

Revista de la Sociedad Mexicana de

Biotecnología y Bioingeniería

Año 2026 Volumen 30, Número 1
ISSN 0188-4786



Sociedad Mexicana de
Biotecnología y Bioingeniería

NÚMERO ESPECIAL



ISSN 0188-4786, revista cuatrimestral publicada por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. 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.

Revista de la Sociedad Mexicana de **Biotechnología** y Bioingeniería

Comité Organizador

MESA DIRECTIVA

2024 – 2026

Dr. Luis Bernardo Flores Cotera

Presidente

*Presidente de la Mesa Directiva Nacional
2024-2026 de la SMBB*

Dr. Francisco José Fernández Perrino

Vicepresidente

Presidente del Comité Organizador

Dr. Manuel Alejandro Lizardi Jiménez

Secretario

Presidenta del Comité Científico

Dra. Neith Aracely Pacheco López

Tesorero

Dra. Andrea Sabido Ramos

Subsecretario

Dra. Carolina Peña Montes

Subtesorero

M. en C. Oscar Ulises García Flores

Vocal estudiante

M. en C. Ileana Emilia Gutiérrez Cancino

Vocal Profesional

EDITORIA

Dra. María Soledad Córdova Aguilar
UNAM

Co-editor

Dr. Jorge Gracida
UAQ

COMITÉ EDITORIAL

Dra. Isadora Martínez Arellano

Dra. María Eugenia de la Torre Hernández

Dra. Beatriz Ruiz Villafán

Dra. María del Rocío Redón de la Fuente

Dra. Daniela Morales Sánchez

Dra. Evelyn Zamudio Pérez

Dr. Adrián Díaz Pacheco

Dr. Ricardo Hernández Martínez

Dr. Arturo Abreu Corona

M. en C. Vanessa Hernández Rodríguez

M. en F. Mirna Rodríguez Aguilar

Formación y edición

Pas. QA Mariana Espinoza Tapia

Instrucciones para los autores

Guía de 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 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 apegarse 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.

Instrucciones para los autores

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 *italica* 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).
5. Si el texto inicia con el nombre de algún subtema, éste de 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 *italicas*.
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 las mismas 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 mostrado..."

Instrucciones para los autores

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.

Instrucciones para los autores

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 emplea.

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 correspondiente. La dirección para mantener comunicación con el editor es: revista_biotecnologia@smbb.mx y marisol.cordova@icat.unam.mx.

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 los mismos sin la aprobación del editor en jefe. Una vez aprobada la prueba, 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/>.

Editorial

La Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería (SMBB), fundada en 1982, se ha consolidado como la principal agrupación científica y profesional en el área de la Biotecnología en México. En su membresía se cuenta con más de 1100 socios profesionales y estudiantes interesados en el desarrollo y la divulgación de la biotecnología y la bioingeniería a nivel nacional.

El Congreso Nacional de la SMBB se lleva a cabo cada dos años, y se ha constituido en el foro más importante para discutir las nuevas tendencias y avances de la biotecnología aplicada a diferentes sectores, tales como el agroalimentario, farmacéutico, industrial, energético y ambiental. En el año 2025, se celebró la vigésima primera edición del congreso, el cual se llevó a cabo del 28 de septiembre al 3 de octubre en la ciudad de Oaxaca, Oax., México. En este XXI Congreso se dieron a conocer los avances biotecnológicos y científicos en las diferentes áreas temáticas del Congreso así como se fomentó el intercambio de experiencias y la creación de redes de cooperación en este campo del conocimiento a nivel internacional. Con miras a involucrar a las nuevas generaciones en este campo del conocimiento se convocó a los científicos, científicas, profesorado, industriales y estudiantes a someter trabajos de investigación original o de revisión en los campos de la Biotecnología y Bioingeniería. Todos los manuscritos fueron sujetos a revisión por miembros del Comité Editorial. Es así como se edita este número especial de la **Revista BioTecnología** con 10 manuscritos de trabajos que se presentaron 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

Índice

Instrucciones para los autores	4
Editorial	8
Artículos	
Normativas en relación a residuos plásticos en México; la biotecnología como aliada en biorremediación	
Leticia Narciso-Ortiz, Carolina Peña-Montes, Manuel A. Lizardi-Jiménez	11
Aislamiento de cepas fúngicas de la agroindustria azucarera: capacidad de producción de amilasas, dextranasas y lacasas	
Serafín Pérez Contreras, Dora Angélica Avalos de la Cruz, Manuel Alejandro Lizardi Jiménez, José Andrés Herrera Corredor, Obdulia Baltazar Bernal, Ricardo Hernández Martínez	23
Índice de conciliación normalizado para la determinación del número óptimo de clusters en un conjunto de biorreactores con controladores proporcionales-integrales	
Laura Elimelet Ángeles-Sánchez, Óscar Núñez-Gaona, Gilberto Reynoso-Meza, Jesús Carrillo-Ahumada	32
Fermentación en medio sólido de <i>Neurospora crassa</i>: producción de invertasa	
Daira Estrella-Rodríguez, Ninel Guardado-Gutiérrez, Nancy Velasco-Álvarez, Luz Tovar-Castro, Antonio Martínez-Ruiz	42
Efecto de los ciclos luz-oscuridad con modulación sinusoidal sobre el cultivo de <i>Scenedesmus obtusiusculus</i> AT-UAM	
Yareni López, Jair Lorenzo, Miriam Montalvo, Luis Sánchez, León Sánchez, Juan Cabello	52
Producción de invertasa por <i>Neurospora crassa</i> en fermentación en estado sólido con aserrín de pino como soporte natural	
Ninel Guardado-Gutiérrez, Daira Estrella-Rodríguez, Nancy Velasco-Alvarez, Luz Tovar-Castro, Antonio Martínez-Ruiz	61
Evaluación del efecto de fitoestimulación de bacterias PGPB en plantas de jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>)	
Soley B. Nava, Yolanda Santos, Alfonso Benitez, Diana V. Cortés. Martha D. Bibbins	71

Índice

Caracterización física, química, compuestos bioactivos y actividad Antioxidante en variedades del frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) del Estado de Oaxaca Janis A. Espíritu-Rojas, Juan Gabriel Torruco-Uco, Paul Mauricio Sánchez-Ocampo, Jacqueline Capataz-Tafur	80
Aislados proteicos de harinas de germinados de frijol y lenteja María Soledad Córdova Aguilar, Tania Vianey Cruz Sandoval, Isadora Martínez Arellano	91
Formulación y evaluación <i>in vitro</i> de hidrogel termosensible como sistema de liberación intravaginal de fármacos Gladys Arline Politrón, Moisés Martínez, Rogelio Rodríguez, Zaira Yunuen García, Aldo Fernando Corona, Nathaly Vasquez	107

NORMATIVAS EN RELACIÓN A RESIDUOS PLÁSTICOS EN MÉXICO; LA BIOTECNOLOGÍA COMO ALIADA EN BIORREMEDIACIÓN

Leticia Narciso-Ortiz¹, Carolina Peña-Montes¹ and Manuel A. Lizardi-Jiménez^{2*}

¹Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Veracruz. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Veracruz, México. C.P. 91897

²SECIHTI-Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, México. C.P. 78210

*Responsable de publicación: Manuel A. Lizardi-Jiménez, manuel.lizardi@uaslp.mx

Resumen

La producción mundial de plásticos está en aumento año con año; los plásticos son parte de la vida diaria, percibir la vida sin los plásticos es prácticamente imposible. Aunque los impactos negativos de los plásticos en la salud humana no se conocen a detalle, las primeras evidencias científicas deben servir como base para que exista una regulación estricta, sobre todo lo referente al uso y desecho de plásticos. También se deben buscar alternativas de biorremediación de contaminación plástica amigables con el medio ambiente. El objetivo de este trabajo fue realizar una revisión sobre las regulaciones en México respecto a la contaminación plástica y evidenciar las alternativas biotecnológicas para la remediación de contaminantes plásticos. Actualmente, no existe una Ley Federal ni General que regule el manejo de los residuos plásticos. Las leyes actuales de México regulan el desecho solo de grandes generadores de plásticos, pero es necesario que se regule la fabricación, uso y destino final de microplásticos. Por otro lado, la biotecnología nos otorga un sinnúmero de herramientas para poder contrarrestar la contaminación plástica, como el uso de microorganismos o enzimas. Es necesario invertir en investigación y tecnología para escalar estos procesos y poder disminuir la contaminación que ya aqueja al planeta.

Palabras Claves: contaminación, polímeros, regulaciones, microorganismos

Abstract

World plastic production is increasing year after year; plastics are part of daily life; perceiving life without plastics is practically impossible. Although the negative impacts of plastics on human health are not known in detail, the first scientific evidence should serve as a basis for strict regulation, especially regarding the use and disposal of plastics. Environmentally friendly plastic pollution bioremediation alternatives should also be sought. The aim of this work was to carry out a review of the regulations in Mexico regarding plastic pollution and to demonstrate biotechnological alternatives for the remediation of plastic contaminants. Currently, there is no Federal or General Law that regulates the management of plastic waste. Current Mexican laws regulate the disposal of only large plastic generators, but it is necessary to regulate the manufacture, use, and final destination of microplastics. On the other hand, biotechnology gives a lot of tools to minimize plastic pollution, such as the use of microorganisms or enzymes. It is necessary to invest in research and technology to scale these processes and reduce the pollution that affects the planet.

Key Words: pollution, polymers, regulations, microorganisms

Introducción

La producción mundial de plásticos está en aumento año con año, a pesar de que entre el año 2019-2020 un pequeño estancamiento se observó debido a la pandemia Covid-19, la producción para el año 2023 aumentó a 413.8 millones de toneladas, de las cuales más del 90 % son plásticos de origen fósil. Los principales tipos de plásticos producidos son: polipropileno (PP) (19 %), polietileno de baja densidad (PELD) (14 %), cloruro de polivinilo (PVC) (12.8 %), polietileno de alta densidad (PEHD) (12.2 %), tereftalato de polietileno (PET) (6.2 %), poliuretano (PUR) (5.3 %) y poliestireno (PS) (5.2 %). Los usos de estos plásticos son embalaje en primer lugar (44 %), seguido de la industria de construcción (18 %) y en el tercer puesto la industria automotriz (8 %), siendo China es el país con mayor producción de plásticos, con el 32 % de la producción mundial, seguido de Europa (27 %) y en tercer lugar Norte América con 18% de la producción mundial (Plastic Europe 2024).

Como puede verse a nuestro alrededor, los plásticos son parte de la vida diaria; percibir la vida sin los plásticos es prácticamente imposible. El verdadero problema se presenta cuando la vida útil de los artículos plásticos termina y es necesario proporcionarles un destino final, ya que la mayoría de los residuos terminan en los ecosistemas, principalmente ecosistemas acuáticos. Los plásticos vertidos en ecosistemas acuáticos eventualmente se fragmentarán, produciendo plásticos de menor tamaño (< 5 mm), llamados microplásticos, que, al ser consumidos por la fauna, podrían ser introducidos a la cadena alimentaria y llegar al ser humano.

Los impactos negativos de los plásticos en la salud humana no se conocen a detalle, pero recientes descubrimientos como la primera evidencia de microplásticos en placenta (Ragusa *et al.*, 2021), sangre (Leslie *et al.*, 2022) y tejido pulmonar (Amato-Lourenço *et al.*, 2021) humanos, deberían ser alertas rojas para poner manos a la obra y atacar este tipo de contaminación.

En primer lugar, debe existir una regulación estricta sobre todo lo referente al uso y desecho de plásticos, ya que México es el

quinto país con mayor producción de desechos plásticos mal gestionados, por debajo solo de India, China, Brasil e Indonesia (Osuna-Laveaga *et al.*, 2023). Aunado a esto, deben buscar alternativas de biorremediación de contaminación plástica amigables con el medio ambiente. Para ello, la biotecnología puede ofrecer interesantes alternativas. La biotecnología es la integración de las ciencias naturales y la ingeniería con el objetivo de lograr la aplicación de organismos, células o moléculas provenientes de ellos, en productos o servicios; la biotecnología utiliza estos bioprocesos como mecanismos operativos, y el desarrollo y mejoramiento de estos procesos proporcionan alternativas tecnológicas para resolver innumerables problemas en salud, alimentos, energía, y ambiente. La biotecnología ambiental abarca el desarrollo de bioprocesos para el diagnóstico de contaminación, productos para prevenir contaminación y biorremediación (Gavrilescu 2010; Barragán-Ocaña *et al.*, 2020;). La biorremediación es una técnica para remover, minimizar o neutralizar contaminantes del ambiente utilizando las rutas metabólicas de organismos como hongos o bacterias (Sharma 2020).

El objetivo de este trabajo fue realizar una revisión sobre las regulaciones en México respecto a la contaminación plástica y evidenciar las alternativas biotecnológicas para la remediación de contaminantes plásticos. Se revisaron las leyes, normas y reglamentos de México publicados hasta el momento, donde se hace mención de regulación de plásticos y microplásticos. También se buscaron publicaciones científicas sobre biorremediación de contaminación plástica.

Regulación de residuos plásticos y microplásticos en México

Actualmente, algunas leyes y normas tienen inmersas pequeñas menciones respecto a los plásticos.

La Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (DOF 08-05-2023) hace mención en el Artículo 7 punto VI:

“Son facultades de la Federación: Expedir las normas oficiales mexicanas que

establezcan, entre otros, los criterios de eficiencia ambiental y tecnológica que deben cumplir los materiales con los que se elaborarán productos, envases, empaques y embalajes de plásticos y poliestireno expandido que al desecharse se convierten en residuos. Dichas normas deberán considerar los principios de reducción, reciclaje y reutilización en el manejo de los mismos”

Y en el Artículo 28 punto III:

“Estarán obligados a la formulación y ejecución de los planes de manejo, según corresponda: Los grandes generadores y los productores, importadores, exportadores y distribuidores de los productos que al desecharse se convierten en residuos sólidos urbanos o de manejo especial que se incluyan en los listados de residuos sujetos a planes de manejo de conformidad con las normas oficiales mexicanas correspondientes; los residuos de envases plásticos, incluyendo los de poliestireno expandido; así como los importadores y distribuidores de neumáticos usados, bajo los principios de valorización y responsabilidad compartida,”

El artículo 28 solo obliga a formular y ejecutar los planes de manejo a los grandes generadores de residuos plásticos, es decir a los que generan cantidades mayores a 10 t anuales, de acuerdo a la NOM-161-SEMARNAT-2011 (DOF 01-02-2013).

Referente a esta Ley, se han decretado algunas propuestas de adición o reforma respecto a fomentar la educación sobre el impacto ambiental producido por plásticos, fomentar la utilización de materiales biodegradables, implementar un Programa de Sustitución de Plástico Biodegradable (Gaceta del Senado 2017, Sistema de Información Legislativa 2013) y reservar los envases, empaque y embalajes plásticos de un solo uso a productos médicos o de ayuda humanitaria (H. Congreso del Estado de Oaxaca 2023), ninguna de ellas autorizada hasta el momento.

La atribución a la Federación de expedir normas en cuestión de contaminación plástica, en general es lo óptimo, veremos que normas han sido sesgadas en este sentido.

La NOM-161-SEMARNAT-2011 (DOF 01-02-2013) *Que establece los criterios para clasificar a los Residuos de Manejo Especial y determinar cuáles están sujetos a Plan de Manejo; el listado de los mismos, el procedimiento para la inclusión o exclusión a dicho listado; así como los elementos y procedimientos para la formulación de los planes de manejo*, considera en su listado, los residuos plásticos originados por grandes generadores (> 10 t anuales), es específico los resultantes de centros médico-asistenciales, agroplásticos generados por las actividades agrícolas, silvícolas y forestales y los residuos de PET, PS, PE, PEAD, PEBD, PVC, PP y Policarbonato (PC), de actividades que generen más de 10 t al año. Es decir, solo las entidades generadoras de este tipo de plásticos y en cantidades grandes, son los que están sujetos a presentar planes de manejo especial para sus residuos.

Si bien, un gran adelanto se ha perpetrado, dado que prácticamente todos los estados del país han prohibido la comercialización, distribución y entrega al consumidor de bolsas de plástico (PE), popotes de PP y charolas para transportar alimentos (PS, unicel), fabricados total o parcialmente de plástico, diseñados para su desecho después de un solo uso excepto los que sean compostables. Esta prohibición tiene su base en la Ley de Residuos Sólidos del Distrito Federal (Gaceta Oficial de la CDMX 2023) que entró en vigor en diciembre 2020 para las bolsas plásticas y en enero 2021 para los demás productos en CDMX. Aunque no exista una Ley Federal ni General, en el orden estatal la mayoría de las entidades ya han legislado en la materia, ya sea reformando sus leyes locales o reglamentos municipales.

La Ley de Residuos Sólidos del Distrito Federal, en su última versión publicada en abril del 2023 (Gaceta Oficial de la CDMX 2023) se incluye la definición de *“Microplásticos: Fragmentos de plástico de tamaño inferior a 5 milímetros”*; en enero del 2021 ya se había incluido la prohibición de comercializar, distribuir y entregar productos que contengan microplásticos añadidos intencionalmente, pero con esta nueva adición de la definición, sin duda se

trata de los microplásticos que las investigaciones científicas han reportado.

Al igual que con los plásticos, para los microplásticos tampoco existe una Ley Federal ni General que los regule. Diputadas y diputados en 2019 (Sistema de Información Legislativa 2019) y 2020 (Sistema de Información Legislativa 2020) presentaron la iniciativa de adicionar al artículo 269 de la Ley General de Salud el párrafo *“Queda prohibida la elaboración, importación y comercialización de productos cosméticos que contengan microplásticos. Se considerará microplástico a las partículas de plástico de hasta 5 milímetros de diámetro”*, la cual no ha sido aprobada. Dicha iniciativa tiene como base legislaciones de otros países, como Canadá, Estados Unidos y China que desde 2018, 2019 y 2020 respectivamente, prohibieron la fabricación, envasado y distribución de cosméticos y artículos de tocador que contengan partículas plásticas menores o iguales a 5 mm, incluso en los dos primeros países mencionados también se prohibió el uso de microplásticos en medicamentos de venta libre (Osuna-Laveaga *et al.*, 2023).

Pasando a otras legislaciones en las que no se mencionan directamente los plásticos o microplásticos pero que se podría hacer uso de ellas para proteger a la sociedad y al medio ambiente, esto con base en los antecedentes de estos residuos como importantes contaminantes ambientales y posibles factores de riesgo de salud humana, se encuentra en primer lugar, la Ley Suprema del sistema jurídico mexicano, La Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.

La Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos (DOF 15-04-2025) en el Artículo 4 menciona que *“Toda Persona tiene derecho a la protección de la salud...”* y *“Toda persona tiene derecho a un medio ambiente sano para su desarrollo y bienestar...”*; es decir, ya sea por salud o medio ambiente sano, la sociedad mexicana tiene derecho a una regulación estricta de residuos plásticos. Esto también porque es un Derecho Humano Universal, reconocido por la Asamblea General de la Organización de las Naciones Unidas

(ONU) en julio de 2022 *“El derecho humano a un medio ambiente limpio, saludable y sostenible”* (A/76/462/Add.2, 2021).

La Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (DOF 08-05-2023) también hace referencia a este derecho en el Artículo 1 *“...tienen por objeto garantizar el derecho de toda persona al medio ambiente sano y propiciar el desarrollo sustentable a través de la prevención de la generación, valorización y gestión integral de los residuos peligrosos, mineros y metalúrgicos, sólidos urbanos, de manejo especial; prevenir la contaminación de sitios con estos residuos y llevar a cabo su remediación...”*.

En cuanto a leyes, podemos mencionar la Ley Federal de Responsabilidad Ambiental (DOF 20-05-2021), que en el Artículo 10 menciona que *“Toda persona física o moral que con su acción u omisión ocasione directa o indirectamente un daño al ambiente, será responsable y estará obligada a la reparación de los daños, o bien, cuando la reparación no sea posible a la compensación ambiental que proceda, en los términos de la presente Ley. De la misma forma estará obligada a realizar las acciones necesarias para evitar que se incremente el daño ocasionado al ambiente”* como parte del Capítulo Segundo llamado *Obligaciones derivadas de los daños ocasionados al ambiente*, ya que la contaminación plástica es inminente, cualquier persona física o moral que contamine o pueda estar contaminando con residuos plásticos, debería reparar los daños y/o realizar acciones para incrementar el daño ambiental.

Ahora, si algún argumento pudiera debatir el hecho de que los estudios en temas referentes a daños a la salud humana por plásticos o microplásticos están en su etapa temprana, se puede recurrir al Principio de Precaución, mencionado en el punto III, del Artículo 26 de la Ley General de Cambio Climático (DOF 01-04-2024) *“Artículo 26. En la formulación de la política nacional de cambio climático se observarán los principios de:...III.*

Precaución, cuando haya amenaza de daño grave o irreversible, la falta de total certidumbre científica no deberá utilizarse como razón para posponer las medidas de mitigación y adaptación para hacer frente a los efectos adversos del cambio climático.”. Donde se establece que la ejecución de actividades para la mitigación de contaminación ambiental se debe realizar incluso si la evidencia científica no es total referente a los impactos ambientales negativos.

Referente a actividad internacionales en materia de gestión de residuos plásticos, en marzo de 2022, la ONU adopta una resolución histórica para desarrollar al 2024 un instrumento jurídico internacional para combatir la contaminación plástica: *“Fin de la contaminación por plásticos: hacia un instrumento internacional jurídicamente vinculante”* donde participaron representantes de 175 países (UNEP/EA.5/Res.14, 2022).

Otro aspecto muy importante cuando se busca lograr un cambio es el Movimiento Social, el cual ya se ha hecho presente para exigir al Gobierno Mexicano regulaciones relativas a residuos y producción de plásticos por medio de la Declaratorio Xitla (2022). La Declaratoria tiene diez exigencias, de las que mencionaremos 3:

- “5. Se elabore una Ley General de Economía Circular que no sea solo una legislación para empaques y embalajes que incluya todos los sectores industriales no solo a la industria del plástico; y se establezcan líneas base como el principio de precaución, políticas claras de Responsabilidad Extendida del Productor;*
- 6. Se transparente el listado de aditivos en los plásticos y haya claridad en el etiquetado de los productos que omiten mencionar el tipo real de plástico.*
- 7. Se reconozca que ninguna planta de agua residual filtra microplásticos, lo que sigue siendo un problema que termina afectando la salud marina y humana.”*

Se resalta la exigencia de una Ley General de Economía Circular para todos los sectores industriales, aunque valdría la pena considerar también la Economía Verde, que es aquella que además de

mejorar la economía y la sociedad, también reduce los riesgos ambientales (Domínguez *et al.*, 2020). Otro aspecto importante son los aditivos que contienen los productos elaborados con plástico, por ejemplo, el bisfenol A y los ftalatos que son disruptores endocrinos, sustancias que pueden alterar el sistema hormonal humano causando enfermedades reproductivas, trastornos metabólicos, enfermedades neurológicas y hasta varios tipos de cáncer si se ingieren o inhalan. Además, los residuos plásticos pueden acarrear estos compuestos tóxicos a los ecosistemas dañando la flora y fauna (Campanale *et al.*, 2020). Otro estudio ha revelado también que la exposición a bisfenol A y ftalatos por medio de biberones en periodo gestacional y de lactancia aumenta el riesgo de desarrollar ansiedad, depresión, trastorno del espectro autista y trastorno de déficit de atención e hiperactividad (Solleiro-Villavicencio *et al.*, 2020).

Y en cuanto a las plantas de tratamiento de aguas residuales en nuestro país, no son aptas para detener los microplásticos, pudiendo llegar al ser humano a través del efluente de agua, incluso el Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA 2019) detectó presencia de microplásticos en las plantas de tratamiento Los Berros y Miravalle, así como en sus fuentes de abastecimiento la presa Valle de Bravo y el Lago de Chapala, tanto en agua como en sedimentos.

Si bien es cierto, una buena noticia de los trabajos del Gobierno se dio a conocer el pasado julio (2023) donde la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) con el apoyo del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) trabajan en la elaboración del Plan Nacional de Acción para Residuos Marinos y Contaminación Plástica (Plan REMAR), cuyo objetivo es identificar acciones e indicadores que permitan implementar una política pública sobre Residuos Marinos y Contaminación Plástica, y que integre los principales resultados del Inventario Nacional de Fuentes de Contaminación Plástica (INFCP) (SEMARNAT 2023a). El INFCP tiene como objetivo conjuntar, analizar e

interpretar la información existente sobre la contaminación por plásticos en México, de la fuente al mar, para servir como base en el desarrollo del Plan REMAR. El Inventario está conformado por cuatro componentes: Identificación de puntos críticos de contaminación plástica, análisis de las características de la gestión de residuos, evaluación de la presencia en ambientes acuáticos, terrestres y producto de consumo y evaluación de contaminación marina por plásticos y microplásticos. En el INFCP se reportó la identificación de dos regiones críticas asociadas a los ríos Suchiate, Colorado y Tijuana, basadas en el potencial de los ríos para llevar contaminación plástica al océano; las regiones críticas identificadas en las costas fueron Nayarit, Oaxaca y el límite estatal Veracruz-Tamaulipas. El 80% de la contaminación plástica marina se detectó que proviene de fuentes ferretes: descargas de aguas residuales domésticas, turismo, pesca, acuacultura, embarcaciones e industrias que general pellets y microplásticos (SEMARNAT 2023b).

La biotecnología como aliada en la biorremediación de contaminación plástica

La biotecnología es una ciencia que integra las ciencias naturales y la ingeniería con la finalidad de utilizar organismos, células o moléculas derivados de estos, en bienes o servicios. La biotecnología ambiental incluye a los procesos de biorremediación. La biorremediación es un método para eliminar, reducir o equilibrar contaminantes ambientales mediante el uso de organismos o enzimas. Estos organismos absorben los contaminantes y producen otras moléculas más sencillas que no se consideran contaminantes. Se han reportado diferentes organismos como degradadores de diversos plásticos, se incluyen organismos superiores como los gusanos, y principalmente microorganismos como los hongos y bacterias. A continuación se mencionan algunos de ellos.

Polipropileno (PP)

El polipropileno es utilizado en empaques, productos desechables y prácticamente en todas las industrias, ya que su estructura

es muy estable, razón por la cual su biodegradación en el ambiente es muy lenta. Los procesos aplicados para biodegradar PP suelen necesitar tratamientos previos como altas temperaturas o irradiación UV.

Un importante estudio sobre degradación de PP es el publicado por Yang *et al.* en el año 2020, donde los gusanos amarillos de la harina (*Tenebrio molitor*) y los supergusanos (*Zophobas atratus*) fueron utilizados para degradar PP en forma de espuma. Después de 35 días, el consumo de PP fue de 68.11 % y 39.70 % respectivamente para cada organismo. La capacidad de estos gusanos para consumir el PP se atribuye a su microbioma intestinal, ya que *Citrobacter* sp. y *Enterobacter* sp., fueron asociados al microbioma de *Z. atratus* y *Cluyvera* a *T. molitor*. En un estudio más reciente, Jeon *et al.* (2021) aislaron la bacteria *Lysinibacillus* sp JJY0216, la cual logró degradar 4% de PP después de 26 días sin un pretratamiento, un adelanto importante en la degradación de este plástico.

Por otro lado, los microplásticos de PP son también un serio problema ambiental, debido a que afectan ecosistemas marinos y terrestres, el estudio de su biodegradación es tema crucial. Habib *et al.* en 2020 evaluaron la degradación de microplásticos de PP por medio de las bacterias *Pseudomonas* sp. ADL15 y *Rhodococcus* sp. ADL36 aisladas de suelo Antártico durante 40 días, obteniendo un porcentaje de degradación de 17.3% y 7.3% por cada bacteria.

Polietileno (PE)

Un gusano también ha sido reportado en la degradación de PE. El gusano de la polilla de la cera (*Galleria mellonella*), tiene la capacidad de degradar 1.95 g de películas de PELD por larva después de 21 días. El microbioma del gusano revela cambios significativos en la bacteria *Serratia* cuando es alimentada con este plástico (Lou *et al.*, 2020). *Aspergillus flavus* PEDX3 fue aislado del intestino de este gusano (*Galleria mellonella*), siendo el hongo capaz de degradar microplásticos de PE de baja y alta densidad después de 28 días, dos enzimas que podrían estar involucradas en el proceso fueron

identificadas como oxidasas multicobre similares a lacasas (Zhang *et al.*, 2019).

En cuanto a bacterias, dos *Pseudomonas* (*P. knackmussii* N1-2 y *P. aeruginosa* RD1-3) aisladas de una planta de tratamiento de aguas residuales, fueron reportadas como capaces de degradar películas de PE utilizadas en agricultura en un porcentaje de 5.95 ± 0.03 % y 3.62 ± 0.32 % respectivamente. Las enzimas identificadas secretadas en el proceso fueron monooxigenasas, dioxigenasas e hidrolasas (Hou *et al.*, 2022).

Por su parte, respecto a la bacteria marina *Microbulbifer hydrolyticus* IRE-31 aislada de residuos industriales marinos ricos en lignina, se ha reportado que después de 30 días de cultivo con PELD, este presentó cambios visibles en su superficie y cambios en sus grupos funcionales, que sugieren la oxidación del plástico (Li *et al.*, 2020).

El PEHD es un poco más difícil de degradar, pocos estudios se han especializado en degradar este tipo de plástico con hongos, entre ellos se encuentra la investigación de Kang *et al.* que en 2019 reportaron que el hongo *Bjerkandera adusta* TBB-03 puede degradar PEHD en presencia de un sustrato de lignocelulosa (astillas de madera de freno), obteniendo cambios químicos, estructurales y morfológicos en la superficie del plástico.

De esta revisión, se puede observar que la atención se encuentra en microorganismos que degradan naturalmente algún biopolímero, para investigar si las enzimas que producen, son aptas para degradar polímeros sintéticos, como lo son los plásticos.

Cloruro de polivinilo (PVC)

La larva *Tenebrio molitor* también ha sido reportada en el tratamiento de microplásticos de PVC, Peng *et al.* en 2020 reportaron una ingesta de 36.62 ± 6.79 mg de PVC por cada 100 larvas por día, durante 16 días y la presencia de residuos de PVC y carbonos clorados en el excremento de las larvas.

Los microorganismos tienen un gran potencial en biodegradación, y algo a lo que se le ha apostado, es al aislamiento de microorganismos de ambientes contaminados, por ejemplo, el trabajo de Saeed *et al.* (2022). Ellos aislaron dos

hongos, *Aspergillus niger* y *Aspergillus glaucus* y dos bacterias, *Bacillus licheniformis* y *Achromobacter xylosoxidans* de suelo contaminado con residuos plásticos. Los hongos demostraron degradación de PVC de 10 y 32 % respectivamente y las bacterias de 15 y 17 % respectivamente, después de 4 semanas.

En 2020, Giacomucci *et al.* reportaron por primera vez la biodegradación de películas de PVC por consorcios marinos en condiciones anaerobias. Después de 7 meses, la pérdida de peso del plástico máxima encontrada fue de 11.7 ± 0.6 %, e incluso aparentemente actuando contra los aditivos y la cadena del polímero.

Ya que se han aislado hongos y bacterias de ambientes contaminados, es probable que el uso de consorcios microbianos sea un camino prometedor en la biodegradación de plásticos.

Tereftalato de polietileno (PET)

La bacteria más conocida en cuanto a degradación de PET es la famosa *Idemonella sakaiensis* 201-F6, aislada de un ambiente donde estaba expuesta al PET. Esta bacteria es capaz de utilizar el plástico como su única fuente de carbono y energía, produciendo dos enzimas especializadas en la despolimerización de PET, denominadas PETasa y MHETasa cuyos sustratos son PET y el intermediario mono(2-hidroxietil) tereftalato (MHET) (Yoshida *et al.*, 2016). A partir de este descubrimiento se ha trabajado con el aislamiento, expresión, caracterización y mejoramiento de estas enzimas tan importantes.

Por otro lado, las cutinasas tanto de hongos como de bacterias, son enzimas que han sido ampliamente estudiadas para la degradación de PET (Sui *et al.*, 2023). Incluso cutinasas de hongos han sido expresadas en bacterias para mejorar su actividad catalítica. Por ejemplo, el trabajo de Vázquez-Alcántara *et al.* (2021), que expresaron una cutinasa del hongo *Moniliophthora roreri* en *Escherichia coli*, obteniendo un porcentaje de degradación del 31 % de PET con la enzima recombinante después de 21 días.

En nuestro grupo de trabajo, se han probado bacterias para la degradación de PET, en la que los mejores resultados se

observaron fue utilizando *Bacillus muralis*, aislada de suelo de bosque (Narciso-Ortiz *et al.*, 2020). Recientemente, también se publicaron resultados de microorganismos aislados de residuos plásticos encontrados en el Sistema Arrecifal Veracruzano, donde se aislaron bacterias y hongos con actividad enzimática del tipo hidrolasas de ácidos de ésteres carboxílicos y porcentajes de degradación de hasta 10 % para la bacteria *Aneurinibacillus migulanus* y 17 % para el hongo *Aspergillus flavus* (Narciso-Ortiz *et al.*, 2023).

Poliuretano (PUR)

El estudio de degradación de PUR ha incluido también bacterias, hongos y consorcios aislados de diferentes ambientes.

Su *et al.* en 2023 probaron la degradación de película de PUR por tres consorcios microbianos provenientes de lixiviado de un vertedero. El consorcio más eficiente, que contiene *Pseudomonas* en mayor porcentaje, acumuló gran cantidad de biomasa en una semana. También identificaron las enzimas mayormente secretadas durante la biodegradación de PUR, las cuales fueron esterases y ureasas.

También han sido evaluadas bacterias aisladas de microbiomas intestinales, por ejemplo, la bacteria *Serratia* sp., aislada del intestino de la mantis asiática (*Hierodula patellifera*) (Kim *et al.*, 2022). En este estudio, se determinó la degradación de espuma de PUR comercial por la bacteria, un porcentaje de 23.95 % después de 2 semanas de incubación. También probaron una lipasa recombinante aislada de la misma bacteria en un sustrato similar al PUR, obteniendo un porcentaje de degradación del 78.35 %.

Los hongos también han sido estudiados para la degradación de PUR, Khan *et al.* en 2017, aislaron una cepa de *Aspergillus tubingensis* del suelo de un vertedero de desechos urbanos, este hongo demostró capacidad para degradar PUR por medio de su adhesión, crecimiento de sus hifas, propagación en la superficie del plástico y finalmente secreción de enzimas degradadoras.

Poliestireno (PS)

El PS es uno de los plásticos más difíciles de degradar, debido a su estructura química, que contiene restos de fenilo unidos a largas cadenas de alcanos.

Kim *et al.* en 2021, aislaron dos bacterias de suelos de campus universitarios, *Pseudomonas lini* JNU01 y *Acinetobacter johnsonii* JNU01, las cuales son aptas para degradar microplásticos de PS por medio de la colonización superficial.

Las *Pseudomonas* podrían ser un organismo con un importante papel en la degradación de PS, ya que otra la cepa, la bacteria *Pseudomonas* sp. DSM 50071, aislada del intestino del supergusano (*Zophobas atratus*) ha demostrado también biodegradar el PS por medio de la colonización superficial y secreción de una serina hidrolasa (Kim *et al.*, 2020).

Recientemente, Liu *et al.* (2023), publicaron el primer reporte de biodegradación de PS por medio de bacterias marinas aisladas de residuos plásticos recolectados de un área de manglar. Diversas bacterias aisladas de *Novosphingobium*, *Gordonia*, *Stappia*, *Mesobacillus*, *Alcanivorax*, *Flexivirga*, *Cytobacillus*, *Thioclava*, y *Thalassospira* mostraron porcentajes de degradación de entre 2.66 y 7.73 % en un mes.

Conclusiones

Los recientes estudios sobre plásticos en salud humana son una alerta temprana para que el país atienda esta problemática. Al igual que con los plásticos, para los microplásticos tampoco existe una Ley Federal ni General que los regule. Las Leyes actuales de México regulan el desecho solo de grandes generadores de plásticos, pero es necesario que se regule la fabricación, uso y destino final de microplásticos. Esperemos que, así como la Ley de Residuos Sólidos del Distrito Federal sirvió de base para que las demás entidades prohibieran la entrega de bolsas, popotes y empaque, también sirva para legislar los microplásticos. La perspectiva es que pronto se promulgue una Ley Federal, General o se adicione a alguna Ley ya existe la regulación de manejo de residuos plásticos y microplásticos.

Por otro lado, la biotecnología nos otorga un sinfín de herramientas para poder contrarrestar la contaminación plástica,

como el uso de microorganismos o enzimas. Es necesario invertir en investigación y tecnología para escalar estos procesos y poder disminuir la contaminación que ya aqueja al planeta.

Agradecimientos

A CONACHYT por el Proyecto A1-S-47929, el Proyecto ProNacEs de Soberanía Alimentaria 321295 y la beca de doctorado otorgada a Leticia Narciso Ortiz (CVU 858149).

