillo O, Camacho A, Andrade M & Pérez L (2010) Depuración de aguas residuales por medio de humedales artificiales Universidad Mayor de San Simón.
- Henny C, Rohaningsih D, Susanti E, Sumi F & Waluyo A (2022) Evaluation of *Heliconia psittacorum* in a Horizontal Flow Constructed Wetland (HFCW) System for the Treatment of Textile Wastewater. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 1062(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1062/1/012026>
- Herazo LC, Zurita F, Nani G, Del Ángel CO & Aguilar FA (2021) Treatment of swine effluent mixed with domestic wastewater and vegetation development in monoculture and polyculture horizontal subsurface flow wetlands *Ecological Engineering*. 173(106432).



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2021.106432>

IDEAM (2007) Instructivo Para La Toma De Muestras De Aguas Residuales. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial – República de Colombia, 3(17).

Jehawi OH, Abdullah SR, Kurniawan SB, Ismail NI, Idris M, Al Sbani, NH, MuhamadMH & Hasan HA (2020) Performance of pilot Hybrid Reed Bed constructed wetland with aeration system on nutrient removal for domestic wastewater treatment. *Environmental Technology and Innovation* 19(100891). <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100891>

Kant BS, Ahuja V, Chandel N, Gurav R, Kant Bhatia R, Govarthanan M, Kumar T V, Kumar V, Pugazendhi A, Rajesh BJ & Yang YH (2022) Advances in algal biomass pretreatment and its valorisation into biochemical and bioenergy by the microbial processes. *Bioresource Technology* 358(127437). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127437>

Khalifa ME, El-Reash YG, Ahmed MI & Rizk FW (2020) Effect of media variation on the removal efficiency of pollutants from domestic wastewater in constructed wetland systems. *Ecological Engineering* 143(105668). <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2019.105668>

Miller GL & Fábrega D J (2022) Reuse of Treated Domestic Wastewater by Employing Artificial

Wetlands in Panama. *Air, Soil and Water Research* 15. <https://doi.org/10.1177/11786221221074401>

Moreira F & Dias E. (2020) Constructed wetlands applied in rural sanitation: A review. *Environmental Research* 190. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110016>

Overton OC, Olson LH, Majumder SD, Shwiyat HF & Nairn RW (2023) Wetland Removal Mechanisms for Emerging Contaminants. *Land*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/land12020472>

Sbahi S, Ouazzani N, Latrach L, Hejjaj A & Mandi L (2020) Predicting the concentration of total coliforms in treated rural domestic wastewater by multi-soil-layering (MSL) technology using artificial neural networks. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 204(111118). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111118>

Sgroi M, Pelissari C, Roccaro P, Sezerino PH, García J, Vagliasindi FG & Ávila C. (2018) Removal of organic carbon, nitrogen, emerging contaminants and fluorescing organic matter in different constructed wetland configurations. *Chemical Engineering Journal* 332. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.09.122>

Shingare RP, Thawale PR, Raghunathan K, Mishra A & Kumar S (2019) Constructed wetland for wastewater reuse: Role and efficiency in removing enteric pathogens. *Journal of Environmental Management* 246.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.05.157>

Shukla R, Gupta D, Singh G & Mishra VK (2021) Performance of horizontal flow constructed wetland for secondary treatment of domestic wastewater in a remote tribal area of Central India. *Sustainable Environment Research* 31(1).

<https://doi.org/10.1186/s42834-021-00087-7>

UNESCO (2020) *La gestión del agua, elemento clave para afrontar el cambio climático*.

<https://es.unesco.org/news/gestion-del-agua-elemento-clave-afrontar-cambio-climatico>

United Nations (2021a) The United Nations World Water Development Report 2021: Valuing water. *En Unesco*.

United Nations (2021b) *UN spotlights rainwater recycling, artificial wetlands among «green» solutions*

to global water crisis.

<https://www.un.org/en/academic-impact/un-spotlights-rainwater-recycling-artificial-wetlands-among-green-solutions-global>

USEPA (2000) *Manual Constructed Wetlands Treatment of Municipal Wastewaters*. EPA/625/R-99/010. September, 166.

Wu H, Gao X, Wu M, Zhu Y, Xiong R & Ye S (2020) The efficiency and risk to groundwater of constructed wetland system for domestic sewage treatment - A case study in Xiantao, China. *Journal of Cleaner Production* 277.

<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123384>

WWAP (2021) The United Nations World Water Development Report 2021 VALUING. *En UNESCO*.

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

CARACTERIZACIÓN FENÓLICA, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIBACTERIANA DE *Pleurotus albidus*

Oscar Antonio Sánchez-Aguirre¹, Fabiola Citlaly Elvira-San Juan², Omar Germán Malagón-Avilés³, Régulo Llarena-Flores⁴ y Marina Guevara-Valencia^{2*}.

¹Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México. ²Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana, Orizaba, Veracruz, México, ³Departamento de Química, Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador. ⁴Facultad de Ciencias Biológico-Agropecuarias, Universidad Veracruzana, Peñuela, Veracruz, México.

*correo electrónico: mguevara@uv.mx

Resumen

Pleurotus albidus es un hongo nativo de América del sur, el cual es considerado una fuente importante de fibra y proteína, además destaca por contener bajos niveles de lípidos a comparación de otras especies del mismo género. Según reportes previos, *P. albidus* ha tenido efectos positivos frente a la obesidad, la formación de células espumosas, la hiperglicemia y la inflamación *in vitro*. El presente trabajo determina el contenido de compuestos fenólicos y evalúa su actividad antioxidante y antibacteriana en cepas de interés hospitalario en extractos de *P. albidus*. Los cuerpos fructíferos de *P. albidus* fueron sometidos a maceración con etanol y metanol. El contenido de compuestos fenólicos fue determinado mediante el método de Folin-Ciocalteu. La actividad antioxidante fue evaluada por el ensayo DPPH y la actividad antibacteriana por difusión en disco de Kirby-Bauer. Los resultados mostraron que ambos extractos presentan una actividad antioxidante débil, sin embargo, el extracto metanólico mostró el efecto frente al radical libre DPPH. En el caso de la actividad antibacteriana solo dos de las diez cepas fueron susceptibles al tratamiento presentando una fuerte inhibición frente a *P. aeruginosa* con zonas de inhibición mayor a 10 mm.

Palabras clave: *Pleurotus albidus*, compuestos fenólicos, actividad antioxidante, actividad antibacteriana.

Abstract

Pleurotus albidus is a mushroom native to South America, which is considered an important source of fiber and protein, also notable for containing low lipid levels compared to other species of the same genus. According to previous reports, *P. albidus* has had positive effects against obesity, foam cell formation, hyperglycemia, and inflammation *in vitro*. The present work determines the content of phenolic compounds and evaluates their antioxidant and antibacterial activity in strains of hospital interest in extracts of *P. albidus*. The fruiting bodies of *P. albidus* were subjected to maceration with ethanol and methanol. The content of phenolic compounds was determined by the Folin-Ciocalteu method. The antioxidant activity was evaluated by the DPPH assay and the antibacterial activity by Kirby-Bauer disk diffusion. The results showed that both extracts present a weak antioxidant activity, however, the methanolic extract showed the effect against the free radical DPPH. In the case of antibacterial activity, only two of the ten strains were susceptible to treatment, presenting strong inhibition against *P. aeruginosa* with zones of inhibition greater than 10 mm.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Key words: Pleurotus albidus, phenolic compounds, antioxidant activity, antibacterial activity.

Introducción

Los hongos son utilizados principalmente como alimento desde tiempos muy remotos, son únicos gracias a su sabor y textura, los cuales son reconocidos por su valor nutricional y culinario. Sin embargo, en las últimas décadas se ha demostrado su potencial actividad biológica; esto se atribuye a la presencia de metabolitos secundarios. Entre las actividades más destacables encontramos a la actividad antioxidante, hipocolesterolémica, antimicrobiana, inmunomoduladora, anticancerígena, entre otras. Por estas razones, los hongos pueden considerarse alimentos funcionales ya que pueden aportar beneficios a la salud más allá de los nutrientes que contienen (Pérez *et al.*, 2021).

Hoy en día, los hongos se utilizan en los campos de la medicina, la alimentación y la fermentación; se consideran una rica fuente de proteínas pues contienen todos los aminoácidos esenciales, además de fibra y poca grasa. Así mismo, aportan cantidades importantes de vitaminas y compuestos bioactivos, como ácidos grasos insaturados, compuestos fenólicos, tocoferoles y carotenoides (Carrasco-González *et al.*, 2017).

El género *Pleurotus* pertenece a la familia Pleurotaceae, comúnmente conocidos como “hongos ostra” por la forma de sus cuerpos fructíferos. Son populares por su textura, aroma y sabor, además del posible efecto sobre la salud humana de los compuestos bioactivos que contienen como son

polisacáridos, β -glucanos, considerados como alimentos funcionales probados, proteínas/enzimas, péptidos, lectinas, terpenoides, policétidos y compuestos fenólicos. Este género comprende aproximadamente 200 especies, que se distribuyen por todo el mundo, y se pueden encontrar en nichos ecológicos, en troncos y ramas de árboles podridos, pero se pueden cultivar en una amplia gama de climas templados y tropicales. conoce como hongos de pudrición blanca (Torres-Martínez *et al.*, 2022).

El género *Pleurotus* se encuentra entre las especies de mayor producción a nivel mundial. Las especies de hongos de este género exhiben efectos multidireccionales que promueven la salud. Además, se le llama la carne del pobre porque una variedad de sustratos considerados desechos se utilizan para cultivar hongos en condiciones rurales, lo que hace que las proteínas de los hongos sean más asequibles y estén más disponibles que las proteínas de origen animal.

Estos hongos son capaces de colonizar y degradar muchos residuos lignocelulósicos (residuos de algodón, cáscara de nuez, paja de arroz, trigo, sorgo, maíz, madera), y son fuente de importantes nutrientes y propiedades curativas. En comparación con otros tipos de hongos, estos requieren menos tiempo de crecimiento y rara vez son atacados por enfermedades y plagas (Liu *et al.*, 2019).

Entre estas especies encontramos a *P. albidus* (Figura 1), hongo nativo de América del sur, considerado una



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

fueron una fuente importante de fibra y proteína, además contiene bajos niveles de grasa a comparación de otras especies del género. De acuerdo con reportes científicos previos, *P. albidus* ha mitigado la obesidad, la formación de células espumosas, la hiperglicemia y la inflamación *in vitro*. Además, se ha reportado su actividad antioxidante en hepatocitos y células endoteliales. En cuanto a su composición fitoquímica

se ha identificado la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides y alcaloides (Quevedo *et al.*, 2021). Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo consiste en evaluar el contenido de compuestos fenólicos, la actividad antioxidante y antibacteriana de los extractos de acetato de etilo y metanol de *P. albidus*.



Figura 1. Cuerpos fructíferos de *Pleurotus albidus*.

Metodología

Material vegetal y obtención de extractos

Los cuerpos fructíferos de *P. albidus* fueron donados por el laboratorio de hongos y el área de proyectos en agroindustria de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Veracruzana campus

Peñuela. 17 g de material vegetal fueron depositados en un matraz Erlenmeyer de 500 mL al que se le agregaron 250 mL de acetato de etilo dejando en maceración durante 8 días. Este procedimiento se repitió para la obtención del extracto metanólico. Pasado el tiempo de maceración, el extracto se filtró al vacío y posteriormente el volumen de disolvente se

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

redujo con ayuda de un rotavapor. Los extractos obtenidos fueron almacenados en viales ámbar de vidrio y en refrigeración hasta su utilización.

Determinación del contenido total de polifenoles

Fue determinado mediante el método de Folin-Ciocalteu de acuerdo con Cai *et al.* (2004) con modificaciones. A 50 μL de muestra (1mg/mL), se añadieron 2.5 mL de una solución 1:10 del reactivo de Folin-Ciocalteu y 2 mL de Na_2CO_3 al 7.5%, las muestras se incubaron a 45°C durante 15 min. Transcurrido el tiempo se tomaron las lecturas de absorbancia a 765 nm utilizando un espectrofotómetro de UV-VIS (VelaQuin VE-550V). La cuantificación del contenido total de polifenoles se llevó a cabo a partir de una curva de calibración (6.75-1000 $\mu\text{g/mL}$ $R^2=0.9918$) en donde se utilizó como patrón ácido gálico.

Estimación de las propiedades antioxidantes usando DPPH

Para la determinación de las propiedades antioxidantes de los extractos de *P. albidus* se preparó una solución DPPH al 9×10^{-5} M en metanol preparada el día del ensayo, se tomaron 2.9 mL de esta solución y se añadieron 100 μL de las soluciones de los extractos a una concentración de 1 mg/mL. Las muestras fueron incubadas durante 30 min a 37°C en un baño maría protegidas de la luz, posteriormente se midió la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro de UV-VIS. Se utilizó como blanco

una solución con 100 μL de metanol en 2.9 mL de la solución de DPPH, la absorbancia se midió en cada ensayo. El experimento se llevó a cabo por triplicado. Como control positivo se usó una solución de ácido ascórbico en concentración de 5 mM (Brand-Williams *et al.*, 1995; Domínguez-Ortiz *et al.*, 2009). La actividad antioxidante fue determinada mediante la aplicación de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ DPPH reducido} = \frac{A - A1}{A} \times 100$$

Dónde:

A: Absorbancia del reactivo de DPPH

A1: Promedio de las absorbancias de las muestras

Método del Poder Reductor de Hierro FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

La solución FRAP fue preparada mezclando 100 mL de tampón de acetato (300 mM, pH 3,6), 10 mL de solución 10 mM de TPTZ (Complejo férrico-2,5,6-tripiridil-5-triazina) disuelto en una solución 40 mM de ácido clorhídrico y 10 ml de solución de cloruro férrico 20 mM (Benzie *et al.* 1996; Domínguez-Ortiz *et al.* 2009). A 150 μL del extracto (concentración de 1 mg/mL) se le añadieron 150 μL de agua destilada y 2.7 mL de solución FRAP. Las soluciones se incubaron a 37°C durante 4 min. Posteriormente, se leyó la absorbancia de las muestras a 593 nm utilizando como blanco el reactivo FRAP. Los resultados fueron expresados en $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$ basados en una curva de

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

calibración a partir de diferentes concentraciones de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 a 750 mmol/L $R^2=0.9906$):

$$\text{Absorbancia} = 0.0011(\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}) - 0.009$$

Actividad antibacteriana

Las cepas utilizadas para esta investigación fueron donadas por el laboratorio de microbiología del Hospital Regional del Instituto Mexicano del Seguro Social los cuales fueron resembrados en sus respectivos medios selectivos (tabla 1).

Tabla 1. Microorganismos utilizados

Microorganismo	Medio de cultivo	Procedencia	Microorganismo	Medio de cultivo	Procedencia
<i>Burkholderia cepacia</i>	CLDE	Urocultivo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Mac Conkey	Hemocultivo
<i>Enterococcus faecalis</i>	Mac Conkey	Urocultivo	<i>Salmonella Typhi</i>	Salmonella-Shigella	Coprocultivo
<i>Escherichia coli</i>	EMB	Urocultivo	<i>Serratia marcescens</i>	Agar sangre	Urocultivo
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Mac Conkey	Exudado faríngeo	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Agar sangre	bacteriemias
<i>Proteus mirabilis</i>	Mac Conkey	Exudado vaginal	<i>Staphylococcus aureus</i>	S-110	Exudado vaginal

Los inóculos fueron preparados de acuerdo con la escala 0.5 de McFarland, para ello, en condiciones de esterilidad una o dos colonias del cultivo fueron tomadas y depositadas en un tubo con 5 mL de solución salina y homogenizadas con ayuda de un vórtex. A continuación, se realizó una lectura en un espectrofotómetro UV-Vis a 600 nm, a una absorbancia entre 0.08 y 0.1 que corresponde a la escala 0.5 de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL). Por otro lado, los extractos de acetato de etilo y metanol en una concentración de 10 mg/mL fueron impregnados en discos de papel filtro Whatman no.1 con un diámetro de 0.5 cm estériles. Como control positivo se utilizó el antibiótico de amplio espectro ceftriaxona (10 μg por

disco) y como control negativo se usaron los disolventes utilizados en la extracción. Finalmente, cajas Petri con agar Mueller Hinton fueron inoculadas con las diferentes cepas por estriado con ayuda de un hisopo. Posteriormente, una vez inoculadas las cajas, los discos fueron depositados sobre la superficie del agar oprimiendo suavemente para asegurar el total contacto con el medio de cultivo. Finalmente, los cultivos fueron incubados a 37°C en una incubadora durante 24 h.

Después del tiempo de incubación se midieron las zonas de inhibición con ayuda de la regla y el porcentaje de inhibición fue calculado de acuerdo con la siguiente ecuación:

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{halo del extracto (mm)} - \text{halo del disolvente (mm)}}{\text{halo del antibiótico (mm)} - \text{halo del disolvente (mm)}} \times 100$$

Análisis estadístico

Los valores de inhibición de la actividad antibacteriana fueron tratados mediante un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software GraphPad Prism versión 8, La Jolla California USA. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la prueba estadística de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Mann-Whitney.