Referencias

A/76/462/Add.2 (2021). Promotion and protection of human rights: human rights questions, including alternative approaches for improving the effective enjoyment of human rights and fundamental freedoms. Human Rights Advancement. A/76/462/Add.2
<https://digitallibrary.un.org/record/395070?ln=es&v=pdf>

Barragán-Ocaña, A., Silva-Borjas, P., Olmos-Peña, S., y Polanco-Olguín, M. (2020). Biotechnology and bioprocesses: Their contribution to sustainability. Processes, 8(4), 436.
<https://doi.org/0.3390/pr8040436>

Campanale, C., Massarelli, C., Savino, I., Locaputo, V., y Uricchio, V. F. (2020). A detailed review study on potential effects of microplastics and additives of concern on human health. International journal of environmental research and public health, 17(4), 1212.
<https://doi.org/10.3390/ijerph17041212>

Declaratoria Xitla (2022). 1er Encuentro "Libérate del Plástico-break free from plastic - México".
https://www.fronterascomunes.org.mx/pdf/Declaratoria_Xitla.pdf

DOF 01-02-2013 (2013). NOM-161-SEMARNAT-2011. Que establece los criterios para clasificar a los Residuos de Manejo Especial y determinar cuáles están sujetos a Plan de Manejo; el listado de los mismos, el procedimiento para la inclusión o exclusión a dicho listado; así como los elementos y procedimientos para la formulación de los planes de manejo.

https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5286505&fecha=01/02/2013#gsc.tab=0

DOF 01-04-2024 (2024). Ley General de Cambio Climático.
<https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LGCC.pdf>

DOF 08-05-2023 (2023). Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos.
<https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LGPGIR.pdf>

DOF 20-05-2021 (2021). Ley Federal de Responsabilidad Ambiental
https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LFRA_200521.pdf

DOF 15-04-2025 (2025). Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos
<https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/CPEUM.pdf>

DOF 29-05-2023 (2023). Ley General de Salud.
<https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LGS.pdf>

Domínguez, J. A., Duarte, J. F. V., Fonseca, F. R., y Espitia, S. M. (2020). VII. La economía verde en el desarrollo empresarial del siglo XXI. Revista de Investigación Transdisciplinaria en Educación, Empresa y Sociedad-ITEES, 2(2), 1-44. ISSN: 2711-1857 (En línea)

Gaceta del Senado (2017). Iniciativa con Proyecto de Decreto por el que se reforma el Artículo 7 de La Ley General Para La Prevención y Gestión Integral De Los Residuos.
https://www.senado.gob.mx/65/gaceta_de_l_senado/documento/70198

Gaceta Oficial de la CDMX (2023). Ley de Residuos Sólidos del Distrito Federal.
<https://www.congresocdmx.gob.mx/media/documentos/5e9cfdc1fa63fdf6120fd92f434a3e407d58af30.pdf>

Gavrilescu, M. (2010). Environmental biotechnology: achievements, opportunities and challenges. Dynamic biochemistry, process biotechnology and

Artículos

molecular biology, 4(1), 1-36.

[http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2010/DBPBM/B_4\(1\)/DBPBM_B_4\(1\)1-36o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2010/DBPBM/B_4(1)/DBPBM_B_4(1)1-36o.pdf)

Giacomucci, L., Raddadi, N., Soccio, M., Lotti, N., y Fava, F. (2020). Biodegradation of polyvinyl chloride plastic films by enriched anaerobic marine consortia. *Marine environmental research*, 158, 104949.

<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.104949>

H. Congreso del Estado de Oaxaca (2023). Iniciativa con Proyecto de Decreto por el que la LXV Legislatura Constitucional del H. Congreso del Estado de Oaxaca propone al Congreso de la Unión Reforma por la cual se adiciona un segundo párrafo a la fracción VI del Artículo 7 de La Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos.

<https://www.congresooaxaca.gob.mx/doc/s65.congresooaxaca.gob.mx/gaceta/20230322a/18.pdf>

Habib, S., Iruthayam, A., Abd Shukor, M. Y., Alias, S. A., Smykla, J., y Yasid, N. A. (2020). Biodeterioration of untreated polypropylene microplastic particles by Antarctic bacteria. *Polymers*, 12(11), 2616.

<https://doi.org/10.3390/polym12112616>

Hou, L., Xi, J., Liu, J., Wang, P., Xu, T., Liu, T. y Lin, Y. B. (2022). Biodegradability of polyethylene mulching film by two *Pseudomonas* bacteria and their potential degradation mechanism. *Chemosphere*, 286, 131758.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131758>

Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA) (2019). Informe Anual 2019. <https://doi.org/10.24850/i-imta-2019-01>

Jeon, J. M., Park, S. J., Choi, T. R., Park, J. H., Yang, Y. H., y Yoon, J. J. (2021). Biodegradation of polyethylene and polypropylene by *Lysinibacillus* species JJY0216 isolated from soil grove. *Polymer Degradation and Stability*, 191, 109662.

<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2021.109662>

Kang, B. R., Kim, S. B., Song, H. A., y Lee, T. K. (2019). Accelerating the biodegradation of high-density polyethylene (HDPE) using *Bjerkandera adusta* TBB-03 and lignocellulose substrates. *Microorganisms*, 7(9), 304.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms7090304>

Khan, S., Nadir, S., Shah, Z. U., Shah, A. A., Karunarathna, S. C., Xu, J. y Hasan, F. (2017). Biodegradation of polyester polyurethane by *Aspergillus tubingensis*. *Environmental pollution*, 225, 469-480.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.012>

Kim, J. H., Choi, S. H., Park, M. G., Park, D. H., Son, K. H., y Park, H. Y. (2022). Polyurethane biodegradation by *Serratia* sp. HY-72 isolated from the intestine of the Asian mantis *Hierodula patellifera*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1005415.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1005415>

Kim, H. W., Jo, J. H., Kim, Y. B., Le, T. K., Cho, C. W., Yun, C. H., y Yeom, S. J. (2021). Biodegradation of polystyrene by bacteria from the soil in common environments. *Journal of Hazardous Materials*, 416, 126239.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126239>

Kim, H. R., Lee, H. M., Yu, H. C., Jeon, E., Lee, S., Li, J., y Kim, D. H. (2020). Biodegradation of polystyrene by *Pseudomonas* sp. isolated from the gut of superworms (larvae of *Zophobas atratus*). *Environmental science & technology*, 54(11), 6987-6996.

<https://doi.org/10.1021/acs.est.0c01495>

Leslie, H. A., Van Velzen, M. J., Brandsma, S. H., Vethaak, A. D., Garcia-Vallejo, J. J., y Lamoree, M. H. (2022). Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. *Environment international*, 163, 107199.

<https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107199>

Li, Z., Wei, R., Gao, M., Ren, Y., Yu, B., Nie, K., y Liu, L. (2020). Biodegradation of low-density polyethylene by *Microbulbifer*

hydrolyticus IRE-31. Journal of environmental management, 263, 110402. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110402>

Liu, R., Zhao, S., Zhang, B., Li, G., Fu, X., Yan, P., y Shao, Z. (2023). Biodegradation of polystyrene (PS) by marine bacteria in mangrove ecosystem. Journal of Hazardous Materials, 442, 130056. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130056>

Lou, Y., Ekaterina, P., Yang, S. S., Lu, B., Liu, B., Ren, N. y Xing, D. (2020). Biodegradation of polyethylene and polystyrene by greater wax moth larvae (*Galleria mellonella* L.) and the effect of co-diet supplementation on the core gut microbiome. Environmental science & technology, 54(5), 2821-2831. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07044>

Narciso-Ortiz, L., Coreño-Alonso, A., Mendoza-Olivares, D., Lucho-Constantino, C. A., y Lizardi-Jiménez, M. A. (2020). Baseline for plastic and hydrocarbon pollution of rivers, reefs, and sediment on beaches in Veracruz State, México, and a proposal for bioremediation. Environmental Science and Pollution Research, 27, 23035-23047. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08831-z>

Narciso-Ortiz, L., Peña-Montes, C., Peralta-Pelaez, L. A., Fernández-Romero, F., Anzures-Jacinto, M. L., Sulbarán, B. C., y Pacheco-Rivera, K. M. (2024). PET-degrading microorganisms isolated from residues of the SAV biosphere reserve and identification of carboxylic ester hydrolase activity during their growth in the presence of polymer. Applied Environmental Biotechnology, 9(1). ISSN 2424-9092. <https://www.udspub.com/ajj/public/index.php/aeb/article/view/1841>

Osuna-Laveaga, D. R., Ojeda-Castillo, V., Flores-Payán, V., Gutiérrez-Becerra, A., y Moreno-Medrano, E. D. (2023). Micro-and nanoplastics current status: legislation, gaps, limitations and socio-economic prospects for future. Frontiers in Environmental Science. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.1071>

99

Peng, B. Y., Chen, Z., Chen, J., Yu, H., Zhou, X., Criddle, C. S. y Zhang, Y. (2020). Biodegradation of polyvinyl chloride (PVC) in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. Environment International, 145, 106106. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106106>

Plastic Europe (2024). Plastics – the Facts 2024, 1, <https://plasticseurope.org/es/knowledge-hub/plastics-the-fast-facts-2024/>

Ragusa, A., Svelato, A., Santacroce, C., Catalano, P., Notarstefano, V., Carnevali, O. y Giorgini, E. (2021). Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. Environment international, 146, 106274. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106274>

Saeed, S., Iqbal, A., y Deebe, F. (2022). Biodegradation study of Polyethylene and PVC using naturally occurring plastic degrading microbes. Archives of Microbiology, 204(8), 497. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03081-8>

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (2023a). Residuos marinos y contaminación plástica. <https://www.gob.mx/semarnat/acciones-y-programas/residuos-marinos-y-contaminacion-plastica>

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (2023). Inventario Nacional de Fuentes de Contaminación Plástica. https://dsiappsdev.semarnat.gob.mx/datos/portal/publicaciones/2023/NFCP_2023.pdf

Sharma, I. (2020). Bioremediation techniques for polluted environment: concept, advantages, limitations, and prospects. In Trace metals in the environment-new approaches and recent advances. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90453>

Sistema de Información Legislativa (2013). De la Comisión de Medio Ambiente y Recursos Naturales, con proyecto de Decreto que Reforma y Adiciona diversas disposiciones de la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos

http://sil.gobernacion.gob.mx/Archivos/Documentos/2013/04/asun_2960966_20130403_1364921851.pdf

Sistema de Información Legislativa (2019). Iniciativa que reforma los Artículos 269 y 421 bis de la Ley General de Salud, suscrita por el diputado Raúl Gracia Guzmán e integrantes del grupo parlamentario del PAN.

http://sil.gobernacion.gob.mx/Archivos/Documentos/2019/10/asun_3936778_20191015_1571170363.pdf

Sistema de Información Legislativa (2020). Iniciativa que adiciona el Artículo 269 de la Ley General de Salud, suscrita por las diputadas Julieta Macías Rábago e Irma Juan Carlos, de los grupos parlamentarios de Movimiento Ciudadano y MORENA.

http://sil.gobernacion.gob.mx/Archivos/Documentos/2020/02/asun_4009153_20200227_1582832039.pdf

Solleiro-Villavicencio, H., Gomez-De León, C. T., Del Río-Araiza, V. H., y Morales-Montor, J. (2020). The detrimental effect of microplastics on critical periods of development in the neuroendocrine system. *Birth Defects Research*, 112(17), 1326-1340. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1776>

Su, T., Zhang, T., Liu, P., Bian, J., Zheng, Y., Yuan, Y. y Qi, Q. (2023).

Biodegradation of polyurethane by the microbial consortia enriched from landfill. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(5), 1983-1995.

<https://doi.org/10.1007/s00253-023-12418-2>

Sui, B., Wang, T., Fang, J., Hou, Z., Shu, T., Lu, Z. y Zhu, Y. (2023). Recent advances in the biodegradation of polyethylene terephthalate with cutinase-like enzymes. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1265139.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1265139>

UNEP/EA.5/Res.14 (2022). Resolución aprobada por la Asamblea de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente el 2 de marzo de 2022.

<https://wedocs.unep.org/rest/api/core/bitstreams/8b993d59-e620-44dd-9bd8-40278b8428a5/content>

Vázquez-Alcántara, L., Oliart-Ros, R. M., García-Bórquez, A., y Peña-Montes, C. (2021). Expression of a cutinase of *Moniliophthora roreri* with polyester and PET-plastic residues degradation activity. *Microbiology Spectrum*, 9(3), e00976-21. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00976-21>

Yang, S. S., Ding, M. Q., He, L., Zhang, C. H., Li, Q. X., Xing, D. F. y Wu, W. M. (2021). Biodegradation of polypropylene by yellow mealworms (*Tenebrio molitor*) and superworms (*Zophobas atratus*) via gut-microbe-dependent depolymerization. *Science of The Total Environment*, 756, 144087.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144087>

Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y. y Oda, K. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate). *Science*, 351(6278), 1196-1199.

<https://doi.org/10.1126/science.aad6359>

Zhang, J., Gao, D., Li, Q., Zhao, Y., Li, L., Lin, H. y Zhao, Y. (2020). Biodegradation of polyethylene microplastic particles by the fungus *Aspergillus flavus* from the guts of wax moth *Galleria mellonella*. *Science of the Total Environment*, 704, 135931.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135931>

Aislamiento de cepas fúngicas de la agroindustria azucarera: capacidad de producción de amilasas, dextranasas y lacasas

Serafín Pérez Contreras¹, Dora Angélica Avalos de la Cruz¹, Manuel Alejandro Lizardi Jiménez², José Andrés Herrera Corredor¹, Obdulia Baltazar Bernal¹ y Ricardo Hernández Martínez^{3*}

¹Colegio de Postgraduados campus Córdoba, Amatlán de los Reyes, Ver. CP 94946.

²SECIHTI-Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Sierra Leona 550, C P 78210 San Luis Potosí, México.

³SECIHTI-Colegio de Postgraduados Córdoba, Amatlán de los Reyes, Ver. CP 94946,

*odracirhema@gmail.com

Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo aislar y caracterizar cepas fúngicas nativas de biomasa de caña de azúcar con potencial para producir enzimas de interés industrial, incluyendo amilasas, dextranasas y lacasas. Los aislados fúngicos fueron aislados a partir de bagazo y hojas de caña de azúcar mediante siembra directa y fueron purificadas realizando subcultivos en agar de papa y dextrosa. La caracterización morfológica reveló que los aislados AB, TH y TB tienen características similares a las reportadas para los géneros *Aspergillus* y *Trichoderma*, ampliamente reportados con capacidad de producción enzimática. Los ensayos enzimáticos cualitativos demostraron que todos los aislados tienen actividad amilasa, AB y TH producen dextranasa, mientras que todas fueron negativas para actividad lacasa. Los resultados concuerdan con reportes sobre el potencial de las especies de *Trichoderma* y *Aspergillus* para la producción de enzimas. Este estudio subraya la importancia de utilizar los recursos microbianos locales para la producción de enzimas, ofreciendo soluciones sostenibles para aplicaciones agroindustriales.

Palabras Claves: Enzimas hidrolíticas, Aislados fúngicos, *Aspergillus*, cepas nativas

Abstract

The objective of this study was to isolate and characterize native fungal strains from sugarcane biomass with the potential to produce enzymes of industrial interest, including amylases, dextranases, and laccases. The fungal isolates were isolated from sugarcane bagasse and leaves by direct inoculation and were purified by subculturing on potato and dextrose agar. Morphological characterization revealed that isolates AB, TH, and TB have characteristics similar to those reported for the genera *Aspergillus* and *Trichoderma*, widely reported to have enzyme production capacity. Qualitative enzyme assays demonstrated that all isolates showed amylase activity, while AB and TH also showed dextranase production, and all were negative for laccase activity. The results are consistent with reports on the potential of *Trichoderma* and *Aspergillus* species for enzyme production. This study highlights the importance of using local microbial resources for enzyme production, offering sustainable solutions for agro-industrial applications.

Key Words: Hydrolytic enzymes, Fungal isolates, Qualitative tests, Native strains

Introducción

Las enzimas son biocatalizadores de origen biológico con amplias aplicaciones en bioprocesos e industrias, caracterizándose por ser productos amigables con el medio ambiente (Nargotra *et al.*, 2022). A nivel industrial, son producidas principalmente por bacterias y hongos, aunque las enzimas fúngicas presentan ventajas adicionales como su naturaleza extracelular lo que facilita su recuperación, la resistencia a condiciones extremas de temperatura pH, entre otras, pueden producirse con altos rendimientos a partir de residuos agroindustriales (Nargotra *et al.*, 2022). La importancia económica de estos biocatalizadores es notable, ya que su mercado alcanzó en años recientes un valor estimado de 7,000 millones de dólares (Leite *et al.*, 2021). No obstante, su producción puede verse limitada por factores como la estabilidad o complejidad estructural particularmente cuando presentan múltiples dominios funcionales, plegamientos tridimensionales difíciles de mantener, alta heterogeneidad conformacional o regiones sensibles a condiciones ambientales (Arregui *et al.*, 2019). Entre las enzimas de mayor interés se encuentran proteasas, lipasas, amilasas, celulasas, xilanasas, lacasas y dextranasas, debido a sus aplicaciones en industrias como la alimentaria, farmacéutica, papelera, azucarera, textil y en procesos de biorremediación (Da Silva *et al.*, 2019; Hasan *et al.*, 2023; Juntarachot *et al.*, 2020; Liu y Kokare, 2023).

Dentro de este grupo, las amilasas (α , β y γ) son enzimas hidrolíticas que degradan almidón en productos como dextrinas, oligosacáridos y maltosa (Vieira y Delerue-Matos, 2020). Tienen aplicaciones en la producción de jarabes de glucosa y maltosa, la reducción de viscosidad en jarabes de azúcar, la clarificación de jugos, la industria cervecera y la panificación (Liu y Kokare, 2023). Las amilasas fúngicas, producidas por géneros como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Thermomyces* y *Mucor*, resultan especialmente valiosas debido a la secreción extracelular y a la capacidad de las hifas para penetrar sustratos sólidos, favoreciendo la hidrólisis (Farooq *et al.*, 2021).

Por su parte, las lacasas son oxidasas que contienen varios átomos de cobre en su estructura que les permiten oxidar los compuestos fenólicos y no fenólicos de la lignina, así como diversos contaminantes

recalcitrantes, lo que les confiere gran interés en aplicaciones ambientales e industriales (Debnath y Saha, 2020). Su versatilidad se amplía mediante el empleo de mediadores redox que transfieren los electrones hacia compuestos que normalmente no pueden acceder al sitio activo (Chmelová *et al.*, 2022). Estas enzimas se producen en bacterias, plantas y, con mayor eficacia, en hongos de los géneros *Trametes*, *Pleurotus* y *Aspergillus*, siendo útiles en la biorremediación, el tratamiento de aguas residuales, la decoloración de tintes, y como auxiliares tecnológicos en la industria alimentaria (Hasan *et al.*, 2023; Singh y Gupta, 2020).

Finalmente, las dextranasas hidrolizan los enlaces α -(1,6)-glucosídicos del dextrano, un polisacárido producido durante la fermentación bacteriana en caña de azúcar y que afecta negativamente el proceso industrial por incrementar la viscosidad de jugos y mieles, alterar la cristalización y dañar los equipos (Tanoue Batista *et al.*, 2021). Aunque estas enzimas tienen aplicaciones en las industrias azucarera, alimentaria y farmacéutica, su uso aún es limitado debido a los altos costos de producción. Sin embargo, los hongos representan fuentes importantes de dextranasas, especies como *Aspergillus niger*, *Chaetomium gracile* y diversas especies de *Penicillium* han sido reportadas como productoras eficientes (Hu *et al.*, 2023; Juntarachot *et al.*, 2020).

En este contexto, el presente trabajo tuvo como objetivo aislar y caracterizar microorganismos nativos de caña de azúcar con potencial para producir amilasas, lacasas y dextranasas, lo que contribuirá al aprovechamiento de recursos locales para aplicaciones industriales y biotecnológicas.

Materiales y Métodos

Aislamiento de cepas fúngicas

Fueron aisladas cepas fúngicas tomando como fuentes de aislamiento bagazo y hojas de caña de azúcar, recolectados en el Colegio de Postgraduados campus Córdoba. Estas fuentes fueron sometidas a un proceso de cámara húmeda a 30 °C durante 7 días, para promover la activación de las cepas nativas. Posteriormente, las muestras fueron sembradas directamente sobre cajas Petri con agar cloranfenicol, rosa de bengala y diclorán y mantenidas a 30° C hasta el desarrollo de la

biomasa (CRBD) (Afolabi *et al.*, 2020; Martínez-Salgado *et al.*, 2021).

Purificación de las cepas

A partir de estas muestras fueron seleccionadas, para su purificación, cepas que presentaron características similares a géneros como *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium* o *Penicillium*, reportados como buenos productores de enzimas (Ire *et al.*, 2021; Juntarachot *et al.*, 2020; A. Singh *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2019). Para la etapa de purificación, fueron realizados subcultivos mediante la técnica de punta de hifa en cajas Petri con agar de papa y dextrosa (APD), incubándolas a 30 °C por 5 días (Lacerda *et al.*, 2018).

Caracterización morfológica de las cepas

Las cepas puras fueron caracterizadas mediante la observación de sus características microscópicas, como la morfología de hifas, conidios y conidióforos, utilizando la tinción con azul de algodón. Además, fueron analizadas sus características macroscópicas de colonia, tales como el color del micelio, color de los conidios, margen, forma, elevación, superficie, presencia de pigmentos y distintos tipos de secreciones, que pueden manifestarse como exudados líquidos, gotas cristalinas, compuestos viscosos o metabolitos coloreados (Savín-Molina *et al.*, 2021).

Conservación de cepas aisladas

Para la conservación de las cepas fúngicas aisladas, estas se resembraron en tubos inclinados con APD e incubadas a 30 °C durante 3 días. Posteriormente, los conidios se recuperaron con solución estéril de Tween 20 (0.02% v/v) y emplearon para inocular matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de APD, los cuales se incubaron a 30 °C durante 5 días. Al término de este periodo, los conidios y el micelio fueron cosechados con 10 mL de solución estéril de leche descremada (10% p/v). La suspensión obtenida, con una concentración mínima de 2×10^8 conidios/mL cuantificada en cámara de Neubauer, fue separada en crioviales y almacenada en congelación a -72 °C. Posteriormente, la suspensión fue liofilizada en un equipo FreeZone Plus 4.5 Liter Cascade Benchtop Freeze Dry System (Labconco, Kansas City, Missouri, USA) a -42 °C y 0.189 mBar durante 24–48 h. Los preservados

fueron mantenidos a -4 °C y su viabilidad fue comprobada mediante reactivación en cajas Petri de APD una vez al mes, los preservados fueron mantenidos en el laboratorio hasta su uso (Stefanello *et al.*, 2019).

Pruebas para la producción de enzimas amilasas, dextranasas y lacasas

Lacasas y amilasas

Para evaluar el potencial de los aislados fúngicos en la producción de enzimas lacasas, las cepas fueron sembradas en cajas Petri con agar extracto de malta (AEM) suplementado con 0.03% (v/v) de guayacol como sustrato indicador. Las cajas inoculadas fueron incubadas a 30 °C por 7 días para detectar la presencia de lacasas mediante un cambio en la coloración del medio (Pourkhanali *et al.*, 2021).

Para evaluar la producción de amilasas, las cepas fueron inoculadas en cajas Petri con medio Czapek-Dox y almidón soluble (200 g/L), ajustando el pH a 6.5 y manteniéndolas en incubación por 4 días. Posteriormente, las cajas Petri fueron inundadas con solución de yodo al 1% durante 10 min para revelar las zonas claras alrededor del hongo (halo de hidrólisis) (Das *et al.*, 2020).

Dextranasas

Para evaluar el potencial de los aislados fúngicos en la producción de dextranasas, las cepas fueron inoculadas en cajas Petri con medio de detección de dextranasas (DTD) compuesto por (g/L): 5 dextrano (T20), 2 K₂HPO₄, 2 KH₂PO₄, 3 peptona y 3 extracto de levadura, ajustado a un pH inicial de 7.4. Las cajas inoculadas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h. La producción de dextranasas fue evidenciada por la formación de zonas claras de hidrólisis alrededor de las colonias (Zohra *et al.*, 2013).

Resultados y discusión

Aislamiento y caracterización de las cepas fúngicas

A partir de los muestreos se seleccionaron tres aislados fúngicos para su estudio: etiquetados como HB1 y HB2, provenientes de bagazo de caña de azúcar, y HH1, aislado de hojas de caña de azúcar (Fig.1). El aislado HB1 se caracterizó por un micelio blanco con conidios verde limón, forma filamentosa, margen filiforme, elevación plana, superficie granular y la producción de un exudado y un pigmento amarillo en el medio. Por su parte, HB2 presentó un micelio incoloro con conidios

negros, forma circular, margen entero, elevación crateriforme, superficie granular y una coloración crema en el medio. Finalmente, el aislado HH1 mostró un micelio blanco con conidios amarillos, forma circular,

margen entero, elevación crateriforme, superficie concéntrica y generó una ligera coloración oscura en el medio de cultivo (Tab. 1).

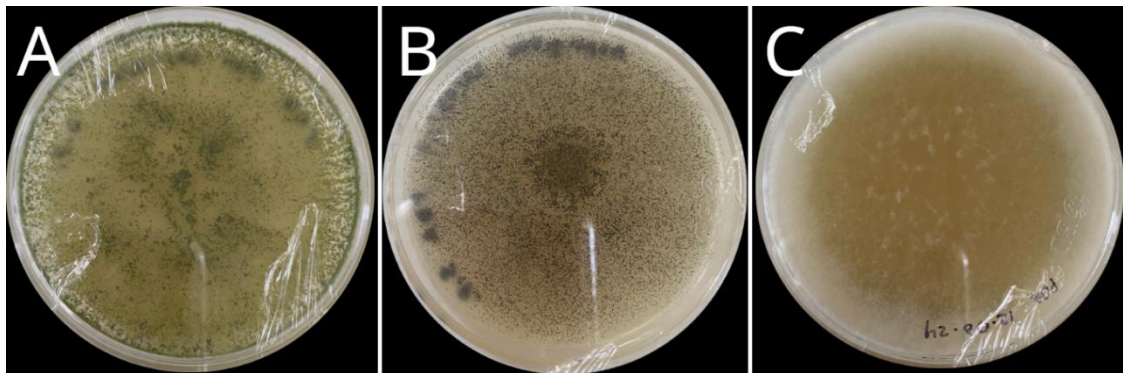


Figura 1. Características macroscópicas de los aislados fúngicos obtenidos de caña de azúcar: A: Hongo de bagazo 1 (HB1), B: Hongo de bagazo 2 (HB2) y C: Hongo de Hojas 1 (HH1). ¿Medio? ¿Condiciones de incubación?

Tabla 1. Características macroscópicas presentes en colonias de aislados fúngicos de caña de azúcar.

Aislado	Color de micelio	Color de conidios	Margen	Forma	Elevación	Superficie	Pigmentos	Secreción
Hongo de Bagazo 1 (HB1)	Blanco	Amarillo	Entero	Circular	Crateriforme	Concéntrica	Sin pigmentos en micelio y un color ligeramente oscuro en el medio.	-
Hongo de Bagazo 2 (HB2)	Incoloro	Negro	Entero	Circular	Crateriforme	Granular	Color crema en el medio	-
Hongo de Hojas 1 (HH1)	Blanco	Verde limón	Filiforme	Filamentosa	Plana	Granular	Amarillo en medio de cultivo	Presencia de exudado

En la caracterización microscópica, los aislados HH1 y HB1 (Fig. 2) mostraron estructuras reproductivas congruentes con las descritas para el género *Trichoderma* (renombrándose como TH y TB respectivamente). Entre ellas destacan conidióforos hialinos, muy ramificados y no verticilados; fiálides solitarias o agrupadas; así como conidios (fiálosporas) hialinos, unicelulares y ovoides, dispuestos en pequeños racimos terminales. Además, estos aislados se distinguen por su rápido crecimiento y la formación de manchas verdes de conidios, características que corresponden a especies saprófitas comunes en suelos y en biomasa lignocelulolítica (Barnett y Hunter, 1972).

Por su parte, el aislado HB2 presentó estructuras típicas del género *Aspergillus* (renombrándose como AB), tales como conidióforos erguidos, simples, terminados en una vesícula globosa o clavada, con fiálides dispuestas en el ápice o distribuidas radialmente. Los conidios observados fueron unicelulares, globosos y dispuestos en cadenas basipétalas secas, con tonalidades oscuras en masa. La disposición circundante de los conidios en la vesícula sugiere afinidad con el subgénero *Circumdati*, mientras que la coloración negra de los conidios indica una posible pertenencia a la sección *Nigri* (Barnett y Hunter, 1972; Mohamed *et al.*, 2021).

Artículos



Figura 2. Características microscópicas de los aislados fúngicos obtenidos de caña de azúcar. A: *Trichoderma* de Hoja (TH), B: *Trichoderma* de Bagazo (TB), C: *Aspergillus* de Bagazo (AB).

Estos resultados coinciden con lo reportado por Mendoza-Infante *et al.*, 2021, quienes encontraron especies de los géneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Trichoderma* en aislados de paja de caña de azúcar. Así mismo, *Trichoderma* es un género de hongos filamentosos ubicuo, que cuenta con un sinnúmero de especies de naturaleza saprofita, por lo que es común encontrarlo en biomasa lignocelulósica (Asad, 2022), como lo son las hojas, tallos y bagazo de caña de azúcar. Por otra parte, Gebbie *et al.* en 2020 2021, realizaron un estudio para la identificación de la microbiota presente en una pila de bagazo de caña, encontrando hasta 10

especies distintas del género *Aspergillus* y 9 especies del género *Penicillium*.

Ensayo para la producción de enzimas amilasas, dextranasas y lacasas

En la tabla 2, se presentan los resultados obtenidos de los tres aislados fúngicos para los distintos grupos enzimáticos mencionados anteriormente. Cabe destacar que los tres aislados mostraron potencial para la producción de amilasas, sin embargo, ningún aislado presentó producción de lacasas. También se resalta que el aislado TB únicamente presentó potencial para la producción amilasas.

Tabla 2. Resultados de las pruebas cualitativas para determinar la capacidad de producción de enzimas en caja Petri.

Aislado	Grupo enzimático		
	Amilasas	Dextranasas	Lacasas
<i>Aspergillus</i> de Bagazo (AB)	+	+	-
<i>Trichoderma</i> de Hoja (TH)	+	+	-
<i>Trichoderma</i> de Bagazo (TB)	+	-	-

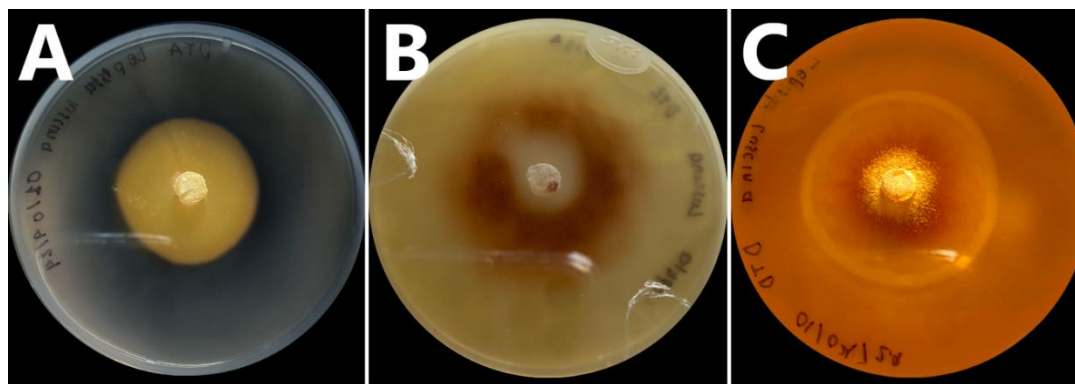


Figura 3. Resultados representativos en pruebas cualitativas A: Amilasas, B: Lacasas, C: Dextranasas.

La capacidad de especies del género *Trichoderma* para la producción de distintos grupos enzimáticos ha sido ampliamente reportada, sin embargo la mayoría de los estudios se han enfocado en celulasas (Legodi *et al.*, 2023, Castrillo *et al.*, 2021 y Guruk y Karaaslan, 2020). Además se ha reportado que especies como *T. harzianum* y *T. virens* tienen capacidad para la producción de xilanasas (Dhaver *et al.*, 2022; Istiqomah *et al.*, 2022). Así mismo existen reportes como el de Gillet *et al.* en 2023, que emplearon una cepa de *T. stromaticum* para producir amilasas en un sistema de fermentación en estado sólido.

Por otra parte, especies del género *Aspergillus* como *A. oryzae*, *A. fumigatus*, *A. niger* y *A. heteromorphus*, han sido reportadas para la producción de amilasas, dextranasas, celulasas y xilanasas (Balakrishnan *et al.*, 2021; Fadel *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2022). Esto estaría en concordancia con los resultados obtenidos para el aislado AB.

Conclusiones

El presente estudio evidencia el potencial de aislados fúngicos nativos de biomasa de caña de azúcar como fuentes de enzimas de interés industrial. En particular, se resalta la capacidad de géneros como *Trichoderma* y *Aspergillus* para producir amilasas y dextranasas que cuentan con aplicaciones biotecnológicas, lo que abre la posibilidad de aprovechar recursos microbianos locales en estrategias sostenibles para la valorización agroindustrial.

Referencias

Afolabi, C. G., Ezekiel, C. N., Ogunbiyi, Abimbola. E., Oluwadairo, O. J., Sulyok, M., y Krska, R. (2020). Fungi and mycotoxins in cowpea (*Vigna unguiculata* L) on Nigerian markets. *Food Additives y Contaminants: Part B*, 13(1), 52–58. <https://doi.org/10.1080/19393210.2019.1690590>.

Arregui, L., Ayala, M., Gómez-Gil, X., Gutiérrez-Soto, G., Hernández-Luna, C. E., Herrera De Los Santos, M., Levin, L., Rojo-Domínguez, A., Romero-Martínez, D., Saparrat, M. C. N., Trujillo-Roldán, M. A., y Valdez-Cruz, N. A. (2019). Laccases: Structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microbial Cell Factories*,

18(1), 200. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1248-0>

Asad, S. A. (2022). Mechanisms of action and biocontrol potential of *Trichoderma* against fungal plant diseases—A review. *Ecological Complexity*, 49, 100978. <https://doi.org/10.1016/j.ecocom.2021.100978>

Balakrishnan, M., Jeevarathinam, G., Kumar, S., Muniraj, I., y Uthandi, S. (2021). Optimization and scale-up of α -amylase production by *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation of edible oil cakes. *BMC biotechnology*, 21(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12896-021-00686-7>

Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1972). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (3rd ed.). Burgess Publishing Company.

Castrillo, M. L., Bich, G. Á., Amerio, N. S., Rodríguez, M. D., Zapata, P. D., y Villalba, L. L. (2021). Assessment of cellulase complex secretory capacity of *Trichoderma* strains and morphological and molecular identification of the isolate with the highest enzymatic secretion capacity: Cellulase complex secretory capacity of *Trichoderma* strains. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 10(5), e1357–e1357. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.1357>

Chmelová, D., Legerská, B., Kunstová, J., Ondrejovič, M., y Miertuš, S. (2022). The production of laccases by white-rot fungi under solid-state fermentation conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(2), 21. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03207-y>

Da Silva, D. S., Dantzger, M., Assis, M. A., Gallardo, J. C. M., Teixeira, G. S., Missawa, S. K., Domingues, R. R., Carazzolle, M. F., Lunardi, I., Leme, A. F. P., Pereira, G. A. G., y Parreiras, L. S. (2019). Lignocellulolytic characterization and comparative secretome analysis of a *Trichoderma erinaceum* strain isolated from decaying sugarcane straw. *Fungal Biology*, 123(4), 330–340. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.01.007>

Das, S., Samanta, P., y Uday, U. S. P. (2020). Isolation and characterization of amylase

producing fungal strain. *Journal of Environmental and Sociobiology*, 17(2), 1–7.

Debnath, R., y Saha, T. (2020). An insight into the production strategies and applications of the ligninolytic enzyme laccase from bacteria and fungi. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 26, 101645. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101645>

Dhaver, P., Pletschke, B., Sithole, B., y Govinden, R. (2022). Isolation, screening, preliminary optimisation and characterisation of thermostable xylanase production under submerged fermentation by fungi in Durban, South Africa. *Mycology*, 13(4), 271–292. <https://doi.org/10.1080/21501203.2022.2079745>

Dhaver, P., Pletschke, B., Sithole, B., y Govinden, R. (2022b). Isolation, screening, preliminary optimisation and characterisation of thermostable xylanase production under submerged fermentation by fungi in Durban, South Africa. *Mycology*, 13(4), 271–292. <https://doi.org/10.1080/21501203.2022.2079745>

Fadel, M., Motawe, F. H., y Roshdy, A. M. (2020). Production of dextranase by *Aspergillus fumigatus* NRC-F103 and its application in cane juice treatment and enhancing ethanol production from sugarcane molasses. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, 19(3), 283–290. https://doi.org/10.4103/epj.epj_16_20

Farooq, M. A., Ali, S., Hassan, A., Tahir, H. M., Mumtaz, S., y Mumtaz, S. (2021). Biosynthesis and industrial applications of α -amylase: A review. *Archives of Microbiology*, 203(4), 1281–1292. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02128-y>

Gebbie, L., Dam, T. T., Ainscough, R., Palfreyman, R., Cao, L., Harrison, M., O'Hara, I., y Speight, R. (2020). A snapshot of microbial diversity and function in an undisturbed sugarcane bagasse pile. *BMC Biotechnology*, 20(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s12896-020-00609-y>

Gillet, S. A., Silva, M. N., Carvalho, E. A., Da Silva, E. G. P., Dos Santos Moreau, P., Uetanabaro, A. P. T., y Da Costa, A. M. (2023). Utilization of Peach-palm waste for

cost-effective amylase production by *Trichoderma stromaticum*: Stability and industrial potential. *Mycology*, 1–12. <https://doi.org/10.1080/21501203.2023.2276728>

Guruk, M., y Karaaslan, M. (2020). Production and Biochemical Characterization of Cellulase Enzyme by *Trichoderma* Strains from Harran Plain. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 3(3), 258–274. <https://doi.org/10.38001/ijlsb.756818>

Hasan, S., Anwar, Z., Khalid, W., Afzal, F., Zafar, M., Ali, U., Refai, M. Y., Afifi, M., AL-Farga, A., y Aljobair, M. O. (2023). Laccase Production from Local Biomass Using Solid State Fermentation. *Fermentation*, 9(2), 179. <https://doi.org/10.3390/fermentation9020179>

Hu, X., Xia, B., Ru, W., Zhang, Y., Yang, J., y Zhang, H. (2023). Research progress on structure and catalytic mechanism of dextranase. *eFood*, 4(1), e60. <https://doi.org/10.1002/efd2.60>

Ire, F. S., Chima, I. J., y Ezebuoro, V. (2021). Enhanced xylanase production from UV-mutated *Aspergillus niger* grown on corn cob and sawdust. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 31, 101869. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101869>

ISTIQOMAH, L., CAHYANTO, M. N., y ZUPRIZAL, Z. (2022a). Xylanase production by *Trichoderma virens* MLT2J2 under solid-state fermentation using corn cob as a substrate. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23(12). <https://smujo.id/biodiv/article/view/12602>

Juntarachot, N., Kantachote, D., Peerajan, S., Sirilun, S., y Chaiyasut, C. (2020). Optimization of Fungal Dextranase Production and Its Antibiofilm Activity, Encapsulation and Stability in Toothpaste. *Molecules*, 25(20), 4784. <https://doi.org/10.3390/molecules25204784>

Lacerda, L. T., Gusmão, L. F. P., y Rodrigues, A. (2018). Diversity of endophytic fungi in *Eucalyptus microcorys* assessed by complementary isolation methods. *Mycological Progress*, 17(6), 719–727. <https://doi.org/10.1007/s11557-018-1385-6>

Legodi, L. M., La Grange, D. C., y van Rensburg, E. L. J. (2023). Production of the Cellulase Enzyme System by Locally Isolated *Trichoderma* and *Aspergillus* Species Cultivated on Banana Pseudostem during Solid-State Fermentation. *Fermentation*, 9(5), 412.

Leite, P., Sousa, D., Fernandes, H., Ferreira, M., Costa, A. R., Filipe, D., Gonçalves, M., Peres, H., Belo, I., y Salgado, J. M. (2021). Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 27, 100407. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2020.100407>

Liu, X., y Kokare, C. (2023). Microbial enzymes of use in industry. En *Biotechnology of Microbial Enzymes* (pp. 405–444). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19059-9.00021-9>

Martínez-Salgado, S. J., Andrade-Hoyos, P., Romero-Arenas, O., Villa-Ruano, N., Landeta-Cortés, G., y Rivera-Tapia, J. A. (2021). Control in vitro de *Fusarium* sp. Asociado al cultivo de cebolla mediante *Trichoderma harzianum*. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 39(2). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2101-4>

Mendoza-Infante, N., Debernardi, H., Hidalgo-Contreras, J., Mugica-Álvarez, V., y Hernández-Martínez, R. (2021). Fungal microbiota of sugarcane straw and their ability to produce hydrolytic enzymes. *Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia*, 39(1), e223908. [https://doi.org/10.47280/RevFacAgron\(LUZ\).v39.n1.08](https://doi.org/10.47280/RevFacAgron(LUZ).v39.n1.08)

Mohamed, A. H., Balbool, B. A., y Abdel-Azeem, A. M. (2021). *Aspergillus* from Different Habitats and Their Industrial Applications. En A. M. Abdel-Azeem, A. N. Yadav, N. Yadav, y Z. Usmani (Eds.), *Industrially Important Fungi for Sustainable Development* (pp. 85–106). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-67561-5_3

Nargotra, P., Sharma, V., Lee, Y.-C., Tsai, Y.-H., Liu, Y.-C., Shieh, C.-J., Tsai, M.-L., Dong,

C.-D., y Kuo, C.-H. (2022). Microbial Lignocellulolytic Enzymes for the Effective Valorization of Lignocellulosic Biomass: A Review. *Catalysts*, 13(1), 83. <https://doi.org/10.3390/catal13010083>

Pourkhanali, K., Khayati, G., Mizani, F., y Raouf, F. (2021). Isolation, identification and optimization of enhanced production of laccase from *Galactomyces geotrichum* under solid-state fermentation. *Preparative Biochemistry y Biotechnology*, 51(7), 659–668. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1848867>

Santos, G. B., de Sousa Francisco Filho, Á., da Silva Rodrigues, J. R., y de Souza, R. R. (2022). Cellulase production by *Aspergillus niger* using urban lignocellulosic waste as substrate: Evaluation of different cultivation strategies. *Journal of Environmental Management*, 305, 114431.

Savín-Molina, J., Hernández-Montiel, L. G., Ceiro-Catasú, W., Ávila-Quezada, G. D., Palacios-Espinosa, A., Ruiz-Espinoza, F. H., y Romero-Bastidas, M. (2021). Morphological characterization and biocontrol potential of *Trichoderma* species isolated from semi-arid soils. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 39(3). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2106-7>

Singh, A., Bajar, S., Devi, A., y Pant, D. (2021). An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. *Bioresource Technology Reports*, 14, 100652. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100652>

Singh, D., y Gupta, N. (2020). Microbial Laccase: A robust enzyme and its industrial applications. *Biología*, 75(8), 1183–1193. <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00414-9>

Stefanello, R. F., Nabeshima, E. H., Iamanaka, B. T., Ludwig, A., Fries, L. L. M., Bernardi, A. O., y Copetti, M. V. (2019). Survival and stability of *Lactobacillus fermentum* and *Wickerhamomyces anomalus* strains upon lyophilisation with different cryoprotectant agents. *Food Research International*, 115, 90–94. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.044>

Tanoue Batista, M. C., Soccol, C. R., Spier, M. R., Libardi Junior, N., y Porto De Souza Vandenberghe, L. (2021). Potential application of dextranase produced by *Penicillium aculeatum* in solid-state fermentation from brewer's spent grain in sugarcane process factories. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 35, 102086. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102086>

Umar, A. (2021). Screening and evaluation of laccase produced by different *Trichoderma* species along with their phylogenetic relationship. *Archives of Microbiology*, 203(7), 4319–4327.

Vieira, E. F., y Delerue-Matos, C. (2020). Exploitation of *Saccharomyces cerevisiae* Enzymes in Food Processing and Preparation of Nutraceuticals and Pharmaceuticals.

En N. K. Arora, J. Mishra, y V. Mishra (Eds.), *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries* (Vol. 11, pp. 41–62). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5_2

Wang, F., Xu, L., Zhao, L., Ding, Z., Ma, H., y Terry, N. (2019). Fungal Laccase Production from Lignocellulosic Agricultural Wastes by Solid-State Fermentation: A Review. *Microorganisms*, 7(12), 665. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120665>

Zohra, R. R., Aman, A., Zohra, R. R., Ansari, A., Ghani, M., y Qader, S. A. U. (2013). Dextranase: Hyper production of dextran degrading enzyme from newly isolated strain of *Bacillus licheniformis*. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 2149–2153. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.044>

ÍNDICE DE CONCILIACIÓN NORMALIZADO PARA LA DETERMINACIÓN DEL NÚMERO ÓPTIMO DE *CLUSTERS* EN UN CONJUNTO DE BIORREACTORES CON CONTROLADORES PROPORCIONALES-INTEGRALES

Laura Elimelet Ángeles-Sánchez¹, Óscar Núñez-Gaona², Gilberto Reynoso-Meza³ y Jesús Carrillo-Ahumada^{4*}

¹Maestría en Biotecnología, Universidad del Papaloapan, Tuxtepec, 68301. ²Centro de Investigaciones Científicas, Universidad del Papaloapan, Tuxtepec, 68301. ³Programa de Posgrado en Ingeniería de Producción y Sistemas (PPGEPS), Pontificia Universidad Católica de Paraná, Brasil, 80215-901. ⁴Ingeniería en Alimentos, Universidad del Papaloapan, Tuxtepec, 68301. *jesuscarrillo18@yahoo.com

Resumen

Los biorreactores son sistemas esenciales en bioingeniería, empleados para la producción controlada de biomoléculas, cultivos celulares y fermentaciones complejas. Debido a su dinámica no lineal, requieren estrategias de control avanzadas que garanticen estabilidad y robustez operativa. Los análisis de *clusters* se han utilizado para caracterizar el desempeño de algoritmos de control; no obstante, la determinación del número óptimo de *clusters* sigue siendo un reto metodológico, pues distintos índices ofrecen resultados divergentes y dependen de la preselección arbitraria del número de *clusters* (k). Para superar esta limitación, se propuso el Índice de Conciliación Normalizado (ICN), una métrica que integra las puntuaciones normalizadas de cinco índices clásicos (Silhouette, GAP, Calinski-Harabasz, Davies-Bouldin y el codo), complementada con la prueba de Tukey para establecer un límite estadísticamente fundamentado a k . El ICN se validó con el control automático de 200 biorreactores simulados en Matlab®, evaluando estabilidad y robustez promedio obtenidas mediante doce reglas de sintonización de controladores proporcionales-integrales (PI). Con *k-means* se identificaron agrupamientos de reglas con desempeño similares. La prueba de Tukey reveló cinco grupos estadísticamente distintos en ambos conjuntos de datos ($\alpha = 0.05$). En estabilidad, todos los índices coincidieron en tres clusters como número óptimo; en robustez, el índice del codo discrepó, siendo el ICN el criterio decisivo. Los resultados demuestran que el ICN mejora la precisión en la identificación de agrupamientos relevantes, al conciliar múltiples métricas, y fortalece la toma de decisiones en sistemas biotecnológicos donde la selección de k influye directamente en la optimización de estrategias de control.

Palabras Claves: estabilidad, robustez, reglas de sintonización, controlador PI.

Abstract

Bioreactors are essential systems in bioengineering, used for the controlled production of biomolecules, cell cultures, and complex fermentations. Due to their nonlinear dynamics, they require advanced control strategies to ensure stability and operational robustness. Cluster analyses have been employed to characterize the performance of control algorithms; however, determining the optimal number of clusters remains a methodological challenge, as different indices yield divergent results and depend on the arbitrary preselection of the number of clusters (k). To overcome this limitation, the Normalized Conciliation Index (NCI) was proposed, a metric that integrates the normalized scores of five classical indices (Silhouette, GAP, Calinski-Harabasz, Davies-Bouldin, and the elbow method), complemented by Tukey's test to establish a statistically grounded upper bound for k . The NCI was validated using the automatic control of 200 bioreactors simulated in Matlab®, assessing average stability and robustness obtained through twelve tuning rules of proportional-integral (PI) controllers. Using *k-means*, clusters of rules with similar performance were identified. Tukey's test revealed five statistically distinct groups in both datasets ($\alpha = 0.05$). For stability, all indices agreed on three clusters as the optimal number; for robustness, the elbow method diverged, making the NCI the decisive criterion. The results demonstrate that the NCI improves accuracy in identifying relevant cluster structures by reconciling multiple metrics, and strengthens decision-making in biotechnological systems where the selection of k directly influences the optimization of control strategies.

Key Words: stability, robustness, tuning rules, PI controller.

Introducción

Los biorreactores son sistemas diseñados para proporcionar un entorno controlado en el que se desarrollan procesos biológicos como el crecimiento de microorganismos (Arteaga-Miñano & Vásquez-Villalobos, 2012), células o tejidos (Maschke *et al.*, 2024), bajo condiciones óptimas y a diversas escalas industriales (Díaz, 2021). Estos dispositivos constituyen el núcleo de la producción biotecnológica, siendo empleados en la generación de fármacos (Pachauri *et al.*, 2017), alimentos (Barzee *et al.*, 2022) y otros bioproductos de interés comercial (Garg *et al.*, 2023).

En bioingeniería, la teoría de control estudia la simulación y regulación de biorreactores para aproximar su comportamiento a condiciones reales, lo cual mejora la seguridad operativa, la supervisión de calidad y la eficiencia del proceso (Åström & Murray, 2021). Los biorreactores pueden ser regulados mediante controladores PI, cuya eficiencia depende de los valores que adquieran su ganancia proporcional, k_p y ganancia integral, k_i (Ec. 1).

$$C(s) = k_p + \frac{k_i}{s}$$

Ec. 1.

El diseño de controladores PI implica el ajuste o sintonización de sus ganancias, proceso para el cual existen numerosas reglas de sintonización desarrolladas a partir de metodologías heurísticas, analíticas o de optimización. Debido a que cada regla proporciona diferentes valores de ganancias, el rendimiento del controlador PI está condicionado por el método de sintonización elegido (Åström & Murray, 2021). El estudio de conjuntos de reglas de sintonización de controladores PI para comparar sus rendimientos en sistemas específicos está ampliamente documentado en la literatura, siendo el análisis de *clusters* un enfoque reciente, ya que los estudios previos se han centrado en comparaciones aisladas o condiciones limitadas.

Los análisis de *clusters* son una estrategia utilizada para reducir la heterogeneidad aparente de un conjunto de mediciones e identificar de forma visual elementos similares, subdividiéndolos en grupos (Syriopoulou-Delli & Papaefstathiou, 2020). El

análisis incluye la elección del conjunto de datos, la elección de la medida de similitud, la elección del algoritmo de agrupamiento, la evaluación del resultado y el arreglo visual de los *clusters*. La evaluación del resultado obtenido por un determinado procedimiento de agrupamiento otorga validez al *cluster*, ya que la mayoría de los algoritmos de agrupamiento imponen una estructura de agrupamiento al conjunto de datos incluso si estos no poseen una estructura. Por lo tanto, la estructura de agrupamiento es válida si no pudo haber ocurrido por casualidad ni como un artificio del algoritmo de agrupamiento (Frades & Matthiesen, 2010).

La evaluación de los efectos de agrupamiento se puede dividir generalmente en la evaluación de los efectos de agrupamiento externos y la evaluación de los efectos de agrupamiento internos (Wang & Xu, 2019). Una evaluación externa de validez compara la estructura recuperada con una estructura *a priori*, mientras que un examen interno de validez determina si la estructura de agrupamiento es intrínsecamente apropiada para los datos (Halkidi & Vazirgiannis, 2001).

Diversos índices permiten evaluar cuantitativamente el número óptimo de *clusters*. Entre los más utilizados se encuentran el índice de Silhouette (S), GAP (G), Calinski-Harabasz (CH), Davies-Bouldin (DB) y el método del codo (C). El índice S constituye una medida interna de validez que determina el número óptimo de *clusters* mediante la diferencia entre la distancia promedio intra-*cluster* (cohesión) y la distancia mínima inter-*cluster* (separación). Por su parte, el índice CH evalúa la calidad del agrupamiento interno a través de la relación entre la dispersión dentro de los *clusters* y la dispersión entre ellos. El índice DB también corresponde a una evaluación interna, y estima la calidad del agrupamiento mediante la razón entre la suma de las distancias promedio intra-*cluster* y la distancia entre los centroides (Wang & Xu, 2019).

En contraste, el índice GAP representa una evaluación externa de validez, ya que compara la dispersión observada dentro de los *clusters* con la esperada bajo una distribución nula de referencia generada aleatoriamente (Tibshirani *et al.*, 2001). El índice C se basa en el análisis de la inercia,

definida como la suma de las distancias cuadradas entre cada punto de datos y el centroide de su *cluster*; en su representación gráfica, se identifica el punto en el que la tasa de disminución de la inercia se desacelera, formando la característica inflexión conocida como “codo”. El criterio de decisión para los índices S, CH y GAP es la maximización, mientras que para el índice DB es la minimización (Liu *et al.*, 2010).

A pesar de la diversidad de índices disponibles para la evaluación del número óptimo de *clusters*, el proceso aun presenta desafíos metodológicos, ya que dependiendo del índice utilizado se pueden obtener resultados distintos para un mismo conjunto de datos. Dado que el análisis exige definir previamente el número de *clusters*, se suelen explorar valores entre 2 y un número arbitrario (k). Los índices que toman decisiones maximizando su valor como el índice S, CH y GAP tienden a favorecer valores elevados de k , y debido a que el número de *clusters* perfecto es igual al número de elementos evaluados, los incrementos indiscriminados de k pueden comprometer la validez del agrupamiento, generando soluciones subóptimas. Esto evidencia la necesidad de una metodología que integre y pondere las decisiones de cada índice de evaluación, y proponga un límite a k basado en el nivel de confianza estadística mínima (95%).

Materiales y Métodos

Se estableció el ICN como la sumatoria de las puntuaciones normalizadas de cinco índices clásicos que evalúan el número óptimo de *clusters* (Ec. 2)

$$ICN_i = S_i + G_i + CH_i + D_i + C_i$$

Ec. 2.

Donde i es el número de *clusters* evaluados con valores desde 2 hasta k definido por el número de grupos estadísticamente diferentes en la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$), S_i es el valor normalizado del índice S cuando se evalúa el *cluster* i , G_i es el valor normalizado del índice G cuando se evalúa el *cluster* i , CH_i es el valor normalizado del índice

de CH cuando se evalúa el *cluster* i , D_i es el valor normalizado invertido del índice de DB cuando se evalúa el *cluster* i y C_i es el valor normalizado invertido del índice C cuando se evalúa el *cluster* i . El número óptimo de *clusters* (k^*) es aquel valor de i para el cual ICN es máximo (Ec. 3).

$$k^* = \arg \max_i (ICN_i)$$

Ec. 3.

Se empleó la prueba de Tukey HSD (*Honest Significant Difference*) como procedimiento *post-hoc*, debido a que garantiza un control riguroso del error tipo I a nivel global en las comparaciones múltiples de medias. Esta elección asegura mayor robustez metodológica y confiabilidad en la interpretación de los resultados, en contraste con métodos menos conservadores como Fisher LSD (*Least Significant Difference*), que incrementan el riesgo de reportar falsos positivos (Mendenhall, 2014).

Para validar el ICN se utilizaron valores de estabilidad y robustez obtenidos mediante el control automático de 200 biorreactores simulados como sistemas de primer orden con tiempo muerto (FOPTD, por sus siglas en inglés) con doce reglas de sintonización de controladores PI obtenidas mediante una revisión exhaustiva de literatura especializada (Tabla 1).

La generación de los sistemas FOPTD se realizó a partir de la variación numérica de los tres parámetros que definen este tipo de modelo (Ec. 4). La ganancia que representa la magnitud de la respuesta del sistema, se mantuvo constante ($K = 1$). Los valores de la constante del tiempo (T) que reflejan la velocidad de respuesta del proceso, se asignaron a partir del conjunto $\{1, 2, 3, \dots, 10\}$. Mientras que el tiempo muerto (L), correspondiente al desfase entre la aplicación de la entrada y la aparición de la salida en el proceso, se definió del conjunto de valores $\{0.1, 0.2, 0.3, \dots, 2.0\}$.

Esta parametrización permitió obtener una representación amplia y diversa del comportamiento de biorreactores empíricos.

Tabla 1. Reglas de sintonización de controladores PI para sistemas FOPTD.

Método ^a	Regla ^b	k_p^c	k_i o t_i^d
H	ZN	$\frac{0.9T}{L}$	$t_i = \frac{L}{0.3}$
	CC	$\frac{1}{K} \left(0.083 + \frac{0.9T}{L} \right)$	$t_i = T \left[\frac{\frac{3.33L}{T} + 0.31 \left(\frac{L}{T} \right)^2}{1 + 2.22 \left(\frac{L}{T} \right)} \right]$
	SK	$\left(\frac{1}{K} \right) \frac{T}{2L}$	$t_i = \min\{T, 4(L + L)\}$
	AMIGO	$\frac{1}{K} \left[0.15 + 0.35 \frac{T}{L} - \frac{T^2}{(L + T)^2} \right]$	$t_i = 0.35L + \frac{13LT^2}{T^2 + 12LT + 7L^2}$
A	CS	$\frac{1}{K} \frac{T}{T + L}$	$t_i = T$
	AM	$0.3 + 0.38 \left(\frac{T}{L} \right) + 0.007 \left(\frac{T}{L} \right)^2$	$t_i = L \left[0.5 + 0.5 \left(\frac{T}{L} \right) + 0.01 \left(\frac{T}{L} \right)^{1.5} \right]$
	SZ	$\frac{2T + L}{3KL}$	$t_i = \min \left\{ T + \frac{L}{2}, 8L \right\}$
	VN ^e	$K \left[\frac{\tau + \tau_0(2 - \tau_0)}{(\tau + \tau_0)^2} \right]$	$t_i = T \left[\frac{\tau + \tau_0(2 - \tau_0)}{\tau + \tau_0} \right]$
O	SN ^f	$\frac{\left(\frac{T}{L} \right) a \sin(\varphi_m + a) - \cos(\varphi_m + a)}{K}$	$k_i = \frac{a \sin(\varphi_m + a) + \left(\frac{T}{L} \right) a^2 \cos(\varphi_m + a)}{KL}$
	SS ^g	$\frac{a\tau^b + c\tau^d}{K}$	$t_i = (a\tau^2 + b\tau + c)T$
	VP-IETSE ^h	$\frac{\alpha_1}{K} \tau^{\beta_1}$	$t_i = \frac{T}{\alpha_2 + \beta_2 \tau}$
	VP-ITETSE ⁱ	$\frac{\alpha_3}{K} \tau^{\beta_3}$	$t_i = \frac{T}{\alpha_4 + \beta_4 \tau}$

^a H: heurísticos, A: analíticos y O: de optimización.

^b ZN: (Ziegler & Nichols, 1942), CC: (Cohen & Coon, 1953), SK: (Skogestad & Grimholt, 2012), AMIGO: (Hägglund, 2019), CS: (Chen & Seborg, 2002), AM: (Awouda & Mamat, 2010), SZ: (Shamsuzzoha, 2013), VN: (Vilanova *et al.*, 2018), SN: (Sun *et al.*, 2016), SS: (Sánchez *et al.*, 2017), VP-IETSE y VP-ITETSE: (Verma & Padhy, 2018).

^c Para VN, SS, VP-IETSE y VP-ITETSE, $\tau = \frac{L}{T}$.

^d Para todas las reglas, excepto SN, $k_i = \frac{k_p}{t_i}$.

^e $\tau_0 = 0.55e^{0.27\tau} + (-0.53e^{-2.72\tau})$

^f $\tau_1 = \frac{L}{T+L}$. Para $\tau_1 < 0.05$, $\varphi_m = 0.73$ y $a = 0.47$. Para $0.05 \leq \tau_1 < 0.1$, $\varphi_m = 0.8$ y $a = 0.48$. Para $0.1 \leq \tau_1 < 0.3$, $\varphi_m = 0.94$ y $a = 0.5$. Para $\tau_1 \geq 0.3$, $\varphi_m = 1.05$ y $a = 0.52$.

^g Para k_p , $a = 0.233$, $b = 0.4582$, $c = 0.7349$ y $d = -0.9348$. Para t_i , $a = -0.01197$, $b = 0.5683$ y $c = 0.4343$.

^h Para $0.1 \leq \tau \leq 1$, $\alpha_1 = 0.98$, $\beta_1 = -0.892$, $\alpha_2 = 0.69$ y $\beta_2 = -0.155$. Para $1.1 \leq \tau \leq 2$, $\alpha_1 = 1.072$, $\beta_1 = -0.56$, $\alpha_2 = 0.648$ y $\beta_2 = -0.114$.

ⁱ Para $0.1 \leq \tau \leq 1$, $\alpha_3 = 1.279$, $\beta_3 = -0.945$, $\alpha_4 = 0.535$ y $\beta_4 = -0.586$. Para $1.1 \leq \tau \leq 2$, $\alpha_3 = 1.346$, $\beta_3 = -0.675$, $\alpha_4 = 0.552$ y $\beta_4 = -0.438$.

Los parámetros K , T y L son específicos del sistema, ya que dependen de sus propiedades físicas y químicas, de sus dimensiones, de las características operativas del proceso y la salida que se desea controlar (Smith & Corripio, 2007).

$$G(s) = \frac{K}{Ts+1} e^{-Ls}$$

Ec. 4.

Para evaluar la estabilidad se utilizó el criterio de los valores propios de la matriz característica (Ec. 5) donde $eig(T(s))$ representa los polos de la función de transferencia de lazo cerrado. Valores

negativos de a generan sistemas con una mayor capacidad para volver a su estado de equilibrio después de ser perturbado. Para evaluar la robustez se utilizó el cálculo del valor máximo de la norma sigma de la función de sensibilidad, $S(j\omega)$ (Ec. 6). Valores de $\|S(j\omega)\|_{\sigma}^{max} \rightarrow 1$, representan una mayor capacidad del sistema para rechazar perturbaciones y tolerar variaciones en el modelo (Emami-Naeini *et al.*, 2019; Iqbal, 2020; Vilanova & Visioli, 2012).

$$a = \max \left(\operatorname{Re} \left(\operatorname{eig}(T(s)) \right) \right)$$

Ec. 5.

$$\|S(j\omega)\|_{\sigma}^{max}$$

Ec. 6.

El análisis de *clusters* se realizó con el algoritmo *k-means* (Ec. 7) y buscó determinar qué reglas de sintonización producen valores de robustez y estabilidad promedio similares.

$$f = \sum_{i=2}^k \sum_{j=i, j \in G_i} \|x_j - Co_i\|^2$$

Ec. 7.

Donde f es la función objetivo del error cuadrático, i es el número de *cluster*, k es el número de grupos estadísticamente

diferentes (determinado por la prueba de Tukey con $\alpha = 0.05$), N es el número de observaciones, x_j es la coordenada de la observación j , Co_i es la coordenada del *cluster* i y G_i es el grupo de observaciones que pertenecen al *cluster* i . Todos los ensayos se realizaron en Matlab®.

Resultados

Se obtuvieron 200 modelos de biorreactores diferentes como sistemas FOPTD por simulación numérica de sus parámetros (Ec. 4) en Matlab®. Para cada uno de los modelos se calculó la estabilidad (Ec. 5) y robustez (Ec. 6) generadas por doce reglas de sintonización en controladores PI (Tabla 1).

Las pruebas de Tukey sugirieron cinco grupos de reglas estadísticamente diferentes para el conjunto de valores a y el conjunto de valores de $\|S(j\omega)\|_{\sigma}^{max}$ con $\alpha = 0.05$ (Fig. 1). Las reglas se ordenaron por grupos, de forma ascendente desde las reglas que producen sistemas menos estables y robustos, hasta las que producen los mejores niveles de estabilidad y robustez de acuerdo con las métricas utilizadas.

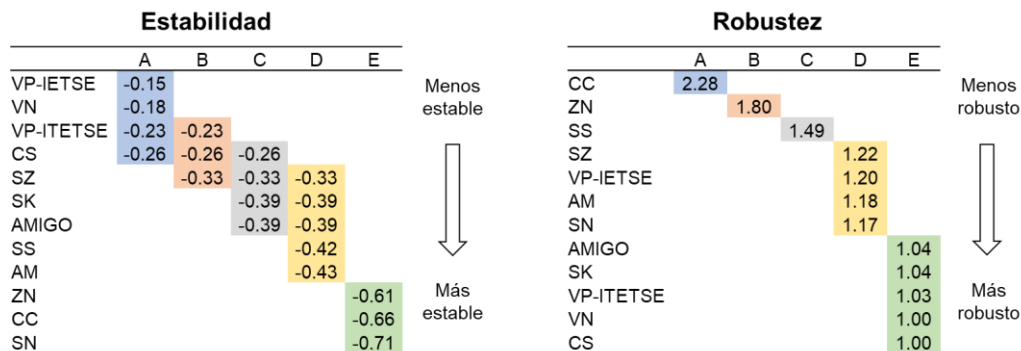


Fig. 1. Grupos de reglas de sintonización PI significativamente diferentes obtenidos con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

De acuerdo con las pruebas de Tukey, las reglas de SN, CC y ZN generaron los sistemas más estables y las reglas de CS, VN, VP-ITETSE, SK y AMIGO generaron los sistemas más robustos. Se observó también que, las reglas de CC y ZN generaron los sistemas menos robustos y las reglas de VP-IETSE, VN, VP-ITETSE y CS generan los sistemas menos estables. Lo anterior sugiere una relación inversamente proporcional entre la estabilidad y la robustez en las reglas mencionadas.

Las pruebas de Tukey permitieron definir $k = 5$ para los análisis de *clusters* en ambos conjuntos de datos (a y $\|S(j\omega)\|_{\sigma}^{max}$). Así, se calcularon $i = \{2, 3, 4, 5\}$ *clusters* con el algoritmo *k-means* (Ec. 7) y se evaluó k^* con los índices S, G, CH, DB, C e ICN. Los valores normalizados de los seis índices se graficaron para facilitar su comparación (Fig. 2). En todos los índices el criterio de elegibilidad fue la maximización de su valor, excepto en el índice C donde el criterio fue el punto de inflexión de la curva.

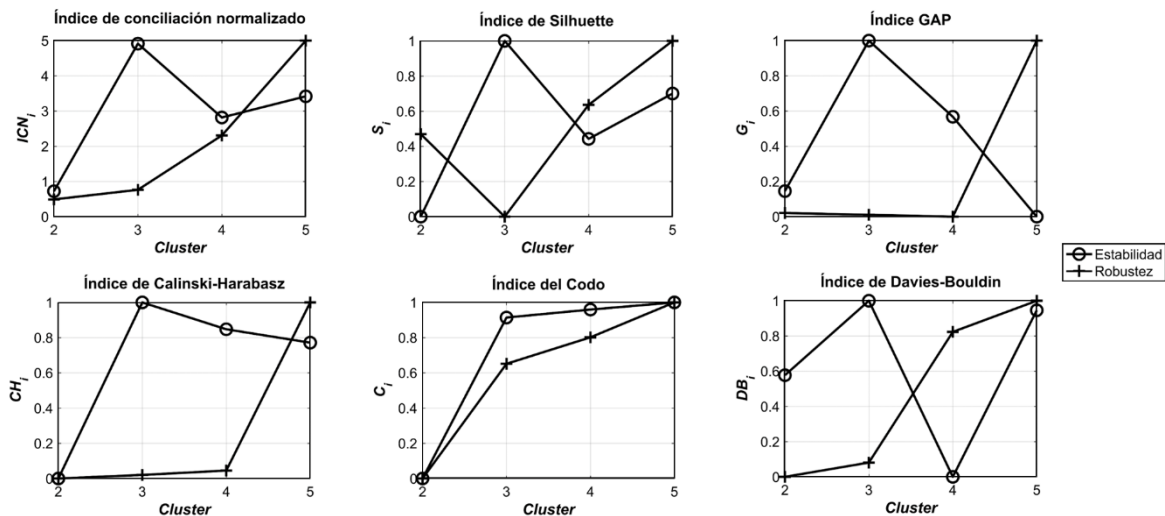


Fig. 2. Evaluación del número óptimo de *clusters* con seis índices para dos conjuntos de datos de biorreactores con controladores PI.

Todos los índices coincidieron que $k^* = 3$ para la estabilidad. En los datos de robustez, todos los índices sugirieron $k^* = 5$, excepto el índice C_i que sugirió un $k^* = 3$, en este caso la decisión final fue tomada con el ICN y se concluyó $k^* = 5$ para la robustez.

La asignación de los elementos a cada *cluster* óptimo de acuerdo con sus valores de α y $\|S(j\omega)\|_{\sigma}^{max}$ fue determinada con el algoritmo *k-means* (Fig 3). Los resultados del análisis de *clusters* y la prueba de Tukey coincidieron para el conjunto de datos de $\|S(j\omega)\|_{\sigma}^{max}$. Las reglas de CS, VN, VP-ITETSE, SK y AMIGO

generaron los sistemas con mejor robustez y conformaron un mismo conglomerado o grupo. Por otro lado, los resultados del análisis de *clusters* y la prueba de Tukey discreparon para el conjunto de datos de α . Mientras la prueba de Tukey generó 5 grupos de reglas estadísticamente diferentes, el análisis de *clusters* generó 3 conglomerados de reglas. Las reglas de sintonización pertenecientes a los grupos B, C y D de la Fig. 1 para α fueron agrupados en el *cluster* 2 de la Fig. 3. No obstante, las conclusiones respecto a las reglas que generaron los sistemas más estables (SN, CC y ZN) fueron consistentes en ambas técnicas.

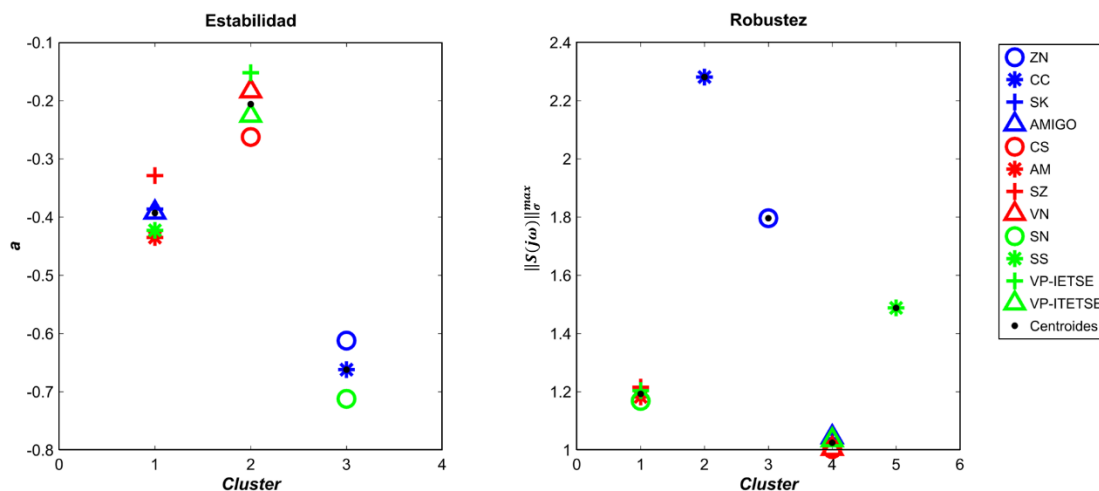


Fig. 3. Agrupamiento de doce reglas de sintonización PI de acuerdo con sus niveles de estabilidad y robustez promedio en 200 biorreactores.

Conclusiones

Se estableció un nuevo índice para determinar el número óptimo de *clusters* construido a partir de la ponderación de los valores normalizados de cinco índices clásicos y complementado con la prueba de Tukey (nivel de confianza 95%) como referencia para establecer el número máximo de *clusters* posibles en un conjunto de datos. El índice propuesto se validó en el contexto del control automático de biorreactores demostrando su aplicabilidad en sistemas complejos y problemas reales de control.

Agradecimientos.

La autora principal (Laura Elimelet Ángeles-Sánchez) agradece a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación de México (SECIHTI) por su apoyo a la investigación y el desarrollo científico a través de las Becas Nacionales para Estudios de Posgrado (2023-2). Número de beca 4005163. El autor de correspondencia (Jesús Carrillo-Ahumada) agradece a la Universidad del Papaloapan por el proyecto interno aprobado, 01-B-05-24-I.

Referencias

Alvarado Castillo, G., & Hernández Escoto, H. (2015). Controlador Convencional vs Control Avanzado de un Biorreactor. *JÓVENES EN LA CIENCIA*, 1(2), Article 2. <https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/427>

Arteaga-Miñano, H., & Vásquez-Villalobos, V. (2012). Control difuso del oxígeno disuelto, pH y temperatura de un biorreactor columna de burbujas en la producción de biomasa de *Candida utilis*. *Scientia Agropecuaria*, 3(2), 139-148. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3986202>

Åström, K. J., & Murray, R. (2021). *Feedback Systems: An Introduction for Scientists and Engineers, Second Edition*. Princeton University Press.