Resultados y discusiones

La tabla 2 muestra los resultados de la evaluación del contenido total de polifenoles de los extractos de

acetato de etilo y metanol de *P. albidus*. Estos muestran que ambos extractos son similares en su composición fenólica. La diferencia se observa en el porcentaje de reducción del radical libre DPPH en el que el extracto metanólico es ligeramente más activo que el de acetato de etilo con 32.39 % el cual es considerado una actividad antioxidante débil, además, este efecto se encuentra relacionado con las propiedades de reducir el Fe^{+3} a Fe^{+2} con 351.50 $\mu\text{mol Fe}^{+2}$. Estos resultados indican que, aunque la actividad antioxidante observada sea débil existen componentes que logran neutralizar al radical DPPH.

Tabla 2. Contenido total de polifenoles y actividad antioxidante de *P. albidus*

Extracto	mg ácido gálico/ g de muestra	% de DPPH reducido	$\mu\text{mol Fe}^{+2}$
Acetato de etilo	0.086 ± 0.012	21.89 ± 3.97	168.78 ± 24.55
Metanol	0.083 ± 0.001	32.39 ± 2.20	351.50 ± 6.67

La tabla muestra el promedio de tres replicas ± desviación estándar.

De acuerdo con el estudio realizado por Stastny *et al.* (2022) quien evaluó la actividad antioxidante de extractos metanólicos (80%) de especies del género *Pleurotus* como *P. flabellatus*, *P. pulmonarius*, *P. opuntiae* y *P. ostreatus* encontró que ninguno de los extractos de las especies estudiadas logró alcanzar una fuerte actividad antioxidante en comparación con un control de quercetina. Por otro lado, Bakir *et al.* (2018) encontró que es necesaria una concentración de 321 $\mu\text{g/mL}$ (actividad baja) para inhibir en un 50 % el radical libre DPPH en un período de 24 h a 20°C en

P. ostreatus. Algunos estudios revelan que ergotioneina, derivado de histidina es uno de los responsables de la actividad antioxidante en especies del género *Pleurotus* incluyendo a *P. albidus* (Halliwell *et al.*, 2018; Gambato *et al.*, 2018).

No sólo la ergotioneina ha sido el compuesto responsable de otorgarle propiedades antioxidantes a especies del género *Pleurotus*. Por ejemplo, en *P. ostreatus* se ha reportado que contiene ácido gálico y clorogénico, además de los flavonoides naringenina y hesperetenina.

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

También se han reportado a los flavonoides quercetina, rutina, hesperidina y miricetina en *P. tuberregium* (Ikewuchi *et al.*, 2013). Gambato *et al.* (2018) determinó que el extracto metanólico de *P. albidus* es una fuente importante de compuestos fenólicos en el que el 20 % de ellos está representado por flavonoides. En este sentido, en el presente trabajo el extracto metanólico de *P. albidus* posee una actividad antioxidante baja, la cual está relacionada con el contenido total de polifenoles y su capacidad de neutralizar radicales libres, posiblemente por la presencia de ergotioneina y flavonoides.

En el caso de la actividad antibacteriana ha llamado la atención que solo se presentó actividad en dos de las diez cepas estudiadas. Mostrando actividad débil en el extracto de acetato de etilo (Figura 2A) en *S. aureus* y *P. aeruginosa* con halos de inhibición menores a 4 mm y menores al control positivo. Este efecto se incrementó en las mismas cepas en el extracto metanólico (Figura 2B) presentando mejor efecto en *P. aeruginosa* con mayor inhibición respecto al control positivo. Cabe señalar que los disolventes utilizados no afectaron el desarrollo bacteriano lo que confirma que el efecto observado es debido a la presencia de los compuestos que constituyen los extractos.

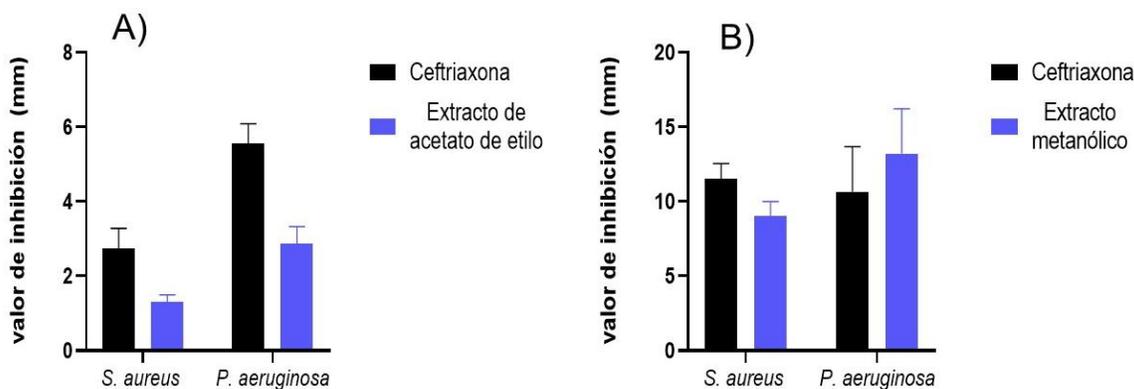


Figura 2. Actividad antibacteriana de *P. albidus*. A) extracto de acetato de etilo ($P < 0.005$), B) extracto metanólico ($P < 0.000$).

Las especies del género *Pleurotus* son consideradas una fuente importante de varios medicamentos antibacterianos ya que se han destacado por exhibir efectos significativos en bacterias Gram (+) y Gram (-). Sin embargo, el estudio realizado por Bawadekji *et al.* (2017) encontró un efecto similar al del presente trabajo, a partir del extracto acuoso de los cuerpos

fructíferos de *P. ostreatus* el cual mostró efecto únicamente en *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Identificaron un efecto muy marcado en *P. aeruginosa* en todas las concentraciones utilizadas (50, 100, 150 y 200 μL) y las zonas de inhibición (17, 20, 23 y 25 mm) presentadas fueron proporcionales a las cantidades de extractos analizadas, mientras que en *S. aureus* la



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

inhibición fue menor. Esta característica de *P. ostreatus* también se ha identificado en extractos de hexano, cloroformo, metanol y en extractos miceliales que no presenta efecto en varias cepas, excepto en *P. aeruginosa*.

Otro estudio revela que el extracto etanólico de los cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* ha presentado una baja actividad en *S. aureus* y *B. subtilis* con zonas de inhibición de 5 mm (100 mg/mL) mientras que el extracto metanólico ha tenido mejor efecto en *P. aeruginosa* y *B. thuringinis* con zonas de inhibición mayores a 10 mm (100 mg/mL). No obstante, la mayor actividad antibacteriana de la especie ha sido mayor en el extracto acuoso que ha sido capaz de inhibir a una gran variedad de bacterias Gram (+) y Gram (-) como *S. entérica*, *B. thuringiensis*, *P. aeruginosa*, *S. dysenteriae*, *S. pyogenes*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* y *K. pneumoniae* con zonas de inhibición de van desde 12 a 17 mm. Este mismo reporte indica que uno de los metabolitos responsables de la actividad es el ácido 3-(2-aminofeniltio)-3-hidroxipropanoico (Ahmed *et al.*, 2015).

Algunos autores como Tiwari *et al.* (2020) explican que el posible efecto antibacteriano que se presenta en especies del género *Pleurotus* puede ser debido a la presencia de alcaloides y flavonoides. Sin embargo, también algunos péptidos se han visto involucrados como es la eringeolisina y ostreolisina identificados en *P. eryngii* y *P. ostreatus*.

El presente trabajo es el primer reporte de las propiedades antioxidantes y antibacterianas de *P.*

albidus lo que da una oportunidad a investigaciones futuras para conocer su composición química y propiedades biológicas. Se sabe que dentro del grupo de metabolitos secundarios posibles de la actividad se encuentran los alcaloides y flavonoides, sin embargo, es necesario confirmar su presencia. Además, esta especie solo incluye reportes de uso como alimento, por lo que, sería de interés encontrar sus usos en la medicina tradicional los cuales se desconocen hasta la fecha.

Conclusiones

El extracto metanólico de *P. albidus* posee una actividad antioxidante débil, no obstante, el extracto metanólico mostró mejor efecto frente a radicales libres. Además, de mostrar efectos antibacterianos frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa* que de acuerdo con reportes previos encontrados en la literatura puede ser atribuido a la presencia de alcaloides, flavonoides o péptidos.

Referencias

- Ahmed, Y., Fang-Sheng, W., Hussien, E. (2015). Antimicrobial Activity of Extracts of the Oyster Culinary Medicinal Mushroom *Pleurotus ostreatus* (Higher Basidiomycetes) and Identification of a New Antimicrobial Compound. *International Journal of Medicinal Mushroom*, 17(6): 579-590.
- Bakir, T., Karadeniz, M., Unal, S. (2018). Investigation of antioxidant activities of *Pleurotus ostreatus* stored at different temperatures. *Food Science & Nutrition*, 6: 1040-1044.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

- Bawadekji, A., Mridha, M., Ali, A., Basha, J. (2017). Antimicrobial Activities of Oyster Mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex. Fr.) Kummer. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 7(10): 227-231.
- Benzie, I., Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1): 70-76.
- Brand-Williams, W. Cuvelier, M., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant capacity. *Food Science and Technologic*, 28(1): 25-30.
- Cai, Y., Luo, Q. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life sciences*, 74: 2157-2184.
- Carrasco-González, J., Serna-Saldívar, S., Gutiérrez-Urbe, J. (2017). Nutritional composition and nutraceutical properties of the *Pleurotus* fruiting bodies: Potential use as food ingredient. *Journal of Food Composition and Analysis*, 58: 69-81.
- Dominguez-Ortiz, M., Muñoz, O., García, R., Vázquez, M. (2009). Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Moussonia deppeana*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9(1): 13-19.
- Gambato, G., Pavao, E., Chilanti, G., Claudete, R., Salvador, M., Camassola, M. (2018). *Pleurotus albidus* modulates mitochondrial metabolism disrupted by hyperglycaemia in EA.hy926 endothelial cells. *BioMed Research International*, 2859787.
- Halliwell, B., Cheah, I., Tang, R. (2018). Ergothioneine a diet derived antioxidant with therapeutic potential. *FEBS Letters*, 592(20): 3357-3366.
- Ikwuchi, J., Ikwuchi, C., Ifeanacho, M., Igboh, N., Ijeh, I. (2013). Moderation of hematological and plasma biochemical indices of sub-chronic salt-loaded rats by aqueous extract of the sclerotia of *Pleurotus tuberregium* (Fr) Sing's: implications for the reduction of cardiovascular risk. *Journal of Ethnopharmacology*, 150: 466-476.
- Liu, X., Pang, H., Gao, Z., Zhao, H., Zhang, J., Jia, L. (2019). Antioxidant and hepatoprotective activities of residue polysaccharides by *Pleurotus citrinipileatus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131: 315-322.
- Pérez, A., Rangel-Vargas, R., Lorenzo, J., Romero, L., Santos, E. (2021). Edible mushrooms as a novel trend in the development of healthier meat products. *Current Opinion in Food Science*, 37: 118-124.
- Quevedo, P., Parron, M., Echer, E., Türck, P., Camassola, M., Cavalheiro, P. (2021). Beneficial effects of *Pleurotus albidus* supplementation on body weight and food intake in healthy C57B6/6 mice. *Journal of future foods*, 1(1): 98-103.
- Stastny, j., Marsik, P., Tauchen, J., Bozik, M., Mascellani, A., Havlik, J., Landa, P., Jablonsky, I., Tremel, J., Herczogova, P., Bleha, R., Synytsya, A.,



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Kloucek, P. (2022). Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of Five Medicinal Mushroom of the Genus *Pleurotus*. *Antioxidants*, 11: 1569.

Tiwari, A., Pandey, I., Kerkar, P., Singh, M. (2021). Antimicrobial Activity and Mycochemical profile of methanol extract from *Pleurotus flabellatus*. *Vegetos*, 34(3): 619-629.

Torres-Martínez, B., Vargas-Sánchez, R., Torrescano-Urrutia, G., Esqueda, M., Rodríguez-Carpena, J., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. Sánchez-Escalante. (2022). A. *Pleurotus* Genus as a Potential Ingredient for Meat Products. *Foods*, 1: 179.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIFIDOGÉNICO DE FRUCTANOS DE AGAVE Y NARINGINA/ β -CICLODEXTRINA SOBRE *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* BB536

Nathalie Schlienger, Hugo Espinosa*, Marisela González, José Daniel Padilla

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Zapopan, Jalisco, México. CP 45019.

*Contacto: hespinosa@ciatej.mx

Resumen

Uno de los mayores géneros microbianos que habitan el tracto gastrointestinal son las bifidobacterias. Se ha visto que la cepa probiótica *Bifidobacterium longum* BB536 es segura y promueve la modulación de la microbiota intestinal. Los prebióticos, como los fructanos de agave, pueden estimular el crecimiento de *Bifidobacterium spp.* La naringina es una flavanona poco soluble en agua, que también puede favorecer la modulación de la microbiota al inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y fomentar el crecimiento de bacterias probióticas. Es posible mejorar la bioaccesibilidad y solubilidad de la naringina al ser encapsulada en β -ciclodextrina. La combinación de fructanos de agave y naringina con β -ciclodextrina puede aumentar su efectividad en la promoción del crecimiento de *B. longum* BB536.

En este trabajo se analizó la capacidad de la cepa probiótica *B. longum* BB536 para metabolizar los fructanos de agave y el complejo de naringina/ β -ciclodextrina. Los resultados indican que estos sustratos podrían ser una opción de sustrato bifidogénico para productos pre y probióticos.

Palabras clave: simbiótico, bifidobacteria, prebiótico, probiótico

Abstract

Bifidobacteria is one of the largest microbial genera inhabiting the gastrointestinal tract. The probiotic strain *Bifidobacterium longum* BB536 is safe and promotes the modulation of intestinal microbiota. Prebiotics, such as agave fructans, can stimulate the growth of *Bifidobacterium spp.* Naringin is a water-insoluble flavanone that can also promote modulation of the microbiota by inhibiting the growth of pathogenic bacteria and promoting the growth of probiotic bacteria. Combining agave fructans and naringin with β -cyclodextrin may increase their effectiveness in promoting the growth of *B. longum* BB536.

This study analysed the capacity of the probiotic strain *B. longum* BB536 to metabolize agave fructans and the naringin/ β -cyclodextrin complex. The results indicate that these substrates could be a bifidogenic option for pre- and probiotic products.

Keywords: synbiotic, bifidobacteria, prebiotic, probiotic

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Introducción

Uno de los mayores géneros microbianos que habitan el tracto gastrointestinal son las bifidobacterias. *Bifidobacterium longum* BB536 es una cepa probiótica gram positiva, anaerobia y reconocida por la Food and Drug Administration (FDA) como segura. Además, *B. longum* BB536 ha mostrado ser efectiva para la modulación de la microbiota, mejorando síntomas gastrointestinales derivados de la intolerancia a la lactosa, alteraciones del metabolismo del lumen intestinal, entre otros (Sugahara et al., 2015; Vitellio et al., 2019).

Los probióticos son definidos como aquellos microorganismos que, al administrarse en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del hospedero. Estos microorganismos deben mostrar ciertas características y requerimientos tales como: ser aislados de individuos sanos, no ser una cepa patogénica, por lo que debe estar desprovista de plásmidos que puedan generar resistencia a antibióticos, además de tener la capacidad de adherirse y colonizar el epitelio del tracto gastrointestinal (Food and Agriculture Organization (FAO), 2002; Hill et al., 2014).

Los prebióticos son sustratos que estimulan el crecimiento de los microorganismos probióticos y que producen una modulación de la microbiota del hospedero (Gibson et al., 2017). En ese sentido, aquellos prebióticos que son específicamente metabolizados por bifidobacterias se denominan “bifidogénicos”. Este potencial sinérgico puede variar

entre las especies autóctonas y alóctonas de *Bifidobacterium*, por lo tanto, es conveniente evaluar su afinidad a la hora de diseñar formulaciones que contengan pre y probióticos (Gänzle et al., 2021).

Los fructooligosacáridos (FOS) y compuestos fenólicos tales como los fructanos de agave y la naringina son considerados prebióticos, además de que promueven la salud e integridad del epitelio gastrointestinal (Liu et al., 2017.; P. Liu et al., 2020). Los FOS más estudiados son los derivados de la *Cichorium intybus*, sin embargo, también se utilizan los de trigo y fructanos de agave. La adición de FOS promueve el aumento de la población autóctona de *Bifidobacterium spp.* (Nagy et al., 2022). Los fructanos de agave actúan como un prebiótico efectivo para promover el crecimiento de bacterias probióticas como *Bifidobacterium spp.* en el tracto gastrointestinal. Además, los fructanos de agave han (Armas Ramos et al., 2019; McRorie & McKeown, 2017) mostrado ser antioxidantes y antiinflamatorios, lo que sugiere que podrían tener efectos beneficiosos más amplios en la salud humana. En general, el uso de fructanos de agave como un prebiótico natural podría ser una estrategia efectiva para mejorar la salud intestinal y promover el crecimiento de bifidobacterias.

Ahora bien, la naringina es la flavanona glicosilada más abundante en las toronjas y principal responsable de su amargor. La naringina ha mostrado tener actividad antiinflamatoria, antioxidante y antimicrobiana. Debido a este último punto, la naringina favorece la modulación de la microbiota



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



mediante la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas y fomentando el crecimiento de bacterias probióticas (Raja Kumar et al., 2019; Zhao & Liu, 2021). Sin embargo, es conveniente determinar cuáles son las cepas probióticas que se benefician de este flavonoide. Además, algunos autores (Cui et al., 2012; Gratieri et al., 2020; Xu et al., 2014) recomiendan formar un complejo con β -ciclodextrina para aumentar su bioaccesibilidad, biodisponibilidad y solubilidad.