Awouda, A. E. A., & Mamat, R. B. (2010). Refine PID tuning rule using ITAE criteria. *2010 The 2nd International Conference on Computer and Automation Engineering (ICCAE)*, 171-176. 2nd International Conference on Computer and Automation

Engineering (ICCAE 2010). <https://doi.org/10.1109/ICCAE.2010.5451484>

Barzee, T. J., El Mashad, H. M., Cao, L., Chio, A., Pan, Z., & Zhang, R. (2022). Cell-cultivated food production and processing: A review. *Food Bioengineering*, 1(1), 4-25. <https://doi.org/10.1002/fbe2.12009>

Botero, H., Álvarez, H., & Gómez, L. (2013). Estimación de Estado y Control de un Gasificador de Carbón en Lecho Fluidizado Presurizado. *Revista Iberoamericana de Automática e Informática industrial*, 10(3), Article 3. <https://doi.org/10.1016/j.riai.2013.05.003>

Brício Barios, E. E., & Hernández-Escoto, H. (2016). Control de reactores con diversas velocidades de conversión. En *Compendio de Investigaciones Científicas en México*. https://www.researchgate.net/publication/316375461_Control_de_reactores_con_diversas_velocidades_de_conversion

Cao, F. (2020). PID controller optimized by genetic algorithm for direct-drive servo system. *Neural Computing and Applications*, 32(1), 23-30. <https://doi.org/10.1007/s00521-018-3739-z>

Chen, D., & Seborg, D. E. (2002). PI/PID Controller Design Based on Direct Synthesis and Disturbance Rejection. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 41(19), 4807-4822. <https://doi.org/10.1021/ie010756m>

Cohen, G. H., & Coon, G. A. (1953). Theoretical Consideration of Retarded Control. *Journal of Fluids Engineering*, 75(5), 827-834. <https://doi.org/10.1115/1.4015451>

Díaz, M. (2021). *Ingeniería de Bioprocesos* (3.ª ed.). Ediciones Paraninfo, S.A.

Emami-Naeini, A., Ivler, C. M., & Powell, J. D. (2019). Frequency-Response and Frequency-Domain Models. En J. Baillieul & T. Samad (Eds.), *Encyclopedia of Systems and Control* (pp. 1-9). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4471-5102-9_236-2

Frades, I., & Matthiesen, R. (2010). Overview on techniques in cluster analysis. En R. Matthiesen (Ed.), *Bioinformatics Methods in*

Clinical Research (pp. 81-107). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-194-3_5

García-Parrado, J., Regalón Anias, O., Calderón Toledo, E., Paneque Díaz, Y., Pérez González, E., García Parrado, J., Regalón Anias, O., Calderón Toledo, E., Paneque Díaz, Y., & Pérez González, E. (2021). Modernización del sistema de control de un biorreactor de 75 L para el cultivo de bacterias y levaduras. *Ingeniería Electrónica, Automática y Comunicaciones*, 42(3), 93-104. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1815-9282021000300093&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Garg, S., Behera, S., Ruiz, H. A., & Kumar, S. (2023). A Review on Opportunities and Limitations of Membrane Bioreactor Configuration in Biofuel Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195(9), 5497-5540. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-03955-z>

Garikiparthi, P. S. N., Lee, S. C., Liu, H., Kolluri, S. S., Esfahani, I. J., & Yoo, C. K. (2016). Evaluation of multiloop chemical dosage control strategies for total phosphorus removal of enhanced biological nutrient removal process. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 33(1), 14-24. <https://doi.org/10.1007/s11814-015-0132-9>

Hägglund, T. (2019). The one-third rule for PI controller tuning. *Computers & Chemical Engineering*, 127, 25-30. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2019.03.027>

Halkidi, M., & Vazirgiannis, M. (2001). Clustering validity assessment: Finding the optimal partitioning of a data set. *Proceedings 2001 IEEE International Conference on Data Mining*, 187-194. <https://doi.org/10.1109/ICDM.2001.989517>

Iqbal, K. (2020). *Introduction to control systems*. LibreTexts. https://eng.libretexts.org/Bookshelves/Industrial_and_Systems_Engineering/Introduction_to_Control_Systems_%28Iqbal%29

Jeng, J.-C., & Ge, G.-P. (2016). Disturbance-rejection-based tuning of proportional-

integral-derivative controllers by exploiting closed-loop plant data. *ISA Transactions*, 62, 312-324. <https://doi.org/10.1016/j.isatra.2016.02.011>

Liu, Y., Li, Z., Xiong, H., Gao, X., & Wu, J. (2010). Understanding of Internal Clustering Validation Measures. *2010 IEEE International Conference on Data Mining*, 911-916. <https://doi.org/10.1109/ICDM.2010.35>

Lizcano-Pulido, A. K., Morales-Toscano, A. C., Naranjo-Lourido, W., & Martínez-Baquero, J. E. (2021). Centro de Investigación de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas. *Revista Vinculos*, 18(2), Article 2. <https://revistas.udistrital.edu.co/index.php/vinculos/article/view/20193>

López-Pérez, P. A., Neria-González, M. I., & Aguilar-López, R. (2013). Nonlinear controller design with application to a continuous bioreactor. *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*, 47(5), 585-592. <https://doi.org/10.1134/S0040579513050199>

Martínez, G., Flores, D., Silos, G., García, H., Ramírez, M., & Cabrera, A. (2020). Control de velocidad de agitación difuso en un biorreactor. *Miscelanea Científica en México. Tomo IV: Ingeniería.*, 568-574.

Maschke, R. W., Seidel, S., Rossi, L., Eibl, D., & Eibl, R. (2024). Disposable Bioreactors Used in Process Development and Production Processes with Plant Cell and Tissue Cultures. En J. Steingroewer (Ed.), *Plants as Factories for Bioproduction: Recent Developments and Applications* (pp. 119-144). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/10_2024_249

Mendenhall, W. (2014). *Introducción a la Probabilidad y Estadística, 14th Edition* (14th edition). Cengage Learning Editores,.

Nikita, S., & Lee, M. (2019). Control of a wastewater treatment plant using relay auto-tuning. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 36(4), 505-512. <https://doi.org/10.1007/s11814-019-0225-y>

O'Dwyer, A. (2006). *Handbook of PI and PID Controller Tuning Rules*. World Scientific.

- Pachauri, N., Rani, A., & Singh, V. (2017). Bioreactor temperature control using modified fractional order IMC-PID for ethanol production. *Chemical Engineering Research and Design*, 122, 97-112. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2017.03.031>
- Pramod, S., & Chidambaram, M. (2000). Closed loop identification of transfer function model for unstable bioreactors for tuning PID controllers. *Bioprocess Engineering*, 22(2), 185-188. <https://doi.org/10.1007/s004499900077>
- Rojas, J. D., Arrieta, O., & Vilanova, R. (2021). *Industrial PID Controller Tuning: With a Multiobjective Framework Using MATLAB®*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-72311-8>
- Román, R., Farràs, M., Camps, M., Martínez-Monge, I., Comas, P., Martínez-Espelt, M., Lecina, M., Casablanco, A., & Cairó, J. J. (2018). Effect of continuous feeding of CO₂ and pH in cell concentration and product titers in hIFN γ producing HEK293 cells: Induced metabolic shift for concomitant consumption of glucose and lactate. *Journal of Biotechnology*, 287, 68-73. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.10.005>
- Sánchez, H. S., Visioli, A., & Vilanova, R. (2017). Optimal Nash tuning rules for robust PID controllers. *Journal of the Franklin Institute*, 354(10), 3945-3970. <https://doi.org/10.1016/j.jfranklin.2017.03.012>
- Shamsuzzoha, M. (2013). Closed-Loop PI/PID Controller Tuning for Stable and Integrating Process with Time Delay. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52(36), 12973-12992. <https://doi.org/10.1021/ie401808m>
- Sheik, A. G., Tejaswini, E. S. S., Seepana, M. M., & Ambati, S. R. (2022). Evaluation of Effluent Quality and Operating Cost in Biological Wastewater Treatment Plants with Non-ideal Sensors in the Feedback Control. En A. K. Dikshit, B. Narasimhan, B. Kumar, & A. K. Patel (Eds.), *Innovative Trends in Hydrological and Environmental Systems* (pp. 645-661). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-981-19-0304-5_45
- Skogestad, S., & Grimholt, C. (2012). The SIMC method for smooth PID controller tuning. En R. Vilanova & A. Visioli (Eds.), *PID Control in the Third Millennium: Lessons Learned and New Approaches* (pp. 147-175). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4471-2425-2_5
- Smith, C. A., & Corripio, A. B. (2007). *Control automático de procesos* (3.^a ed.). Limusa.
- Sun, L., Li, D., & Lee, K. Y. (2016). Optimal disturbance rejection for PI controller with constraints on relative delay margin. *ISA Transactions*, 63, 103-111. <https://doi.org/10.1016/j.isatra.2016.03.014>
- Syriopoulou- Delli, C. K., & Papaefstathiou, E. (2020). Review of cluster analysis of phenotypic data in Autism Spectrum Disorders: Distinct subtypes or a severity gradient model? *International Journal of Developmental Disabilities*, 66(1), 13-21. <https://doi.org/10.1080/20473869.2018.1542561>
- Tibshirani, R., Walther, G., & Hastie, T. (2001). Estimating the number of clusters in a data set via the gap statistic. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*, 63(2), 411-423. <https://doi.org/10.1111/1467-9868.00293>
- Verma, B., & Padhy, P. K. (2018). Optimal PID controller design with adjustable maximum sensitivity. *IET Control Theory & Applications*, 12(8), 1156-1165. <https://doi.org/10.1049/iet-cta.2017.1078>
- Vilanova, R., Arrieta, O., & Ponsa, P. (2018). Robust PI/PID controllers for load disturbance based on direct synthesis. *ISA Transactions*, 81, 177-196. <https://doi.org/10.1016/j.isatra.2018.07.040>
- Vilanova, R., & Visioli, A. (Eds.). (2012). *PID Control in the Third Millennium: Lessons Learned and New Approaches*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4471-2425-2>
- Wang, X., & Xu, Y. (2019). An improved index for clustering validation based on Silhouette index and Calinski-Harabasz index. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 569(5), 052024. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/569/5/052024>

Artículos

Yadav, E. S., Indiran, T., & Priya, S. S. (2020). Optimal Energy Consumption of the Distillation Process and Its Product Purity Analysis Using Ultraviolet Spectroscopy. *ACS Omega*, 6(2), 1697-1708. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c05731>

Ziegler, J. G., & Nichols, N. B. (1942). Optimum Settings for Automatic Controllers. *Transactions of the American Society of Mechanical Engineers*, 64(8), 759-765. <https://doi.org/10.1115/1.4019264>

Fermentación en Medio Sólido de *Neurospora crassa*: Producción de invertasa

Daira Estrella-Rodríguez¹, Ninel Guardado-Gutiérrez¹, Nancy Velasco-Álvarez¹, Luz Tovar-Castro², Antonio Martínez-Ruiz^{1*}

¹ Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco No.186, Col. Leyes de Reforma 1A sección, Alcaldía Iztapalapa, CP 09310, CDMX, México.

² Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso, Col. Villa Quietud, Alcaldía Coyoacán, CP 04960, CDMX, México.

* Autor de correspondencia: mrja@xanum.uam.mx

Resumen

Neurospora crassa es un hongo filamentoso con gran potencial para aplicaciones biotecnológicas debido a su rápido crecimiento y fácil cultivo. En este estudio, se evaluó la capacidad de producción de la enzima invertasa a partir de este microorganismo, mediante fermentación en medio sólido (FMS) y agrolita como soporte inerte. Se evaluaron factores de crecimiento y producción enzimática relevantes como el contenido de sustrato, niveles de humedad, temperaturas de incubación y nivel de inóculo. La producción de invertasa se incrementó al incrementar la concentración de sustrato, alcanzando una actividad máxima de 10.69 ± 0.01 U/mL, empleando 90 g/L de sacarosa. De igual manera, la actividad enzimática se vio favorecida al emplear 65 % de humedad inicial en la FMS (44.56 ± 1.76 U/mL), una temperatura de 35 °C (46 ± 1.63 U/mL) y un nivel de inóculo de 1×10^8 esporas/mL (41.38 ± 1.00 U/mL). Además, se observó que la concentración de proteína varió en función de estas condiciones, con un máximo de 0.08 ± 0.01 mg/mL a 65 % de humedad inicial. Estos resultados muestran que *N. crassa* es un buen modelo de estudio para el diseño de estrategias que permitan la elección de las condiciones de cultivo en FMS, para mejorar la producción de enzimas industrialmente importantes, como es el caso de la invertasa.

Palabras Claves: *Neurospora crassa*, Fermentación en medio sólido, invertasa, agrolita.

Abstract

Neurospora crassa is a filamentous fungus with great potential for biotechnological applications due to its rapid growth and easy cultivation. In this study, the production capacity of the invertase enzyme from this microorganism was evaluated by solid media fermentation (SMF) with agrolite as an inert support. Relevant growth and enzyme production factors such as substrate content, humidity levels, incubation temperatures, and inoculum level were assessed. Invertase production increased with increasing substrate concentration, reaching a maximum activity of 10.69 ± 0.01 U/mL, using 90 g/L of sucrose. Similarly, enzymatic activity was enhanced by using 65 % initial humidity in the SMF (44.56 ± 1.76 U/mL), a temperature of 35 °C (46 ± 1.63 U/mL), and an inoculum level of 1×10^8 spores/mL (41.38 ± 1.00 U/mL). Furthermore, it was observed that protein concentration varied depending on these conditions, with a maximum of 0.08 ± 0.01 mg/mL at 65 % initial humidity. These results show that *N. crassa* is a good study model for the design of strategies that allow the choice of culture conditions in SMF to improve the production of industrially important enzymes, such as invertase.

Key Words: *Neurospora crassa*, Solid media fermentation, invertase, agrolita

Introducción

Los hongos filamentosos se han utilizado para la producción industrial de muchas enzimas, entre ellas, amilasas, proteasas, lipasas, celulasas, celobiosa e invertasa (Machida 2002; Ray & Behera, 2017; Ohara et al., 2015). Las enzimas se emplean en una variedad de sectores industriales, desde la alimentación, cosméticos y biocombustibles, entre otros (Wikandari et al., 2023). Esta producción puede derivar de procesos como la fermentación en estado sólido (FMS) y la fermentación sumergida (FS). La FMS se define como cualquier proceso de fermentación microbiana llevado a cabo sobre materiales insolubles, en la casi ausencia de líquido que fluya libremente. Dichos materiales sirven como fuente de nutrientes y soporte físico (Rodríguez & Sanromán, 2006). Se considera más apropiado cuando se utilizan hongos, porque los sustratos sólidos se asemejan a su hábitat natural, lo que mejora su crecimiento y secreción de una amplia gama de enzimas extracelulares (Castro et al., 2014). Aunque la FS es más común en los bioprocesos, la FMS está emergiendo como una alternativa atractiva debido a beneficios como una mayor productividad y rendimientos, aprovechamiento de numerosos residuos agroindustriales, menor costo de producción y riesgo de contaminación, menor requerimiento de energía y menores costos de energía para la esterilización, entre otros (Oviedo et al., 2014; Chilakamarry et al., 2022; de Castro et al., 2018).

Neurospora crassa es un hongo filamentoso comúnmente llamado moho del pan, que crece en el entorno natural y en materia vegetal muerta (Saraswathy & Ramalingam, 2011). Se encuentra comúnmente en alimentos ricos en carbohidratos y residuos del procesamiento de la caña de azúcar (Kuo et al., 2014). *Neurospora crassa* tiene un rápido crecimiento a 32 °C, con carbohidratos, nutrientes simples y biotina y sus cultivos vegetativos se reconocen por sus esporas de color naranja (conidios) (Selker, 2017). Se considera que todas estas características le confieren un potencial biotecnológico (Havlik et al., 2017). Diversos estudios han demostrado la producción de distintas enzimas mediante fermentación en medio sólido, utilizando *N. crassa*. Este microorganismo fue capaz de generar altos

rendimientos de celulasa y β -glucosidasa a partir de sustratos sólidos (Macris et al., 1989). En harina de canola extraída con hexano (HECM), exhibió una actividad significativa de β -glucosidasa en FMS (Alhomodi et al., 2022). Así mismo, logró una actividad enzimática de celulasa de 4.72 U/mL cuando se mejoraron los parámetros del proceso de fermentación de *N. crassa* en salvado de trigo (Verma & Kumar, 2020). En el caso de la proteasa, se utilizaron condiciones específicas con okara como sustrato, logrando una actividad significativa tras 72 h de fermentación (Zheng et al., 2020). De igual manera, se reportó la producción de α -amilasa empleando residuos de café y de lipasa con harina de mostaza como sustrato (con una actividad enzimática de 3.88 U/mL) (Murthy et al., 2009; Arooj et al., 2025).

Otra enzima importante es la invertasa (EC 3.2.1.26), la cual ha atraído la atención de diferentes sectores industriales debido a su potencial biotecnológico (Giraldo et al., 2012). Esta enzima cataliza la hidrólisis del enlace β -fructósido en la sacarosa (Toledo et al., 2019) y otros oligosacáridos como la kestosa, rafinosa y la estaquiosa (Andjelkovic & Lah, 2011). Varios estudios han demostrado la producción de invertasa por diferentes microorganismos, especialmente por *Saccharomyces cerevisiae* (Nobre et al., 2016). En el caso de *Aspergillus niger* en FMS, se reportó una productividad de 0.09 U/mL·h utilizando espuma de poliuretano (PUF) como soporte inerte (Romero-Gómez et al., 2000). Por otro lado, con *Aspergillus niger* y melaza de soja como soporte, se reportó una actividad de 0.355 U/mL (Kabir et al., 2025). En contraste, *Emmericella nidulans* mostró una mayor actividad invertasa (28.6 U/mL) (Alves et al., 2013).

Diversos parámetros influyen en la producción de enzimas, incluyendo el tipo de microorganismo, la fuente de carbono, el pH inicial, el contenido de humedad, la temperatura de incubación y el tiempo de fermentación. Debido a su importancia, estas variables han sido evaluadas para mejorar la producción enzimática a partir del hongo *Neurospora Crassa* en FMS, empleando agrolita como soporte inerte (Nobre et al., 2016; Boondaeng et al., 2024).

Materiales y Métodos

Microorganismo y condiciones de cultivo

Se empleó el hongo *Neurospora crassa* FGSC#9717 (Δ mus-51::bar⁺; mat A his-3), el cual fue inoculado en matraces Erlenmeyer (250 mL) que contenían medio Vogels (10X) con sacarosa (1.5 %) como fuente de carbono e inductor para la producción de invertasa y 1.5 % de agar. Los matraces se incubaron a 30 °C por 4 días. Los conidios se recuperaron con 30 mL de Tween 80 estéril al 0.01 % (v/v) y se emplearon 500 mL de la suspensión de conidios para inocular matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio Vogels (1.5 % de sacarosa y 1.5 % de agar). Después de 4 días a 30 °C, se recolectaron los conidios (inóculo) para las FMS.

Fermentación en Medio Sólido (FMS)

Se utilizó agrolita previamente tamizada (tamaño de partícula de 1.19 – 2.38 mm) y lavada con agua del grifo, seguida de un enjuague con agua destilada. Luego, se secó a 60 °C y se empleó como soporte sólido para la FMS. La composición del medio base fue (g/L): sacarosa, 15; Na₃C₆H₅O₇·5H₂O, 30; KH₂PO₄ (anhidro), 50; NH₄NO₃ (anhidro), 20; MgSO₄·7H₂O, 2; CaCl₂·2H₂O, 1. Se adicionó 1 mL de solución de oligoelementos, 0.5 mL de solución de biotina y 1 mL de cloroformo. La agrolita y el medio de cultivo se esterilizaron por separado por 15 min a 121 °C. Se evaluaron concentraciones iniciales de sacarosa de 30-120 g/L.

Se pesaron 10 gramos de agrolita por matraz ErlenMeyer (250 mL) y se humedecieron con 15 ± 1 mL de medio de cultivo inoculado (1x10⁷ esporas/mL) para tener una humedad inicial del 60 %. Se hicieron FMS a 30 °C empleando diferentes concentraciones de sacarosa (30, 45, 60, 90 y 120 g/L). Después, se hizo un estudio en FMS a 30 °C y diferentes contenidos de humedad inicial (55 y 65 %), con 15 g/L de sacarosa. Posteriormente, se evaluó el efecto de la temperatura sobre la producción enzimática a partir de FMS (15 g/L de sacarosa y 60 % humedad inicial) a 25 y 35 °C. Finalmente, se hicieron FMS a 30 °C (30 g/L de sacarosa, 60 % de humedad inicial) con tres tamaños de inóculo (1x10⁶, 1x10⁷ y 1x10⁸ esporas/mL).

Recuperación de la proteína extracelular

La proteína extracelular se recuperó incorporando 100 mL de agua destilada por matraz, los cuales se agitaron en vórtex por 5

min y después su contenido se filtró al vacío (Whatman 41). La concentración de proteína en los extractos crudos se determinó de acuerdo con lo reportado por Mora-Pérez et al. (2024). Los extractos obtenidos se almacenaron a -20 °C para su posterior análisis. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Análisis de actividad enzimática

Las pruebas enzimáticas se realizaron a partir de los extractos proteicos crudos, midiendo la concentración de azúcares reductores (AR), liberados debido a la actividad enzimática. La mezcla de reacción se preparó con 0.180 mL de sacarosa 0.1 M como sustrato para la reacción, después se adicionaron 0.02 mL de extracto de proteína, se incubó a 50 °C (Guerrero-Urrutia et al., 2021) y la reacción se detuvo adicionando 0.3 mL de ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS). Los AR liberados se cuantificaron por el método de Miller (Miller et al., 1960). Una unidad de actividad invertasa (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 µmol de AR por minuto, bajo estas condiciones de ensayo. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Determinación de azúcares totales, pH y humedad

La concentración de azúcares totales se determinó por el método de fenol-sulfúrico (Bradford, 1976). Los valores de pH se midieron mediante potenciometría (PHS-3BW, BANTE Instruments) y el contenido de humedad se cuantificó con termobalanza (MB45, OHAUS). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Resultados y discusión

Efecto de la concentración de sustrato sobre la producción de invertasa en FMS

La producción de invertasa mediante FMS se evaluó utilizando concentraciones iniciales de sacarosa de 30 a 120 g/L, con tiempos de incubación de 72 y 120 h a 30 °C. Se observó un incremento en la producción de proteína (fig. 1) y de invertasa (fig. 2) hasta 3.09 veces al aumentar la concentración de sacarosa de 30 a 90 g/L, alcanzando una actividad máxima de 10.69 ± 0.01 U/mL a 120 h de cultivo. En esta condición, el consumo de sacarosa fue del 96 %, la concentración de proteína fue de 0.0264 ± 0.002 mg/mL y la actividad específica de 405.00 ± 6.15 U/mg. Este

comportamiento coincide con lo reportado por Mora-Pérez et al. (2024), para el mismo microorganismo en FMS. La producción de invertasa a la concentración más baja de sustrato fue 2.66 y 6.66 veces más alta (con PUF y aserrín, respectivamente), en comparación con este estudio. Sin embargo, las actividades específicas fueron en promedio 13.5 veces más bajas, en comparación con este estudio. De igual manera, la actividad enzimática obtenida en este estudio fue superior a la reportada por Li et al. (2018), para *Aspergillus foetidus* (5.5 ± 0.1 U/mL) a las 96 h de fermentación. Por otro lado, Nadeem et al. (2015) reportaron una actividad invertasa de 0.350 U/mL en cultivos con *Streptomyces* sp y 30 g/L de sacarosa inicial. La actividad enzimática obtenida en este estudio fue 3.55 veces más baja en comparación con lo reportado por Guerrero-Urrutia et al. (2021) para *A. brasiliensis* en

FMS, utilizando agrolita como soporte y 120 g/L de sacarosa inicial. Bajo estas condiciones de cultivo, no se presentó represión catabólica por sustrato, evidenciando que es posible emplear concentraciones de sustrato altas, pero sobre todo bajas, para obtener enzimas de interés como la invertasa, y abatir costos de producción. Esta producción está directamente relacionada con varios factores como el microorganismo, las condiciones y el tipo de cultivo, así como la fuente de carbono y los soportes empleados. Estos últimos juegan un papel importante en la producción y rendimiento de estas enzimas, lo cual se vio reflejado en la comparación de los títulos de actividad enzimática, en donde sobresale el PUF, el cual presenta ventajas sobre la agrolita al tener una capacidad de retención de agua alta, lo que puede mejorar la productividad enzimática, sin diluir el producto durante la recuperación del mismo.

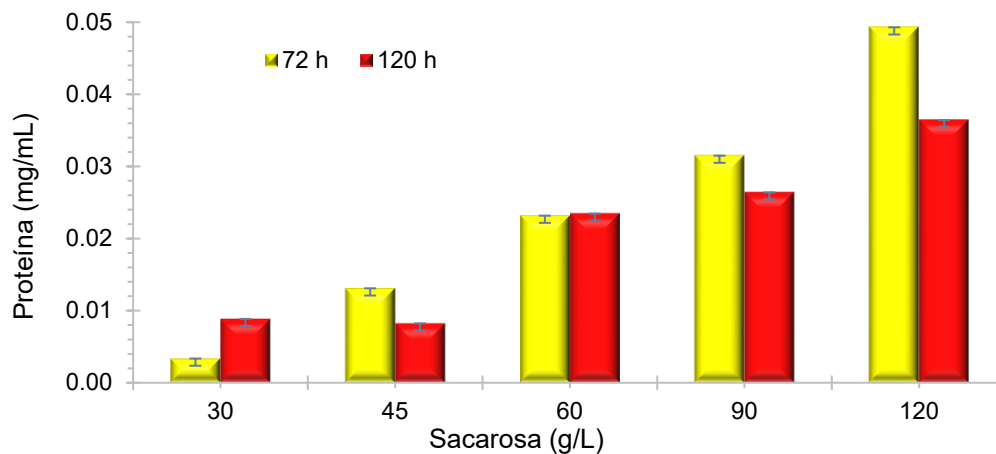


Figura 1. Efecto de la concentración de sacarosa inicial a 72 y 120 h de FMS de *N. crassa*, sobre la producción de proteína extracelular.

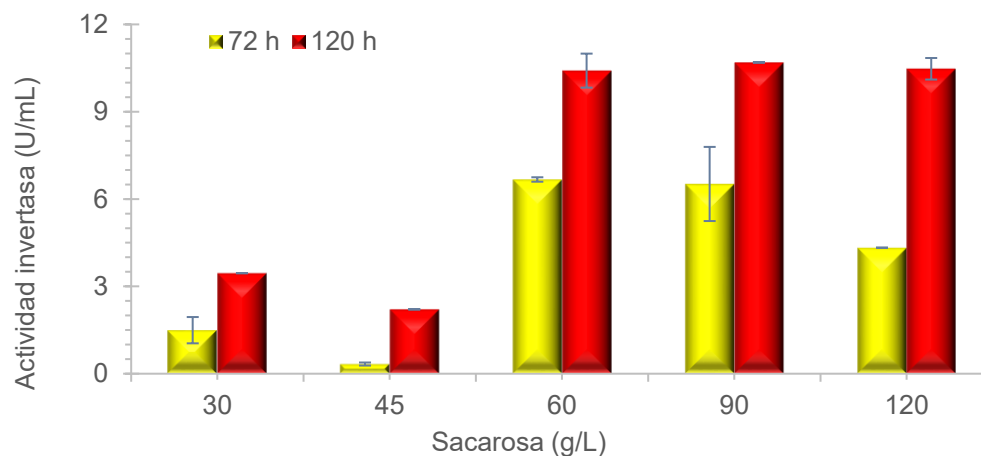


Figura 2. Efecto de la concentración de sacarosa inicial a 72 y 120 h de FMS de *N. crassa*, sobre la actividad invertasa.

Efecto de los diferentes porcentajes de humedad sobre la producción de invertasa en FMS

La humedad es un factor importante a considerar durante los procesos de FMS, para garantizar un buen crecimiento y producción de metabolitos de interés, como las enzimas. De acuerdo con Montiel-González et al. (2004), niveles muy bajos o muy altos podrían obstaculizar esta producción. Se sabe que una mayor disponibilidad de agua en el sustrato favorece la actividad enzimática, debido a una mejor difusión de nutrientes (Cebrián & Ibarruri, 2023). Por tal motivo, se establecieron dos condiciones de humedad: 55 % y 65 %, con 15 g/L de sacarosa, pH 6.5, tamaño de inóculo de 1×10^7 esporas/mL, a 30 °C, condiciones similares a lo reportado por Carrillo-Sancén et al. (2016). Al final de las fermentaciones, la humedad disminuyó en promedio 13.87 %, mientras que el consumo de sustrato fue de 83 y 93 %, respectivamente. La actividad invertasa, así como la concentración de proteína (44.56 ± 1.76 U/mL y 0.08 ± 0.01 mg/mL,

respectivamente) fue 1.3 veces mayor cuando la humedad inicial de la FMS fue del 65 % (fig.3). Mientras que a un menor contenido de humedad inicial, la actividad específica fue 2 veces más alta (1140.72 ± 20.05 U/mg). Guerrero-Urrutia et al (2021) reportaron que el contenido de humedad inicial en la FMS no afectó significativamente el crecimiento y la producción de invertasa a partir de *Aspergillus brasiliensis*. Cuando trabajaron con condiciones similares a 20 g/L de sacarosa y un contenido de humedad inicial del 60 %, la actividad enzimática fue la misma (aproximadamente 8 U/mL), mientras que la actividad específica que encontraron fue 21.16 veces más bajas, en comparación con este estudio. Así mismo, Mora et al. (2024) reportaron una actividad enzimática y actividad específica 3.1 y 7.23 veces más baja, a partir de la FMS de *Neurospora crassa* con PUF como soporte, con respecto a este estudio. Mientras que con aserrín la actividad enzimática fue 1.55 veces más alta y la actividad específica fue 17.36 veces más baja, en comparación con este estudio.

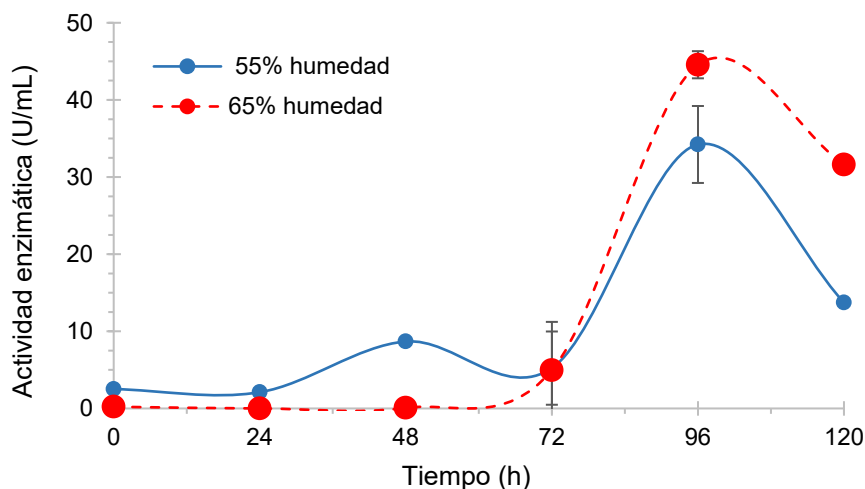


Figura 3. Efecto del porcentaje de humedad inicial (55 y 65%) d la FMS de *N. crassa*, sobre la actividad invertasa.

El contenido de humedad en los procesos de FMS varía entre 20 y 80 %. Particularmente, para hongos filamentosos, la humedad podría alcanzar entre el 20 y 70 % (Guerrero-Urrutia et al., 2021). Si la humedad es demasiado baja, el crecimiento de hongos disminuye debido a la poca solubilidad de nutrientes y si es muy alta se tienen problemas de transferencia de oxígeno (Cebrián & Ibarruri, 2023). Bajo estas condiciones de humedad inicial, *N. crassa* no presentó estos problemas y fue capaz de mejorar la producción de

invertasa. Es importante considerar estudios adicionales y variables como el crecimiento, para tener un mejor entendimiento del efecto del contenido de humedad sobre este, con la finalidad de mejorar los tiempos de cultivo y maximizar la productividad y el rendimiento de esta enzima en FMS a partir de *N. crassa*.

Efecto de la temperatura sobre la producción de invertasa

La temperatura de un proceso enzimático es un compromiso entre la actividad y la

estabilidad enzimática, porque las altas temperaturas maximizan la actividad; mientras, la estabilidad se puede ver desfavorecida por la inactivación térmica (Illanes, 2008). Es un parámetro crítico que debe controlarse, varía según el organismo y determina el éxito del sistema de optimización (Shankar & Mulimani, 2007). En este estudio se evaluó el efecto de la temperatura de cultivo sobre la producción de invertasa de *Neurospora crassa* en FMS a 25 y 35 °C (con 15 g/L de sacarosa inicial). En ambas condiciones, la producción de invertasa aumentó hasta un máximo de 20.75 ± 6.67 U/mL y 46 ± 1.63 U/mL, respectivamente (fig. 4). La actividad específica fue 28.87 veces más alta (770.11 ± 26.67 U/mg) con una temperatura de cultivo de 35 °C. Este comportamiento coincidió con Shankar y Mulimani (2007), quienes reportaron una mayor actividad invertasa a 35 °C, a partir de *Aspergillus niger* y *Lactobacillus reuteri*. La

actividad enzimática en este estudio fue 8.15 veces más alta en comparación con lo reportado por Kabir y Ju (2023), con una temperatura de incubación de 40 °C (3.47 ± 0.32 U/mL), utilizando *A. niger* y residuos de cáscara de soja como sustrato, a las 72 h de cultivo. Así mismo, Mora et al. (2024) reportaron una actividad enzimática y actividad específica 5.66 y 14.43 veces más baja con respecto a este estudio, a partir de la FMS de *N. crassa* y 65 h de cultivo, con PUF como soporte. Es importante mencionar que la temperatura más alta provocó una disminución de la concentración de proteína, a las 96 h de cultivo. Esto pudo deberse a un proceso de proteólisis o a la desnaturalización de las proteínas por la temperatura y el tiempo de cultivo. Por ello, es necesario realizar más estudios que confirmen esto, de tal manera que la producción, la actividad y la estabilidad enzimática no se vean afectadas por cambios debidos a la temperatura del cultivo.

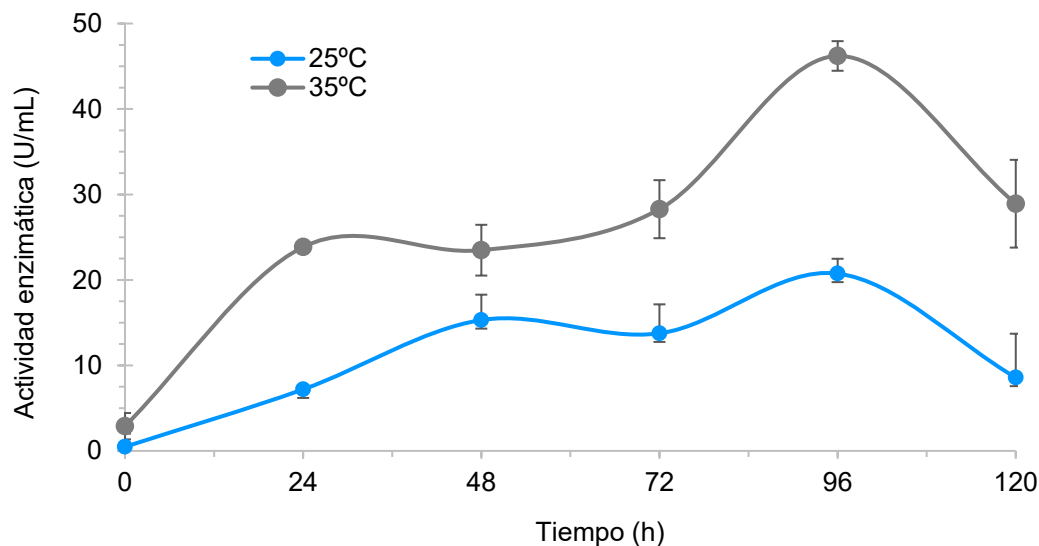


Figura 4. Efecto de la temperatura de la FMS de *N. crassa*, sobre la actividad invertasa.

Efecto del nivel de inóculo sobre la producción de invertasa

El tamaño de inóculo es un factor importante en los procesos microbianos. Niveles inadecuados de este pueden afectar significativamente tanto al crecimiento como a la producción de metabolitos de interés. Por ello, se evaluaron tres tamaños de inóculo: 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 esporas/mL. El nivel de inóculo más grande permitió mantener una actividad promedio de 28.92 U/mL por 72 h y una mayor actividad enzimática al final del

cultivo de 41.38 ± 1.00 U/mL (fig. 5). De igual manera, la actividad específica (1334.80 ± 23.88 U/mg) fue 1.74 y 1.26 veces más alta, en comparación con los niveles de inóculo de 1×10^7 y 1×10^6 esporas/mL, respectivamente (768.18 ± 14.62 y 1060.53 ± 20.82 U/mg, respectivamente). La concentración de proteína fue 1.2 veces más alta (0.07 ± 0.004 mg/mL), pero a las 48 h de cultivo. Estos resultados mostraron un comportamiento similar al reportado para *Aspergillus niger* ATCC20611 en la producción y actividad

inulinasa e invertasa (Dinarvand et al., 2017). De igual manera, se aumentó 5.78 veces la actividad invertasa, en comparación con lo reportado por Mora et al. (2024), empleando

N. crassa en FMS con espuma de poliuretano y 5.95 veces menos de lo reportado empleando *A. niger* LBA 02 a 72 h de cultivo (Ohara et al., 2015).

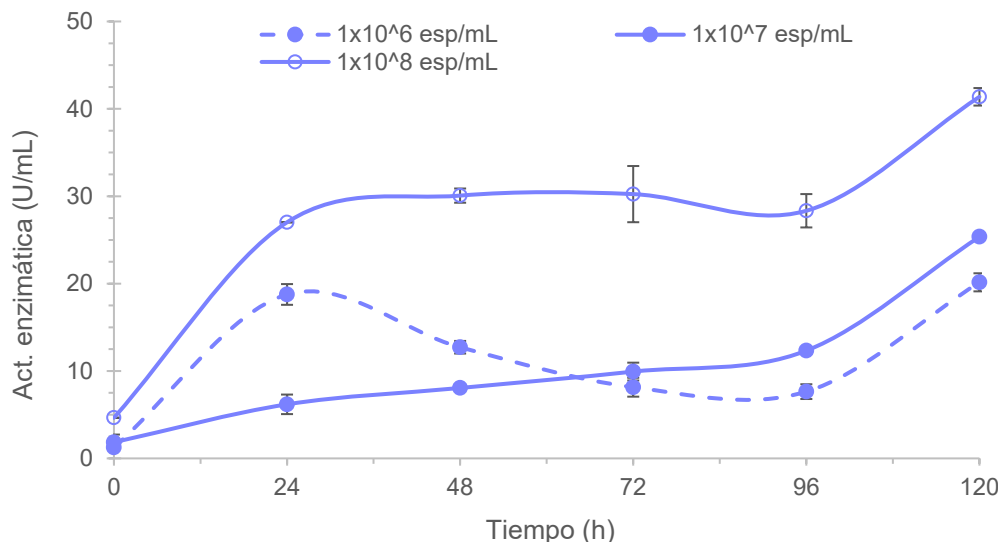


Figura 5. Efecto del nivel de inóculo (1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 esp/mL) en la FMS de *N. crassa*, sobre la actividad invertasa.

Conclusiones

Neurospora crassa fue capaz de crecer y producir la enzima invertasa bajo condiciones de FMS, empleando agrolita como soporte natural. La humedad y la temperatura influyeron de manera positiva en la actividad invertasa, mientras que el nivel de inóculo determinó la rapidez y eficiencia del proceso. Además, la disponibilidad del sustrato impactó directamente el rendimiento, mostrando que concentraciones moderadas de éste favorecen la producción y la actividad enzimática, sin generar efectos inhibitorios. Este estudio confirma el potencial de la FMS y de *N. crassa* como un microorganismo prometedor en la biotecnología industrial, abriendo la puerta a futuras investigaciones para optimizar y escalar el proceso, así como evaluar su aplicación en distintos sustratos agroindustriales. Es crucial continuar desarrollando estrategias más eficientes para la producción de enzimas, con el objetivo de fortalecer su uso en la industria biotecnológica y mejorar los procesos productivos.

Referencias

Alhomodi AF, Gibbons WR, Karki B (2022) Estimation of cellulase production by *Aureobasidium pullulans*, *Neurospora crassa*, and *Trichoderma reesei* during solid and

submerged state fermentation of raw and processed canola meal. Bioresource Technology Reports 18: 101063. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101063>

Alves JN, Jorge, JA, Guimarães LHS (2013) Production of Invertases by Anamorphic (*Aspergillus nidulans*) and Teleomorphic (*Emmericella nidulans*) Fungi under Submerged Fermentation Using Rye Flour as Carbon Source. Advances in Microbiology 3(5): 421-429. <https://doi.org/10.4236/aim.2013.35057>

Andjelkovic U, Lah J. (2011) Thermodynamics and structural features of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms in guanidinium-chloride solutions. Journal of agricultural and food chemistry 59(2):727-732. <https://doi.org/10.1021/jf103441p>

Arooj S, Iftikhar T, Mustafa S, Ullah N, Sarwar A, Nelofer R, Rahman S, Aziz T, Alharbi M, Alshammari A, Alasmari A (2023) Correction to: Optimization of critical medium components for lipase production by *Neurospora crassa* in solid state fermentation. Biomass Conversion and Biorefinery 15: 3113. <https://doi.org/10.1007/S13399-023-05178-6>

Boondaeng A, Keabpimai J, Trakunjae C, Vaithanomsat P, Srichola P, Niyomvong N (2024). Producción de celulasa bajo fermentación en estado sólido por *Aspergillus* sp. IN5: Optimización de parámetros y aplicación. *Heliyon* 10(5): e26601. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e26601>

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 72(1-2): 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Carrillo-Sancén G, Carrasco-Navarro U, Tomasini-Campocoso A, Corzo G, Pedraza-Escalona MM, Favela-Torres E (2016) Effect of glucose as carbon repressor on the extracellular proteome of *Aspergillus niger* during amylase production by solid-state culture. *Process Biochemistry*, 51(12): 2001-2010 <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.09.001>

Castro RJS, Nishide TG, Sato HH (2014) Production and biochemical properties of proteases secreted by *Aspergillus niger* under solid-state fermentation in response to different agroindustrial substrates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3(4): 236–245. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.06.001>

Cebrián M & Ibarruri J (2023) Filamentous fungi processing by solid-state fermentation. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Filamentous Fungi Biorefinery* 251-292. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91872-5.00003-X>

Chilakamaray CR, Sakinah AMM, Zularisam A W, Sirohi R, Khilji IA, Ahmad N, Pandey A (2022) Advances in solid-state fermentation for bioconversion of agricultural wastes to value-added products: Opportunities and challenges. *Bioresource Technology*, 343: 126065. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126065>

de Castro AM, dos Santos AF, Kachrimanidou V, Koutinas AA, Freire D MG (2018) Solid-State Fermentation for the Production of

Proteases and Amylases and Their Application in Nutrient Medium Production. En *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 185-210). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00010-4>

Dinarvand M, Rezaee M, Foroughi M (2017) Optimizing culture conditions for production of intra and extracellular inulinase and invertase from *Aspergillus niger* ATCC 20611 by response surface methodology (RSM). *Brazilian Journal of Microbiology* 48(3): 427-441. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.026>

Giraldo, M. A., Silva, T. M., Salvato, F., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., & Guimarães, L. H. S. (2012). Thermostable invertases from *Paecylomyces variotii* produced under submerged and solid-state fermentation using agroindustrial residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(2), 463–472. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0837-9>

Guerrero-Urrutia C, Volke-Sepulveda T, Figueroa-Martinez F, Favela-Torres E (2021) Solid-state fermentation enhances inulinase and invertase production by *Aspergillus brasiliensis*. *Process Biochemistry* 108: 169-175. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.06.014>

Havlik D, Brandt U, Bohle K, Fleiner A (2017) Establishment of *Neurospora crassa* as a host for heterologous protein production using a human antibody fragment as a model product. *Microbial Cell Factories* 16(128). <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0734-5>

Illanes A (2008) *Enzyme biocatalysis: Principles and applications*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8361-7>

Toledo LE, García DM, Cruz EP, Intriago LM, Pérez JN, Chanfrau JM (2019). Fructosyltransferases and invertases: useful enzymes in the food and feed industries. *Enzymes in food biotechnology* 1:451-69. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00026-8>

Kabir MF & Ju LK (2023) On optimization of enzymatic processes: Temperature effects on activity and long-term deactivation kinetics. *Process Biochemistry* 130: 734–746.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.05.031>

Kabir MF, Bochenek C, Wesdemiotis C, Ju LK (2025) Reaction pathways and integral kinetics for the hydrolysis of soy oligosaccharides by α -galactosidase and invertase. *Process Biochemistry* 150: 357–370.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2025.01.021>

Kuo H, Hui S, Choi J, Asiegbu FO, Valkonen JPT, Lee YH (2014). Secret lifestyles of *Neurospora crassa*. *Scientific Reports*, 4(51359).

<https://doi.org/10.1038/srep05135>

Li Q, Loman AA, Callow NV, Islam SMM, Ju LK (2018) Leveraging pH profiles to direct enzyme production (cellulase, xylanase, polygalacturonase, pectinase, α -galactosidase, and invertase) by *Aspergillus foetidus*. *Biochemical Engineering Journal*, 137: 247–254.

<https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.06.008>

Machida M (2002) Progress of *Aspergillus oryzae* genomics. *Advances in Applied Microbiology*, 51: 81-106.

[https://doi.org/10.1016/S0065-164\(02\)51002-9](https://doi.org/10.1016/S0065-164(02)51002-9)

Macris BJ, Kekos D, Evangelidou X (1989) A simple and inexpensive method for cellulase and β -glucosidase production by *Neurospora crassa*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 31(2): 150–151.

<https://doi.org/10.1007/BF00262453>

Miller GL, Blum R, Glennon WE, Burton AL (1960) Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Analytical Biochemistry* 1(2): 127-132.

[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(60\)90004-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(60)90004-X)

Montiel-González AM, Viniegra-González G, Fernández FJ, Loera O (2004) Efecto de la actividad del agua en la producción de invertasa en fermentación en estado sólido mediante cepas diploides mejoradas de *Aspergillus niger*. *Bioquímica de procesos* 39: 2085-2090,

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.10.013>

Mora-Pérez CJ, Sánchez-Ruiz MC, Salgado-Bautista D, Carrasco-Navarro U, Favela-Torres E (2024) Growth and invertase production by *Neurospora crassa* in submerged and solid-state cultures. *Mexican Journal of Biotechnology* 9(3): 20-35.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2024.9.3.20>

Murthy PS, Naidu MM, Srinivas P (2009) Production of α -amylase under solid-state fermentation utilizing coffee waste. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 84(8): 1246–1249.

<https://doi.org/10.1002/JCTB.2142>

Nadeem H, Hamid M, Hussnain M, Azeem F, Muzammil S, Rizwan M, Amjad M, Rasul I, Riaz M (2015) Microbial invertases: a review on kinetics, thermodynamics, physiochemical properties. *Process Biochemistry* 50(8): 1202–1210,

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.04.015>.

Nobre C, Castro C, Hantson A-L, Teixeira J, De Weireld G, Rodrigues L (2016) Strategies for the production of high-content fructo-oligosaccharides through the removal of small saccharides by co-culture or successive fermentation with yeast. *Carbohydrate polymers*.136:274-281.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.088>

Ohara A, De Castro RJS, Nishide TG, Dias FFG, Bagagli MP, Sato HH (2015) Invertase production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation: Focus on physical–chemical parameters, synergistic and antagonistic effects using agro-industrial wastes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 4(4): 645-652.

<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.06.008>

Oviedo JC, Casas AE, Valencia JA, Zapata JE (2014) Analysis of Biomass Measurement in Solid-State Fermentation using Neural Networks and a Logistic Model. *Información tecnológica*, 25(4).

<https://doi.org/10.4067/S0718-07642014000400016>

Artículos

Ray RC & Behera SS (2017) Solid state fermentation for production of microbial cellulases. En R. C. Ray & Rosell (Eds.) *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications* (pp. 43–79). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00003-0>

Rodríguez CS & Sanromán MÁ (2006) Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *Journal of Food Engineering*, 76(3): 291–302. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022>

Romero-Gómez S, Augur C, Viniegra-González G (2000) Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnology Letters* 22: 1255–1258, <https://doi.org/10.1023/A:1005659217932>

Saraswathy N & Ramalingam P (2011) Genomas de organismos modelo. En *Conceptos y Técnicas en Genómica y Proteómica* (pp. 29–48). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781908818058.29>

Selker EU (2017) *Neurospora crassa*. En *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (pp. 61–63). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.06790-X>

Shankar SK & Mulimani VH (2007) Alpha galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*; 98: 958–961. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.03.013>

Verma N & Kumar V (2020) Impact of process parameters and plant polysaccharide hydrolysates on cellulase production by *Trichoderma reesei* and *Neurospora crassa* under wheat bran-based solid-state fermentation. *Bioresource Technology Reports*, 25, e00416. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00416>

Wikandari R, Manikhanda Dewanti-Hariyadi R, Taherzadeh MJ (2023) Filamentous fungi for food. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Filamentous Fungi Biorefinery* (pp. 343–397). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91872-5.00007-7>

Zheng L, Yu X, Wei Ch, Qiu L, Yu Ch, Xing Q, Fan Y, Deng Z (2020) Production and characterization of a novel alkaline protease from a newly isolated *Neurospora crassa* through solid-state fermentation. *LWT* 122: 108990. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.108990>

Efecto de los ciclos luz-oscuridad con modulación sinusoidal sobre el cultivo de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM

Yareni López¹, Jair Lorenzo¹, Miriam Montalvo¹, Luis Sánchez¹, León Sánchez², Juan Cabello^{3*}

¹ Estudiante de la Licenciatura en Ingeniería Química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco 186, Iztapalapa, C.P. 09310, Ciudad de México.

² Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa, Av. Vasco de Quiroga 4871, Cuajimalpa de Morelos, C.P. 05384, Ciudad de México.

^{3*} Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco 186, Iztapalapa, 09310, Ciudad de México.

Correo electrónico: jjcr@xanum.uam.mx

Resumen

Este trabajo presenta la implementación de un dispositivo diseñado a partir de una tarjeta ESP32 programada en Arduino para controlar un sistema de iluminación LED aplicado en el cultivo de la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM, en un fotobiorreactor air-lift de 5 L. El dispositivo permitió simular ciclos sinusoidales de luz-oscuridad (L-O), en el orden de horas hasta segundos, en condiciones de laboratorio, reproduciendo dinámicas similares a las que se exponen de manera natural en sistemas a la intemperie. Se evaluó el efecto de un ciclo sinusoidal de L-O (12:12 h) sobre la producción de oxígeno y la productividad de biomasa, considerando una intensidad máxima de $365 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, así como el efecto de cambios en escalón de la intensidad de luz sobre la tasa aparente de producción de oxígeno. Esta estrategia permitió determinar en el orden de minutos las tasas de producción de oxígeno de un cultivo microalgal aclimatado a un ciclo sinusoidal de L-O, obteniendo un valor máximo de $52 \text{ mgO}_2 \text{ g}_b^{-1} \text{ h}^{-1}$ a $365 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y a una concentración de biomasa de 0.5 g L^{-1} , en comparación con el obtenido en iluminación continua ($93.8 \text{ mgO}_2 \text{ g}_b^{-1} \text{ h}^{-1}$), se muestra la importancia de considerar el efecto de aclimatación respecto a las condiciones de iluminación. Debido a la complejidad de evaluar la actividad fotosintética de la microalga en ciclos externos, este estudio constituye una alternativa importante para generar información que facilite el desarrollo de modelos matemáticos orientados al diseño y escalamiento de fotobiorreactores que operan a la intemperie.

Palabras Claves: Fotobiorreactor, sinusoidal, luz-oscuridad, *Scenedesmus*

Abstract

This work presents the implementation of a device based on an ESP32 board programmed with Arduino to control an LED lighting system applied to the cultivation of the microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM, in a 5 L air-lift photobioreactor. The device enabled the simulation of sinusoidal light-dark (L-D) cycles, ranging from hours to seconds, like those naturally occurring in outdoor photobioreactor systems. The effect of a sinusoidal L-D cycle (12:12 h) on oxygen production and biomass productivity was evaluated, considering a maximum light intensity of $365 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, as well as the effect of step changes in light intensity on the apparent oxygen production rate. This strategy allowed the determination, within minutes, of oxygen production rates in a microalgal culture acclimated to a sinusoidal L-D cycle, reaching a maximum value of $52 \text{ mgO}_2 \text{ g}_b^{-1} \text{ h}^{-1}$ at $365 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a biomass concentration of 0.5 g L^{-1} . In comparison with continuous illumination ($93.8 \text{ mgO}_2 \text{ g}_b^{-1} \text{ h}^{-1}$), the results highlight the importance of considering acclimation effects under different lighting conditions. Due to the complexity of evaluating the photosynthetic activity of microalgae under external cycles, this study offers an important alternative for generating data that supports the development of mathematical models aimed at designing and scaling up outdoor-operating photobioreactors.

Key Words: Photobioreactor, sinusoidal, light-dark, *Scenedesmus*

Introducción

En la actualidad, las microalgas han adquirido relevancia por su capacidad de aprovechar la energía solar mediante fotosíntesis para producir biomasa, utilizada como materia prima en la obtención de lípidos, pigmentos y diversos productos de valor agregado (Saccardo et al., 2025). Además, las microalgas poseen la capacidad de fijar CO₂ durante su crecimiento, lo que contribuye a la reducción de gases de efecto invernadero, así como la eliminación de contaminantes de aguas residuales (Saccardo et al., 2025).

A lo largo del tiempo, se han desarrollado dos principales sistemas para el cultivo de microalgas: los sistemas abiertos, como los estanques tipo circuito y los sistemas cerrados o fotobiorreactores, los cuales permiten un mayor control sobre las condiciones de cultivo (Terry, 1986). Estos últimos representan una opción viable para la producción a gran escala, al contrarrestar los principales problemas asociados al control de variables en los sistemas abiertos. Sin embargo, la elección del tipo de sistema depende de la aplicación y el producto que se desea obtener. Los fotobiorreactores (FBR) están diseñados para favorecer el crecimiento microalgal bajo condiciones controladas de luz, temperatura, pH y mezclado (Kwon et al., 2012). Existe una amplia variedad de diseños y configuraciones, entre los que destacan los sistemas tubulares, de placa plana y las columnas de burbujeo, debido a su alta productividad de biomasa y actividad fotosintética. No obstante, es importante considerar que los sistemas cerrados implican un elevado costo de inversión y mantenimiento.

Optimizar el rendimiento en fotobiorreactores, requiere comprender y evaluar el efecto de variables como la temperatura, el pH, la intensidad de luz, los ciclos luz-oscuridad (L-O) y las condiciones de mezclado. En cultivos a condiciones externas uno de los factores más importante es la exposición de la microalga a ciclos naturales de L-O, que influyen en su eficiencia fotosintética (Kwon et al., 2012). No obstante, resulta complejo evaluar la actividad fotosintética en estos ciclos, aunque este tipo de estudios es esencial para generar información que favorezca el diseño y escalamiento de fotobiorreactores.

Los estudios realizados por Fernández et al. (2018) presentan un sistema de iluminación que simula las condiciones de ciclo L-O

mediante un sistema de LED y fuente de luz controlado por un trazador de curvas programable (TG4001), para evaluar el efecto de luz intermitente sobre la respuesta fotosintética. En el cultivo de *Scenedemus obliquus* realizado por Bertuccio et al. (2014) se trabajó con un fotobiorreactor a escala laboratorio simulando los ciclos L-O bajo irradiación estacional mediante una lámpara LED sintonizable, mostrando los efectos sobre el crecimiento y productividad de biomasa en las diferentes estaciones del año. Para el estudio de cinéticas de crecimiento, Jacobi et al. (2012) desarrollaron un sistema de iluminación de LED avanzado, instalado con dos carcasas alrededor de un biorreactor de tanque agitado. Estos estudios indican que simular los ciclos L-O en condiciones controladas de laboratorio es una estrategia clave para obtener información que permita un mejor diseño y escalamiento de fotobiorreactores que operan a la intemperie. Es importante señalar que, para evaluar los cambios en la intensidad de luz, se requieren experimentaciones de corta duración que eviten efectos asociados al crecimiento de biomasa. En este sentido, experimentos dinámicos de cambios en escalón, pulso y oscilaciones han adquirido relevancia por su amplia aplicabilidad, ya que permiten obtener información del cultivo de manera más rápida en comparación con los métodos tradicionales, los cuáles requieren varios días de evaluación (Spadiut et al., 2013).

El objetivo de este trabajo fue evaluar experimentos dinámicos para estimar la tasa aparente de producción de oxígeno de la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM aclimatada a una exposición sinusoidal de iluminación mediante un sistema generador de funciones que simula ciclos L-O 12-12 h.

Materiales y Métodos

Inóculo

Se realizó el mantenimiento de la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM (Sánchez, 2013) en un reactor de vidrio de 1 L con agitación magnética, sistema de aireación mediante un difusor de aire e iluminación continua a 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 1). Posteriormente, el cultivo se propagó en un fotobiorreactor tipo columna de burbujeo (air-lift) con una concentración inicial de biomasa de 0.01 g L⁻¹ empleando medio mineral BG-11 (Tabla 1)



Figura 1. Sistema para la propagación de la microalga; reactor de vidrio de 1 L con difusor de aire, parrilla de calentamiento y bomba de aire.

Tabla 1. Composición del medio BG11

Medio de cultivo BG-11	
Compuesto	Concentración (g L ⁻¹)
NaNO ₃	1.5
K ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O	0.04
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0.075
EDTA disódico de magnesio	0.01
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0.036
C ₆ H ₈ O ₇	0.006
Citrato de amonio férrico	0.006
Na ₂ CO ₃	0.02
Metales traza A5+Co	1 mL
Metales traza A5+Co	
Compuesto	Masa (g)
H ₃ BO ₃	2.86
MnCl ₂ • 4H ₂ O	1.81
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0.222
NaMoO ₄ • 2 H ₂ O	0.39
CuSO ₄ • 5H ₂ O	0.079
Co(NO ₃) ₂ • 6H ₂ O	0.0494
Agua destilada	1.0 L
H ₃ BO ₃	2.86

Fotobiorreactor air-lift instrumentado

Se operó en modo lote un fotobiorreactor air-lift instrumentado construido en material de acrílico con dimensiones de 104 cm de altura, 0.3 cm de espesor, 8 cm de diámetro externo y volumen de 5 L (Figura 2). Se encuentra dividido principalmente en tres secciones: anular para la captación de fotones, concéntrica con separación de 1.2 cm de la anular y la zona de desgasificación que permite la liberación de oxígeno. En la parte inferior se suministró de forma continua aire mezclado con CO₂ para generar una distribución homogénea de la fase gaseosa para el crecimiento de la microalga. El pH se midió con un sensor electroquímico (Cole Palmer) y la concentración de oxígeno disuelto mediante un sensor polarográfico (Vernier Go Direct). Las señales de cada uno de los sensores se obtuvieron mediante una tarjeta de adquisición de datos (National Instrument) conectada a una computadora mediante el software NI LabVIEW (2009) para el registro de datos. Además, se diseñó y construyó un dispositivo para exponer la superficie del fotobiorreactor a un comportamiento sinusoidal de iluminación de L-O, que simula de manera periódica un ciclo natural 12-12 h. Para ello, se empleó una tarjeta ESP32 programada en Arduino mediante una función de tipo seno, generando variaciones hasta una intensidad máxima de 365 μmol m⁻² s⁻¹ para controlar un sistema de iluminación de LED (Figura 2.A). Sin embargo, es importante mencionar que el dispositivo se encuentra diseñado con la capacidad de generar ciclos L-O en el orden de horas hasta segundos, como se representa en la Figura 2.B.

Determinación de biomasa y nitratos

Se utilizó el método de peso seco para conocer la concentración de biomasa cada 24 h. Se filtró una alícuota de 10 ml con una membrana de nylon de 0.4 μm. El filtrado reservado se utilizó para la determinación de nitratos, utilizando una membrana de acetocelulosa de 0.2 μm y medición por espectrofotometría siguiendo el método descrito en Sánchez (2013).

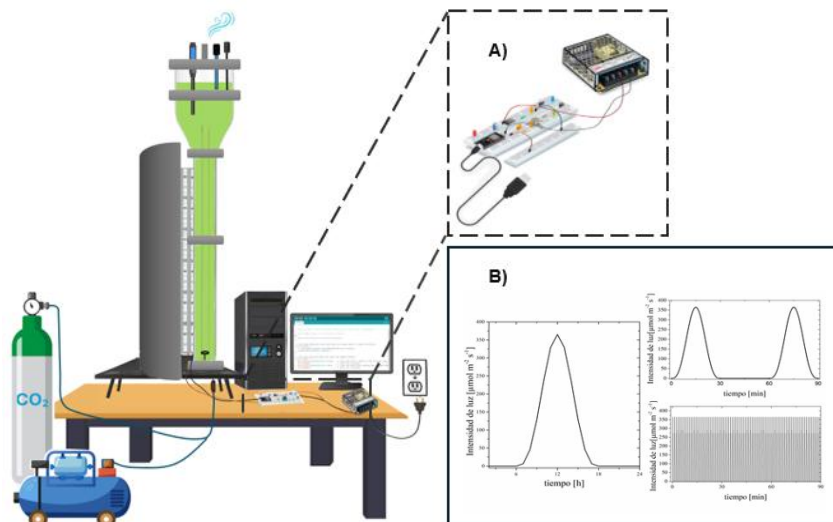


Figura 2. Fotobiorreactor air-lift instrumentado para el cultivo de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM. **A)** Tarjeta ESP32 **B)** Ciclos L-O generadores mediante la función sinusoidal: 12-12 h, 30-30 min, 30-30 s.

Condiciones de operación y experimentos dinámicos

El fotobiorreactor air-lift se operó en modo lote con 4.25 L de medio mineral BG-11, 0.75 L de inóculo de *S. obtusiusculus* y una iluminación sinusoidal con intensidad máxima de $365 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La concentración de CO_2 fue 1 % y se suministró con aire a un flujo de 2 L min^{-1} . Durante el crecimiento de la microalga se realizaron experimentos dinámicos para determinar la evolución de O_2 a diferentes intensidades de luz y en dos concentraciones de biomasa (0.5 y 1.0 g L^{-1}). Los experimentos dinámicos se iniciaron, después de un periodo de 12 horas de oscuridad, con una intensidad de 103, 157, 225, 300 y $365 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para periodos de 35 minutos cada uno. En estas condiciones sinusoidales, las variables respuesta (pH, temperatura y concentración de oxígeno disuelto) alcanzaron estados pseudo-estacionarios y se determinó la tasa de producción de O_2 por unidad de biomasa para cada intensidad de luz (Cabello et al., 2014).

Tasas de producción de oxígeno

A partir de un balance macroscópico de oxígeno en la fase líquida se pueden determinar las tasas de producción de oxígeno para cada cambio escalón mediante la siguiente expresión, como se reporta en Cabello et al. (2014).

$$\frac{d\text{CO}_2}{dt} = -k_L a \left(C_{\text{O}_2} - \frac{P_{\text{O}_2}}{H} \right) + R_{\text{O}_2} \quad (1)$$

Donde C_{O_2} representa la concentración de oxígeno disuelto en la fase líquida (promedio de los últimos 5 minutos, en cada estado pseudo-estacionario), R_{O_2} la tasa aparente de producción de oxígeno para cada intensidad de luz, P_{O_2} la presión parcial de oxígeno en la fase gaseosa, y H el coeficiente de Henry. El coeficiente volumétrico de transferencia de masa ($k_L a$) se estimó previamente dando un valor de 27 h^{-1} , utilizando la correlación propuesta por Akita et al. (1974) para columnas de burbujeo.

Resultados y discusión

La Figura 3 muestra el crecimiento de biomasa y el consumo de nitratos bajo un comportamiento de ciclo L-O, mostrando las fases de crecimiento y adaptación: lag, exponencial y estacionaria. Asimismo, se comparan estos resultados con los obtenidos bajo iluminación continua en las mismas condiciones de operación y el mismo sistema, mostrando que en iluminación continua el crecimiento para una concentración de biomasa de 0.1 a 2.0 g L^{-1} es en 12 días en comparación con el ciclo L-O de 17 días, debido a los periodos de oscuridad (12 h) y el comportamiento sinusoidal generado por la fuente de iluminación. Después de alcanzar una concentración de biomasa de 1 g L^{-1} , en ambos casos, la causa que limita el crecimiento de microalgas es la atenuación de luz debido al traslape entre las células, evitando una distribución homogénea de luz

dentro del fotobiorreactor (Cabello et al., 2014). De esta manera, el crecimiento de la microalga (después de 10 días) expuesta a una iluminación sinusoidal de L-O fue más lento y casi dos veces menor, en comparación

con iluminación continua, debido a los tiempos de exposición de luz de forma sinusoidal, los cuales, en este trabajo, buscan simular y proporcionar información más real del crecimiento de biomasa a la intemperie.

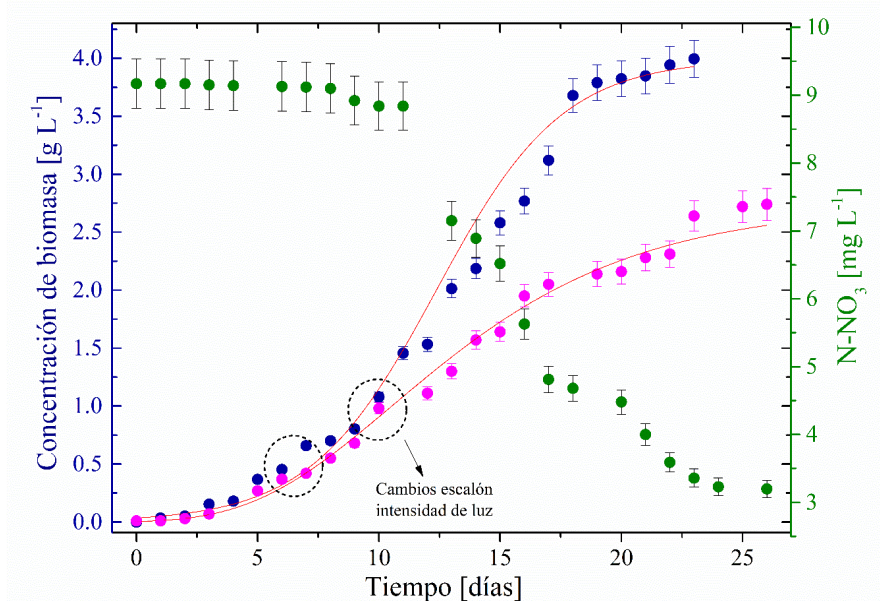


Figura 3. Curvas de crecimiento *S. obtusiusculus* AT-UAM. (●) nitratos y crecimiento de biomasa: (●) ciclo L-O, (●) luz continua

En la Figura 3, el efecto de la iluminación sinusoidal de ciclos L-O sobre la actividad fotosintética no se distingue debido a las distintas escalas de tiempo en que ocurren los mecanismos, químicos (reacciones fotoquímicas), biológicos (fotosistemas, fijación de CO_2 y crecimiento) y físicos (captación de luz, transporte de gases y de nutrientes) que van del orden de segundos, minutos a horas. Por ello, en la Figura 4 (A, B, C) se presenta la evolución temporal del pH, temperatura, y oxígeno disuelto (DO) durante 24 (Figura 4. A, B) y 48 h (Figura 4.C), correspondientes a las tres fases de crecimiento de la microalga (Figura 3), bajo condiciones de iluminación sinusoidal. En la figura 4.A se observan ligeros cambios (temperatura, oxígeno disuelto, pH) que corresponden a un periodo de adaptación de la microalga al sistema experimental. En la Figura 4.B se observan valores con mínimos

y máximos de la concentración de oxígeno disuelto, temperatura y pH, que corresponden a la actividad de fotosíntesis inducida por el sistema de iluminación sinusoidal para un ciclo de 12:12 h. También se observa (Figura 4.B, círculo punteado) un periodo de tiempo donde se realizaron los experimentos de escalón para distintas intensidades de luz, con el objetivo de evaluar en tiempos cortos la tasa de producción de oxígeno para distintas intensidades de luz, como se presenta en Cabello et al., 2014. En la Figura 4.C, el incremento en la temperatura hasta 28°C se asoció principalmente al calor generado por las variaciones en la intensidad de luz. En cuanto al oxígeno disuelto, se observó una disminución hasta 6.0 mg L^{-1} durante el periodo de oscuridad debido a la respiración celular, mientras que en iluminación se presentó un aumento hasta 8.0 mg L^{-1} debido al proceso de fotosíntesis.

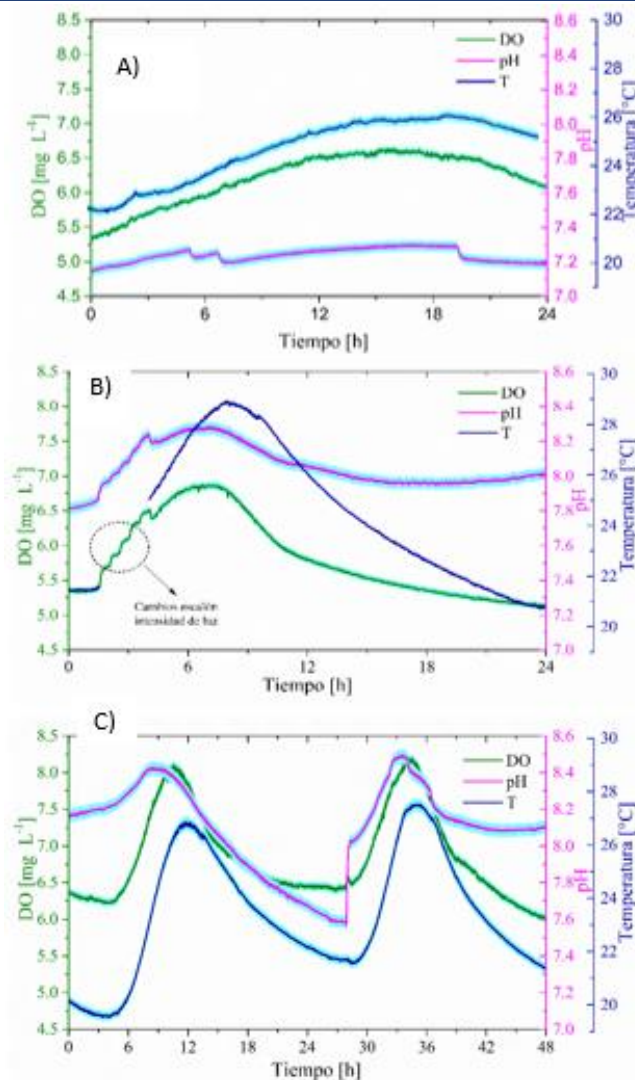


Figura 4. Respuesta de temperatura, pH y oxígeno disuelto (DO) en las distintas fases de crecimiento: **A)** lag **B)** exponencial **C)** estacionaria. Las barras de error con el área de relleno cian indican el error de medición.

La Figura 5 muestra el comportamiento dinámico del oxígeno disuelto (DO) a dos (0.5 y 1.0 g L⁻¹) concentraciones de biomasa y para cada cambio en escalón de la intensidad de luz, de acuerdo con la metodología experimental presentada en este trabajo. Se observa que en ambas concentraciones de biomasa se alcanzan estados pseudo-estacionarios de producción de oxígeno, como resultado de su adaptación a corto plazo en cada intensidad de luz. Con esta información, en la Figura 6 se presentan las tasas de producción de oxígeno en estado pseudo-estacionario, calculadas con la

Ecuación 1, para una concentración de biomasa de 0.5 g L⁻¹, además, se realiza una comparación con los resultados obtenidos bajo luz continua y misma concentración de biomasa en el estudio de Cabello et al. (2014). Los valores ajustaron a una función de tipo exponencial simple, ampliamente utilizada para microorganismos fotosintéticos que se encuentran expuestos a ciclos L-O (Chalker, 1981). Se determinó una constante de saturación (I_k) de $357 \pm 1.21E-4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y una tasa de producción máxima de oxígeno (P_m) de $84.24 \pm 2.75 \text{ mg}_\text{O}_2 \text{ g}_\text{b}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

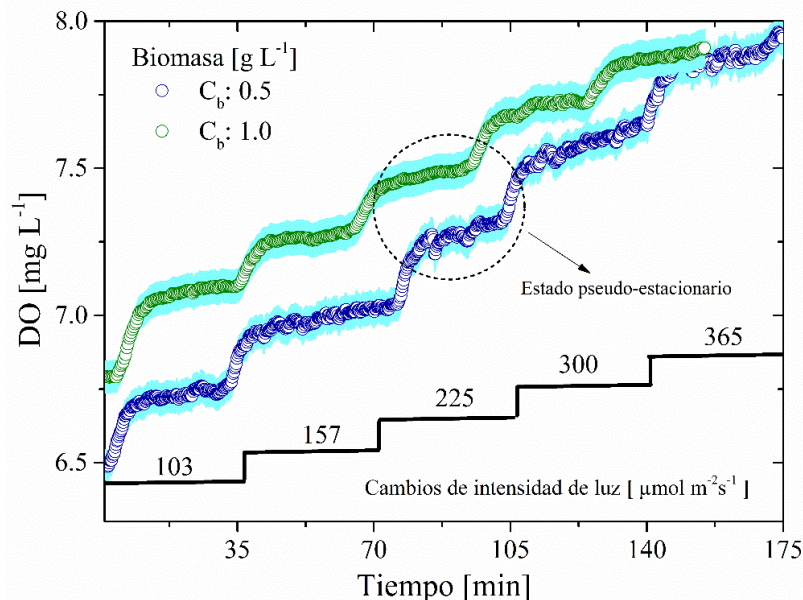


Figura 5. Respuesta dinámica de oxígeno disuelto (DO) de la microalga *S. obtusiusculus* AT-UAM a los cambios en escalón de intensidad de luz, para diferentes concentraciones de biomasa: 0.5 y 1.0 g L⁻¹. Las barras de error con el área de relleno cian indican el error de medición.