El objetivo del presente trabajo es identificar *in vitro* el potencial bifidogénico de los fructanos de agave, naringina/ β -ciclodextrina y su combinación sobre la cepa probiótica *Bifidobacterium longum* BB536.

Material y Métodos

Material

La naringina (pureza >98%) y L-cisteína fueron compradas de Sigma-Aldrich (CDMX, México), la β -ciclodextrina, los fructanos de agave fueron comprados de The Iidea Company (Jalisco, México), el medio MRS fue comprado de Difco (Detroit, MI, USA) y el agar BSM se obtuvo de Becton Dickinson and Company (Sparks, MD, USA). Los demás reactivos utilizados eran de grado analítico.

Preparación del complejo naringina/ β -ciclodextrina

La encapsulación de naringina se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Xu et al. (2014) con modificaciones. La naringina y la β -ciclodextrina se pesaron en relación molar 1:1. La naringina se disolvió en etanol al 80% para posteriormente añadir una solución acuosa de β -ciclodextrina. Se mantuvo en

agitación por 30 min a 60 °C y luego por 5 h más sin la aplicación de calor. La mezcla se guardó 12 h a 4 °C y posteriormente fue secada por aspersión (DL410, Yamato Scientific America Inc., Santa Clara, CA, USA). El secado fue realizado con una temperatura de entrada de 130 °C usando una tasa de aire seco de 0.4 m³/min a 320 kPa. La temperatura de salida fue de 55 ± 2 °C. El polvo recuperado se guardó en bolsas al vacío a 25°C.

Cepa bacteriana y condiciones de cultivo

La cepa *Bifidobacterium longum* BB536 fue obtenida de América Alimentos (Jalisco, México) y activada de soluciones stock mantenidas a -80°C en glicerol al 50% y medio MRS suplementado con 0.05% de L-cisteína. La activación de la cepa se llevó a cabo por dos cultivos sucesivos en medio MRS con cisteína a 38°C por 72 horas en condiciones anaerobias. Las condiciones anaerobias se llevaron a cabo en jarra de anaerobiosis (Oxoid Ltd., Basing-stoke, UK) con bolsas generadoras de anaerobiosis (GasPak, BD).

Efecto prebiótico sobre *B. longum*

La cinética de crecimiento se realizó de acuerdo con el reporte de González-Ávila, et al. (2014) con modificaciones. El medio MRS con cisteína fue modificado reemplazando la glucosa como fuente de carbono con los diferentes sustratos (20 g/L) (Tabla.1). El medio sin glucosa fue usado como control negativo y el medio con glucosa fue usado como control positivo. Para determinar la viabilidad de *B. longum*

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

BB536 con cada sustrato, se cultivó en agar BSM para posterior conteo y estimación de UFC mL⁻¹.

Tabla. 1. Fuentes de carbono utilizadas

Fuente de hidratos de carbono (20 g/L)
Fructanos de agave (FRU)
Naringina/ β -ciclodextrina (NB)
Naringina/ β -ciclodextrina y fructanos de agave (NBF)
β -ciclodextrina (BCD)
Naringina (NAR)
Sacarosa (SAC)
Sin fuente de hidrato de carbono (SINHC)

Análisis estadístico

Se utilizó el software Statgraphics Centurion XVII Versión 17.0.16 (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). Los experimentos se realizaron por duplicado. Los datos fueron expresados como la media \pm desviación estándar. El análisis de varianza fue utilizado para conocer las diferencias entre los tratamientos, esto de acuerdo con la prueba de Tukey, con nivel de significancia de 95%.

Resultados y Discusión

La naringina, una flavanona glicosilada, representa un compuesto con potencial bioactivo, pero su aplicación tanto en entornos clínicos como experimentales se ve limitada por desafíos importantes, como su baja solubilidad, bioaccesibilidad y biodisponibilidad. Estas limitaciones dificultan su utilización práctica y su incorporación en formulaciones farmacéuticas y

alimentos funcionales. Por tanto, se requieren enfoques innovadores para superar estos obstáculos y aprovechar al máximo los beneficios terapéuticos y nutricionales de la naringina.

Una de las estrategias utilizadas para mejorar la solubilidad y biodisponibilidad de la naringina es la formación de complejos de inclusión con otras moléculas. Entre estas, la β -ciclodextrina ha sido ampliamente estudiada y utilizada como agente de encapsulación debido a su capacidad de formar complejos con compuestos hidrofóbicos, como la naringina. La β -ciclodextrina, con su estructura anular, puede envolver a la naringina en su interior, protegiéndola de la interacción con el agua y, por lo tanto, mejorando su solubilidad en medios acuosos. Además, este proceso de encapsulación contribuye a aumentar la estabilidad del compuesto y prevenir su

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

degradación prematura, lo que es esencial para garantizar la eficacia terapéutica y la viabilidad de aplicaciones prácticas (Wen et al., 2010).

En el presente trabajo, se llevó a cabo la preparación del complejo de inclusión de naringina/ β -ciclodextrina utilizando el método previamente descrito por Cui et al. (2012). Como resultado, se obtuvo un polvo altamente dispersable en agua (Fig.1). También se muestra la diferencia en la dispersión de la naringina sola y el

complejo de inclusión de naringina/ β -ciclodextrina a distintos valores de pH y a una temperatura de 38 °C, siendo la temperatura y el pH cercano a 7 el que se usó para las pruebas de crecimiento, es relevante destacar que estos dos parámetros son considerados factores que pueden tener un impacto significativo en la solubilidad del complejo formado (Heidary Moghaddam et al., 2020).

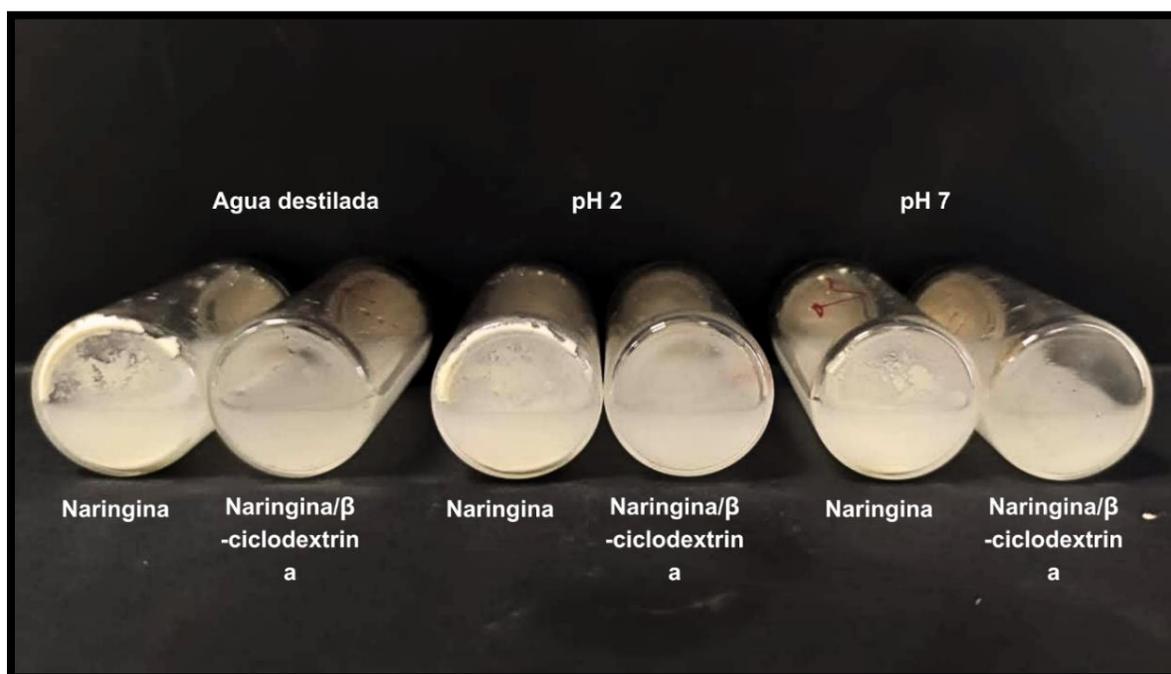


Fig. 1. Solubilidad de naringina y naringina/ β -ciclodextrina en agua a distintos pH.

La dispersión uniforme y estable del complejo de inclusión en agua sugiere un exitoso proceso de formación, donde la β -ciclodextrina encapsula eficazmente a la naringina, mejorando así su

solubilidad y evitando la formación de agregados que serían característicos de la naringina no complejada (Oliveira et al., 2020). Por otro lado, la naringina sola, sin formar el complejo, muestra una tendencia a



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

formar agregados y precipitar en el medio acuoso. Esta limitación en su solubilidad restringe su capacidad para disolverse y puede afectar su bioaccesibilidad y biodisponibilidad a la hora de ser metabolizada por bacterias probióticas como sustrato energético o incluso por los seres humanos lo que, en última instancia, mermaría su potencial bioactivo (Zhao et al., 2021). Esta mejora en la solubilidad y estabilidad es crucial para ampliar las aplicaciones potenciales de la naringina en diversas áreas, como la formulación de productos farmacéuticos o alimentos funcionales.

La cepa *B. longum* BB536, exhibe requerimientos nutricionales específicos para su crecimiento y supervivencia óptimos. Entre estos, destacan las fuentes de carbono, carbohidratos y aminoácidos esenciales como la cisteína y metionina, que desempeñan un papel crucial en el metabolismo y síntesis proteica bacteriana. Asimismo, esta cepa requiere la presencia de vitaminas esenciales, incluyendo el ácido nicotínico y el folato, que son vitales para diversas rutas metabólicas y el funcionamiento celular adecuado. También se han identificado otras vitaminas pertenecientes al complejo B, que son indispensables para el crecimiento y desarrollo de la bacteria (Schöpping et al., 2021).

Los resultados mostraron que el fructano de agave (FRU) fue el sustrato que favoreció una mayor viabilidad en el medio MRS modificado, alcanzando un conteo final de 1.62×10^{10} UFC/mL⁻¹ ($p < 0.05$) (Fig.2).

Estos hallazgos sugieren que la presencia de fructanos de agave por sí solos favorecen el crecimiento y la viabilidad de *B. longum* BB536, similar a lo reportado por otros autores que han utilizado oligofructosa producida por hidrólisis enzimática de la inulina de achicoria y donde tuvieron conteos finales arriba de 1.0×10^9 UFC ml⁻¹ y un índice de crecimiento de 73.01% con fructooligosacáridos (FOS) al 4%. Además, en un estudio reciente de Parhi et al. (2022) observaron que la cepa *B. longum* ATCCBAA-999 tuvo un índice de crecimiento de 73.01% con fructooligosacáridos (FOS) al 4%. Por lo tanto, el crecimiento de las bacterias se atribuye a la actividad de la fructofuranosidasa, aunque es importante tener en cuenta que la viabilidad celular dependerá del grado de polimerización de los FOS y de la cepa específica de bifidobacteria utilizada.

Ahora bien, la combinación del complejo de naringina/ β -ciclodextrina con fructanos de agave (NBF) permitió una viabilidad similar al control positivo en cual contenía sacarosa (SAC) teniendo conteos de 9.3 y 4.8×10^9 UFC ml⁻¹ respectivamente. Se puede observar este crecimiento debido a que *B. longum* BB536 es capaz de metabolizar el complejo NBF ya que presenta un conjunto de enzimas conocidas como β -glucosidasas, que juegan un papel crucial en el metabolismo de flavonoides. Estas β -glucosidasas tienen la capacidad de hidrolizar los enlaces de glicósidos presentes, por ejemplo, en la naringina, liberando así, la aglicona, la cual se encuentra unida a dos ramnosas.

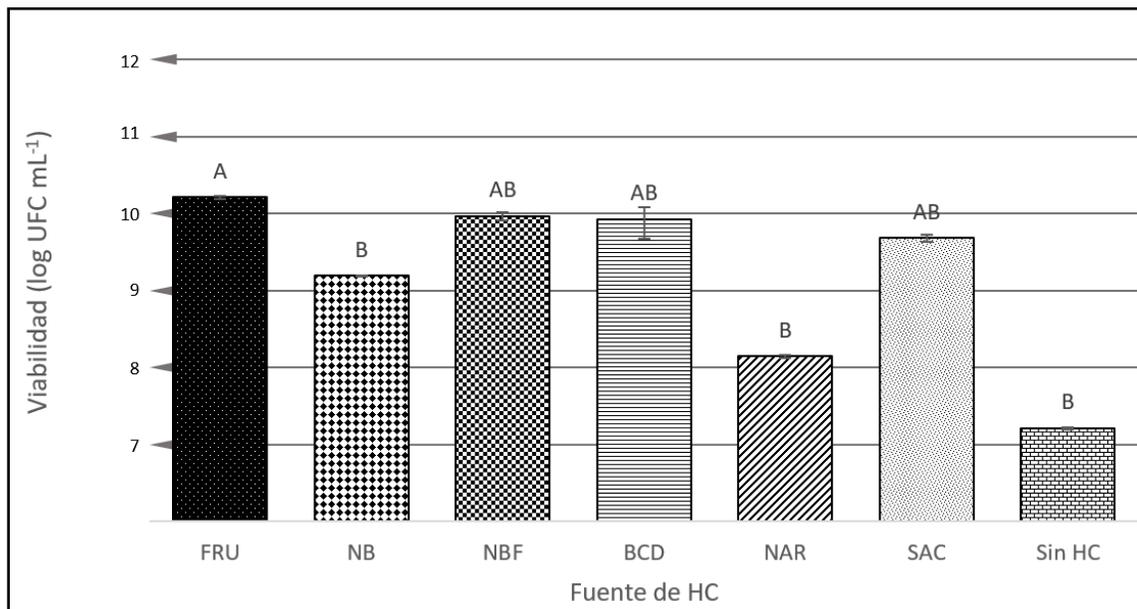


Fig. 2. Viabilidad de *B. longum* BB536 en presencia de los diferentes sustratos.

Este proceso de hidrólisis es fundamental para iniciar con la deglicosilación de la molécula, facilitando su asimilación y utilización por parte de la bacteria (Braune & Blaut, 2016).

Esto se evidencia en trabajos como el de Pereira-Caro et al. (2015), en el cual reportaron que la cepa *B. longum* R0175 es capaz de metabolizar flavanonas gracias a la acción de las β -glucosidasas de esta cepa, que permiten la deglicosilación de los compuestos. Sin embargo, se detectó que dosis elevadas de naringina (>50 $\mu\text{g/mL}$) pueden inhibir o reducir la viabilidad del microorganismo. En este estudio, se obtuvieron resultados similares, ya que la presencia de naringina (NAR) en el medio provocó una reducción en el crecimiento de *B. longum* BB536, llegando a un conteo

final de 1.4×10^8 UFC mL^{-1} . Incluso en el medio con el complejo de naringina/ β -ciclodextrina (NB), el crecimiento también se vio disminuido, obteniendo un conteo de 1.6×10^9 UFC mL^{-1} . Estos datos fueron comparables con el control negativo carente de fuente de hidrato de carbono (sinHC), donde solo se obtuvo una cantidad de 1.6×10^7 UFC mL^{-1} .

Adicionalmente, Fidéliz et al. (2020) llevaron a cabo un estudio clínico en el que observaron que el consumo diario de jugo de naranja provocó cambios en la microbiota de los participantes, específicamente, se incrementó la población de *Bifidobacterium spp.*, atribuyendo este aumento a la presencia de flavanonas en el jugo.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



También se evaluó a la β -ciclodextrina (BCD) para ver si tenía capacidad de sustrato energético. Si bien es un elemento que se utilizó para mejorar la solubilidad de la naringina y no se ha estudiado su posible efecto prebiótico a profundidad; en este trabajo se pudo encontrar que permitió una viabilidad similar a SAC y NBF, teniendo un conteo final de 8.5×10^9 UFC ml^{-1}

También se evaluó la β -ciclodextrina (BCD) para determinar si tenía alguna capacidad como sustrato energético. Aunque se utilizó principalmente para mejorar la solubilidad de la naringina y no se ha estudiado exhaustivamente su potencial efecto prebiótico, los resultados de este trabajo revelaron que la β -ciclodextrina permitió una viabilidad similar al medio con sacarosa (SAC) y la combinación de naringina/ β -ciclodextrina (NBF), alcanzando un conteo final de 8.5×10^9 UFC ml^{-1} . Singh et al. (2018) realizaron un trabajo en el que observaron que la incorporación de β -ciclodextrina en la encapsulación de *L. rhamnosus* GG en partículas de celulosa-quitosano mejoraba significativamente la viabilidad de las células, incluso independientemente del tamaño de las partículas utilizadas. Además, la presencia de β -ciclodextrina aumentó la eficiencia de encapsulación, lo que resultó en una mayor protección de las células probióticas durante la exposición a fluidos gastrointestinales simulados.

Estos resultados sugieren que la β -ciclodextrina podría desempeñar un papel más relevante en el crecimiento y la viabilidad de *B. longum* BB536 de lo

que se pensaba inicialmente. Aunque su principal función fue como material encapsulante, su capacidad para soportar el crecimiento bacteriano de manera similar a otras fuentes de hidratos de carbono abre nuevas perspectivas para futuras investigaciones sobre su potencial como prebiótico. Dado que los prebióticos son sustancias no digeribles que promueven selectivamente el crecimiento y actividad de microorganismos benéficos en el intestino, la β -ciclodextrina podría ser un candidato prometedor para ser estudiado en mayor profundidad como un posible compuesto prebiótico.