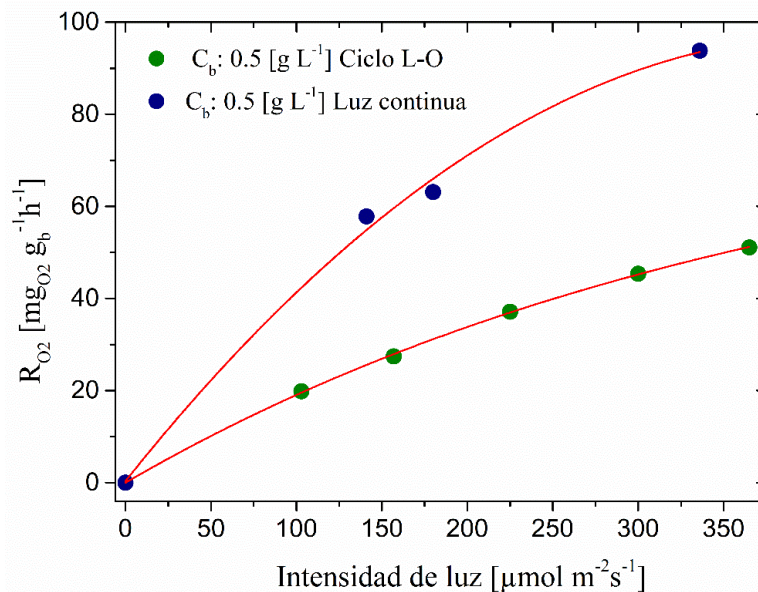


Figura 6. Tasas de producción de oxígeno en estado pseudo-estacionario a diferentes intensidades de luz, para *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM expuesta a ciclos L-O e iluminación continua.

Con base en los resultados, se aprecia lo relevante de considerar el efecto del ciclo L-O sobre la actividad fotosintética de la microalga para la determinación de parámetros cinéticos y globales de crecimiento. En la Tabla 1 se presentan los valores obtenidos de productividad de biomasa y tasas de producción de oxígeno que consideran el efecto de un ciclo L-O 12-12 h, a su vez, se realiza una comparación con lo reportado en

la literatura para diferentes microalgas que fueron cultivadas en condiciones de iluminación continua. Se observa que la productividad de biomasa en condiciones de ciclo L-O es de 0.11 g L⁻¹ día⁻¹ en comparación con las obtenidas en iluminación continua de 0.44, 0.76 y 0.80 g L⁻¹ día⁻¹ reportadas por Chowdary et al. (2022), Cabello et al. (2014) y Fernández et al. (2006), respectivamente, debido a la saturación intermitente de los

fotosistemas, disminución del pH durante la oscuridad y una atenuación de luz más pronunciada que considera 12 horas de oscuridad y durante el periodo de iluminación. En cuanto a las tasas de producción de oxígeno, experimentos dinámicos realizados con esta microalga por Cabello et al. (2014) reportan una tasa de producción de oxígeno de $96.2 \text{ mg}_{\text{O}_2} \text{ g}_{\text{b}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a una concentración de biomasa de 0.5 g L^{-1} y $336 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en comparación con los obtenidos en este trabajo de $52.3 \text{ mg}_{\text{O}_2} \text{ g}_{\text{b}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a 0.5 g L^{-1} y $365 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Estos resultados evidencian que bajo un comportamiento sinusoidal de ciclo L-O, la iluminación intermitente afecta la actividad fotosintética, en consecuencia, la producción de oxígeno se limita a la fase luminosa, reduciendo el valor promedio de la tasa en comparación con luz continua.

Conclusiones

El dispositivo empleado para la iluminación del cultivo logró reproducir de manera adecuada el ciclo externo de L-O, lo que permitió evaluar la actividad fotosintética de la microalga en condiciones internas de laboratorio. Los resultados evidenciaron que la aclimatación de la microalga a un ciclo L-O influye de manera significativa en su crecimiento y productividad de biomasa, en comparación con lo observado bajo iluminación continua. La estrategia dinámica de cambios en escalón en la intensidad de luz permitió determinar en tiempos cortos, las tasas de producción de oxígeno que consideraron el efecto de una aclimatación a un ciclo sinusoidal de L-O. Debido a la complejidad de evaluar la actividad fotosintética de la microalga en ciclos externos, este estudio constituye una alternativa importante para generar información que facilite el desarrollo de modelos matemáticos orientados al diseño y escalamiento de fotobiorreactores que operan a la intemperie.

Agradecimientos

A la Dra. Marcia Morales de la UAM-C por proporcionar la cepa que se utilizó en este trabajo de investigación.

A la coordinación de la Licenciatura en Ingeniería Química de la UAM-Iztapalapa por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

Referencias

- Akita, K., & Yoshida, F. (1974). Bubble size, interfacial area, and liquid-phase mass transfer coefficient in bubble columns. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development*, 13(1), 84-91.
- Bertucco, A., Beraldi, M., & Sforza, E. (2014). Continuous microalgal cultivation in a laboratory-scale photobioreactor under seasonal day–night irradiation: experiments and simulation. *Bioprocess and biosystems engineering*, 37(8), 1535-1542. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1125-5>
- Cabello, J., Morales, M., & Revah, S. (2014). Dynamic photosynthetic response of the microalga *Scenedesmus obtusiusculus* to light intensity perturbations. *Chemical Engineering Journal*, 252, 104-111. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.04.073>
- Chalker, B. E. (1981). Simulating light-saturation curves for photosynthesis and calcification by reef-building corals. *Marine Biology*, 63(2), 135-141. <https://doi.org/10.1007/BF00406821>
- Chowdhary, A. K., Kishi, M., & Toda, T. (2022). Enhanced growth of *Chromocloris zofingiensis* through the transition of nutritional modes. *Algal Research*, 65, 102723. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102723>
- Fernández-Sevilla, J. M., Brindley, C., Jiménez-Ruiz, N., & Acién, F. G. (2018). A simple equation to quantify the effect of frequency of light/dark cycles on the photosynthetic response of microalgae under intermittent light. *Algal research*, 35, 479-487. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.09.026>
- Jacobi, A., Steinweg, C., Sastre, R. R., & Posten, C. (2012). Advanced photobioreactor LED illumination system: scale-down approach to study microalgal growth kinetics. *Engineering in Life Sciences*, 12(6), 621-630. <https://doi.org/10.1002/elsc.201200004>
- Kwon, J. H., Rögner, M., & Rexroth, S. (2012). Direct approach for bioprocess optimization in a continuous flat-bed photobioreactor system. *Journal of biotechnology*, 162(1), 156-162. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.031>

Artículos

López, M. G. M., Sánchez, E. D. R., López, J. C., Fernández, F. A., Sevilla, J. F., Rivas, J., ... & Grima, E. M. (2006). Comparative analysis of the outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* in tubular and bubble column photobioreactors. *Journal of biotechnology*, 123(3), 329-342.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.11.010>

Saccardo, A., Wolf, J., Hankamer, B., & Bezzo, F. (2025). Scaling-up information from high-throughput pulsed light data to predict microalgae growth dynamics in photobioreactors. *Algal Research*, 104073.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2025.104073>

Sánchez García L. (2013). Cultivo a la intemperie de *Scenedesmus obtusiusculus* en un fotobiorreactor solar "air-lift". Tesis Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana. México, CDMX.

Spadiut, O., Rittmann, S., Dietzsch, C., & Herwig, C. (2013). Dynamic process conditions in bioprocess development. *Engineering in Life Sciences*, 13(1), 88-101.
<https://doi.org/10.1002/elsc.201200026>

Terry, K. L. (1986). Photosynthesis in modulated light: quantitative dependence of photosynthetic enhancement on flashing rate. *Biotechnology and Bioengineering*, 28(7), 988-995.
<https://doi.org/10.1002/bit.260280709>

Producción de invertasa por *Neurospora crassa* en fermentación en estado sólido con aserrín de pino como soporte natural

Ninel Guardado-Gutiérrez¹, Daira Estrella-Rodríguez¹, Nancy Velasco-Alvarez¹, Luz Tovar-Castro², Antonio Martínez-Ruiz^{1*}

¹ Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco No. 186, Col. Leyes de Reforma 1A sección, Alcaldía Iztapalapa, CP 09310, CDMX, Mexico.

² Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso, Col. Villa Quietud, Alcaldía Coyoacán, CP 04960, CDMX, Mexico.

* Autor de correspondencia: mrja@xanum.uam.mx

Resumen

La fermentación en estado sólido (FES) se ha consolidado como una estrategia biotecnológica sostenible y económicamente viable para la producción de enzimas de alto valor agregado. En este estudio se evaluó la producción de invertasa por *Neurospora crassa*, utilizando aserrín de pino como soporte natural en condiciones de FES. Se analizaron parámetros fisicoquímicos como la concentración de sacarosa como sustrato, el contenido de humedad, la temperatura de incubación, el tamaño de inóculo y la ausencia de sacarosa, sobre la producción de invertasa. *N. crassa* fue capaz de asimilar concentraciones altas de sacarosa (30-120 g/L), con una mayor producción de invertasa (29.59 ± 0.04 U/mL) a 30 g/L. La humedad inicial del cultivo a 65 % y la temperatura de incubación de 35 °C, afectaron de manera positiva la producción de la enzima invertasa (64.03 ± 5.70 U/mL y 168.23 ± 1.05 U/mL, respectivamente). Además, una concentración de inóculo de 1×10^7 conidios/mL permitió tener títulos enzimáticos de 146.14 ± 11.45 U/mL. Por último, *N. crassa* fue capaz de utilizar el aserrín como soporte natural y sustrato para la FES, con una producción enzimática de 142.37 ± 0.11 U/mL, lo que sugiere que la composición química del aserrín proporciona una fuente alternativa de carbono suficiente para sustentar el metabolismo fúngico. Estos hallazgos destacan el potencial de la FES como una plataforma biotecnológica ecológica y económicamente ventajosa para la biosíntesis de enzimas, contribuyendo a la valorización de residuos agroindustriales lignocelulósicos, y a la optimización de los costos de producción en la industria enzimática.

Palabras Claves: Fermentación en estado sólido, *Neurospora crassa*, invertasa, aserrín de pino, sacarosa.

Abstract

Solid state fermentation (SSF) has been consolidated as a sustainable and economically viable biotechnological strategy for the production of high value-added enzymes. In this study, the production of invertase by *Neurospora crassa* was evaluated, using pine sawdust as a natural support under SSF conditions. Physicochemical parameters such as sucrose concentration as substrate, moisture content, incubation temperature, inoculum size and absence of sucrose were analyzed on the production of invertase. *N. crassa* was able to assimilate high sucrose concentrations (30-120 g/L), with higher invertase production (29.59 ± 0.04 U/mL), at 30 g/L. Initial culture humidity at 65 % and incubation temperature of 35 °C positively affected invertase enzyme production (64.03 ± 5.70 and 168.23 ± 1.05 U/mL, respectively). Furthermore, an inoculum concentration of 1×10^7 conidios/mL resulted in enzyme titers of 146.14 ± 11.45 U/mL. Finally, *N. crassa* was able to utilize sawdust as a natural support and substrate for SSF, with an enzyme production of 142.37 ± 0.11 U/mL, suggesting that the chemical composition of sawdust provides an alternative carbon source sufficient to sustain fungal metabolism. These findings highlight the potential of SSF as an environmentally friendly and economically advantageous biotechnological platform for enzyme biosynthesis, contributing to the valorization of lignocellulosic agroindustrial residues and optimizing production costs in the enzyme industry.

Key Words: Solid state fermentation, *Neurospora crassa*, invertase, pine sawdust, saccharose

Introducción

La fermentación en estado sólido (FES) se define como el crecimiento de microorganismos en ausencia de una fase acuosa libre. Este proceso representa una alternativa eficiente a la fermentación en estado líquido (FEL) para la síntesis de productos de alto valor agregado, ya que ofrece algunas ventajas sobre la FEL. Estas ventajas incluyen una menor represión catabólica e inhibición por sustrato (Aguilar et al., 2001; Salgado-Bautista et al., 2020), la cantidad de agua disponible en el sistema, menor proteólisis, mayores rendimientos enzimáticos y productividades volumétricas así como productos más estables y bajos costos de producción (Viniestra-González et al., 2003; Volke-Sepúlveda et al., 2016; Dobrev et al., 2018). Tanto bacterias como hongos pueden desarrollarse en sustratos sólidos, aunque los hongos filamentosos son los microorganismos mejor adaptados a este tipo de cultivo. Estos microorganismos son usados para producir algunas proteínas y enzimas industriales como celulasas, pectinasas, proteasas, lipasas, inulinasa e invertasa, entre otras (Aguilar et al., 2002; Alves et al., 2013; Guerrero-Urrutia et al., 2021; Singh et al., 2021; Kumar et al., 2023; Zheng et al., 2020), así como metabolitos secundarios incluidos la penicilina y la cefalosporina (Fierro et al., 2022). En particular, *Neurospora crassa* es un hongo filamentoso de rápido crecimiento, cuyo micelio puede expandirse a una velocidad de 4 mm/h a temperaturas de 30 a 32 °C, y ha cobrado interés por su capacidad para crecer tanto en FEL como en FES. Se ha reportado la relación de enzimas y genes de *N. crassa* (Beadle & Tatum, 1941), así como su capacidad de producir diversas enzimas hidrolíticas en FES como; amilasas a partir de residuos de café (Murthy et al., 2009), celulasas y hemicelulasas a partir de paja y salvado de trigo (Dogaris et al., 2009), proteasas a partir de pulpa de soja (Volke-Sepúlveda et al., 2016) y lipasas a partir de harina de mostaza (Arooj et al., 2023). Alhomodi et al. (2022), demostraron que la producción de β -glucosidasa y celulasa con *N. crassa* cultivado en FES con semilla de canola fue mayor que la obtenida en FEL.

Entre las enzimas producidas por *Neurospora crassa* se encuentra la invertasa (EC 3.2.1.26), la cual cataliza la hidrólisis de la

sacarosa en glucosa y fructosa (Nadeem et al., 2015). Su uso es ampliamente reconocido en las industrias farmacéutica y alimentaria, especialmente en la producción de confitería, incluyendo chocolates, bombones, miel sintética, mermeladas y otros productos similares (Ashokkumar et al., 2001). Asimismo, la invertasa es utilizada en la fabricación de edulcorantes artificiales y en la industria cervecera (Manoochchri et al., 2020). Algunas invertasas con actividad fructosiltransferasa pueden aplicarse en la producción de fructooligosacáridos (FOS), azúcares con propiedades prebióticas. La invertasa también se utiliza en la producción de miel artificial, agentes plastificantes utilizados en cosméticos, medicamentos y la industria papelera. Recientemente, la enzima también ha encontrado aplicación en la construcción de electrodos para la detección de niveles de sacarosa (Lazar et al., 2011) y en la conversión de celulosa a ácido itacónico (Zhao et al., 2018). En general, las invertasas fúngicas han atraído la atención de diferentes sectores industriales debido a su potencial biotecnológico (Alhomodi et al., 2022; Roche et al., 2014).

La fermentación en estado sólido ha cobrado gran relevancia en la producción de enzimas debido a sus ventajas propias, tales como un menor costo y un mayor rendimiento en comparación con los métodos convencionales (Ohara et al., 2015). En particular, el uso de residuos agroindustriales como sustrato ha despertado un gran interés debido a su disponibilidad y bajo costo. En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la producción de invertasa por *Neurospora crassa* bajo diferentes condiciones de cultivo sólido, utilizando aserrín como soporte natural.

Materiales y Métodos

Microorganismo y condiciones de cultivo

Se empleó el microorganismo *Neurospora crassa* FGSC#9717 ($\Delta mus-51::bar^+$; *mat A his-3*), el cual se inoculó en matraces Erlenmeyer (250 mL) que contenían medio Vogels (10X) con sacarosa (1.5 %) como fuente de carbono e inductor para la producción de invertasa y 1.5 % de agar. Los cultivos se incubaron a 30 °C por 4 días. Los conidios se recuperaron con 30 mL de Tween 80 estéril al 0.01 % (v/v). Posteriormente, se utilizaron 500 mL de la suspensión de conidios para inocular matraces Erlenmeyer de 250 mL

que contenían 50 mL de medio Vogels con 1.5 % de sacarosa y 1.5 % de agar. Después de 4 días a 30 °C, se recolectaron los conidios que fueron utilizados como inóculo para los cultivos en la fermentación en estado sólido (FES).

Fermentación en Estado Sólido (FES)

Se utilizó aserrín de pino (tamaño de partícula de 2.38–1.19 mm) el cual se lavó dos veces con agua caliente de grifo, seguido de dos enjuagues con agua destilada. Posteriormente, se secó a 60 °C y se empleó como soporte sólido para la FES. La composición del medio base fue (g/L): sacarosa, 15; $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 30; KH_2PO_4 (anhidro), 50; NH_4NO_3 (anhidro), 20; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1. Además, se añadió 1 mL de solución de elementos traza, 0.5 mL de solución de biotina y 1 mL de cloroformo. Tanto el soporte como el medio de cultivo se esterilizaron durante 15 min a 121 °C. Los matraces Erlenmeyer (250 mL) con 10

g de aserrín seco se humedecieron con 15 ± 1 mL de medio de cultivo inoculado (1×10^7 conidios por mL), obteniendo un contenido de humedad inicial del 60 %. Se hizo un estudio para FES (Fig. 1) a 30 °C con sacarosa a 30, 45, 60, 90 y 120 g/L. Después, se hicieron cultivos con 15 g/L de sacarosa y se evaluaron condiciones de humedad inicial de 55 y 65 %, con una temperatura de cultivo de 30 °C. Así mismo, cultivos con 30 g/L de sacarosa y un contenido de humedad inicial de 60 % fueron incubados a 25 y 35 °C, evaluando así el efecto de la temperatura sobre la producción enzimática. Posteriormente, se hicieron FES con 30 g/L de sacarosa y tres niveles de inóculo (1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 conidios por mL), con una humedad inicial del 60 % y una temperatura de cultivo de 30 °C. Finalmente, se llevó a cabo un estudio comparativo empleando el medio de cultivo con (15 g/L) y sin sacarosa, para evaluar su impacto sobre el crecimiento y la producción de invertasa.



Figura 1. FES de *Neurospora crassa*.

Recuperación de la proteína extracelular

La proteína extracelular se recuperó adicionando 100 mL de agua destilada a cada matraz, enseguida se agitó en vórtex por 5 min y después el contenido de cada matraz se filtró al vacío (Whatman 41). La concentración de proteína en los extractos crudos se determinó de acuerdo con lo reportado por Mora-Pérez et al. (2024). Los extractos proteicos se almacenaron a -20 °C para su posterior análisis. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Análisis de actividad enzimática

Las pruebas enzimáticas se realizaron sobre los extractos proteicos crudos. La mezcla de reacción contenía 0.02 mL de extracto de

proteína y 0.180 mL de sacarosa 0.1 M. La mezcla de reacción se incubó a 50 °C durante 15 min (Guerrero-Urrutia et al., 2021) y la reacción se detuvo añadiendo 0.3 mL de ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS). Los azúcares reductores (AR) liberados se cuantificaron de acuerdo con Miller et al. (1960). Una unidad de actividad invertasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de AR por minuto, bajo estas condiciones de estudio. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Determinación de azúcares totales, pH y humedad.

La concentración de azúcares totales se determinó por el método de DuBois (1956).

Los valores de pH se midieron mediante potenciometría (PHS-3BW, BANTE Instruments) y el contenido de humedad (datos no mostrados) se cuantificó con una termobalanza (MB45, OHAUS). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Resultados y discusión

Efecto de la concentración de sustrato en la FES sobre la producción enzimática

La producción de invertasa por fermentación en medio sólido fue evaluada utilizando *Neurospora crassa* en presencia de diferentes concentraciones iniciales de sacarosa y un tiempo de cultivo de 120 h. Bajo estas condiciones de estudio, se presentó un consumo de sustrato de entre 72 y 88 %. Los

mejores títulos de actividad enzimática se obtuvieron a concentraciones extremas de sacarosa de 30 y 120 g/L, con valores de 29.59 ± 0.04 y 23.92 ± 0.31 U/mL de extracto enzimático (Fig. 2) y una actividad específica de 739.67 ± 0.02 y 598.06 ± 0.16 U/mg, respectivamente. Este comportamiento podría sugerir que la producción de invertasa en *Neurospora crassa* bajo condiciones de fermentación en medio sólido responde a la disponibilidad de sustrato de manera dual: a bajas concentraciones de sacarosa, el hongo incrementa la síntesis de invertasa para facilitar el acceso a la fuente de carbono; mientras que, a concentraciones elevadas, la elevada presencia del sustrato podría inducir una producción adicional de la enzima para gestionar eficientemente su metabolismo.

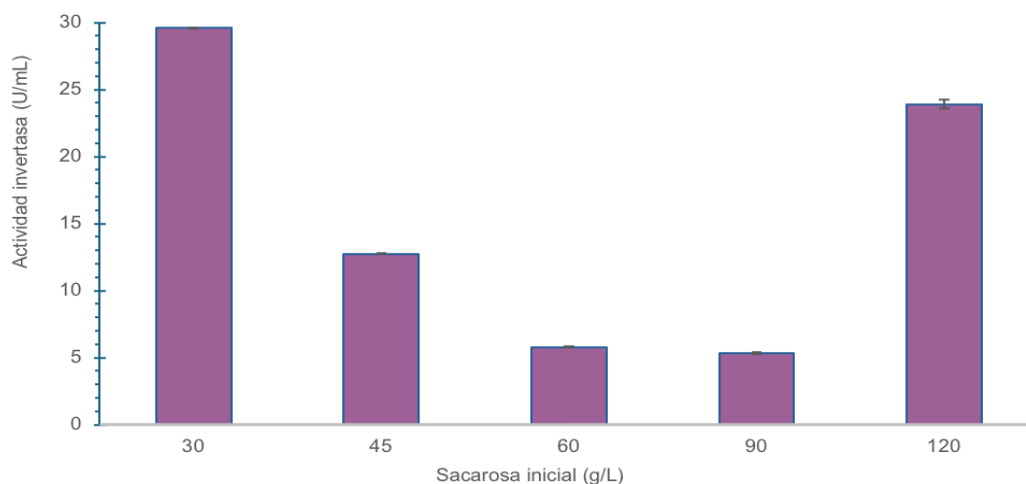


Figura 2. Producción de invertasa de *N. crassa* cultivada en condiciones de FES a diferentes concentraciones iniciales de sacarosa.

Al comparar estos resultados con los obtenidos por Mora-Pérez et al. (2024), empleando el mismo microorganismo, sustrato y soporte en FES, se observó una diferencia importante en la actividad enzimática en función de la concentración de sacarosa y del tiempo de cultivo. De acuerdo con dicho estudio, al emplear una concentración de sacarosa del 3 % obtuvieron una actividad enzimática de 10 U/mL, la cual se incrementó a 14 U/mL con 5 % de sacarosa, pero en un menor tiempo de cultivo (30-35 h). En contraste, en este estudio, al aumentar la concentración de sustrato a 4.5 %, la actividad disminuyó a 12.74 ± 0.05 U/mL, lo que difiere del patrón observado en el estudio de Mora-Pérez et al. (2024), pero no así en los títulos de actividad invertasa. Este patrón contrasta también con lo reportado

para otros hongos filamentosos, como por ejemplo en un estudio empleando *Aspergillus brasiliensis* (Guerrero-Urrutia et al., 2021) en FES se observó que al aumentar la concentración de sacarosa de 20 a 210 g/L en el medio de cultivo, la actividad invertasa también aumentó de manera proporcional (41.69 ± 3.6 U/mL), lo cual concuerda con la evidencia de que la FES reduce la represión de catabolitos y la inhibición de sustrato, permitiendo una mayor producción de enzimas en comparación con la FEL (Aguilar et al., 2002). Esta diferencia podría atribuirse a particularidades metabólicas y regulatorias propias de *N. crassa*, incluyendo mecanismos específicos de detección y utilización de carbohidratos, así como su fisiología asociada al crecimiento en medios sólidos. Estudios adicionales enfocados en la regulación génica

y la cinética metabólica de *N. crassa* en sistemas de FES, permitirían esclarecer estos mecanismos y optimizar las condiciones de fermentación para maximizar la producción de invertasa.

Efecto del contenido de humedad inicial sobre la producción enzimática

El contenido de humedad del sustrato es esencial para el crecimiento de microorganismos durante el proceso de FES. El nivel de humedad en los procesos fermentativos cumple funciones muy importantes, como disolver homogéneamente los nutrientes del medio y facilitar su acceso a la célula, además de disolver los productos del metabolismo cuando se excretan al medio (Carrasco et al., 2003). Un menor contenido de humedad reduce la solubilidad del sustrato y los nutrientes, mientras que la aglomeración de partículas ocurre con un mayor contenido de humedad, lo que reduce aún más la transferencia de oxígeno (Ohara et al., 2015). Cuando el contenido de humedad es muy alto, disminuye la porosidad del sustrato y el volumen de gas entre las partículas, lo que dificulta su efecto intercambiante y aumenta el riesgo de contaminación bacteriana (Carrasco et al., 2003). Típicamente, la humedad óptima para el crecimiento de cepas de hongos en FES está en el intervalo de 50-70 % p/p (Dobrev et al., 2018). Por tal motivo, se establecieron dos condiciones de humedad: 55 % y 65 %, empleando sacarosa como sustrato al 1.5 %, un inóculo de 1×10^7 esporas/mL de medio de cultivo, a un pH de 6 y una temperatura de incubación de 30 °C. Al final de las FES, el contenido de humedad para ambas condiciones disminuyó en promedio un 20 %, mientras que la actividad enzimática aumentó en ambos casos, como se observa en la Figura 3. En esta condición (55 % humedad), tras 96 h de fermentación se

consumió el 78.36 ± 1.14 % del sustrato inicial, obteniendo 0.07 ± 0.01 mg/mL de proteína extracelular, una máxima actividad enzimática de 43.39 ± 2.62 U/mL y una actividad específica de 619.87 ± 1.32 U/mg. Mientras que para un 65 % de humedad inicial en la FES, el sustrato consumido fue del 93.1 ± 0.67 %, con una concentración de proteína extracelular de 0.12 ± 0.01 mg/mL, una actividad enzimática de 64.03 ± 5.70 U/mL y con una actividad específica de 533.61 ± 2.86 U/mg. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Guerrero-Urrutia et al. (2021), en donde observaron que los cambios iniciales en el contenido de humedad no afectaron de manera negativa el crecimiento fúngico ni la producción de enzimas. En contraste, cuando se presenta un aumento en la humedad con respecto a la inicial, se generan condiciones desfavorables, como es el caso de un estudio con *Trichoderma viride* (Carrasco et al., 2003), en donde la humedad inicial (70 %) se elevó debido a la condensación dentro del biorreactor. Como resultado, la producción de las enzimas endo y exo 1,4- β -glucanasa a las 72 h de cultivo disminuyó (3.5077 y 0.6067 U/mL, respectivamente). Esto indica que cada microorganismo tiene un intervalo óptimo de humedad, y sobrepasarlo puede afectar negativamente el crecimiento y la producción de enzimas. Es importante resaltar que en los procesos de FES la concentración de producto basado en la masa del soporte inerte puede ser un criterio de diseño y sólo ocurre con soportes con una alta relación de capacidad de retención de agua y contenido de humedad crítica (WHC/CMC) (Mora-Pérez et al., 2024) y el aserrín, a diferencia de la espuma de poliuretano (PUF) por ejemplo, tiene una CMC baja.

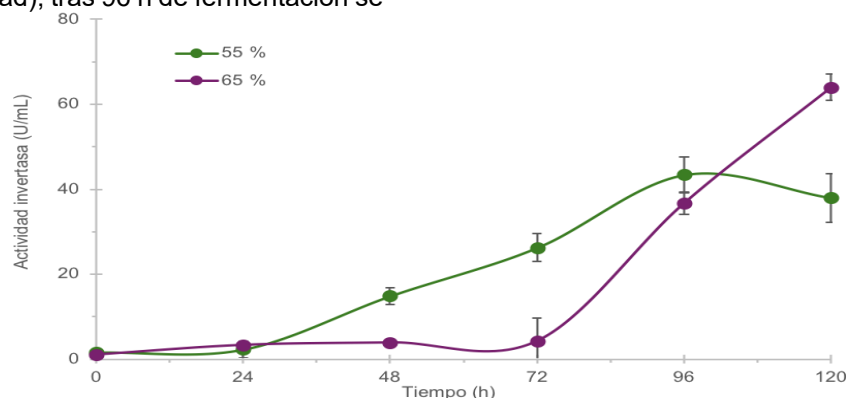


Figura 3. Cinética enzimática de *N. crassa* cultivada en FES a diferentes porcentajes de humedad inicial.

Efecto de la temperatura de la FES sobre la producción de invertasa

La temperatura es un factor importante que rige el crecimiento microbiano. Cada microorganismo crece en un intervalo de temperatura particular, produciendo metabolitos secundarios y enzimas (Perwez & Asheh, 2024). En este sentido, se evaluó el efecto de la temperatura de cultivo (25 y 35 °C) sobre la producción de invertasa en FES. Independientemente de la temperatura, la producción de invertasa aumentó (Figura 4) hasta alcanzar un valor máximo de 96.58 ± 10.24 U/mL al cabo de 96 h, con una concentración de proteína extracelular de 0.07 ± 0.03 mg/mL y una actividad específica de 1379.75 ± 5.14 U/mg, para la temperatura de cultivo de 25 °C. Mientras que, cuando la temperatura de cultivo fue de 35 °C se presentó una producción enzimática de 168.23 ± 1.05 U/mL a las 72 h, con una concentración de proteína extracelular de

0.06 ± 0.009 y una actividad específica de 18692.60 ± 0.53 U/mg. Mora et al en 2024 llevó a cabo un estudio con *Neurospora crassa* bajo las mismas condiciones a una temperatura de cultivo de 30 °C y 25 h de cultivo y reportaron una producción de invertasa de 1.89 y 2.79 veces más baja que lo encontrado en este estudio a 24 h de cultivo. Este comportamiento coincide también con lo observado por Rodríguez et al. (2012), quienes encontraron que la producción de lipasas por *Rhizopus microsporus* aumentó al aumentar la temperatura de cultivo hasta 35 °C. En otro estudio en condiciones similares empleando *Aspergillus brasiliensis* ATCC 9642 y agrolita como soporte (Guerrero-Urrutia et al., 2021), se reportó una producción de invertasa de 41.69 ± 3.60 U/mL. Esto evidencia que la regulación térmica juega un papel determinante en la actividad metabólica de los hongos.

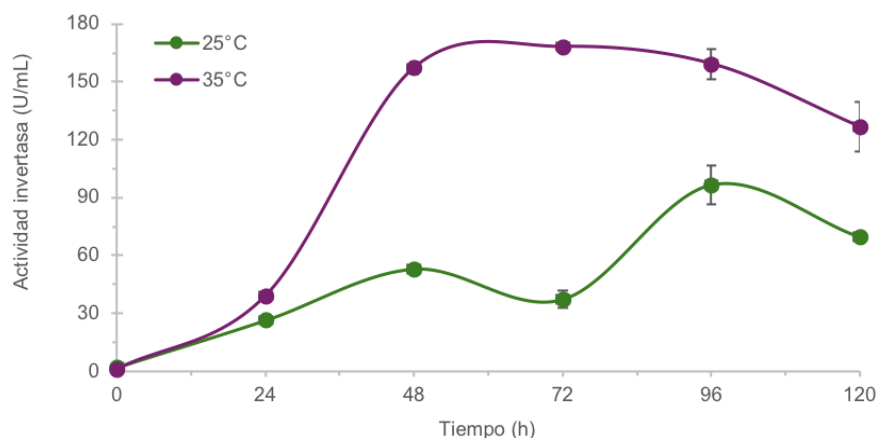


Figura 4. Cinética enzimática de *N. crassa* cultivada en FES a diferentes temperaturas de cultivo.

Efecto del tamaño de inóculo sobre la producción de invertasa

Otro factor determinante en los procesos de fermentación en estado sólido es el tipo y tamaño de inóculo, así como la estrategia de inoculación utilizada (Perwez & Asheh, 2024). En este estudio, se evaluaron tres niveles de inóculo (1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 conidios/mL). Para el nivel más bajo de inóculo, la máxima actividad enzimática fue de 77.72 ± 3.23 U/mL (Fig. 5) con una concentración de proteína extracelular de 0.058 ± 0.0015 mg/mL y una actividad específica de 1340.01 ± 1.62 U/mg. Mientras que, con los dos niveles de inóculo más altos, la producción enzimática aumentó 2 veces (146.14 ± 11.45 y 143.74 ± 5.91 U/mL, respectivamente) así como la concentración

de proteína extracelular (0.079 ± 0.0092 y 0.109 ± 0.0126 mg/mL, respectivamente) y la actividad específica (1849.84 ± 5.73 y 1084.34 ± 2.96 U/mg, respectivamente). Estos resultados coinciden con lo reportado en la literatura, donde se ha observado que un tamaño de inóculo pequeño conduce a una menor densidad celular inicial, lo que retrasa el aprovechamiento eficiente del sustrato y, por lo tanto, la producción del metabolito de interés. Por el contrario, al aumentar el tamaño del inóculo, se favorece una colonización más rápida. Sin embargo, cuando el inóculo excede cierto umbral, pueden presentarse limitaciones en la transferencia de masa y una reducción en la actividad metabólica, lo cual explica por qué el

mayor nivel de inóculo no generó un aumento en la producción enzimática (Perwez & Asheh, 2024). Así mismo, en este estudio se logró aumentar 29.23 veces la producción de invertasa por *Neurospora crassa*, en comparación con un reporte con el mismo microorganismo empleando PUF (5 U/mL) (Mora-Pérez et al., 2024). En condiciones similares, un estudio sobre la producción de invertasa con *Aspergillus niger* LBA 02 (Ohara et al., 2015) reportó una actividad enzimática de 59.04 ± 6.21 U/mL a las 72 h de cultivo, con 50 % de humedad inicial, 30 °C y un nivel de inóculo de 1×10^7 esporas/gmsi (equivalente a 1.5×10^7 esporas/gmsi en este estudio). En

contraste, en el presente estudio, se obtuvo una producción de invertasa 2.14 veces mayor a las 72 h de cultivo, lo que indica una mejora en las condiciones de producción. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, un aumento en el tamaño del inóculo puede reducir la actividad metabólica, lo que sugiere que 1×10^7 esporas/mL es un tamaño adecuado para una mayor producción de invertasa, no solo para *N. crassa*, sino también para *A. niger*. Estos resultados resaltan la importancia de un adecuado ajuste del inóculo para maximizar la producción enzimática en distintos sistemas de fermentación.

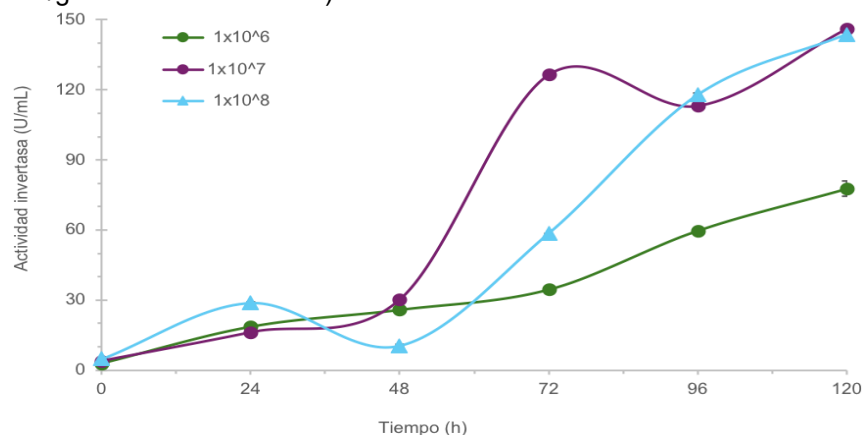


Figura 5. Cinética enzimática de *N. crassa* cultivada en FES con diferentes concentraciones de inóculo.

Efecto del soporte natural en la FES sobre la producción de invertasa

Se evaluó el efecto del aserrín como soporte natural en FES sobre la producción de invertasa, sin interferencias debidas a inductores como la sacarosa. Para ello se hicieron FES con y sin sacarosa en el medio de cultivo. La producción de invertasa (Fig. 6), así como la concentración de proteína y la actividad específica (142.37 ± 0.11 U/mL, 3.31 ± 0.04 mg/mL y 42.96 ± 0.07 U/mg, respectivamente) se vieron favorecidas por la ausencia de sacarosa en el medio de cultivo. Mientras que, en presencia de sacarosa, tanto la actividad enzimática como la actividad específica disminuyeron 1.58 y 1.8 veces, respectivamente. Sin embargo, la producción de invertasa a las 24 h de cultivo con sacarosa fue 5.2 y 23.4 veces más alta que lo reportado por Mora-Pérez et al. (2024), usando aserrín de pino y PUF, respectivamente. El aserrín de pino puede ser un modelo de soporte natural para la producción de enzimas, ofreciendo una solución al problema de la disposición

final de estos residuos para minimizar el impacto negativo al medio ambiente. En la literatura se destaca que los residuos agroindustriales poseen características fisicoquímicas adecuadas para ser utilizados como sustratos en bioprocesos de fermentación en estado sólido. Su composición química, caracterizada por la presencia de polisacáridos, constituye una fuente de carbono clave para el desarrollo microbiano (Machado & Brieva, 2014). La información disponible sobre este tema resalta la necesidad de realizar más estudios para profundizar en el conocimiento de este fenómeno. Hasta donde sabemos, no existen reportes sobre la producción de invertasa en FES empleando aserrín de pino como soporte natural, sin sacarosa como inductor. Por ello, es recomendable continuar con investigaciones adicionales que permitan comprender mejor los mecanismos involucrados y mejorar las condiciones para su aplicación en distintos contextos.

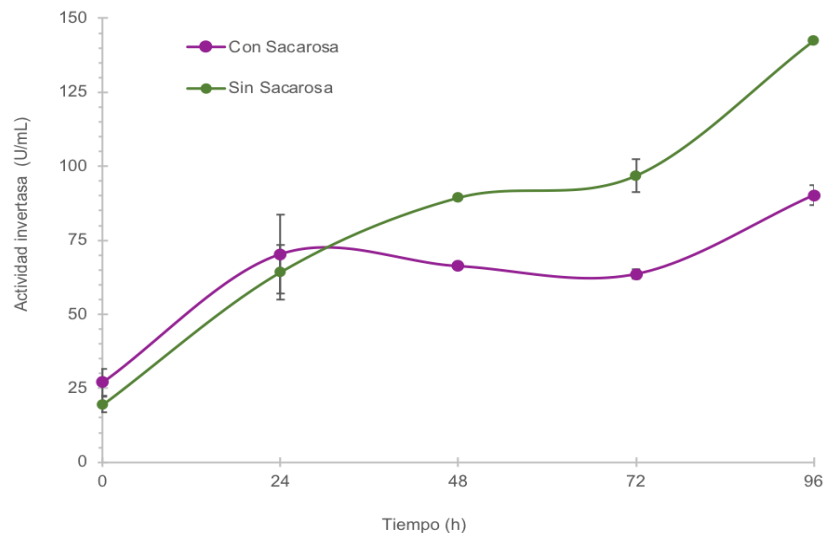


Figura 6. Cinética enzimática de *N. crassa* cultivada en FES con aserrín de pino en presencia y ausencia de sacarosa.

Conclusiones

Neurospora crassa produce invertasa en FES a diferentes concentraciones de sacarosa. El aumento en el contenido de humedad inicial, en la temperatura del cultivo así como en el tamaño de inóculo, promueve una mayor producción de invertasa. La ausencia de sacarosa exógena no afecta negativamente la biosíntesis enzimática; por el contrario, se proporciona evidencia de que la FES constituye una estrategia altamente eficaz para la producción de invertasa por *N. crassa*, aprovechando el aserrín de pino como soporte natural. Esta investigación resalta la relevancia industrial de la FES como una alternativa escalable y sostenible a la SmF. La reutilización de residuos agroindustriales como sustratos en la producción enzimática no solo reduce los costos de fabricación, sino que también se alinea con los principios de la bioeconomía circular y la valorización de desechos. Es necesario enfocarse en el estudio de los mecanismos moleculares y regulatorios subyacentes a la biosíntesis de invertasa en *N. crassa* bajo condiciones de FES, así como en la mejora del proceso a través de la ingeniería metabólica y el diseño de biorreactores. Estos avances podrían potenciar aún más la eficiencia y la aplicabilidad de las enzimas producidas mediante FES en la industria alimentaria, farmacéutica y de biocombustibles.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo de la Planta Piloto 4 de Fermentación en Medio Sólido de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.

Referencias

- Aguilar CN, Augur C, Favela-Torres E, Viniegra-González G (2001) Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures. *Process Biochemistry* 36(6): 565-570. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00251-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00251-X)
- Aguilar, CN, Favela-Torres E, Viniegra-González G, Augur C (2002) Culture conditions dictate protease and tannase production in submerged and solid-state cultures of *Aspergillus niger* Aa-20. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 102: 407-414. <https://doi.org/10.1385/ABAB:102-103:1-6:407>
- Alhomodi AF, Gibbons WR, Karki B (2022) Estimation of cellulase production by *Aureobasidium pullulans*, *Neurospora crassa*, and *Trichoderma reesei* during solid and submerged state fermentation of raw and processed canola meal. *Bioresource*

Technology Reports 18: 101063.

<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101063>

Alves JN, Jorge, JA, Guimarães LHS (2013) Production of Invertases by Anamorphic (*Aspergillus nidulans*) and Teleomorphic (*Emmericella nidulans*) Fungi under Submerged Fermentation Using Rye Flour as Carbon Source. *Advances in Microbiology* 3(5): 421-429.

<http://doi.org/10.4236/aim.2013.35057>

Arooj S, Iftikhar T, Mustafa S, Ullah N, Sarwar A, Nelofer R, Rahman S, Aziz T, Alharbi M, Alshammari A, Alasmari A (2023) Correction to: Optimization of critical medium components for lipase production by *Neurospora crassa* in solid state fermentation. *Biomass Conversion and Biorefinery* 15: 3113.

<https://doi.org/10.1007/S13399-023-05178-6>

Ashokkumar B, Nagarajan K, Paramasamy G (2001) Optimization of media for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry* 37(4): 331-338.

DOI: [10.1016/S0032-9592\(01\)00204-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00204-7)

Beadle GW, Tatum EL (1941) Genetic Control of Biochemical Reactions in *Neurospora**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 27(11): 499-506.

<https://doi.org/10.1073/pnas.27.11.499>

Carrasco T, Valiño E, Ibarra A, García Y, Pérez T (2003) Efecto negativo de la humedad en la fermentación en estado sólido del bagazo de caña de azúcar. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 37(1): 37-41.

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193018072006>

Dobrev G, Strinska H, Hambarliiska A, Zhekova B, Dobрева V (2018) Optimization of Lipase Production in Solid-State Fermentation by *Rhizopus arrhizus* in Nutrient Medium Containing Agroindustrial Wastes. *The Open Biotechnology Journal* 12(1), 189-203.

<https://doi.org/10.2174/1874070701812010189>

Dogaris I, Vakontios G, Kalogeris E, Mamma D, Kekos D (2009) Induction of cellulases and hemicellulases from *Neurospora crassa* under solid-state cultivation for bioconversion of

sorghum bagasse into ethanol. *Industrial Crops and Products* 29(2-3): 404-411.

<https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2008.07.008>

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Roberts PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28(3): 350-356.

<https://doi.org/10.1021/ac60111a017>

Fierro F, Vaca I, Castillo NI, García-Rico RO, Chávez R (2022) *Penicillium chrysogenum*, a Vintage Model with a Cutting-Edge Profile in Biotechnology. *Microorganisms*. 10(3): 573.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms10030573>

Guerrero-Urrutia C, Volke-Sepulveda T, Figueroa-Martinez F, Favela-Torres E (2021) Solid-state fermentation enhances inulinase and invertase production by *Aspergillus brasiliensis*. *Process Biochemistry* 108: 169-175.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.06.014>

Kumar A, Verma V, Dubey VK, Srivastava A, Garg SK, Singh VP, Arora PK (2023) Industrial applications of fungal lipases: a review. *Frontiers in Microbiology* 14:1142536.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1142536>

Lazar Z, Walczak E, Robak M (2011) Simultaneous production of citric acid and invertase by *Yarrowia lipolytica* SUC+ transformants. *Bioresource Technology*, 102(13): 6982-6989.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.032>

Machado GJ & Brieva JL (2014) Fermentación en estado sólido: Una alternativa biotecnológica para el aprovechamiento de desechos agroindustriales.

<https://revistas.fondoeeditorial.uru.edu/index.php/tecnocientificauru/article/view/ferremachadobrievan7a14>

Manoochchhri H, Hosseini N, Saidijam M, Taheri M, Rezaee H, Nouri F (2020) A review on invertase: Its potentials and applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 25, 101599.

<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101599>

Artículos

Miller GL, Blum R, Glennon WE, Burton AL (1960) Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Analytical Biochemistry* 1(2): 127-132.

[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(60\)90004-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(60)90004-X)

Mora-Pérez CJ, Sánchez-Ruiz MC, Salgado-Bautista D, Carrasco-Navarro U, Favela-Torres E (2024) Growth and invertase production by *Neurospora crassa* in submerged and solid-state cultures. *Mexican Journal of Biotechnology* 9(3): 20-35.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2024.9.3.20>

Murthy PS, Naidu MM, Srinivas P (2009) Production of α -amylase under solid-state fermentation utilizing coffee waste. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 84(8): 1246–1249.

<https://doi.org/10.1002/JCTB.2142>

Nadeem H, Hamid M, Hussnain M, Azeem F, Muzammil S, Rizwan M, Amjad M, Rasul I, Riaz M (2015) Microbial invertases: a review on kinetics, thermodynamics, physiochemical properties. *Process Biochemistry* 50: 1202–1210,

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.04.015>

Ohara A, De Castro RJS, Nishide TG, Dias FFG, Bagagli MP, Sato HH (2015) Invertase production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation: Focus on physical–chemical parameters, synergistic and antagonistic effects using agro-industrial wastes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 4(4): 645-652.

<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.06.008>

Perwez M, & Asheh SA (2024) Valorization of Agro-Industrial waste through Solid-State Fermentation: Mini Review. *Biotechnology Reports* 45: e00873.

<https://doi.org/10.1016/j.btre.2024.e00873>

Roche CM, Glass NL, Blanch HW, Clark DS (2014) Engineering the filamentous fungus *Neurospora crassa* for lipid production from lignocellulosic biomass. *Biotechnology and Bioengineering* 111(6): 1097–1107.

<https://doi.org/10.1002/bit.25211>

Rodríguez BEH (2012) Caracterización bioquímica de lipasas producidas por hongos termotolerantes en fermentación en medio sólido. Tesis Doctorado en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. CDMX, México.

<https://doi.org/10.24275/uami.6q182k19f>

Salgado Bautista D, Volke-Sepúlveda T, Figueroa-Martínez F, Carrasco-Navarro U, Chagolla-López A, Favela-Torres E (2020) Solid-state fermentation increases secretome complexity in *Aspergillus brasiliensis*. *Fungal Biology* 124(8): 723-734.

<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.04.006>

Singh A, Bajar S, Devi A, Pant D (2021) An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. *Bioresource Technology Reports* 14: 100652.

<https://doi.org/10.1016/J.BITEB.2021.100652>

Viniegra-González G, Favela-Torres E, Aguilar CN, Romero-Gomez S, Díaz Godínez G, Augur C (2003) Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal* 13(2–3): 157–167.

[https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00128-6](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00128-6)

Volke-Sepulveda T, Salgado-Bautista D, Bergmann C, Wells L, Gutierrez- Sanchez G, Favela-Torres E (2016) Secretomic insight into glucose metabolism of *Aspergillus brasiliensis* in solid-state fermentation. *Journal of Proteome Research* 15(10): 3856-3871.

<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00663>

Zhao C, Chen S, Fang H (2018) Consolidated bioprocessing of lignocellulosic biomass to itaconic acid by metabolically engineering *Neurospora crassa*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102(22): 9577–9584.

<https://doi.org/10.1007/S00253-018-936>

Zheng L, Yu X, Wei Ch, Qiu L, Yu Ch, Xing Q, Fan Y, Deng Z (2020) Production and characterization of a novel alkaline protease from a newly isolated *Neurospora crassa* through solid-state fermentation. *LWT* 122: 108990.

<https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.108990>

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE FITOESTIMULACIÓN DE BACTERIAS PGPB EN PLANTAS DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa*)

*Soley B. Nava¹, Yolanda Santos², Alfonso Benitez, Diana V. Cortés¹, Martha D. Bibbins¹

¹. Instituto Politécnico Nacional, CIBA Lab 4. Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5 Tlaxcala C.P. 90700, México. ². Instituto Tecnológico Superior de Zacapoaxtla, Carretera a Acuaco Zacapoaxtla Kilómetro 8 Totoltepec, 73680 Zacapoaxtla, Pue. *snava@ipn.mx.

Resumen

El cultivo de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) constituye una alternativa agrícola de relevancia económica en México; no obstante, su productividad puede ser limitada por factores edáficos y fisiológicos. En este sentido, las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) representan una estrategia biotecnológica sostenible para mejorar su rendimiento. En el presente estudio se evaluó el efecto de diferentes aislados bacterianos sobre la germinación, desarrollo temprano y crecimiento en invernadero de plántulas de jamaica. A las 24 h, las semillas mostraron un 100% de germinación con un índice de velocidad de germinación (IVG) de 0.935, confirmando su alta viabilidad. Las cepas, XM10 y OM1 promovieron un mayor crecimiento radicular (4.6 cm) y abundantes raíces laterales, mientras que TM5 estimuló la elongación del hipocótilo (5.4 cm). En contraste, el aislado TM10 provocó pudrición radicular que limitó el desarrollo de plántulas. Bajo condiciones controladas de invernadero, las cepas XM10, OM1 y AM5 mostraron el mejor desempeño global, alcanzando una altura promedio de planta de 78 cm. En cuanto a la acumulación de biomasa fresca, el tratamiento TM5 presentó el mayor rendimiento, con 280 g en tejidos aéreos y 21.85 g en raíz. De manera destacada, el tratamiento AM5 promovió la mayor inducción floral. Estos resultados resaltan el potencial de cepas con características de BPCV como inoculantes para incrementar el crecimiento y productividad de jamaica, así como, aportando bases para su aplicación en sistemas agrícolas sustentables.

Palabras Claves: *Hibiscus sabdariffa*, bacterias promotoras de crecimiento vegetal, cultivo

Abstract

Hibiscus sabdariffa is an economically important crop in Mexico, yet its productivity is often constrained by edaphic and physiological factors. Plant growth-promoting bacteria (PGPB) offer a sustainable approach to enhance crop performance. This study assessed the effects of different bacterial isolates on seed germination, early seedling development, and greenhouse growth of *H. sabdariffa*. Seeds reached 100% germination within 24 h, with a germination velocity index (GVI) of 0.935, indicating high viability. Bacterial strain XM10 promoted the greatest root growth (4.6 cm) and abundant lateral root formation, while strain TM5 enhanced hypocotyl elongation (5.4 cm). Conversely, TM10 caused root rot, restricting seedling development. Under greenhouse conditions, plants inoculated with strains XM10, OM1, and AM5 reached a mean height of 78 cm, outperforming the other treatments. In terms of fresh biomass, treatment TM5 recorded the highest values, with 280 g in aerial tissue and 21.85 g in roots. Additionally, AM5 resulted in the greatest number of flowers among all treatments evaluated. These findings underscore the potential of specific PGPB strains as bioinoculants to boost *H. sabdariffa* growth and productivity, supporting their integration into sustainable agricultural systems.

Key Words: *Hibiscus sabdariffa*, plant growth promoting bacteria, cultivation

Introducción

El cultivo de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) posee una importancia socioeconómica relevante en varias regiones de México, donde su producción está mayoritariamente a cargo de pequeños productores y asociaciones rurales (Ariza, 2020). A pesar de las condiciones agroclimáticas favorables para su cultivo y su creciente demanda por usos alimentarios e industriales (bebidas, mermeladas, ingredientes funcionales) (Galicia et al., 2008), los rendimientos nacionales permanecen por debajo de su potencial técnico, solamente en 2021 fueron cosechados 8,617.29 t de flor en México e importado el 52% del consumo total de países como China, Sudán, Nigeria y Senegal (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), 2023; Esquivel et al., 2024). Así mismo las limitaciones estructurales impactan de manera importante en su producción. Por otra parte, entre los factores que limitan la productividad se reconocen presiones bióticas —plagas y enfermedades foliares y de fruto (Abdel-Moniem et al., 2006) — y estreses abióticos como baja fertilidad edáfica, déficit hídrico y salinización puntual del suelo, además de prácticas de manejo tradicionales con escaso acceso a tecnología y asesoría técnica. Estas restricciones explican la heterogeneidad de rendimientos y la alta dependencia de mano de obra y mercados informales en sistemas de pequeña escala.

Frente a este escenario, las estrategias microbiológicas basadas en Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal (MPCV) se postulan como alternativas sostenibles para mejorar productividad. Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) actúan mediante múltiples mecanismos complementarios: fijación biológica de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de fitohormonas (por ejemplo IAA), actividad de ACC-desaminasa que reduce el etileno de estrés, producción de sideróforos y compuestos antagonistas frente a fitopatógenos, además de contribuir a la estabilización de la estructura del suelo y la tolerancia frente a estrés salino e hídrico (Kloepper and Beauchamp 1992; Kloepper et al., 2004; Souza et al., 2015; Mitter et al., 2021; Olaniyan et al., 2022). Esta multifuncionalidad ha sido respaldada por estudios en distintos cultivos, incluida la jamaica, donde inoculaciones con MPCV y

asociaciones con micorrizas han mostrado mejoras en biomasa, parámetros fotosintéticos y rendimiento bajo estrés hídrico (Sanayei et al., 2021).

En México, ensayos agronómicos y trabajos de selección de cultivares combinados con prácticas agroecológicas evidencian que la incorporación de biotecnologías microbianas y protocolos de manejo adaptados a pequeña escala pueden mejorar significativamente el rendimiento de las plantas. Por ello, la evaluación experimental del efecto de bacterias con características de promoción de crecimiento vegetal en plantas de jamaica contribuye a la generación de bioinoculantes apropiados para sistemas locales y así reducir la dependencia de insumos químicos y aumentar la rentabilidad y sostenibilidad de pequeños productores.

Materiales y Métodos

Germinación y crecimiento in vitro de semillas de jamaica.

Se realizaron pruebas de germinación de semillas de jamaica (variedad costeña de productores del Istmo en Oaxaca). Se seleccionaron semillas completas y de tamaño uniforme, colocadas en 5 lotes de 7 semillas, las cuales fueron desinfectadas por tratamiento con etanol al 70% (30–60 s) seguido de hipoclorito de sodio (1–3%, 1–5 min), y lavados posteriores con agua estéril. La esterilidad se confirmó colocando las semillas en placas de agar LB (Fiodor et al., 2023).

Preparación del inóculo bacteriano

Las cepas fueron crecidas en medio líquido Luria-Bertani (10 g de triptona, 5 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura y 1000 mL de agua destilada), a una temperatura de 30 °C, hasta alcanzar la fase logarítmica. Posteriormente se ajustó la concentración por densidad óptica de 1×10^8 UFC en solución salina con carboximetilcelulosa (0.5%).

Bioensayo en semillas de jamaica

Las semillas previamente desinfectadas, se colocaron en matraces que contenían 50 mL de una suspensión bacteriana y se mantuvieron por 60 min con agitación a 120 rpm, para posteriormente eliminar la suspensión de cada una de las muestras. Los tratamientos se dejaron secar en un horno a 35 °C durante 24 h. Se depositaron 7 semillas sobre papel de filtro estéril humedecido con 5

mL de agua desionizada estéril dentro de una placa de Petri; Posteriormente, las semillas se colocaron cuidadosamente con el embrión ubicado hacia abajo. Finalmente, las placas de Petri se sellaron y se colocaron en una incubadora de crecimiento con un fotoperiodo de 12:12 a 25 ± 2 °C con una humedad relativa del 60 %. La germinación de las semillas se cuantificó diariamente, analizando los siguientes parámetros de crecimiento:

porcentaje de germinación (G) (fórmula 1) (Bewley, 2013).

Índice de velocidad de germinación (IVG) (fórmula 2) (Maguire, 1962)

La longitud de la plúmula (PL) fue medido desde la unión de la radícula con el hipocótilo y longitud de la radícula (RL), se midió desde la base del hipocótilo hasta el ápice de la radícula, también fue medido el peso fresco y seco de los brotes.

$$(\%) = \frac{\text{Número de semillas germinadas } G}{\text{Número total de semillas germinadas}} * 100$$

Fórmula 1. Fórmula para calcular el porcentaje de germinación en semillas de jamaica.

$$IVG (\%) = \sum \frac{G}{N}$$

Fórmula 2. Índice velocidad de germinación donde: **G** = número de semillas germinadas en el conteo **N** = días después de la siembra en que ocurrió

Pruebas en invernadero

El ensayo se estableció en un diseño de bloques completamente al azar, con 2 bloques (réplicas) y 9 tratamientos, con un total de 18 macetas.

Tabla 1. Matriz de tratamientos

Tratamiento	ID	ESPECIE BACTERIANA
T1	OM3	<i>Ochrobactrum sp</i>
T2	IM1	<i>Pseudomonas hibiscicola</i>
T3	TM5	<i>Pseudomonas geniculata</i>
T4	XM10	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
T5	OM1	<i>Serratia marcescens</i>
T5	AM5	<i>Ochrobactrum sp</i>
T6	TM2	<i>Ochrobactrum sp</i>
T7	XM2	<i>Klebsiella spp</i>
T8	CTR	dH ₂ O estéril

Cada bloque contiene dos réplicas de todos los tratamientos (1 maceta por tratamiento por bloque). Las posiciones de las macetas fueron aleatorizadas dentro de cada bloque antes de iniciar el ensayo.

Preparación del material vegetal, sustrato e inóculo

Se utilizaron semillas de jamaica previamente tratadas como en el apartado 2.1, en tanto que, el sustrato consistió en vermiculita estéril; volumen por maceta: 5 L. Las condiciones de temperatura y humedad fueron registradas diariamente; fotoperiodo natural, riego manual a volumen constante; evitando encharcamientos y cada tercer día se adicionó solución Hoagland. El inóculo

bacteriano se preparó anteriormente y el control de formulación (T2) contenía el mismo portador sin microorganismos.

Procedimiento de inoculación

Tres semillas previamente tratadas y germinadas fueron sembradas en una maceta a 1–2 cm de profundidad; después de 7 días, las dos plántulas más vigorosas fueron mantenidas y retirada la tercera. Control: semillas sumergidas en agua estéril. A la semana de ser trasplantada, se aplicaron 10 mL de suspensión bacteriana (10^8 UFC/mL⁻¹) (Santiago et al., 2020) en el cuello radicular de cada planta. Las aplicaciones se repitieron a los 14 y 28 días. Los parámetros que se evaluaron fueron, altura de la planta (cm), biomasa fresca parte aérea y de la raíz.

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p \leq 0,05$). La normalidad de los datos porcentuales (porcentaje de germinación) se verificó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, y los datos porcentuales se transformaron mediante la transformación de raíz cuadrada de arcoseno antes de realizar el ANOVA.

Resultados y discusión

Crecimiento bacteriano

Nueve cepas bacterianas (OM3, IM1, TM5, XM10, OM1, AM5, TM2, XM2 y TM10) pertenecientes a los géneros *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum* y *Serratia* aisladas de cultivos impactados con plaguicidas,

fueron previamente evaluadas y seleccionadas a través de pruebas bioquímicas en sus propiedades de promoción del crecimiento vegetal. En la figura 1, se muestran las curvas de crecimiento de las nueve cepas. Los aislados lograron crecer en medio LB, presentando diferentes velocidades de crecimiento. OM1 (*Serratia marcescens*) y XM2 (*Klebsiella spp.*) ($\mu=0.13$ y 0.127 h^{-1} respectivamente), presentaron una rápida velocidad de crecimiento, alcanzando la fase exponencial en tan solo 2 horas de incubación, y la fase

estacionaria, después de 4 h. Por otra parte, las cepas XM10 (*Stenotrophomonas maltophilia*), IM1 (*Pseudomonas hibiscicola*) y TM5 (*Pseudomonas geniculata*) iniciaron la fase exponencial después de 6 h, alcanzando la fase estacionaria después de 22 h. La velocidad de crecimiento de cada cepa nos permitió generar inóculos estandarizados, así como discernir en la conformación de inóculos a ser aplicados en el tratamiento de semillas.

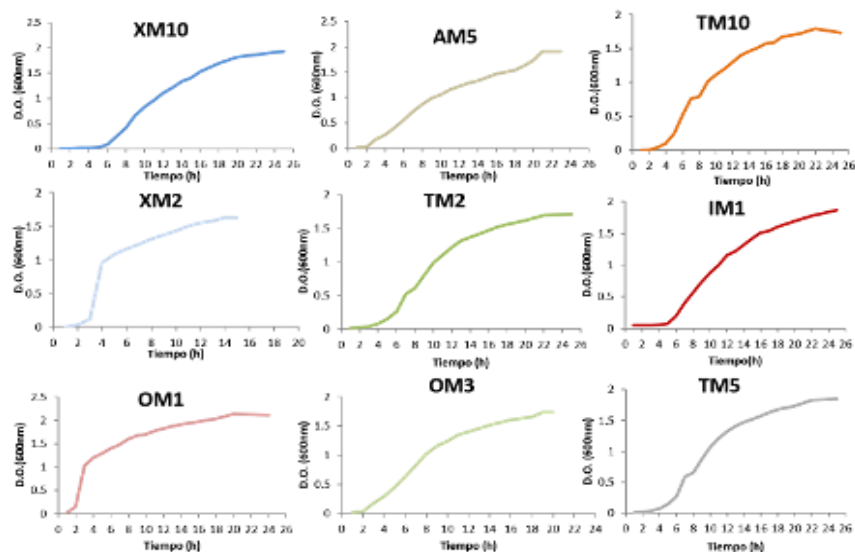


Figura 1. Curvas de crecimiento bacteriano de los géneros *Stenotrophomonas* (XM10), *Klebsiella* (XM2), *Serratia* (OM1), *Ochrobactrum* (AM5, TM2), *Pseudomonas* (IM1, TM5) y *Ochrobactrum* (TM10, OM3). Crecimiento en medio LB, a 30°C y agitación a 120 rpm

Germinación, crecimiento y desarrollo inicial de jamaica

En la figura 2, se muestra la germinación de semillas de *Hibiscus sabdariffa*, después de 24 h de incubación, las semillas presentaron el 100% de germinación, con un índice de velocidad de germinación (IVG) de 0.935. Con lo que se asegura la viabilidad de las semillas. De acuerdo con estudios de International Seed Testing Association (ISTA, 2020), porcentajes por debajo del 80% de germinación en semillas, indican mala calidad. De los 5 lotes probados, todos presentaron el 100 % de germinación sin presencia de contaminantes. Los resultados obtenidos evidencian que las semillas de

jamaica utilizadas en este estudio poseen una viabilidad óptima y homogénea. Estudios previos han resaltado la importancia de la calidad fisiológica de la semilla en la respuesta a tratamientos de biofertilización y bioprotección. Bewley et al. (2013) destacan que semillas con alto vigor presentan un desempeño más consistente en ambientes controlados y de campo, lo que repercute directamente en el éxito de programas de inoculación microbiana. De manera similar, Finch-Savage y Bassel (2016) enfatizan que la sincronía en la germinación es crucial para estudios de biotecnología vegetal, ya que reduce la variabilidad experimental asociada a diferencias fisiológicas en las plántulas.

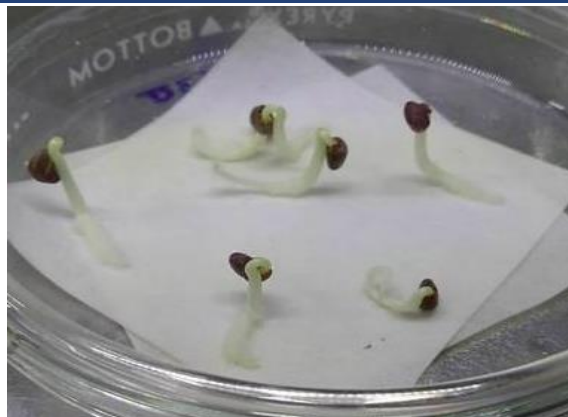


Figura 2. Semillas de jamaica germinadas después de 24 h.

En relación con los resultados obtenidos en los ensayos de germinación y desarrollo temprano de plántulas, se evidencia que los tratamientos con bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB) ejercen efectos diferenciados sobre la morfología inicial de la raíz y del hipocótilo. La cepa XM10 (*Stenotrophomonas maltophilia*) promovió un desarrollo radicular significativamente mayor, alcanzando en promedio 4.6 cm de longitud, acompañado de una abundante formación de pelos radicales (tabla 2). Este efecto es relevante, ya que el incremento en la superficie de absorción radicular mejora la adquisición de nutrientes y agua, lo que se traduce en un potencial mayor de

establecimiento y vigor de las plántulas en etapas posteriores (Lugtenberg y Kamilova, 2009). El estímulo sobre el crecimiento radicular puede estar relacionado con la producción de fitohormonas, especialmente auxinas como el ácido indol-3-acético (AIA), cuya síntesis por bacterias rizosféricas ha sido ampliamente documentada (Spaepen et al., 2007). En particular, *S. maltophilia* ha mostrado capacidad para secretar AIA y compuestos secundarios que modulan la arquitectura radicular (Ryan et al., 2009), lo cual concuerda con la presencia de raíces más largas y con mayor densidad de pelos radicales observados en este estudio.

Tabla 2. Crecimiento de las plántulas de jamaica 24 h después del tratamiento con bacterias

Tratamiento	Raíz (cm)	Plúmula	Hipocótilo (cm)	Pelos radicales	Raíces secundarias
XM10	4.6	No	4.9	***	5
XM2	3.8	Si	4.6	**	3
OM1	4.4	Si	5.2	**	3
AM5	2.4	No	4.7	**	5
TM2	2.1	No	5.3	**	3
OM3	3.2	No	5.1	**	3
TM10	1.1	No	1.7	no	0
IM1	2.7	Si	4	***	3
TM5	2.9	Si	5.4	**	3
CTR	2.4	No	5.4	**	3

Nota: * >10 PR, ** < 20 PR *** < 50 PR (Pelos Radicales)

Por otro lado, el tratamiento con *Pseudomonas geniculata* (TM5), se asoció con un efecto diferencial sobre la elongación del hipocótilo, alcanzando 5.4 cm en promedio, además de una abundante producción de pelos radicales. El alargamiento del hipocótilo podría explicarse por la producción bacteriana de giberelinas y citoquininas, hormonas conocidas por promover la división y elongación celular en

tejidos aéreos en etapas tempranas del desarrollo (Gutiérrez-Mañero et al., 2001; Khan et al., 2020). Estudios en *Pseudomonas spp.* han demostrado la capacidad de estas bacterias para producir metabolitos que estimulan tanto la parte aérea como el sistema radicular, dependiendo de la interacción planta-cepa (Kloepper et al., 2004). La figura 3 muestra el efecto sobre la germinación de las cepas bacterianas. Se

observó que las semillas tratadas con la cepa OM1 (*Serratia marcescens*) mostraron una plúmula y raíz principal mayor que el resto de los tratamientos, así como abundantes raíces secundarias. Caso contrario, sucede con la cepa TM10 (*Ochrobactrum pituitosum*), la

cual, provocó un proceso de pudrición de la plántula. Existen diversos reportes de especies de *Ochrobactrum* implicados en enfermedades de plantas bajo ciertas condiciones (Ryan et al., 2020)

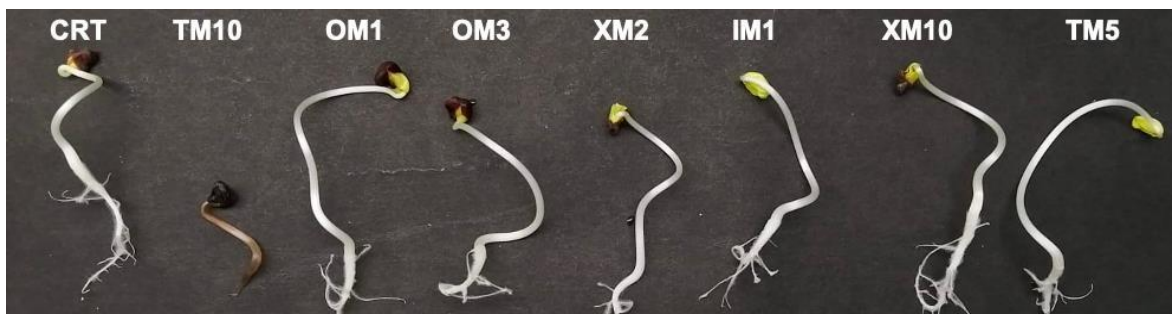


Figura 3. Efecto de bacterias [*Ochrobactrum pituitosum* (TM10), *Serratia marcescens* (OM1), *Ochrobactrum sp* (OM3), *Klebsiella sp* (XM2), *Pseudomonas hibiscicola* (IM1), *Stenotrophomonas maltophilia* (XM10), *Pseudomonas geniculata* (TM5)], sobre semillas de *Hibiscus sabdariffa*. Día 5 después del tratamiento

En la figura 4 se presentan los resultados del efecto de las bacterias sobre el crecimiento radicular. Se observó una diferencia significativa de la cepa OM1 (*Serratia marcescens*), respecto al resto de los tratamientos. Matteoli et al. (2018) reporta que *S. marcescens* promueve el crecimiento vegetal por diversos mecanismos como: (i) biosíntesis de compuestos auxínicos (IAA o compuestos indólicos) que modulan la arquitectura radicular; (ii) solubilización de

nutrientes (fosfato, zinc) que mejora la disponibilidad de minerales; (iii) producción de sideróforos y metabolitos antagonistas que reducen la presión de fitopatógenos; y (iv) actividad de ACC desaminasa que mitiga la acumulación de etileno en plantas sometidas a estrés, facilitando así la tolerancia a salinidad y sequía. Así mismo en estudios funcionales y genómicos respaldan la presencia de rutas y genes asociados a estos rasgos en cepas candidatas a bioinoculantes.

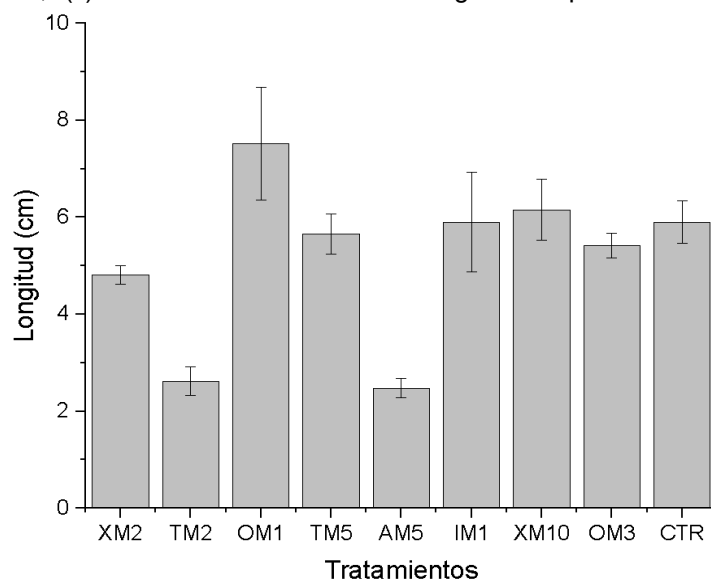


Figura 4. Efecto de las bacterias [*Klebsiella sp* (XM2), *Ochrobactrum sp* (TM2), *Serratia marcescens* (OM1), *Pseudomonas geniculata* (TM5), *Ochrobactrum sp* (AM5), *Pseudomonas hibiscicola* (IM1), *Stenotrophomonas maltophilia* (XM10), *Ochrobactrum sp* (OM3)]. sobre el crecimiento radicular. Longitud de la radícula (RL) en semillas germinadas de *Hibiscus sabdariffa* al día 5 germinadas.

Artículos

Los resultados de fitotoxicidad demostraron que ocho cepas no presentan efectos adversos en la germinación y mejoran el desarrollo del hipocótilo y hojas primarias en un periodo de 5 días de crecimiento.

Evaluación en invernadero

Las pruebas de invernadero se realizaron en los meses de julio y agosto del 2020, los tratamientos fueron con las bacterias; OM3,

IM1, TM5, XM10, OM1, AM5, TM2, XM2 y como control agua (CTR). Como se observa en la figura 5 el desarrollo de las plantas a los 70 días en condiciones de invernadero fue lento y con poco follaje, cabe mencionar que la temperatura promedio oscilo entre los 20 y 37 °C con una humedad relativa menor al 50%, por lo que se vio afectado su crecimiento.