Los resultados obtenidos hasta ahora solo proporcionan un primer vistazo a la influencia de la combinación de fructanos de agave y naringina/ β -ciclodextrina en la viabilidad de *B. longum* BB536.

Para entender completamente su efecto y potencial como simbiótico, se requiere una investigación más detallada, incluyendo estudios *in vitro* e *in vivo* que evalúen su capacidad para promover el crecimiento de bifidobacterias y su impacto en la composición de la microbiota intestinal. Sería de gran interés explorar si la combinación de fructanos de agave y naringina/ β -ciclodextrina puede tener algún efecto sinérgico, permitiendo nuevas oportunidades en el desarrollo de formulaciones prebióticas y probióticas más efectivas.

Conclusión

Los resultados obtenidos en este estudio indican que la combinación de fructanos y naringina/ β -



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

ciclodextrina favorece el crecimiento y viabilidad de *B. longum* BB536, mostrando potencial como sustrato bifidogénico y simbiótico. La actividad de las enzimas β -glucosidasas en la bacteria juega un papel crucial en el metabolismo de la naringina, permitiendo su deglicosilación y asimilación.

Además, la β -ciclodextrina, utilizada principalmente para mejorar la solubilidad de la naringina, también podría tener un efecto beneficioso como posible compuesto prebiótico, aunque se requiere más investigación para comprender completamente su potencial y función en el crecimiento bacteriano.

Se requiere seguir explorando las interacciones entre prebióticos, probióticos y componentes bioactivos para comprender mejor los efectos sinérgicos y potenciar su aplicación en intervenciones nutricionales que mejoren la salud intestinal y el bienestar general del individuo. La investigación en esta área tiene el potencial de abrir nuevas oportunidades para el desarrollo de formulaciones más efectivas que otorguen beneficios para la salud.

Agradecimiento. A CONACYT (SEP-CONACYT 2018, A1-S-34273) por el financiamiento del trabajo.

Referencias

Armas Ramos, R. A., Martínez García, D., Pérez Cruz, E. R., Armas Ramos, R. A., Martínez García, D., & Pérez Cruz, E. R. (2019). Fructanos tipo inulina: efecto en la microbiotaintestinal, la obesidad y la saciedad. In *Gaceta Médica Espirituana* (Vol. 21, Issue 2). Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas.

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1608-89212019000200134&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Braune, A., & Blaut, M. (2016). Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut. *Gut Microbes*, 7(3), 216–234. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1158395>

Cui, L., Zhang, Z.-H., Sun, E., & Jia, X.-B. (2012). Effect of β -Cyclodextrin Complexation on Solubility and Enzymatic Conversion of Naringin. *Int. J. Mol. Sci*, 13, 14251–14261. <https://doi.org/10.3390/ijms131114251>

Fidélis, M., Milenkovic, D., Sivieri, K., & Cesar, T. (2020). Microbiota modulation and effects on metabolic biomarkers by orange juice: a controlled clinical trial. *Food Funct*, 11, 1599. <https://doi.org/10.1039/c9fo02623a>

Food and Agriculture Organization (FAO). (2002). *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food; Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.* <http://www.fao.org/es/ESN/Probio/probio.htm>

Gänzle, M., Andrew Mills, D., Riedel, C. U., Kelly, S. M., Sinderen, van D., Munoz-Munoz, J., & van Sinderen, D. (2021). *Plant Glycan Metabolism by Bifidobacteria.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.609418>



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 14, Issue 8, pp. 491–502). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>

Gratieri, T., Pinho, L. A. G., Oliveira, M. A., Sa-Barreto, L. L., Marreto, R. N., Silva, I. C., Gelfuso, G. M., de Souza Siqueira Quintans, J., Quintans-Junior, L. J., & Cunha-Filho, M. (2020). Hydroxypropyl- β -cyclodextrin-complexed naringenin by solvent change precipitation for improving anti-inflammatory effect in vivo. *Carbohydrate Polymers*, 231, 115769. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2019.115769>

Heidary Moghaddam, R., Samimi, Z., Moradi, S. Z., Little, P. J., Xu, S., & Farzaei, M. H. (2020). Naringenin and naringin in cardiovascular disease prevention: A preclinical review. *European Journal of Pharmacology*, 887, 173535. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2020.173535>

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and

prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>

Liu, F., Li, P., Chen, M., Luo, Y., Prabhakar, M., Zheng, H., He, Y., Qi, Q., Long, H., Zhang, Y., Sheng, H., & Zhou, H. (2017). Fructooligosaccharide (FOS) and Galactooligosaccharide (GOS) Increase Bifidobacterium but Reduce Butyrate Producing Bacteria with Adverse Glycemic Metabolism in healthy young population OPEN. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10722-2>

Liu, P., Bian, Y., Fan, Y., Zhong, J., & Liu, Z. (2020). Protective Effect of Naringin on in Vitro Gut-Vascular Barrier Disruption of Intestinal Microvascular Endothelial Cells Induced by TNF- α . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(1), 168–175. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06347>

McRorie, J. W., & McKeown, N. M. (2017). Understanding the Physics of Functional Fibers in the Gastrointestinal Tract: An Evidence-Based Approach to Resolving Enduring Misconceptions about Insoluble and Soluble Fiber. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 117(2), 251–264. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2016.09.021>

Nagy, D. U., Sándor-Bajusz, K. A., Bódy, B., Decsi, T., Van Harsselaar, J., Theis, S., & Lohner, S. (2022). Effect of chicory-derived inulin-type fructans on



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

abundance of Bifidobacterium and on bowel function: a systematic review with meta-analyses. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor and Francis Ltd.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2098246>

Oliveira, M. A., Heimfarth, L., Passos, F. R. S., Miguel-dos-Santos, R., Mingori, M. R., Moreira, J. C. F., Lauton, S. S., Barreto, R. S. S., Araújo, A. A. S., Oliveira, A. P., Oliveira, J. T., Baptista, A. F., Martinez, A. M. B., Quintans-Júnior, L. J., & Quintans, J. S. S. (2020). Naringenin complexed with hydroxypropyl- β -cyclodextrin improves the sciatic nerve regeneration through inhibition of p75NTR and JNK pathway. *Life Sciences*, 241, 117102.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117102>

Parhi, P., Song, K. P., & Choo, W. S. (2022). Growth and survival of Bifidobacterium breve and Bifidobacterium longum in various sugar systems with fructooligosaccharide supplementation. *Journal of Food Science and Technology*, 59(10), 3775–3786.

<https://doi.org/10.1007/s13197-022-05361-z>

Pereira-Caro, G., Oliver, C. M., Weerakkody, R., Singh, T., Conlon, M., Borges, G., Sanguansri, L., Lockett, T., Roberts, S. A., Crozier, A., & Augustin, M. A. (2015). Chronic administration of a microencapsulated probiotic enhances the bioavailability of orange juice flavanones in humans.

Free Radical Biology and Medicine, 84, 206–214.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.010>

Raja Kumar, S., Mohd Ramli, E. S., Abdul Nasir, N. A., Ismail, N. H. M., & Mohd Fahami, N. A. (2019). Preventive Effect of Naringin on Metabolic Syndrome and Its Mechanism of Action: A Systematic Review. In *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* (Vol. 2019). Hindawi Limited.

<https://doi.org/10.1155/2019/9752826>

Schöpping, M., Gaspar, P., Neves, A. R., Franzén, C. J., & Zeidan, A. A. (2021). ARTICLE Identifying the essential nutritional requirements of the probiotic bacteria Bifidobacterium animalis and Bifidobacterium longum through genome-scale modeling. *Systems Biology and Applications*.

<https://doi.org/10.1038/s41540-021-00207-4>

Singh, P., Medronho, B., Valente, A. J. M., Miguel, M. G., & Lindman, B. (2018). Exploring the prebiotic effect of cyclodextrins on probiotic bacteria entrapped in carboxymethyl cellulose-chitosan particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 168, 156–162.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.12.014>

Sugahara, H., Odamaki, T., Fukuda, S., Kato, T., Xiao, J.-Z., Abe, F., Kikuchi, J., & Ohno, H. (2015). Probiotic Bifidobacterium longum alters gut luminal metabolism through modification of the gut microbial community.

<https://doi.org/10.1038/srep13548>



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Vitellio, P., Celano, G., Bonfrate, L., Gobbetti, M., Portincasa, P., & De Angelis, M. (2019). Effects of bifidobacterium longum and lactobacillus rhamnosus on gut microbiota in patients with lactose intolerance and persisting functional gastrointestinal symptoms: A randomised, double-blind, cross-over study. *Nutrients*, 11(4).

<https://doi.org/10.3390/nu11040886>

Wen, J., Liu, B., Yuan, E., Ma, Y., & Zhu, Y. (2010). Preparation and Physicochemical Properties of the Complex of Naringenin with Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin. *Molecules*, 15(6), 4401–4407.

<https://doi.org/10.3390/molecules15064401>

Xu, X.-R., Yu, H.-T., Hang, L., Shao, Y., Ding, S.-H., & Yang, X.-W. (2014). Preparation of Naringenin/ γ -Cyclodextrin Complex and Its More Potent Alleviative Effect on Choroidal Neovascularization in Rats.

<https://doi.org/10.1155/2014/623509>

Zhao, Y., & Liu, S. (2021). Bioactivity of naringin and related mechanisms. *Pharmazie*, 76, 359–363.

<https://doi.org/10.1691/ph.2021.1504>

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO DE AGUA DE LA ACUACULTURA EN UN BIORREACTOR AIR-LIFT

Adriana Tronco ^a, Joanna Ramírez ^a, Martín Cruz ^b, Jorge Gracida ^a, Rodrigo Melgarejo ^c, Dulce María Palmerín ^a,

^a Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Qro., Querétaro, México. CP: 76010.

^b Departamento de Ingeniería y Tecnología, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-Campo Uno, Universidad Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, C.P. 54740.

^c Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, CDMX, México, C.P. 09340.

Autor de correspondencia: dulce.palmerin@uaq.mx

Resumen

El incremento de la acuicultura para satisfacer el rápido crecimiento de la población también ha incrementado el uso y desperdicio de agua para esta práctica. Las aguas residuales de los estanques de la acuicultura productoras de mojarra de San Juan del Río, Qro., contienen nutrientes provenientes del estiércol de los peces. Estas aguas residuales se desechan en ríos y desembocan en lagos y océanos generando más contaminación. Los nutrientes nitrógeno y fósforo pueden estimular el crecimiento de algas. Estos nutrientes pueden ser aprovechados para el crecimiento de microalgas y producir biomasa como ingrediente nutricional para alimento de ganado o como fertilizante orgánico NPK. En este trabajo, se cultivó un consorcio de microalgas nativas de Tarimoro, Gto., y Tula, Hidalgo en un biorreactor air-lift para evaluar su potencial como ficorremediación para el tratamiento de aguas de una pesquería de San Juan del Río, Qro, determinando el efecto del consorcio en la eficiencia de remoción de contaminantes y demostrando el posible uso de la reutilización de agua en la acuicultura. En este trabajo hubo una remoción de nitratos, nitritos, amoníaco y fósforo de hasta 90%. El crecimiento celular máximo alcanzado fue de 15 g/L y 10 µg/mL de clorofila.

Palabras clave: acuicultura, biorreactor air-lift, ficorremediación

Abstract

As aquaculture grows trying to supply the rapidly growing population, more water is used and wasted for this practice. The wastewater that comes out of farms is full of nutrients from fish manure. Unfortunately, this wastewater is dumped into rivers, creating nutrient pollution that ends up in our lakes and oceans. When dumped into the sea in large quantities, agricultural nutrients such as nitrogen and phosphorus can stimulate algae growth. The microalgae of aquatic bodies are fast growing that grow by absorbing nutrients from aquaculture water, transforming the biomass into a perfect functional and nutritional ingredient for livestock feed or as an organic NPK fertilizer. In this work, a consortium of native microalgae was cultivated in an air-lift bioreactor to evaluate their respective potential for the treatment of real aquaculture wastewater from a fishery, determining the effect of the consortium on the efficiency of contaminant removal demonstrating the possible use of water reuse in aquaculture.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



In this work there was a removal of nitrates, nitrites, ammonia and phosphorus of up to 90 %. The maximum cell growth achieved was 15 g/L and 10 µg/mL chlorophyll.

Key words: aquaculture, air-lift bioreactor, phycoremediation

Introducción

La producción acuícola mundial deberá alcanzar los 102 millones de toneladas para 2025 para mantener el nivel actual de consumo (FAO 2016). En la actualidad, el rápido desarrollo de la acuicultura ha causado graves problemas ambientales, especialmente el del tratamiento de aguas residuales (Latif et al., 2022). El efluente de esta industria es rico en carbono orgánico disuelto, compuestos nitrogenados (amoníaco, nitrito y nitrato) y fósforo, lo cual induce la proliferación de algas, deteriorando el ecosistema acuático natural si las aguas residuales no se tratan adecuadamente (Davoodikia et al., 2021 y Koul et al., 2022). Actualmente una de las fuentes principales de contaminación del agua es la acuicultura. Esta actividad aumenta su demanda a un ritmo acelerado, lo que se ve reflejado en el aumento de producción. En el 2018 se produjeron alrededor de 82.1 millones de toneladas de peces a nivel mundial (Crespo y Jiménez, 2021). En México la producción pesquera creció a 2 millones de toneladas (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, México, 2022).

La fitorremediación de aguas residuales ha recibido atención en los últimos años ya que las microalgas pueden asimilar el nitrógeno y fósforo para producir biomasa, además pueden acumular proteínas y

lípidos, (Kaloudas et al., 2021). En comparación con el método convencional de remediación, las técnicas de fitorremediación logran reducciones de costos y proporcionan bio-tratamiento terciario mientras se produce biomasa de alto valor agregado. La biomasa de las microalgas contiene tres componentes principales: las proteínas, cuyo porcentaje sobre el peso seco puede variar del 46-63%; los carbohidratos, con porcentajes entre el 10-17%; y los lípidos, con 4-61% (Mulumba y Farag, 2012). En menor medida; se encuentran los ácidos nucleicos. De todas ellas, los lípidos son las biomoléculas de mayor interés en el proceso de obtención de biocombustibles (Richmond, 2004). También, por medio de la fitorremediación se pueden eliminar metales pesados, así como sustancias orgánicas tóxicas, sin producir contaminación secundaria (Stephen et al., 2021). La fitorremediación con microalgas permite mediante enzimas como la glucosa oxidasa la ruptura de la melanoidina, que se encuentra presente en aguas residuales Kalavathi et al., (2001). Compuestos como la glutamina reducida, la riboflavina y el ácido ascórbico podrían utilizarse para mejorar la tasa de degradación de aguas residuales por parte de las microalgas. El peróxido de hidrógeno, un fuerte agente oxidante producido por las microalgas durante el



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

proceso fotosintético, se considera el agente fundamentalmente implicado en el tratamiento de aguas residuales industriales por parte de las microalgas (Krishnamoorthy & Manickam, 2021).

Algas y microalgas

Las algas comprenden tanto las macroalgas marinas (más comúnmente conocidas como algas marinas) como las microalgas. Especies de microalgas como *Scenedesmus*, se encuentran en agua dulce y se usan en gran medida como fuentes potenciales de biodiesel y durante procesos de purificación de aguas residuales, ya que proporcionan oxígeno para la descomposición de materia orgánica (Britannica, 2022). Las microalgas pertenecientes al género *Chlorella* han sido de las primeras microalgas consideradas para cultivo masivo y producidas comercialmente, pues se consideran una fuente de alimento rica en proteínas, aunque también se han propuesto como fuente de biocombustible (Borowitzka et al., 2018). Las especies de *Chlorella* son principalmente de agua dulce, comúnmente se encuentran en aguas muy ricas en nutrientes. También se encuentran en suelos (Borowitzka et al., 2018).

Biorreactor air-lift

Los fotobiorreactores son los sistemas más adecuados para el crecimiento de microalgas. Se debe considerar la selección, diseño y construcción de un biorreactor con un efectivo suministro de luz, el control

de temperatura, mezclado y pH debe ser eficiente (Ramírez et al., 2013 y López et al., 2010). Este tipo de biorreactores se han utilizado ampliamente en industrias biotecnológicas, químicas y en tratamiento de agua debido a su fácil construcción, bajo consumo de energía, alta eficiencia, mejor mezcla y la transferencia de masa es relativamente alta (Hernández et al., 2022 y Luo et al., 2011).

El objetivo de este trabajo consiste en evaluar la eficiencia de remoción de contaminantes provenientes de agua usada en la acuicultura, mediante un consorcio de microalgas nativas aisladas de cuerpos acuáticos de Tarimoro, Gto y Tula, Hidalgo, empleando un reactor air-lift.

Metodología

El consorcio de microalgas de los géneros *Chlorella* (12%), *Scenedesmus* (23%), *Euglena* (12%), *Nitzschia* (8%), *Golenkinia* (11%), *Pediastrum* (16%) y *Staurastrum* (18%), fueron precultivadas en medio BG11 formulado con macronutrientes [g/L]: K_2HPO_4 0.04, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.08, Ácido Cítrico. H_2O 6.0×10^{-3} , Citrato amonio férrico. $2H_2O$ 6.0×10^{-3} , $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ 1.0×10^{-3} , Na_2CO_3 0.02; micronutrientes [g/L]: H_3BO_3 2.8×10^{-3} , $MnCl_2$ 1.8×10^{-3} , $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2×10^{-3} , $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.4×10^{-3} , $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.08×10^{-3} , $CO(NO_3)_2 \cdot 5H_2O$ 0.05×10^{-3} , durante 15 días en un frasco-biorreactor con 0.1 vvm de flujo de aire a 30°C.

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Los sedimentos se lavan con agua desionizada y se centrifugan. Luego, la pastilla se re suspende en 200 mL de agua residual de la acuicultura (Rancho Monji, San Juan del Río, Qro) y se inocularon 1×10^6 cel/ml en un biorreactor air-lift de 4 L que contenía 3.75 L de agua residual de la acuicultura, manteniendo un flujo de aire de 1 vvm y 30°C. Se evaluó el consumo de los contaminantes, durante 26 días en el biorreactor.

Determinación de la calidad de agua

Para la determinación de la calidad del agua, la suspensión de microalgas se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.45 μm . A este sobrenadante se le determinó nitratos, nitritos, amonio y fósforo total por absorbancia, pH y conductividad eléctrica de acuerdo a Gholipour et al., 2020. La biomasa separada se utilizó para cuantificar peso seco y clorofila disponible en cada

muestra (Mera et al., 2016). Todas las muestras fueron cuantificadas por triplicado.

Resultados

Para la evaluación de contaminantes presentes en el agua de acuicultura, se obtuvieron los datos iniciales del agua para producción de mojarra del Rancho Monji después de 15 días de crecimiento de los peces (Tabla 1). Se compara con un análisis de datos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el uso de agua potable. Lo cual, se encontró concentrado en contaminantes y conductividad, respecto a lo indicado por la OMS. Esta agua es desechada, contaminando el suelo o ríos. La conductividad es una medida de la capacidad del agua para transmitir corriente eléctrica, en función de las sales disueltas y otras sustancias químicas inorgánicas conducen la corriente eléctrica, la conductividad aumenta a medida que aumenta la salinidad (Qasem et al., 2021).

Tabla 1. Cuantificación de contaminantes iniciales del agua de la granja Monji, San Juan del Río, Qro.

Agua	Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)	pH	Nitratos (mg/L)	Nitritos (mg/L)	Fosfatos (mg/L)	Amonio (mg/L)
Rancho Monji	1272	5.94	2400 ± 9.21	4.76 ± 0.76	926.75 ± 5.12	63.31 ± 3.01
Potable (OMS)	400-800	6.5-7.5	50	0.5	0.1	0.5

El pH fluctúa en los estanques de acuicultura, con un pH de 7 a 8, al principio del día, aumentando hasta un valor de 9.5 (Boyd Claude E., 2019). Esto da un valor de referencia para comparar con el pH de la muestra, que proviene de un criadero de mojarra, y cuyo valor

de pH se encuentra fuera del rango antes mencionado, (5.94).

El amoníaco es un compuesto extremadamente tóxico para los peces, valores menores a 1 mg/L,

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

comprometen la supervivencia de muchas especies e incrementan el estrés en muchas otras, dependiendo el tiempo de exposición. Según la especie, este compuesto puede ser tóxico, desde 0.08 mg/L para peces como los Salmónidos hasta 2.2 mg/L para las carpas (SAGARPA, 2018). Generalmente los peces de agua dulce son más tolerantes que los de agua salada (Blancas-Arroyo et al., 2014). La muestra resultó

mayor a 1 mg/L de NH_4/NH_3 , un valor peligroso para la vida acuática, sin embargo, la muestra se tomó a los 15 días de que se realizara el recambio de agua. Posteriormente, se realizó el conteo de células del consorcio de microalgas, para la obtención de inóculo en el biorreactor air-lift. Las microalgas nativas se pueden apreciar en la Figura 1.

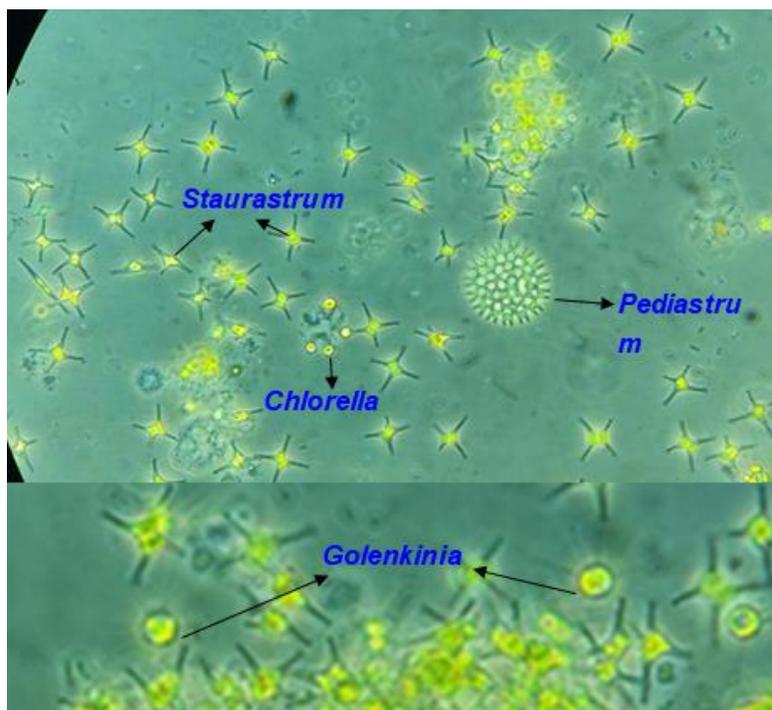


Figura 1. Consorcio de microalgas nativas utilizadas en el bioproceso.

El inóculo añadido al biorreactor fue de 1×10^6 células/mL, manteniendo un flujo de aire de 1 vvm y 30°C .

En la Figura 3 se muestra el perfil de consumo de nitratos y nitritos del agua de la granja de mojarra, en

el biorreactor air-lift, durante 26 días de bioproceso. El cambio regular de agua junto con la aireación frecuente disminuyó la concentración de los nitritos (Ciji et al., 2019).

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

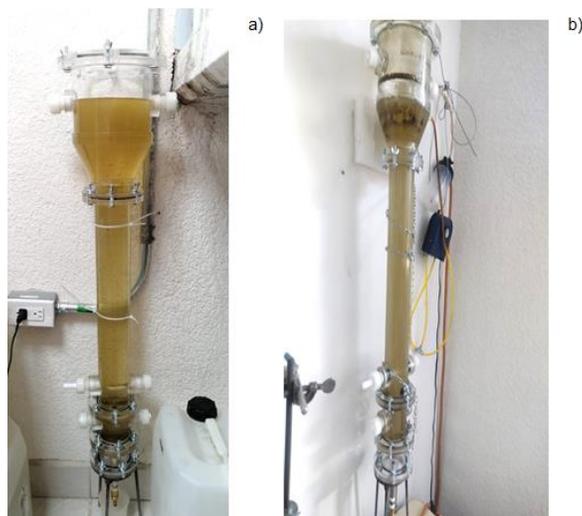


Figura 2. Biorreactor air-lift empleado para la evaluación del tratamiento de agua de acuicultura. a) inicio del proceso; b) biorreactor al final del proceso.

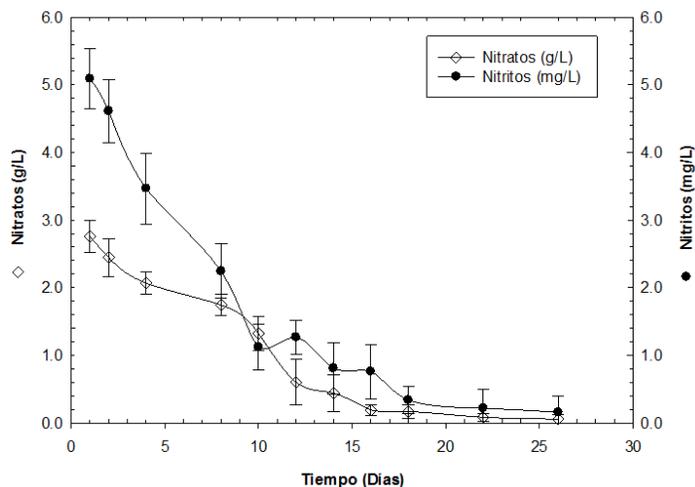


Figura 3. Cinéticas de consumo de nitratos y nitritos, durante 26 días de bioproceso, en el biorreactor air-lift a 1 vvm y 30°C.

Se observa en las Figuras 3 y 4, que existe un consumo de contaminantes por el consorcio de microalgas nativas, dentro de los primeros 12 días de bioproceso. Por lo que, la fitorremediación es una

alternativa eficiente para el tratamiento de aguas de acuicultura.

Jian Sun et al., (2020), demostraron que 100 mg/L de nitrógeno amoniacal se eliminan por completo en 90 h

utilizando un biocátodo de algas y bacterias, los autores atribuyen principalmente a la actividad de los oxidantes de amoníaco en presencia de oxígeno

fotosintético y el nitrato/nitrito resultante se eliminó de forma acelerada mediante la desnitrificación bioelectroquímica catódica.

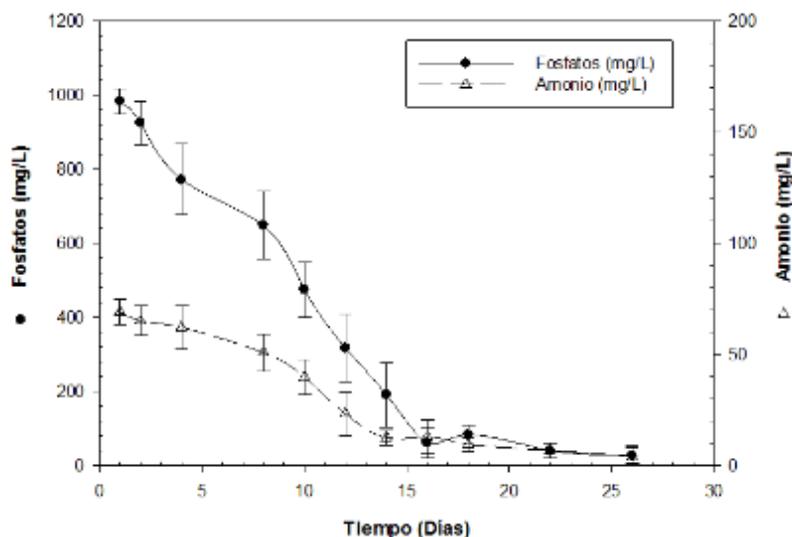


Figura 4. Cinéticas de consumo de fosfatos y amonio, durante 26 días de bioproceso, en un biorreactor air-lift a 1 vvm y 30°C.

El consumo de fosfatos parece ser más rápido, pues a partir del tercer día se muestra un cambio de pendiente (Figura 4), en comparación con el de nitratos, nitritos y amonio, que muestran un cambio más notorio en su pendiente a partir de los días 12 respectivamente (Figura 3). Arbib et al., 2014, reportan un comportamiento similar para el consumo de fosfato por las especies *Chlorella vulgaris*, *Chlorella Kessleri* y *Scenedesmus obliquus*, lo cual podría indicar que ciertas especies de microalgas tienen preferencia por un tipo de nutriente en específico, en este caso por los fosfatos.

Dentro de la clasificación de los pigmentos se encuentran los carotenoides, clorofilas y ficobilinas. El autor, Kim (2015) encontró que la microalga *Chlorella* spp., a 0.5 vvm en un reactor tubular, contiene una alta cantidad en luteína y clorofilas a, b, 0.45% y hasta 4.5% peso seco, respectivamente. En este consorcio de microalgas, contamos con el género *Chlorella*, por lo que se espera obtener una cantidad de clorofila superior.

Con respecto al crecimiento celular, (Figura 5) este ocurre dentro de los 12 a 15 días, esto puede deberse a que no todos los nutrientes consumidos por las

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

microalgas son utilizados para su crecimiento, ya que tienden a consumir nitrógeno y fósforo en exceso, a esto se le conoce como “luxury uptake” (Haro y Perales, 2015). La velocidad de crecimiento podría

incrementarse proporcionando al biorreactor una mejor calidad de luz, ya que en este estudio se trabajó con 12 h luz natural y 12 h en oscuridad.

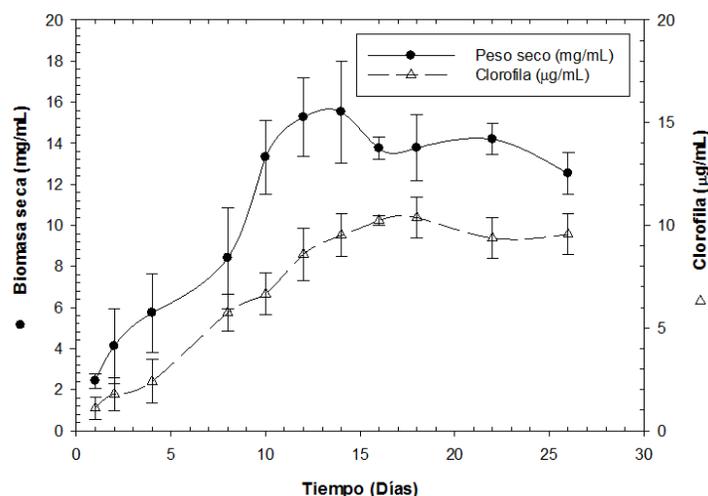


Figura 5. Cinéticas de producción de biomasa y clorofila, durante 26 días de bioproceso, en un biorreactor air-lift a 1 vvm y 30°C.

La biomasa de microalgas se utiliza en la acuicultura como alimento, potenciadores del crecimiento e inmunoestimulantes en peces. Los resultados obtenidos muestran un incremento de biomasa seca de hasta 15 g/L a los 13 días de bioproceso, así como la concentración de clorofila con 9.8 µg/mL al finalizar el bioproceso. Se ha observado que la disminución de la concentración de sal da como resultado un incremento de los niveles de clorofila (Hiremath & Mathad 2010). En este estudio se observa un incremento de clorofila conforme disminuye la cantidad de sales presentes en el agua (Figura 6). La concentración de clorofila-a por encima de 0.2 mg/m³

tiene un efecto positivo para aumentar la actividad planctónica que, en última instancia, ayuda a mejorar la actividad de los peces (Zainuddin et al. 2004). Esto significa, que la clorofila producida en este estudio podría ser utilizada como alimento para plancton, o pigmentos comerciales para aplicaciones industriales. Con respecto al pH, este tuvo un valor final al día 12 de pH 7.5, lo cual es un valor dentro del rango adecuado para acuicultura, pero, aunque se muestra un aumento del pH, se requiere monitorear constantemente para observar mejor el comportamiento de este y comparar con el consumo de los diferentes nutrientes (Figura 6).

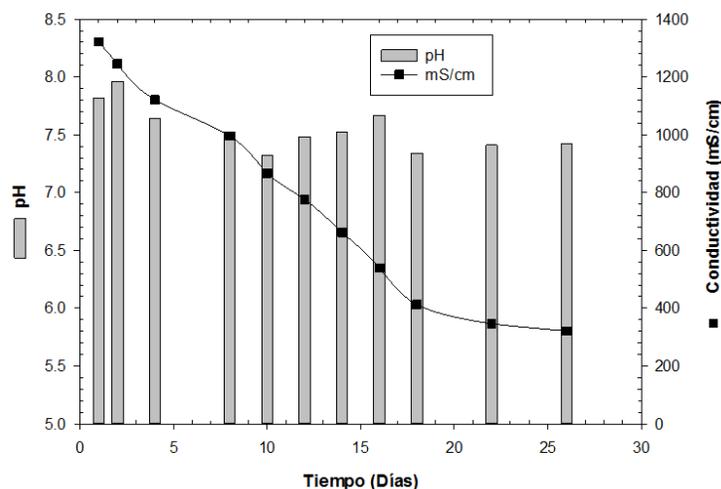


Figura 6. Cinéticas de pH y conductividad, durante 26 días de bioproceso, en un biorreactor air-lift a 1 vvm y 30°C.

La remoción total de nutrientes que se ha descrito en la literatura varía dependiendo principalmente de la o las especies de microalgas y el tipo de agua o medio utilizado. A la microalga *Chlorella vulgaris* se le ha asignado una eficiencia de remoción de 86% de nitrógeno inorgánico y 70% de fósforo inorgánico (Tam y Wong, 1996; Abdel-Raouf, et al., 2012). Hammouda et al., (1995), obtuvieron un consumo del 100% de nitrato, amonio y fósforo luego de 36, 42 y 48 días respectivamente, en cultivos de laboratorio utilizando *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. Nuestros resultados presentaron un consumo del 80% de contaminantes a los 12 días del bioproceso, en el cual se utilizó un consorcio de microalgas, con una notable presencia de *Chlorella* sp (12%) y *Scenedesmus* (23%). Finalmente se registró un consumo de: nitrato del 95%, consumiendo un total de 2400 mg/L en 26 días; fosfato del 90% consumiendo un total de 927 mg/L en 26 días; nitritos del 95% consumiendo un total de 5

mg/L en 26 días; amonio del 96% consumiendo un total de 63 mg/L en 26 días.

Conclusiones

El uso del consorcio de microalgas nativas de los cuerpos de agua de Tarimoro, Gto., y Tula, Hidalgo, es una alternativa para la limpieza de contaminantes presentes en aguas de granjas productoras de mojarra en San Juan del Río, Qro. Por lo tanto, este trabajo presenta una propuesta de inóculo, para reutilizar la propia agua en la producción de peces. Sin embargo, es necesario estudiar más a fondo las variables como la intensidad de luz, el inóculo inicial o la cantidad inicial de nutrientes en el biorreactor air-lift para conocer cuáles serían los valores óptimos y obtener el mayor consumo de contaminantes presentes en el agua residual, en el menor tiempo posible. Adicionalmente, la obtención de biomasa le da un valor agregado al proceso, pues actualmente se



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

estudian múltiples usos que se le puede dar, entre los que destaca el uso en biocombustibles, piensos y fertilizantes NPK, es por estas razones que podemos concluir que el cultivo de microalgas es ambientalmente atractivo.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Financiamiento

Esta investigación fue financiada por la UAQ (FOPER-2022-FQU02683).

Referencias

Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., & Ibraheem, I. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi journal of biological sciences*, 19(3), 257-275.

Arbib, Z., Ruiz, J., Álvarez-Díaz, P., Garrido-Pérez, C., & Perales, J. A. (2014). Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: Wastewater tertiary treatment, CO₂ bio-fixation and low cost biofuels production. *Water Research*, 49, 465–474. doi:10.1016/j.waters.2013.10.036.

Blancas-Arroyo, G. A., Frías-Sevilla, R., la Rosa-Pimentel, D., Suárez-Navarro, V., Castro-Gómez, J. R., & Magaña-Morales, J. (2014). Efecto de la salinidad en la sobrevivencia de peces silvestres del

género *Chirostoma* durante el transporte y mantenimiento en laboratorio. *Hidrobiológica*, 24(3), 223-230.

Borowitzka, M. (2018) Chapter 3 - Biology of Microalgae. En I. Levine & J. Fleurence (Eds.), *Microalgae in Health and Disease Prevention* (pp 23-72). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811405-6.00003-7>.

Boyd, C. E. (2019). *Water quality: an introduction*. Springer Nature. Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "Scenedesmus". Encyclopedia Britannica, 15 Nov. 2018, <https://www.britannica.com/science/Scenedesmus>. Accessed 6 April 2023.

Crespo, J. M., & Jiménez, A. (2021). Hacia el desarrollo sostenible de la pesca y la acuicultura en México. *Cuadernos Geográficos*, 60(3), 6-28. DOI: <http://dx.doi.org/10.30827/cuadgeo.v60i3.15953>.

Ciji, Alexander & Akhtar, M S. (2019). Nitrite implications and its management strategies in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*. 12. 10.1111/raq.12354.

Davoodikia M., Kamran Rezaei Tavabe, Ali Mashincian Moradi. 2021. Evaluation of the common duckweed (*Lemna minor*) phytoremediation on nitrate, phosphate, cadmium and lead parameters reduction



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

from aquaculture wastewater and determination of the heavy metals effects on this species growth inhibition. J. of aquaculture sciences.FAO (2016) State of World Fisheries and Aquaculture: Contributing to Food Security and Nutrition for All, p. 266. Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO), Rome. Italy

Gholipour, M., Mehrabanjoubani, P., Abdolzadeh, A. *et al.* Facilitated decrease of anions and cations in influent and effluent of sewage treatment plant by vetiver grass (*Chrysopogon zizanioides*): the uptake of nitrate, nitrite, ammonium, and phosphate. *Environ Sci Pollut Res* **27**, 21506–21516 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08677-5>

Hammouda, O., Gaber, A., & Abdelraouf, N. (1995). Microalgae and wastewater treatment. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 31(3), 205-210.

Haro, S., & Perales, J. A. (2015). Cinética de consumo de nutrientes y crecimiento de un bloom de microalgas en un fotobiorreactor High Rate Algae Pond (HRAP). *Tecnología y ciencias del agua*, 6 (3): 15-31.

Hernández AG, Aparicio G, Martínez Trujillo MA, Cruz Díaz MR. (2022). Modelo de dispersión axial para la producción de pectinasas por *Aspergillus flavipes* FP-500, en un biorreactor airlift de tubos concéntricos. Memorias del XLIII Encuentro Nacional de la AMIDIQ. 457–462.

Hiremath S, Mathad P. (2010). Impact of salinity on the physiological and biochemical traits of *Chlorella vulgaris* Beijerinck. *Journal of Algal Biomass Utilisation* 1: 51–59.

Jian Sun, Nan Li, Ping Yang, Yaping Zhang, Yong Yuan, Xingwen Lu, Hongguo Zhang, (2020). Simultaneous antibiotic degradation, nitrogen removal and power generation in a microalgae-bacteria powered biofuel cell designed for aquaculture wastewater treatment and energy recovery, *International Journal of Hydrogen Energy*, 45, (18), 10871-10881, <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.02.029>.

Kalavathi D., Uma L, Subramanian G. (2001). Degradation and metabolization of the pigment—melanoidin in distillery effluent by the marine cyanobacterium *Oscillatoria boryana* BDU 92181. *Enzyme and Microbial Technology*, 29 (4–5), 246-251, [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00383-0](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00383-0).

Kaloudas, D., Pavlova, N. & Penchovsky, R. Phycoremediation of wastewater by microalgae: a review. (2021). *Environ Chem Lett* **19**, 2905–2920. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01203-0>.

Koul, B., Sharma, K., & Shah, M. P. (2022). Phycoremediation: A sustainable alternative in wastewater treatment (WWT) regime. *Environmental Technology & Innovation*, 25. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.102040>



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



Krishnamoorthy, S., & Manickam, P. (2021). Phycoremediation of industrial wastewater: challenges and prospects. *Bioremediation for Environmental Sustainability*, 99–123. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-820318-7.00005-8>.

Latif Ahmad A., Jing Yi Chin, Mohd Hazarel Zairy Mohd Harun, Siew Chun Low. 2022. Environmental impacts and imperative technologies towards sustainable treatment of aquaculture wastewater: A review. *Journal of Water Process Engineering* 46, 102553. DOI:[10.1016/j.jwpe.2021.102553](https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102553)

López, A; Rojas, C. (2010). Diseño y montaje de un fotobiorreactor a escala laboratorio para la producción de microalgas (Tesis de pregrado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Luo, L; Liu, F; Xu, Y; Yuan, J. (2011). Hydrodynamics and mass transfer characteristics in an internal loop airlift reactor with different spargers. *Chemical Engineering Journal*, Mera, R., Torres, E., & Abalde, J. (2016). Effects of sodium sulfate on the freshwater microalga *Chlamydomonas moewusii*: implications for the optimization of algal culture media. *Journal of Phycology*, 52(1), 75-88. <https://doi.org/10.1111/jpy.12367>

Mulumba, N., and Farag, I. H. (2012) Tubular photobioreactor for microalgae biodiesel production,

International Journal of Engineering Science and Technology, 4 (2): 703-709.

Qasem, N. A., Generous, M. M., Qureshi, B. A., & Zubair, S. M. (2021). A comprehensive review of saline water correlations and data: part II—thermophysical properties. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 46, 1941-1979. <https://doi.org/10.1007/s13369-020-05020-5>

Ramírez-Mérida, Luis & Zepka, Leila & Jacob-Lopes, Eduardo. (2013). FOTOBIORREACTOR: HERRAMIENTA PARA CULTIVO DE CIANOBACTERIAS. *Ciencia y Tecnología*. 6. 9-19. 10.18779/cyt.v6i2.178

Richmond, A. (Ed.). 2004. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Publishing Company. Reino Unido. Stephen, D., Suresh, P., Manikandan, S., Subbaiya, R., Govarthanan, M., Karmegam, N. (2021).

Phycoremediation of wastewater for pollutant removal: A green approach to environmental protection and long-term remediation. *Environmental Pollution*, 290. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117989>

Tam, N. F. Y., & Wong, Y. (1996). Effect of ammonia concentrations on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media. *Bioresour. technology*, 57(1), 45-50.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Wuang, S., Khin M.C, Chua, P. Q. D, & Luo, Y. D. (2016). Use of spirulina biomass produced from treatment of aquaculture wastewater as agricultural fertilizers. *Algal Res* 15:59–64. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.02.009>

Zainuddin M, Saitoh S, Saitoh K. (2004). Detection of potential fishing ground for albacore tuna using synoptic measurements of ocean color and thermal remote sensing in the northwestern North Pacific. *Geophysical Research Letters* 31: 1–4

<https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/drinking-water>

http://www.cedrssa.gob.mx/post_secretaria_de_agricultura_ganadern-

a_desarrollo_rural_pesca_y_alimentacinin--n-sagarpa-n.htm

<https://www.gob.mx/agricultura/articulos/acuicultura-en-mexico>



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

EL PAPEL DE LA BIOTECNOLOGÍA EN LA SOBERANÍA ALIMENTARIA: DIÁLOGO DE SABERES EN COMUNIDADES DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN

Sergio Valdivia-Rivera^a, Neith Pacheco^{a*}, Miguel Oliva-Ruiz^a, Harumi Hernández-Guzmán^a,
Manuel Alejandro Lizardi-Jiménez^b,

^aCentro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.
(CIATEJ), Subsede Sureste, Mérida, 97302

^bCONAHCYT-Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP), Facultad de derecho, San Luis
Potosí, 78210.

npacheco@ciatej.mx

Resumen

En el presente trabajo se aborda un diálogo de saberes entre el saber científico y el saber de pueblos y comunidades tradicionales en la Península de Yucatán, dentro del enfoque de la Soberanía Alimentaria y el aprovechamiento y valorización de residuos de la pesca y acuicultura. El trabajo consiste en el primer acercamiento por parte del colectivo científico del proyecto a 7 comunidades de pescadores y/o acuicultores, mediante propuestas de transformación biotecnológicas que fueron evaluadas y modificadas por los integrantes de las comunidades en función de los intereses y relevancia social específicos de cada comunidad. Del diálogo de saberes realizado se obtuvieron sugerencias o mejoras de uso para las propuestas biotecnológicas realizadas, se entendieron las necesidades específicas de cada comunidad, se concretaron nuevas propuestas biotecnológicas no consideradas inicialmente y se formó un colectivo de incidencia en el que tanto los integrantes de las comunidades, de forma voluntaria, como los integrantes del colectivo de investigación, aceptaron participar y establecer planes de trabajo y compromisos que permitirán avanzar en la consecución de la Soberanía Alimentaria de las comunidades en la Península de Yucatán, a la vez que el trabajo a realizarse se pretende pueda servir como modelo replicable en otras regiones del país.

Palabras clave: Soberanía Alimentaria, Diálogo de Saberes, Península de Yucatán

Abstract

This work deals with a knowledge dialogue between scientific knowledge and the knowledge of traditional villages and communities in the Yucatan Peninsula, within the approach of Food Sovereignty and the use and valorization of fishing and aquaculture residues. The work consists of the first approach by the scientific group of the project to 7 communities of fishermen and/or aquaculture farmers, through biotechnological transformation proposals that were evaluated and modified by the members of the communities based on the interests and specific social relevance of each community. After the knowledge dialogue, suggestions or improvements of use were obtained for the biotechnological proposals that were initially made, the specific needs of each community were understood, new biotechnological proposals not initially considered were obtained and an incidence group was formed in which both the members of the communities, voluntarily, and the members of the research group, agreed to participate

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



and establish work plans and commitments that will make possible to advance in the achievement of Food Sovereignty for the communities in the Yucatan Peninsula, while the work to be carried out is intended to serve as a replicable model in other regions of the country.

Key words: Food Sovereignty, Knowledge Dialogues, Yucatan Peninsula

Introducción

A pesar de las bondades de la ciencia y la tecnología, que nos han permitido desarrollar la sociedad a una escala impensable hace tan solo 100 años atrás, existen problemas ambientales y de alimentación que amenazan nuestro futuro y que la ciencia y la tecnología actuales no han podido resolver. Por otra parte, a pesar de las problemáticas y los cambios de las últimas décadas, muchos de los saberes de los pueblos y comunidades tradicionales han permanecido durante siglos, como guardianes de la naturaleza (Hernández, 2020). Sin embargo, el saber de los pueblos y comunidades tradicionales a menudo es infravalorado al compararlo con el saber de la ciencia, pues se suele adoptar una postura colonial que busca legitimar a la ciencia como fuente única y confiable de saberes.

El saber científico y el saber de las comunidades no deberían excluirse mutuamente, al contrario, debería ser integrado sin el establecimiento de jerarquías ni imposiciones colonialistas, promoviendo un diálogo entre ambos saberes que permita reflexionar y deconstruir considerando los actores sociales con los que se comparte una realidad (Sánchez, 2020).

Es relevante considerar que los saberes tradicionales siguen siendo practicados por pueblos y comunidades, es decir, no son cosa del pasado y pueden ser útiles para afrontar el futuro. En este sentido Crespo y Vila-Viñas (2015) indican: “El buen conocer exige que la gestión de dichos saberes provenga precisamente de los propios pueblos y comunidades portadoras, a través de una interacción entre ellas y de un diálogo horizontal y continuo con otros saberes diversos del conjunto de la sociedad contemporánea construyendo un ecosistema donde se pueda alojar el buen vivir como proyecto común de sociedad”. Por lo tanto, es importante revalorizar, conservar e integrar los saberes de los pueblos y las comunidades tradicionales al conocimiento científico, mediante un proceso dialógico en igualdad de condiciones y jerarquías.

En el caso de la Soberanía Alimentaria, propuesta por la Vía Campesina en 1996 como el derecho de los pueblos a definir sus políticas agrícolas y alimentarias, cuando se focaliza en alguna región determinada, por ejemplo, la Península de Yucatán, puede servir como caso de estudio y modelo para su consecución en otras regiones del país, e inclusive en otras partes del mundo.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



El presente trabajo se enmarca en el proyecto nacional de investigación e incidencia (Pronaii) 321295 de los Programas Nacionales Estratégicos (ProNacEs): “Desarrollo e implementación de metodologías sustentables para el aprovechamiento de biomasa de algas, residuos pesqueros y acuícolas de la Península de Yucatán, para su valorización como ingredientes alimenticios nutritivos y productos funcionales”.

El objetivo particular del trabajo presentado en este documento consistió en realizar un primer acercamiento y diálogo de saberes, no jerárquico, entre el saber de comunidades de la Península de Yucatán y el saber científico, como paso fundamental hacia una soberanía alimentaria mediante desarrollos biotecnológicos que involucren el aprovechamiento de residuos de la pesca y acuicultura.

Metodología.

La estrategia empleada se basó en la teoría de la investigación transdisciplinaria (Binder et al., 2015) y en la metodología de investigación acción participativa (Ander-Egg, 1990). Se incluyó sustancialmente a actores del sistema socio-ecológico que están fuera del ámbito académico, es decir, habitantes de comunidades de la Península de Yucatán, con la finalidad de resolver de forma colaborativa problemas focalizados y relevantes socialmente, en cuestión de soberanía alimentaria. El trabajo se realizó a través de procesos de aprendizaje mutuo y la transferencia de saberes mediante un diálogo no jerárquico, dando el

mismo valor al saber de la comunidad científica, representada por el grupo de investigación, y al saber tradicional de las comunidades consideradas dentro de la zona de incidencia del proyecto (Figura 1).

En el proyecto se consideran dos zonas de incidencia: La zona 1 compuesta por comunidades en las que sea posible obtener residuos de la actividad pesquera y/o acuícola y el trabajar en conjunto con pescadores, acopiadores y/o acuicultores. En la zona de incidencia 2 se ubican comunidades que no cuentan con actividad pesquera ni acuícola y que no suelen incluir pescados y/o mariscos en sus dietas tradicionales, sin embargo, podrían verse beneficiadas del uso de los productos obtenidos de la transformación biotecnológica de los residuos de la zona 2. Durante el 2022 se realizaron visitas iniciales a 7 comunidades en el estado de Yucatán (Tabla 1), como un primer acercamiento.

Las comunidades abordadas tanto para la zona 1 como para la zona 2 fueron seleccionadas en función de la confianza que se tiene entre los miembros de la comunidad y el grupo de investigadores del Pronaii 321295. El hecho de seleccionar comunidades para las zonas de incidencia 1 y 2 permite suponer la replicabilidad del modelo, en otras palabras, no solo involucra estrictamente a los pescadores y/o acuicultores si no que “tierra adentro” difunde los beneficios de la valorización biotecnológica propuesta por el grupo de investigación.

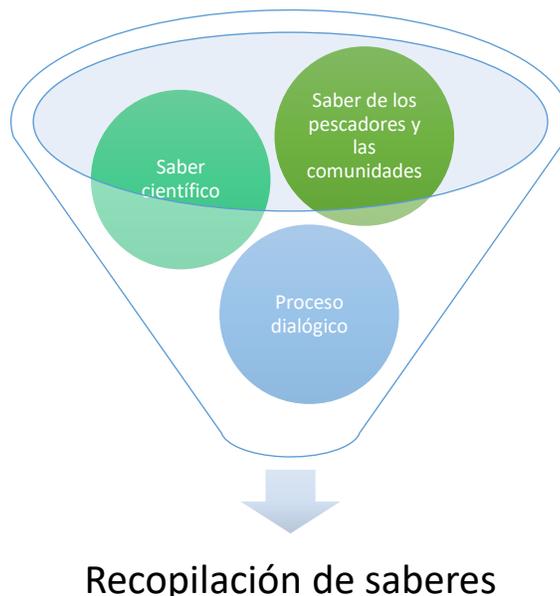


Fig. 1. Conceptualización de la recopilación de saberes mediante una valoración equitativa del saber científico y el saber de las comunidades, a través de un proceso dialógico.

En cada comunidad se expusieron los objetivos y alcances del proyecto, además se presentó al colectivo de investigación que asistió a los diálogos de saberes (Tabla 2) y se explicó que el colectivo de trabajo está integrado por 31 investigadores pertenecientes a diversas instituciones civiles, educativas, de investigación y de gobierno (Figura 2). También se presentaron propuestas biotecnológicas para la transformación y aprovechamiento de residuos de la pesca y acuicultura generados en cada comunidad, con la finalidad de apoyar el desarrollo económico y contribuir a la soberanía alimentaria de las comunidades. Todas las propuestas estuvieron sujetas a modificación con base al resultado del diálogo de saberes.

Dentro de las propuestas biotecnológicas iniciales realizadas a las comunidades, específicamente para el trabajo con residuos pesqueros y acuícolas, se destacan las siguientes:

- Desarrollar las bases tecnológicas para el cultivo de pulpo, robalo y canané, incluyendo todas las fases del ciclo de vida y la fabricación de alimentos de bajo costo, aprovechando los desechos de la industria pesquera. Con énfasis en el desarrollo de un pienso de valor nutritivo y adaptado para cada especie, cuya base sean residuos de las especies pesqueras y acuícolas avaladas por las comunidades. Esta propuesta pretende promover y facilitar condiciones para

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Tabla 1. Comunidades visitadas para establecer un diálogo de saberes.

Comunidad	Zona de incidencia	Coordenadas	Habitantes
Cosgaya	2	21°05'52.459" N, 89°42'17.139" W	809
Dzilam de Bravo	1	21°23'35.625" N, 88°53'30.767" W	2,455
Kikteil	2	21°07'46.887" N, 89°41'36.847" W	243
Oxkutzcab	1 y 2*	20°18'06.957" N, 89°25'07.506" W	26,175
Sisal	1	21°09'53.631" N, 90°01'57.145" W	2,078
Suytunchén	2	21°06'04.108" N, 89°43'52.440" W	150
Tixcacal	2	20°56'38.963" N, 89°42'56.613" W	1,119

Nota: Datos recopilados de INEGI, 2020. *En Oxkutzcab se trabaja con un grupo que incluye acuicultores y otro grupo dedicado a la agricultura.

Tabla 2. Composición del colectivo de investigación directamente involucrado en el diálogo de saberes

Integrante	Perfil científico	Institución
Dra. Neith Aracely Pacheco López	Biotecnología alimentaria y biopolímeros	CIATEJ
Dr. Manuel Alejandro Lizardi Jiménez	Biotecnología ambiental y derechos humanos	CONAHCYT-UASLP
Dr. Sergio Valdivia Rivera	Biotecnología agroalimentaria y ambiental	CIATEJ
M.C. Miguel Oliva Ruiz	Horticultura y biotecnología	CIATEJ
M.C. Harumi Hernández Guzmán	Horticultura y trabajo comunitario	CIATEJ

el desarrollo de la actividad acuícola en las comunidades.

- Identificar las especies pesqueras, sus desechos y procesamiento en las cooperativas pesqueras, para dar valor agregado a través de nuevas presentaciones culinarias nutritivas que permitan su incorporación a la dieta de las

comunidades de la zona de incidencia 2, con la finalidad de que los integrantes de las comunidades se beneficien de los efectos que aporta este tipo de alimentos a la salud y, a su vez, se promueva el comercio entre comunidades de la zona 1 y 2.

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



Fig. 2. Instituciones y organizaciones que componen el colectivo científico y de incidencia del proyecto.

- Elaborar películas bioactivas para embalaje alimenticio que permitan la extensión de su vida de anaquel, a partir de macromoléculas biológicas provenientes de residuos pesqueros y acuícolas de la Península de Yucatán, desarrollando procesos sustentables y de bajo costo que puedan ser utilizados por los habitantes de las comunidades para su auto sustento mediante la comercialización directa de residuos que usualmente son desechados como desperdicio en las zonas de incidencia 1.

Adicionalmente, se entregó un formato a los integrantes de las comunidades enlistando las especies o patrimonios naturales con los que el colectivo proponía

trabajar, con la finalidad de obtener su aval para las especies que les fueran de interés dentro de las propuestas y objetivos del proyecto: Abadejo (*Mycteroperca microlepis*), boquinete (*Lachnolaimus maximus*), caracol (*Lobatus gigas*), cazón, coronado (*Seriola dumerili*), huachinango (*Lutjanus campechanus* y *L. vivanus*), jaiba (*Callinectes sapidus* y *C. similis*), jurel (*Caranx hipos*), kanxik (*Lutjanus apodus*), lampara, langosta (*Panulirus argus*), mero (*Epinephelus morio*), pargo (*Lutjanus sp.*), pargo canané/rubia (*Ocyurus chrysurus*), pargo mulato (*Lutjanus griseus*), picuda (*Sphyræna sp.*), pulpo (*Octopus maya*), robalo blanco (*Centropomus undecimalis*), sargazo (*Alsidium spp.*, *Digenea Laurencia* y *Sargassum spp.*). En el mismo



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

formato se pidió dejar por escrito si deseaban formar parte del colectivo de trabajo.

Finalmente, se solicitó indicaran cualquier otra especie que consideraran importante para trabajar y se les pidió respondieran de formar oral y por escrito las siguientes dos preguntas:

- ¿Qué piensa que usted pueda aportar, discutir o cambiar a la información expuesta?
- ¿Qué piensa que los investigadores pueden aportar, discutir o cambiar en la información expuesta?

Resultados

Como primer resultado destacable se obtuvo el aval de las comunidades para seguir trabajando con ellos, de forma tal que pasaron a formar parte del colectivo de trabajo e incidencia del proyecto. En este sentido es importante destacar que de acuerdo con la metodología de acción participativa se busca la formación de un colectivo de trabajo entre personas de distintas comunidades e investigadores científicos, priorizando la participación de las personas desde el punto de vista cualitativo sobre el cuantitativo. Es decir, que los participantes se mantengan activos y comprometidos con las actividades y el proyecto, dejando el número de participantes fuera del foco de prioridad, puesto que con el avance del proyecto y la obtención de resultados se puede sumar mas gente y provocar un efecto multiplicador que contribuya a la extensión del alcance del proyecto hacia mas personas y comunidades.

Tras el diálogo con los miembros de cada comunidad (Figura 3) se modificaron las propuestas biotecnológicas en función de los siguientes rubros:

- 1) Patrimonios naturales presentes en cada comunidad.
- 2) Las propuestas que resultaron de interés.
- 3) El nivel de compromiso con el que cada comunidad aceptó involucrarse en el proyecto
- 4) Las capacidades técnico-científicas del grupo de investigación
- 5) Sugerencias de mejor uso, enfoque o aplicación surgidas de los miembros de las comunidades

Dentro de las especies o patrimonios naturales de interés para trabajo en procesos de transformación biotecnológica (Figura 4), se destacan el mero (*Epinephelus morio*) y el pulpo (*Octopus maya*) con un 11 % del total de los avales cada uno, seguido por el boquinete (*Lachnolaimus maximus*) con el 10%, el pargo (*Lutjanus sp.*) con el 9%, el pargo canané/rubia (*Ocyurus chrysurus*) y el pargo mulato (*Lutjanus griseus*) con el 8% cada uno y la langosta (*Panulirus argus*) con el 6%, concentrando entre todos más del 60% del total de los avales de las comunidades. Por otra parte, los integrantes de las comunidades propusieron el trabajo con tilapia, camarón, mejillones, ostiones y calamares, los cuales no estaban considerados originalmente en el proyecto.

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



Fig. 3. Fotografías tomadas durante los diálogos de saberes con integrantes de las siguientes comunidades: Cosgaya, Dzilam de Bravo, Kikteil, Oxkutzcab, Sisal, Suytunchén y Tixcacal.

Mediante la modificación de las propuestas de trabajo biotecnológico con las comunidades, así como la lista de especies de interés, se demuestra el intercambio y la complementación de saberes mediante el diálogo y aprendizaje mutuo, ya que se pone a disposición de las comunidades el conocimiento y desarrollo científico-tecnológico para su deconstrucción en función de necesidades socialmente significativas y no de intereses ajenos a los actores con los que se comparte la realidad. Es decir, la ciencia se realiza para el pueblo y por el pueblo, quienes al participar activamente en el desarrollo de esta se convierten en científicos ciudadanos.

Tras las adecuaciones en función de los intereses de los ahora miembros del colectivo de trabajo e

incidencia, las propuestas de trabajo quedaron de la siguiente manera:

- Desarrollo de piensos para el cultivo de pulpo y para animales de corral (ensilados), ya que la comunidad de Sisal cuenta con un proyecto acuícola para el cultivo del pulpo y requieren un desarrollo tecnológico que facilite su alimentación, mientras que las comunidades de Cosgaya, Kikteil y Suytunchén por el momento no desean incursionar en la acuicultura, pero cuentan con animales de corral para los que requieren una disminución de los gastos destinados a su alimentación. Las formulaciones de los piensos serán realizadas con los residuos de las especies o patrimonios



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

- naturales que fueron avalados por las comunidades.
- Desarrollo de las bases tecnológicas para el cultivo de tilapia, incluyendo todas las fases del ciclo de vida y la fabricación de alimentos de bajo costo, aprovechando los desechos de la industria pesquera. Esta propuesta es específica para el grupo de trabajo en Oxkutzcab de la zona de incidencia 2, quienes si desean incursionar en la acuicultura, pero no con las especies propuestas por el colectivo de investigación.
 - El desarrollo de nuevas presentaciones culinarias nutritivas para su incorporación en la dieta de la comunidad de Tixcacal, quienes se mostraron receptivos a incrementar su consumo de pescado debido a sus cualidades nutritivas y en beneficio de su salud, a pesar de no ser un alimento que se incluya en sus recetas tradicionales.
 - El aprovechamiento de los residuos generados de la pesca en Dzilam de Bravo y en el grupo acuícola de la zona 1 de Oxkutzcab para la elaboración de las películas bioactivas para embalaje alimenticio, con la finalidad de poder obtener ingresos extras del aprovechamiento de sus residuos.
 - Como propuesta surgida en función de las necesidades de varias comunidades, y con el afán de fomentar la interacción y futuras

relaciones comerciales directas entre ellas, también se trabajará en la elaboración de bioles a partir de los residuos generados en Dzilam de Bravo y en Oxkutzcab para su implementación en tierras de cultivo en las comunidades de Cosgaya, Kikteil, Oxkutzcab y Suytunchén.

- Finalmente, y a petición de las comunidades de la zona de incidencia 2, se realizarán talleres sobre buenas prácticas e inocuidad en la elaboración de alimentos, elaboración de conservas, mermeladas y secado solar de frutos y hortalizas, entre otros, para promover el autoconsumo e incentivar la economía local.

Conclusiones.

Se formó un colectivo de trabajo entre los investigadores y los miembros de las comunidades, quienes por voluntad propia decidieron participar activamente en el proyecto. Gracias a la participación de los miembros de las comunidades se reformularon y reorientaron las propuestas biotecnológicas de los investigadores de acuerdo con las necesidades de cada comunidad, estableciendo planes de trabajo y compromisos de ambas partes.

Agradecimiento.

Al CONAHCYT y al Proyecto ProNacEs de Soberanía Alimentaria #321295.

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

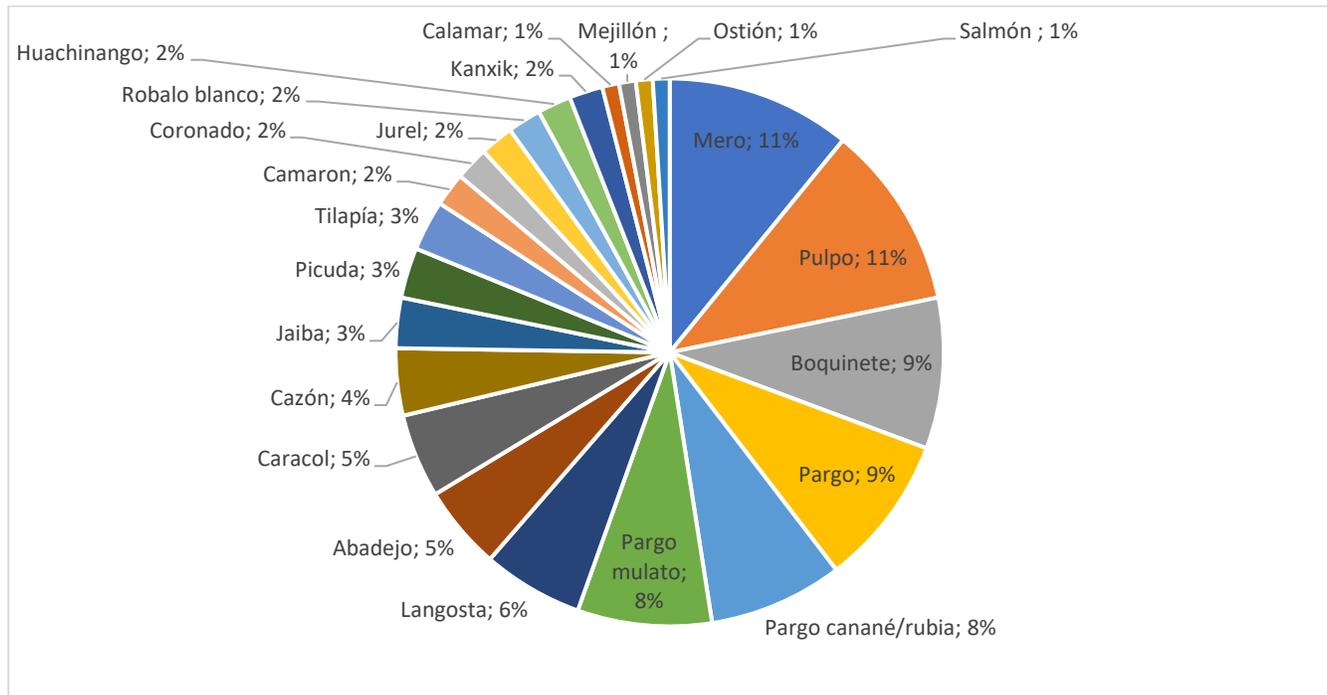


Fig. 4. Porcentajes de aprobación de los patrimonios naturales por parte de las comunidades para transformación mediante procesos biotecnológicos.

Bibliografía.

Ander-Egg, E (1990) Repensando la Investigación Acción-Participativa. Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco (eds). Bilbao, España.

Binder CR, Absenger-Helmli I, Schilling T (2015) The reality of transdisciplinarity: a framework-based self-reflection from science and practice leaders. Sustainability Science 10: <https://doi.org/10.1007/s11625-015-0328-2>

Crespo JM, Vila-Viñas D (2015) Comunidades: Saberes y conocimientos originarios, tradicionales y populares. In: Buen Conocer-FLOK Society. Modelos sostenibles y políticas públicas para una economía social del conocimiento común y abierto en el Ecuador. Vila-Viñas D, Barandiaran XE (eds). IAEN-CIESPAL. Quito, Ecuador pp. 551-616.

Hernández SM (2020) Guarda de la Naturaleza: Conocimientos Ecológicos Tradicionales de los Pueblos Indígenas y Estrategias de Protección. Cuadernos de Derecho Actual 1(13): <https://www.cadernosdedereitoactual.es/ojs/index.php/cadernos/article/view/454>

INEGI, Censo de Población y Vivienda 2020: Principales resultados por localidad (ITER). (<https://www.inegi.org.mx/app/scitel/Default?ev=9>)

Sánchez JAM (2020) La "ética dialógica" latinoamericana: aportes de Enrique Dussel y Raúl Fonet Betancourt. Aporía: Revista Internacional de Investigaciones Filosóficas (18): <https://doi.org/10.7764/aporia.18.1491>



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

APOPTOSIS INDUCIDA POR HIPERTERMIA MAGNÉTICA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON CON NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE HIERRO RECUBIERTAS CON TETRAHIDROXIQUINONA

Michelle Valdovinos*, Zaira López, M. Eduardo Cano & Peter Knauth

*Cell Biology Laboratory, Centro Universitario de la Ciénega,
Universidad de Guadalajara. 47810 Ocotlán (Jal.), México*

michelle.valdovinos@alumnos.udg.mx

Resumen

La tetrahidroxiquinona (THQ) es un compuesto orgánico con propiedades fisicoquímicas, magnéticas y biológicas prometedoras para fines biomédicos, que, además, ha demostrado capacidad para inducir apoptosis, por lo que se considera un candidato interesante para iniciar experimentos para el tratamiento del cáncer. En este trabajo, se evaluó la citotoxicidad de nanopartículas de óxido de hierro (IONPs) recubiertas con THQ para ser usadas en hipertermia magnética (MHT). Para los experimentos biológicos se utilizó la línea celular humana de cáncer de colon HT-29, que fue expuesta a diferentes concentraciones (0,03 a 3 mg/ml) de IONPs-THQ y posteriormente sometida a MHT durante 20 min a temperaturas desde los 37 a 48 °C. Los resultados demostraron que, hasta 2 mg/ml, las IONPs-THQ no tienen un efecto citotóxico en las células HT-29. Los ensayos de MHT mostraron un buen calentamiento de las IONPs y un incremento del porcentaje de muerte celular por apoptosis hasta ~15% a 45 °C. Además, se observó que, a temperaturas moderadas de 39 °C, durante 15 min, hay una reducción de la actividad metabólica del ~50%, lo que indica que un ligero aumento de temperatura puede ser suficiente para potencializar los efectos de THQ, es decir, posiblemente hay un efecto sinérgico entre ambos tratamientos para conducir a la muerte celular por apoptosis.

Palabras clave: hipertermia magnética, zztetrahidroxiquinona, IONP, cáncer

Abstract

Tetrahydroxyquinone (THQ) is an organic compound with promising physicochemical, magnetic and biological devices, and, moreover, it has been shown to induce apoptosis by producing reactive oxygen species (ROS), thus it is an interesting candidate to be used in experiments in cancer therapy. In this work, the cytotoxicity of THQ-coated iron oxide nanoparticles (IONPs) used in magnetic hyperthermia (MHT) has been evaluated. Therefore, the human colon cancer cell line HT-29 was exposed to different concentrations (0.03 to 3 mg/ml) of IONP-THQ, as well as to MHT treatment for 20 min reaching temperatures from 37 to 48 °C. Up to 2 mg/ml IONP-THQ did not exhibit cytotoxic effects on HT-29 cells, thus this concentration has been used for the further MHT experiments. MHT at 45 °C induced apoptosis in ~15% of the treated cells. Moreover, MHT already at 39 °C reduced the



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



metabolic activity of HT-29 by ~50%, indicating that this slight temperature increase during only 20 min may have increased the ROS formation by THQ thus was potentializing the cytotoxic effect.

Key words: magnetic hyperthermia, tetrahydroxyquinone, IONP, cancer

Introducción

THQ es un compuesto orgánico poco hidrosoluble (<14 g/l) que, cuando se disuelve en agua, tiene unidas dos moléculas de H₂O mediante puentes de hidrógeno. Por su estructura de quinona y en presencia de O₂ tiene una alta capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante su autooxidación, formando un radical superóxido y semiquinona (González *et al.*, 2022). Esta característica, en combinación con una disminución de la señalización de supervivencia dependiente de la proteína quinasa B (AKT/PKB), promueve la apoptosis en células leucémicas HL60 (Martins Cavagis *et al.*, 2006). Además, THQ causa efectos citotóxicos en fibroblastos de hámster chino V79 por alterar la homeostasis de Ca²⁺ y generar H₂O₂, lo cual inhibe la función mitocondrial y la síntesis de ADN (De Souza-Pinto *et al.*, 1996). A pesar de las pocas publicaciones científicas acerca de THQ en el campo biomédico o biotecnológico, por sus efectos pro-apoptóticos se considera un candidato prometedor para recubrir IONPs e iniciar experimentos *in-vitro* tratando células cancerígenas por MHT; las ventajas que dicha cubierta provee a las IONPs son proporcionadas por sus características i) fisicoquímicas, como tamaño y forma adecuados que facilitan la internalización celular, ii) magnéticas, por ejemplo, buena estabilidad coloidal y saturación magnética así como tasa de absorción específica elevadas que contribuyen a una mejor

respuesta a la hipertermia magnética, y iii) biológicas, como baja citotoxicidad (González *et al.*, 2022). La unión de THQ con el hierro es mediante uno de sus grupos hidroxilo, probablemente mediante interacciones iónicas (**Figura 1**). Por otro lado, la MHT es una terapia que consiste en la administración de nanopartículas dentro del área tumoral seguida de la exposición a un campo magnético alterno, el cual, mediante bobinas de inducción, rodea el objeto biológico externo y produce agitación de las nanopartículas. La energía resultante se transfiere a las células vecinas en forma de calor, lo que eleva la temperatura, por encima de los 43 °C (Fatima *et al.*, 2021); sin embargo, se ha detectado apoptosis a partir de los 39 °C, siendo aún más notoria a temperaturas más altas (42 – 48 °C) (González *et al.*, 2022). Los métodos convencionales de hipertermia afectan tanto a los tejidos tumorales como a los sanos por su baja especificidad (Mortezaei *et al.*, 2021); estos inconvenientes se pueden reducir por el calor localizado, generado por MHT, que provoca la muerte de las células cancerosas, ya que son más sensibles al calor que las células sanas (Fatima *et al.*, 2021), y, por lo tanto, evitan un daño al tejido normal, lo cual le da una ventaja ante otras técnicas de calentamiento. De esta forma, las propiedades de THQ combinadas con MHT potencializan la capacidad de muerte celular por apoptosis.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

El objetivo de este trabajo fue evaluar el comportamiento sinérgico de nanopartículas recubiertas con tetrahidroquinona en células de cáncer de colon sometidas a hipertermia magnética y la determinación de muerte celular por apoptosis.

Metodología

1. Cultivo celular

La línea celular humana de cáncer de colon, HT-29, se cultiva **en frascos T-25** con medio de cultivo **Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)** suplementado con 10% de **suero fetal bovino** a 37 °C, 95% de **humedad relativa** y 4% CO₂. Para los experimentos con IONPs se agrega antibiótico (PenStrep, 1x) al medio de cultivo.

2. Citotoxicidad

HT-29 se cultiva sobre un **cubeobjetos** en pocillos de 2 cm de diámetro que contienen 1 ml de medio de crecimiento y se incuban durante 24 h para su adherencia. Después se agrega IONPs a diferentes concentraciones (**0,03, 0,3, 1, 2 y 3 mg/ml**) y se incuban las células por 24 h más. Posteriormente se retira el medio, se lavan las células tres veces con **tampón fosfato salino (PBS)** y se agrega medio nuevo que contiene 2% de **tetrazolio soluble en agua (WST)**. Se incuban las células durante 2 a 4 h en las que las células metabólicamente activas reducen, por su actividad de deshidrogenasas, el tetrazolio (amarillo) a formazan (rojo), que se cuantifica midiendo la absorbancia del medio de cultivo a 440 nm. Se realiza un ensayo semi-cuantitativo con azul de tripano (TB) en el cual se añade a las células crecidas sobre **cubeobjetos** 5% de TB,

se incuba 5 min y se observa las células bajo el microscopio para estimar tanto la confluencia como el porcentaje de células teñidas; solo las células necróticas se tiñen de azul.

3. Hipertermia magnética

En diferencia al experimento de citotoxicidad, se incuban las células con las IONPs añadidas solamente durante 2 h para su internalización. Posteriormente se les somete a MHT durante 20 min, usando una frecuencia fija de $f = 530 \pm 0,1$ kHz y calentando cada muestra a 37, 39, 42, 45 y 48 °C. Por último, se incuban las células en condiciones estándar durante 24 h y se sigue el método de citotoxicidad mencionado anteriormente.

4. Apoptosis

Después de la hipertermia magnética, en vez de medir el efecto citotóxico, se determina la apoptosis inducida por lavar las células (crecidas sobre cubeobjetos) con PBS y después con **tampón de ensayo** para ajustar la concentración de Ca²⁺. Posteriormente se incuban las células con Annexin V-FITC y propidium iodide (PI) durante 15 min en oscuro. A continuación, se lava las células nuevamente con tampón de ensayo y se observa las células bajo el microscopio de epifluorescencia con filtros de color verde (para FITC) y rojo (para PI). Las células apoptóticas se tiñen de verde, las necróticas de verde y rojo, mientras que las células sanas no se tiñen. (González *et al.*, 2022).

Resultados

Las células HT-29 fueron expuestas a diferentes concentraciones de las IONPs-THQ (**0.03, 0.3, 1, 2 y 3**



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



mg/ml); a concentraciones de hasta 2 mg/ml las células se mantienen altamente viables, muy similar al control, mientras que a concentraciones mayores de 2 mg/ml, se reduce la actividad metabólica (**Figura 2 (a)**). Además, las células se tiñen de azul con TB indicando que la membrana celular está comprometida (necrosis). Asimismo, a estas concentraciones elevadas, aproximadamente el 15% de las células se tiñen con PI, indicando necrosis (**Fig. 2 (b)**).

Los resultados de la actividad metabólica demuestran que, hasta 2 mg/ml, las IONPs-THQ no tienen un efecto citotóxico en las células HT-29, es decir, que son viables para ser usadas en un tratamiento por MHT. Así, células HT-29 con 2 mg/ml de IONPs-THQ fueron expuestas a MHT alcanzando durante 20 min temperaturas de 37 a 48 °C.

La actividad metabólica relativa de HT-29 disminuyó constantemente, desde 100% del control (37 °C) hasta 5% a 48 °C (**Figura 3**). Esto indica que el daño celular fue producido principalmente por el tratamiento térmico, aunque hasta aquí no se conoce el tipo de daño que causó la muerte celular. En algunos trabajos se ha reportado que a temperaturas de entre 42 a 45 °C se induce apoptosis; además, ha sido demostrado que THQ induce apoptosis a través de la producción de ROS.

En base a estos conocimientos se realizaron ensayos de MHT a temperaturas de 43 y 45 °C, usando la misma concentración de 2 mg/ml de IONPs-THQ, para distinguir la muerte celular entre necrosis y apoptosis (Annexin V-FITC/PI). Aparte de que, con el aumento

de la temperatura, incrementó el porcentaje de las células muertas por necrosis (subió de ~20% a 43 °C a ~25% a 45 °C), también aumentó el número de células muertas por apoptosis: de ~10% a 43 °C a ~15% a 45 °C (**Figura 4**).

Hay que resaltar, que el efecto térmico por MHT y a temperaturas moderadas de 39 °C, durante 20 min, reduce la actividad metabólica a ~50%. Temperaturas más altas, de 43 y 45 °C, tienen un efecto en reducir la actividad metabólica, a ~30% y 20% respectivamente, menos pronunciado. Podría ser, que el incremento ligero de la temperatura sea suficiente para incrementar la formación de ROS por THQ, indicando un efecto sinérgico entre ambos.

Conclusiones

- 1) Las IONPs-THQ no son tóxicas para las células HT-29 en concentraciones desde **0,03** hasta 2 mg/ml
- 2) Cuando las células HT-29 son sometidas a hipertermia magnética con IONPs-THQ (2 mg/ml) de 37 hasta 48 °C, se induce muerte celular (la **actividad metabólica** disminuye de 100 hasta el 5%)
- 3) La muerte celular de las células HT-29 con IONPs-THQ, cuando son sometidas al tratamiento térmico, es vía apoptosis

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

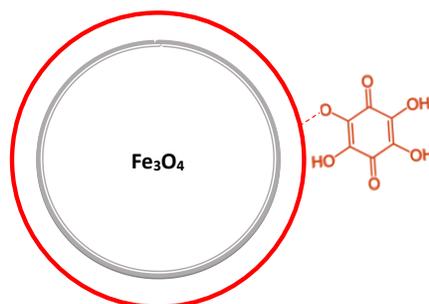


Figura 1. Nanopartícula de óxido de hierro recubierta con tetrahidroxiquinona (IONP-THQ).

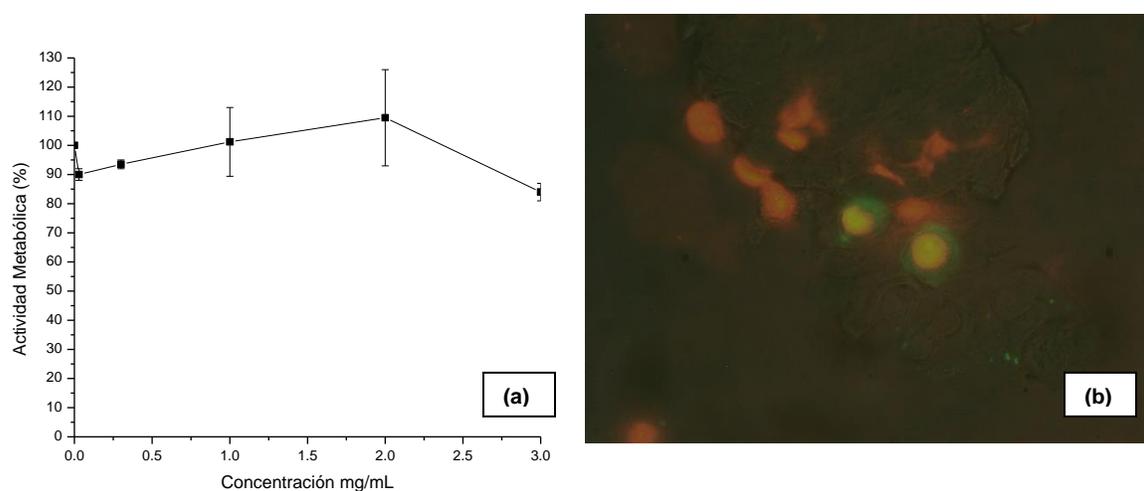


Figura 2. (a) Actividad metabólica de la línea celular HT-29 expuestas a diferentes concentraciones de IONP-THQ durante 24 h. (b) Tinción con Annexin V-FITC/PI de células HT-29, expuestas a 2 mg/ml de IONPs-THQ durante 24 h.

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

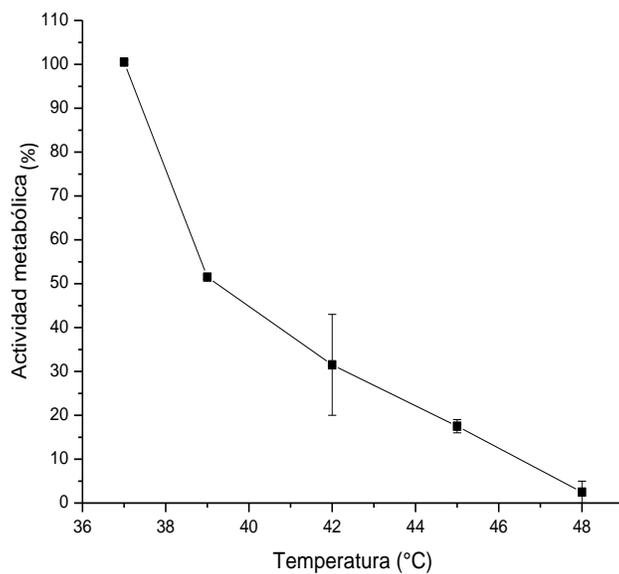


Figura 3. Actividad metabólica de células HT-29 expuestas a un campo magnético alterno, con 2 mg/ml de IONPs-THQ, durante 20 min alcanzando diferentes temperaturas (37 - 48 °C).

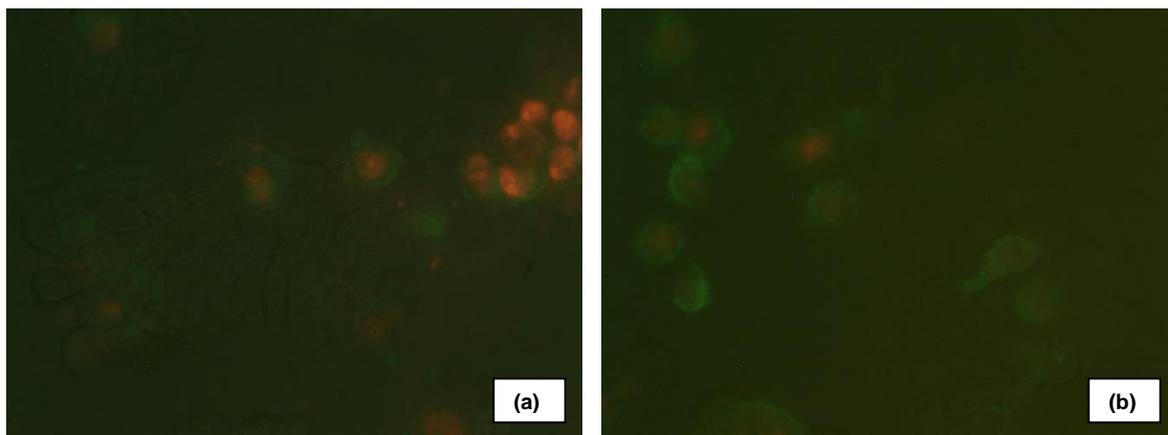


Figura 4. Células HT-29 con 2 mg/ml de IONPs-THQ expuestas a MHT por 15 min y teñidas con Annexin V / PI: células calentadas a (a) 43 °C y (b) 45 °C.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Bibliografía

De Souza-Pinto, N. C., Vercesi, A. E. & Hoffmann, M. E. (1996). Mechanism of tetrahydroxy-1,4-quinone cytotoxicity: Involvement of Ca^{2+} and H_2O_2 in the impairment of DNA replication and mitochondrial function. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(5): 657–666.
[https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02179-](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02179-5)

5

Fatima, H., Charinpanitkul, T. & Kim, K. S. (2021). Fundamentals to apply magnetic nanoparticles for hyperthermia therapy. *Nanomaterials*, 11(5): id1203.
<https://doi.org/10.3390/nano11051203>

González, A. G., Casillas, N., López, Z., Cervantes, O., Knauth, P., Hernández-Gutiérrez, R., Topete-Camacho, A., Rosales, S., Quintero, L. H., Paz, J. A., Flores, X. & Cano, M. E. (2022). Tetrahydroxyquinone: A suitable coating for ferrofluids used in magnetic

hyperthermia. *Coatings*, 12(8): id1130.
<https://doi.org/10.3390/coatings12081130>

Martins Cavagis, A. D., Ferreira, C. V., Versteeg, H. H., Assis, C. F., Bos, C. L., Bleuming, S. A., Diks, S. H., Aoyama, H. & Peppelenbosch, M. P. (2006). Tetrahydroxyquinone induces apoptosis of leukemia cells through diminished survival signaling. *Experimental Hematology*, 34: 188–196.
<https://doi.org/10.1016/J.EXPHEM.2005.11.001>

Mortezaee, K., Narmani, A., Salehi, M., Bagheri, H., Farhood, B., Haghi-Aminjan, H. & Najafi, M. (2021). Synergic effects of nanoparticles-mediated hyperthermia in radiotherapy / chemotherapy of cancer. *Life Sciences*, 269: id119020.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119020>



www.smbb.com.mx