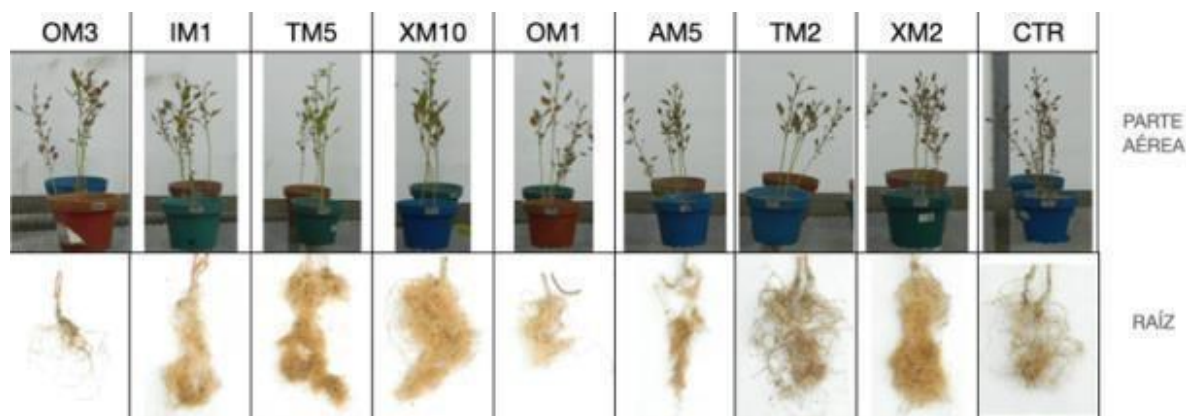


Figura. 5. Evaluación de la promoción de crecimiento vegetal en maceta. Plantas de jamaica de 2 meses de crecimiento inoculadas con bacterias con propiedades de crecimiento vegetal. *Ochrobactrum sp* (OM3), *Pseudomonas hibiscicola* (IM1), *Pseudomonas geniculata* (TM5), *Stenotrophomonas maltophilia* (XM10), *Serratia marcescens* (OM1), *Ochrobactrum sp* (AM5), *Ochrobactrum sp* (TM2), *Klebsiella sp* (XM2).

En la tabla 3, se muestran los datos fenotípicos de los aislados bacterianos, respecto al control, La longitud de la parte aérea de la planta alcanzó un máximo de 78 cm para los tratamientos XM10 y OM1 con la generación de un sistema radicular abundante; en tanto que el más bajo fue de 54 cm para la cepa AM5. En relación a la biomasa fresca de la parte aérea el

tratamiento TM5 presento el valor máximo de 280 g y el menor fue para IM1 (167 g), con respecto a la biomasa fresca de parte de la raíz TM5 (21.85 g) sobresalió. Finalmente, la presencia de flores fue muy variado por tratamientos, pese a que las plantas del tratamiento AM5 no crecieron más allá de 54 cm fue la que inicio primeramente con flores, contabilizando en total 22.

Tabla 3. Datos fenotípicos de *Hibiscus sabdariffa* a nivel invernadero.

Tratamiento	Altura (cm)	Biomasa fresca (g)		Número de flores
		aérea	raíces	
OM3	58	195	7.3	11
IM1	57	167	11.8	16
TM5	73	280	21.85	14
XM10	78	201	14.5	18
OM1	78	239	9.5	20
AM5	54	220	8.69	22
TM2	75	249	13	8
XM2	56	278	17.4	12
CTR	58	270	14	14

Conclusiones

Las semillas de *Hibiscus sabdariffa* variedad costeña, presentó una alta tasa de germinación (100 %) en un periodo de 48 h, sin presencia de contaminantes.

Ocho cepas bacterianas no presentaron efecto fitotóxico sobre la germinación de semillas de *Hibiscus sabdariffa* y favorecieron la elongación de las plántulas.

El desarrollo de la planta fue favorecido por la cepa TM5 y en producción de flores, la cepa AM5.

Perspectivas del trabajo

A fin de corroborar el efecto de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal se propone el someter la interacción de las mejores cepas XM10, TM5 y OM1; así como consorcios microbianos junto con un producto comercial para ser un referente de medición.

Agradecimientos

Gracias al Instituto Politécnico Nacional, a los proyectos SIP 20254124 MULTIDICIPLINARIO 2362, por el apoyo brindado para el desarrollo de este estudio.

Referencias

Abdel-Moniem ASH, Abd El-Wahab TE (2006). Insect pests and predators inhabiting roselle plants, *Hibiscus sabdariffa* L., a medicinal plant in Egypt. Archives of phytopathology and plant protection, 39(1), 25-32.
<https://doi.org/10.1080/03235400500103869>

Ariza-Flores R, Gálvez-Marroquín LA (2020) Quinba R-TC: new variety of Jamaica creole type of high yield. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).
<https://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/index.php/agricolas/article/download/1044/3494?inline=1>. cienciasagricolas.inifap.gob.mx

Bewley J D, Bradford K, Hilhorst H, Nonogaki H (2013) Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy. Springer.

Esquivel NH, Sagarnaga-Villegas LM, Barrera-Perales OT, Leos-Rodríguez J A, Salas-González JM (2024) Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) production in Mexico: Challenges and strategic prospects.

Revista TSA / CCBA (2024).
<https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/5124>

Finch-Savage WE, Bassel GW (2016) Seed vigour and crop establishment: extending performance beyond adaptation. Journal of Experimental Botany, 67(3), 567–591.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erv490>

Fiodor A, Ajijah N, Dziewit L, Pranaw K (2023) Biopriming of seed with plant growth-promoting bacteria for improved germination and seedling growth. Frontiers in Microbiology, 14, 1142966.

Galicia FLA, Salinas MY, Espinoza GBM, Sánchez FC (2008) Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) nacional e importada. Revista Chapingo. Serie Horticultura. 14(2):121129.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2008000200004&lng=es&nrm=iso

Gutiérrez-Mañero FJ, Ramos-Solano B, Probanza A, Mehouchi J, Tadeo FR, Talon M (2001) The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. Physiologia Plantarum, 111(2), 206–211.
<https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1110211.x>

International Seed Testing Association (ISTA). (2020). International Rules for Seed Testing. Bassersdorf, Switzerland

Khan AL, Waqas M, Lee I J (2020) Biotechnological and agronomic approaches for enhancing plant growth-promoting rhizobacteria applications. Critical Reviews in Biotechnology, 40(7), 975–993.
<https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1764731>

Kloepper J W, Beauchamp CJ (1992) A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. Can. J. Microbiol. 38: 1219-1232.

Artículos

Kloepper JW, Ryu CM, Zhang S (2004) Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94(11), 1259–1266. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1259>

Lugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541–556. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>

Maguire J D (1962) Speed of Germination—Aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *crop science*, 2(2), 176–177. DOI:10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x.

Matteoli FP, Passarelli-Araujo H, Reis RJA, Da Rocha LO, De Souza EM, Aravind L, Venancio T M (2018) Genome sequencing and assessment of plant growth-promoting properties of a *Serratia marcescens* strain isolated from vermicompost. *BMC genomics*, 19(1), 750.

Mitter EK, Tosi M, Obregón D, Dunfield KE, Germida JJ (2021) Rethinking crop nutrition in times of modern microbiology: innovative biofertilizer technologies. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 606815.

Olaniyan FT, Alori ET, Adekiya AO, Ayorinde BB, Daramola FY, Osemwegie OO, Babalola OO (2022) The use of soil microbial potassium solubilizers in potassium nutrient availability in soil and its dynamics. *Annals of Microbiology*, 72(1), 45.

Ryan MP, Pembroke JT (2020) The genus *Ochrobactrum* as major opportunistic pathogens. *Microorganisms*, 8(11), 1797.

Ryan RP, Monchy S, Cardinale M, Taghavi S, Crossman L, Avison MB, Dow JM (2009) The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology*, 7(7), 514–525. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2163>

Sanayei S, Barmaki M, Ebadi A, Torabi-Giglou M (2021) Amelioration of water deficiency stress in roselle (*Hibiscus sabdariffa*) by arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 49(2), Article 11987. <https://doi.org/10.15835/nbha49211987>. ResearchGate

Santiago HS, Aranda-Ocampo S, Hernández-Morales J, Peña-Lomeli A (2020) Effect of *Bacillus* spp. on the germination and growth of roselle plants (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Agro Productividad*, 13(10).

Souza RD, Ambrosini A, Passaglia LM (2015) Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and molecular biology*, 38, 401–419.

Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 425–448. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>

CARACTERIZACIÓN FÍSICA, QUÍMICA, COMPUESTOS BIOACTIVOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN VARIEDADES DEL FRIJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.) DEL ESTADO DE OAXACA.

Janis A. Espíritu-Rojas^{1,2}, Juan Gabriel Torruco-Uco⁴, Paul Mauricio Sánchez-Ocampo^{1,3}, Jacqueline Capataz-Tafur^{1,3*}.

¹Centro de Investigaciones Científicas, Instituto de Biotecnología, Universidad del Papaloapan, Tuxtepec 68301, Oaxaca, México. ²Programa de Doctorado en Biotecnología, División de Estudios de Posgrado, Universidad del Papaloapan, Tuxtepec 68301, Oaxaca, México. ³Laboratorio de Biotecnología de Plantas Medicinales, Instituto de Biotecnología, Universidad del Papaloapan, Tuxtepec 68301, Oaxaca, México.

⁴Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tuxtepec. Calzada Dr. Víctor Bravo Ahúja, No. 561. Col. Predio El Paraíso, Tuxtepec, Oaxaca, C.P. 68350, México.

Correspondencia: jcapataz@unpa.edu.mx.

Resumen

Se evaluaron cinco variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas en el estado de Oaxaca: Jamapa, Criollo San Juan, Blanco, Rojo Oscuro y Mixteco, con el objetivo de caracterizar sus propiedades físicas, químicas, contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante (DPPH• y ABTS⁺⁺). La variedad Rojo Oscuro destacó por presentar el mayor tamaño de semilla, así como un elevado contenido de proteínas (13.46%), cenizas (4.92%), compuestos fenólicos (2.37 mg EAG/g b.s.), flavonoides totales (7.09 mg EQ/g b.s.) y la mayor actividad antioxidante (18.78 DPPH• y 37.96 ABTS⁺⁺). Por su parte, el frijol Blanco mostró el mayor contenido proteico (14.48%) y de grasa (2.57%). Las variedades de frijol negro (Jamapa y Criollo San Juan) también se destacaron por su notable actividad antioxidante, en particular en el ensayo ABTS⁺⁺.

En conjunto, estos resultados evidencian que las variedades de frijol con tonalidades oscuras concentran mayores cantidades de compuestos bioactivos y exhiben una mayor actividad antioxidante, lo que resalta su potencial como alimentos funcionales con beneficios para la salud, especialmente en la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles.

Palabras Claves: Frijol común, compuestos bioactivos, actividad antioxidante, alimento funcional.

Abstract

Five common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties cultivated in the state of Oaxaca Jamapa, Criollo San Juan, Blanco, Rojo Oscuro, and Mixteco were evaluated characterizing their physical and chemical properties, bioactive compound content, and antioxidant activity (DPPH• and ABTS⁺⁺). The Rojo Oscuro variety stood out for exhibiting the largest seed size, as well as a high content of proteins (13.46%), ash (4.92%), phenolic compounds (2.37 mg GAE/g d.w.), total flavonoids (7.09 mg QE/g d.w.), and the highest antioxidant activity (18.78 DPPH• and 37.96 ABTS⁺⁺). In turn, the Blanco bean showed the highest protein (14.48%) and fat (2.57%) contents. The black bean varieties (Jamapa and Criollo San Juan) also stood out for their remarkable antioxidant activity, particularly in the ABTS⁺⁺ assay.

Overall, these findings demonstrate that dark colored bean varieties concentrate higher amounts of bioactive compounds and exhibit greater antioxidant activity, highlighting their potential as functional foods with health benefits, especially in the prevention of non-communicable chronic diseases.

Key Words: Common bean, bioactive compounds, antioxidant activity, functional food.

Introducción

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las leguminosas de mayor relevancia a nivel mundial, debido principalmente a su elevado valor nutritivo. Constituye una fuente relevante de proteínas (20-25%) y carbohidratos complejos (50-60%), además de aportar cantidades importantes de fibra dietética, ácidos grasos poliinsaturados y diversos macro y micronutrientes esenciales (Chen *et al.*, 2015). Estas propiedades nutricionales se encuentran estrechamente vinculadas con la composición estructural del grano, el cual está conformado por tres componentes principales: la testa (9%), los cotiledones (90%) y el eje embrionario (1%), cada uno con perfiles específicos de compuestos bioactivos (Figura 1).

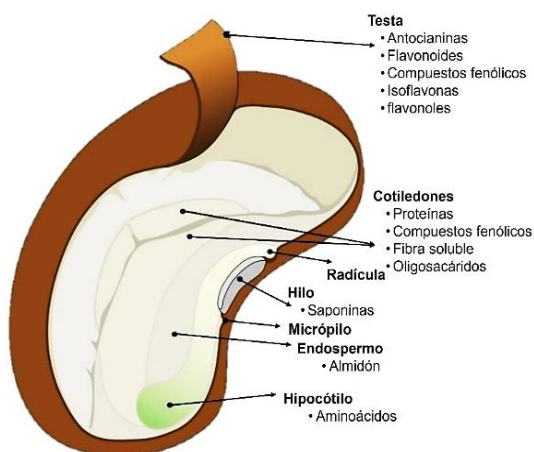


Figura 1. Anatomía de la semilla del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (Reyes-Bautista *et al.*, 2024).

Diversos estudios han demostrado que el contenido de compuestos fenólicos se encuentra estrechamente correlacionado con la actividad antioxidante del frijol. En particular, las variedades con testa pigmentada (roja, negra, rosa, crema o marrón) presentan niveles significativamente superiores de actividad antioxidante en comparación con aquellas de testa blanca (Rodríguez-Madrera *et al.*, 2021). Estos compuestos no solo actúan como neutralizadores de radicales libres, sino que también se han asociado con efectos antiinflamatorios, anticancerígenos, antidiabéticos, antiobesidad y antimutagénicos (Ganesan & Xu, 2017). El consumo regular de frijol se ha relacionado

con la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2, cáncer gástrico y de próstata, así como con la prevención de la obesidad. Dichas propiedades funcionales se atribuyen principalmente a la presencia de compuestos bioactivos, tales como compuestos fenólicos, flavonoides, ácidos fenólicos, taninos y ácidos triterpénicos, entre otros.

En el estado de Oaxaca, el frijol constituye uno de los cultivos agrícolas de mayor relevancia. A lo largo del tiempo, los productores locales han realizado una selección empírica de colectas, priorizando aquellas variedades mejor adaptadas a las condiciones agroclimáticas de cada región, lo cual influye de manera determinante en los niveles de productividad. En diferentes zonas del estado se han identificado numerosas colectas locales; no obstante, pese a los esfuerzos realizados a nivel nacional para caracterizar la diversidad genética del frijol, el conocimiento sobre la totalidad del germoplasma disponible sigue siendo limitado. De igual forma, son escasos los estudios que aborden de manera integral aspectos taxonómicos, anatómicos, fisiológicos y etnobotánicos de estas variedades (Pliego-Marín *et al.*, 2013).

En este contexto, el presente estudio tiene como objetivo evaluar la composición nutricional, el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, así como la actividad antioxidante de distintas variedades de frijol, con el propósito de identificar aquellas con mayor potencial funcional y nutracéutico.

Materiales y Métodos

Materia prima

Se evaluaron cinco variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) procedentes del estado de Oaxaca (Tabla 1). Los granos fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y procesados en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas Medicinales del Centro de Investigaciones Científicas de la Universidad del Papaloapan (UNPA), campus Tuxtepec. Posteriormente, los granos fueron sometidos a un proceso de limpieza, envasados en bolsas de plástico selladas al vacío y almacenados a una temperatura de 8-10 °C hasta su uso.

Artículos

Tabla 1. Variedades y origen del frijol común.

Variedad de frijol	Origen	Foto
Rojo Oscuro	Zimatlán de Álvarez, Valles centrales de Oaxaca, México.	
Blanco	Zimatlán de Álvarez, Valles centrales de Oaxaca, México	
Mixteco	Santa Ana Tlapacoya, Valles Centrales de Oaxaca, México	
Criollo San Juan	San Juan Sayultepec, región Mixteca, Oaxaca, México	
Jamapa	San Juan Bautista Tuxtepec, región de la Cuenca del Papaloapan, Oaxaca, México	

Caracterización física de los granos de frijol

Los granos de frijol fueron limpiados y seleccionados, posteriormente se midieron las características físicas (largo, ancho, grosor e

hilo, peso, Figura 2), a 100 granos de cada variedad con un vernier digital (RexQualis), los granos también fueron pesados usando una balanza analítica (ADAM) (León-Murillo, 2016).



Figura 2. Representación de las tres dimensiones del frijol común

Se calculó del diámetro geométrico (D_g), el diámetro aritmético (D_a), el volumen (mm^3), el coeficiente de aplanamiento y el criterio de la

esfericidad (Φ) para de los granos de frijol de acuerdo con las ecuaciones de la Tabla 2 (Mohsenin, 2020 y Ganesan & Xu, 2017).

Tabla 2. Propiedades físicas de los granos de frijol.

Propiedad física	Ecuación
Diámetro aritmético (D_a)	$D_a = \frac{L \times A \times G}{3}$
Diámetro geométrico (D_g)	$D_g = (G \times A \times L)^{1/3}$
Esfericidad (Φ)	$\Phi = \frac{D_a}{L}$
Coeficiente de aplanamiento	$\text{Coef. de apl} = \frac{G}{L}$
Volumen aproximado (V):	$Vol = \frac{3\pi LAG}{32}$

Donde: L= longitud (mm), A= ancho (mm), G= grosor (mm), D_a = diámetro medio aritmético (mm), D_g =diámetro medio geométrico (mm), Φ = esfericidad (adimensional), V= volumen (mm^3).

Obtención de harinas

Los granos fueron molidos en un equipo Nutribullet (licuadora de alta velocidad), y se tamizaron con una malla No. 80 (0.177 mm). Las harinas crudas (HC) obtenidas se almacenaron en bolsas de polipropileno selladas al vacío y se conservaron a temperatura ambiente hasta su uso (Manuel-Pérez *et al.*, 2023).

Análisis químico proximal

La caracterización química proximal se realizó siguiendo la metodología propuesta por AOAC (2019), utilizando 1 g de HC de cada variedad de frijol. El contenido de humedad se determinó a 105 °C hasta alcanzar peso constante (Método 925.09). El contenido de cenizas se obtuvo por calcinación a 550 °C durante 4 h (Método 923.03). La grasa cruda se cuantificó como lípidos libres, mediante extracción con hexano (Método 920.39). La proteína cruda se determinó por el método Kjeldahl, aplicando un factor de conversión 6.25 para estimar el contenido proteico (Método 954.01). La fibra total se cuantificó por digestión ácido-alcalina utilizando 1 g de harina (Método 978.10). Finalmente, el extracto libre de nitrógeno (ELN) se calculó por diferencia.

Extracción de compuestos bioactivos

La extracción de compuestos bioactivos se realizó utilizando una relación 1:10 (p/v) de harina con una mezcla de acetona, agua y ácido acético (70:29.5:0.5 v/v/v) (Singh *et al.*, 1991; Xu & Chang, 2007). La suspensión se mantuvo en agitación (Prendo, modelo AGO 60-40) durante 16 h a 160 rpm. Posteriormente, los extractos se centrifugaron (Thermo Fisher, modelo Heraeus Megafuge 16R) a 3490 × g por 15 min, el precipitado se lavó con el mismo solvente. Los sobrenadantes obtenidos se concentraron en un rotavapor a 45 °C, se liofilizaron y finalmente almacenados bajo refrigeración a -4 °C hasta su análisis.

Determinación de compuestos fenólicos y flavonoides totales

La extracción de compuestos fenólicos y flavonoides se realizó a partir de 10 mg de harina suspendidos en 10 mL de metanol. El contenido de compuestos fenólicos se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999), mientras que, el contenido de flavonoides totales se

evaluó mediante un ensayo colorimétrico adaptado al formato de microplacas (Xu & Chang, 2007). Para la elaboración de las curvas estándar se utilizaron ácido gálico y catequina como patrones de referencia. Los resultados de compuestos fenólicos totales (CFT) se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por g de base seca (mg EAG/g b.s.) y los flavonoides totales (FT) como mg equivalentes de quercetina por g base seca (mg EQ/g b.s.).

Evaluación de la actividad antioxidante (ABTS^{•+} y DPPH[•])

La actividad antioxidante de los extractos metanólicos (10 mg/mL) se evaluó mediante los métodos ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (Re *et al.*, 1999) y DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (Brand-Williams *et al.*, 1995), ambos adaptados al formato de microplacas. Para la cuantificación se construyó una curva de calibración elaborada con Trolox (1 mg/mL en metanol) en un intervalo de 0 a 1000 µg/mL. Los resultados se expresaron como µmol equivalente de Trolox/g de muestra en bases seca (ecuación 1).

$$\text{Ecuación (1)} \quad \%AA = \left[1 - \frac{A_m}{A_R} \right] \times 100$$

Donde: %AA: Actividad antirradical; A_m : Absorbancia de las muestras; A_R : Absorbancia de la referencia.

Análisis estadístico

El análisis de los resultados se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, y una prueba de Fisher para la comparación de medias. Este estadístico se realizó con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, utilizando el paquete estadístico Minitab® 2020 (versión 20.3).

Resultados

Las características físicas de los granos de las cinco variedades de *Phaseolus vulgaris* L., se presentan en la Tabla 3. Las variedades mostraron diferencias significativas entre sí, reflejando la diversidad morfológica existente. La variedad Rojo Oscuro destacó por ser la de mayor tamaño con valores de longitud (10.36 mm), ancho (6.45 mm), grosor (5.50 mm), hilo (2.23 mm), peso (0.27 g) y volumen (0.11 mm³). Asimismo, presentó los mayores diámetros aritmético ($D_a = 7.44$ mm)

y geométrico ($D_g = 4.72$ mm), confirmando su condición de una semilla grande y de forma ovalada. Estos valores difieren ligeramente de lo reportado por García-Díaz (2016), quien caracterizó esta misma variedad con dimensiones mayores (longitud: 11.8 mm, ancho, 7.1 mm, grosor: 5.4 mm y peso: 0.261 g), y concluyó que el frijol rojo es uno de los granos más grandes del género *P. vulgaris*.

Las variedades **Jamapa**, **Criollo San Juan** y **Mixteco** mostraron dimensiones intermedias. La variedad **Jamapa** mostró

valores similares en longitud (8.66 mm), volumen (0.07 mm^3) y coeficiente de esfericidad (0.74), lo que sugiere una semilla con una **forma ovalada a ligeramente redondeada**. El **Criollo San Juan** presentó una esfericidad de 0.69 y un coeficiente de aplanamiento de 0.47, indicando una semilla más **alargada y aplanada**. Por su parte, la variedad **Mixteco**, presentó la menor esfericidad (0.66) y el coeficiente de aplanamiento más bajo del grupo (0.40), lo que confirma su **forma alargada y aplanada**.

Tabla 3. Características físicas y morfológicas de los granos de frijol común.

Propiedades físicas	Variedades de frijol				
	Jamapa	Criollo San Juan	Blanco	Rojo Oscuro	Mixteco
Longitud (mm)	8.66 ± 0.04^d	9.27 ± 0.05^c	9.17 ± 0.05^c	10.36 ± 0.06^a	9.64 ± 0.05^b
Ancho (mm)	5.98 ± 0.40^b	5.41 ± 0.03^d	5.37 ± 0.03^d	6.45 ± 0.08^a	5.61 ± 0.03^c
Grosor (mm)	4.64 ± 0.03^b	4.37 ± 0.03^c	3.93 ± 0.03^d	5.50 ± 0.04^a	3.87 ± 0.04^d
Hilo (mm)	1.90 ± 0.05^c	1.80 ± 0.03^d	1.74 ± 0.03^d	2.23 ± 0.04^a	2.11 ± 0.03^b
Peso (g)	0.18 ± 0.03^b	0.17 ± 0.03^c	0.14 ± 0.02^e	0.27 ± 0.04^a	0.16 ± 0.02^d
D_a (mm)	6.43 ± 0.36^b	6.35 ± 0.30^b	6.16 ± 0.30^c	7.44 ± 0.04^a	6.38 ± 0.03^b
D_g (mm)	4.39 ± 0.12^b	4.36 ± 0.10^b	4.30 ± 0.01^c	4.72 ± 0.01^a	4.37 ± 0.01^b
ϕ	0.74 ± 0.02^a	0.69 ± 0.02^c	0.67 ± 0.01^d	0.72 ± 0.02^b	0.66 ± 0.02^c
Volumen (mm^3)	0.07 ± 0.01^b	0.06 ± 0.01^c	0.06 ± 0.01^d	0.11 ± 0.02^a	0.06 ± 0.01^c
Coef. De aplanamiento	0.54 ± 0.03^a	0.47 ± 0.03^b	0.43 ± 0.03^c	0.53 ± 0.04^a	0.40 ± 0.04^d

Los valores son el promedio de 100 repeticiones $\pm$ error estándar. ^{a-f}Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa de ($p < 0.05$).

Finalmente, la variedad **Blanca** fue la de menor tamaño, con los valores más bajos en las características en grosor (3.93 mm), hilo (1.74 mm), peso (0.14 g), volumen (0.06 mm^3), coeficiente de aplanamiento (0.43) y esfericidad ($\phi = 0.67$). Estos resultados coinciden con lo reportado por Solano-Cervantes *et al.* (2009), quienes caracterizaron esta misma variedad (longitud: 8.50 mm, ancho: 5.95 mm y grosor: 5.0 mm) y concluyeron que se encuentra entre las semillas más pequeñas del género *P. vulgaris* L.

Las diferencias observadas en las características físicas (tamaño, peso, diámetro, volumen, esfericidad y coeficiente de aplanamiento) pueden atribuirse tanto a la variedad y al manejo agronómico del cultivo, como a las condiciones climáticas y al origen del grano (Maqueira-López *et al.*, 2021).

Asimismo, se reconoce la influencia de factores genéticos (García-Díaz, 2016). Cabe destacar que, respecto al volumen y al coeficiente de aplanamiento, no hay estudios previos que describan estas características en frijoles u otras leguminosas; por lo tanto, los resultados obtenidos constituyen un aporte relevante para futuras investigaciones orientadas a relacionar estas propiedades físicas con la calidad del grano, el diseño de cribadoras para la selección de semillas por tamaño y el comportamiento en procesos biológicos como la germinación.

El análisis químico proximal de las harinas crudas de frijol se presenta en la Tabla 4. El contenido de humedad osciló entre 9.07% (Mixteco) a 11.44% (Jamapa), estos valores se encuentran dentro de lo establecido por la NOM-147-SSA1-1996 ($\leq 15\%$ de humedad en harinas), lo cual garantiza su calidad y vida de

anaquel, además de confirmar que las muestras cumplen con los requisitos para su comercialización y procesamiento industrial.

En cuanto al contenido de proteína, las variedades Blanco (14.48%) y Rojo Oscuro (13.46%) destacaron por presentar valores más altos, ubicándose dentro del intervalo de 14.2-19% reportado para frijoles rojos y negros por Campos-Vega *et al.* (2010). Por el contrario, las variedades Jamapa (11.22%), Criollo San Juan (11.01%) y Mixteco (12.77%) mostraron valores inferiores a lo descrito en la literatura. El elevado contenido proteico en las HC de las variedades Blanco y Rojo Oscuro puede atribuirse a una eficiente acumulación de reservas en los cotiledones (Singh & Singh Riar, 2022). Cabe señalar que la concentración de proteína en el frijol depende no solo de los genes implicados en su síntesis y acumulación, sino también de procesos fisiológicos relacionados con la absorción de nutrientes, la maduración, el tamaño de la semilla y la síntesis y acumulación de almidón. Además, factores ambientales como la ubicación geográfica y la época de cosecha influyen de manera significativa en este parámetro (Cid-Gallegos *et al.*, 2023).

Respecto al contenido de grasa, las variedades evaluadas se encontraron en un intervalo de 1.64% (Jamapa) a 2.57% (Blanco) (Tabla 4), valores que coinciden con lo reportado por Kan *et al.*, (2017), para diversas variedades de *P. vulgaris* L. (0.8-2.83%). Las diferencias observadas pueden atribuirse a la variabilidad genética, así como a las condiciones de cultivo y ambientales durante el desarrollo del grano (Galván-Mondragón, 2023).

En el caso de las cenizas, las variedades Blanca (5.10%) y Mixteco (5.26%) mostraron los valores más altos (Tabla 4), superando en aproximadamente un 45% lo reportado por Galván-Mondragón. (2023) para frijol común (3.51%). Por otro lado, las variedades Jamapa (3.84%) y Criollo San Juan (3.58%) presentaron los contenidos más bajos, aunque ligeramente superiores, cerca del 2%, a los mencionados por dicho autor. Esta variabilidad refleja la diversidad genética y funcional de variedades de frijol, lo que subraya su potencial nutraceutico (Onwuka *et al.*, 2024).

Tabla 4. Composición química proximal de las harinas crudas del frijol (*P. vulgaris* L).

Nombre común del frijol	%					
	Humedad	Proteínas	Grasa	Cenizas	Fibra total	ELN
Jamapa	11.44 ± 0.15 ^a	11.22 ± 0.23 ^c	1.64 ± 0.06 ^c	3.84 ± 0.03 ^c	1.43 ± 0.06 ^d	70.34 ± 0.22 ^b
Criollo San Juan	10.94 ± 0.40 ^b	11.01 ± 0.13 ^c	1.70 ± 0.05 ^c	3.58 ± 0.01 ^d	2.13 ± 0.04 ^{ab}	70.64 ± 0.09 ^a
Blanco	9.94 ± 0.29 ^c	14.48 ± 0.22 ^a	2.57 ± 0.06 ^a	5.10 ± 0.03 ^a	1.77 ± 0.01 ^c	66.14 ± 0.44 ^d
Rojo oscuro	10.57 ± 0.18 ^b	13.46 ± 0.08 ^a	2.21 ± 0.07 ^b	4.92 ± 0.02 ^b	2.25 ± 0.10 ^a	66.59 ± 0.55 ^d
Mixteco	9.07 ± 0.14 ^c	12.77 ± 0.29 ^b	2.13 ± 0.07 ^b	5.26 ± 0.01 ^a	2.04 ± 0.01 ^b	68.73 ± 0.46 ^c

Los valores son el promedio de 3 repeticiones ± error estándar. ^{a-d}Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa de (p<0.05).

Las variedades de Criollo San Juan, Mixteco y Rojo Oscuro presentaron los mayores contenidos de fibra 2.26%, 2.13% y 2.39%, respectivamente (Tabla 4). Estos valores fueron inferiores a los reportados por Guevara *et al.* (2020), quienes encontraron valores de 3.52% a 6.73% en variedades de frijol negro y

rojo. En contraste, las variedades Blanco y Jamapa mostraron los valores más bajos 1.86% y 1.52% respectivamente. El bajo contenido de fibra total observado en las variedades evaluadas podría atribuirse a la mayor proporción de otros componentes (proteínas y carbohidratos), así como a

factores genéticos y ambientales que afectan la acumulación de polisacáridos estructurales (Cid-Gallegos *et al.*, 2023).

Las harinas de frijol Rojo Oscuro y Criollo San Juan presentaron el mayor contenido de extracto libre de nitrógeno (ELN) 77.44% y 70.91%, respectivamente (Tabla 4), valores superiores al intervalo de 50-60% para frijol común reportado por Cid-Gallegos *et al.* (2023). En contraste, la variedad Jamapa presentó el valor más bajo (62.21%), ligeramente superior al reportado por el mismo autor. El intervalo de ELN observado (52-76%) indica la presencia de compuestos nitrogenados disponibles como reserva energética en el grano, con un alto porcentaje de almidón, azúcares solubles y fibra dietética (Singh & Singh Riar, 2022). Cabe destacar que el almidón de las leguminosas contribuye a la liberación lenta de glucosa, favoreciendo un bajo índice glucémico y generando beneficios a la salud (Berrios *et al.*, 2010).

El contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides totales (FT) se presenta en la Figura 3. El CFT (Figura 3A) variaron entre 0.89 mg EAG/g b.s. (Blanco) y 2.37 mg EAG/g b.s. (Rojo Oscuro). Esta última variedad mostró el valor más alto, consistente con lo reportado por Rodríguez-Madrera *et al.* (2021), quienes encontraron concentraciones de 2.24-2.62 mg EAG/g b.s. en frijoles de tonos marrones y rojizos. Las variedades Jamapa y Mixteco presentaron contenidos intermedios 1.59 y 1.34 mg EAG/g b.s., respectivamente. El frijol Blanco presentó el menor contenido (0.89 mg EAG/g b.s.), dentro del intervalo reportado por Agostini-Costa *et al.* (2015) para esta variedad (0.1-2.1 mg EAG/g b.s.). De acuerdo con la clasificación de Marathe *et al.* (2011), los frijoles con CFT <1.0

mg EAG/g b.s. se consideran bajos; entre 1-2 mg EAG/g b.s, moderados; y >2 mg EAG/g b.s, altos. Así, las variedades Rojo Oscuro y Criollo San Juan se clasifican como de alto contenido, Jamapa y Mixteco como moderado, y Blanco como de bajo contenido fenólico.

En cuanto al contenido de FT (Figura 3B), la variedad Rojo Oscuro presentó el valor más alto (7.09 mg EQ/g b.s), el cual fue dos veces mayor al reportado por Pérez-Pérez *et al.* (2019) para frijoles rojos (3.39 mg EQ/g b.s.). Los frijoles Criollo San Juan, Mixteco y Jamapa mostraron valores intermedios (4.51, 4.73 y 3.89 mg EQ/g b.s., respectivamente), que fueron entre 0.66 y 0.80 veces menores a lo señalado por Singh & Singh Riar (2022) en frijoles negros (5.9 mg EQ/g b.s.). El frijol Blanco mostró el menor contenido (1.72 mg EQ/g b.s.), ligeramente superior al reportado por Campos-Vega *et al.* (2018) (1.37 mg EQ/g b.s.).

En conjunto, los resultados indican que el frijol Rojo Oscuro constituye una fuente particularmente rica de compuestos bioactivos (fenólicos y flavonoides), con potencial beneficio para la salud humana debido a su elevada capacidad antioxidante. Estudios previos han señalado que las características genéticas influyen de manera significativa en el contenido total de flavonoides en la testa de la semilla (Campos-Vega *et al.* 2018). Asimismo, se ha reportado que la concentración de CFT y FT varía según la época del año, las condiciones de cultivo y el origen de la semilla, lo que refleja la amplia diversidad de *P. vulgaris* como fuente de compuestos fenólicos con interés funcional y nutraceutico (Gan *et al.*, 2017; Marathe *et al.*, 2011).

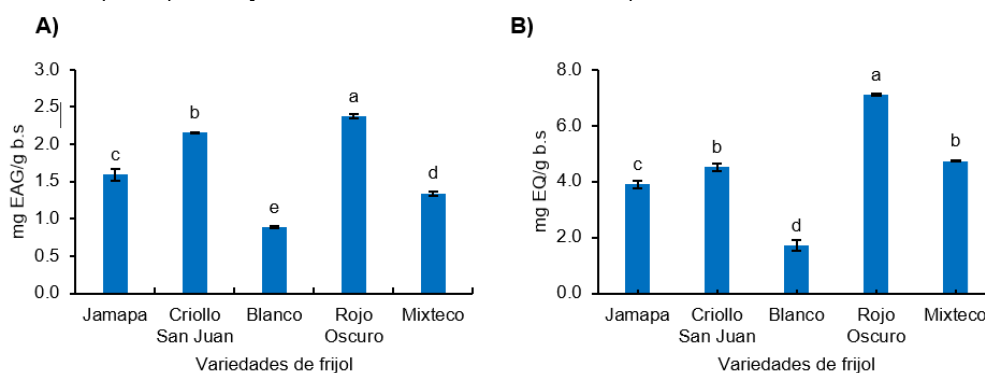


Figura 3. A) Compuestos fenólicos. B) Flavonoides totales. ^{a-e}Letras diferentes en la misma gráfica indican diferencia significativa de (p<0.05).

La actividad antioxidante de las cinco variedades de frijol se evaluó mediante los métodos DPPH• y ABTS^{•+} (Figura 4). En el análisis por DPPH•, la variedad Rojo Oscuro presentó el valor más alto (**18.78 $\mu\text{mol ET/g b.s.}$**) (Figura 4A), coincidiendo con lo reportado por Rodríguez-Madrera *et al.* (2021), quienes informaron un valor de **18.7 $\mu\text{mol ET/g b.s.}$** en frijoles con tonos rojos. Las variedades de frijol negro mostraron valores intermedios: **Jamapa (9.56 $\mu\text{mol ET/g b.s.}$)**, **Mixteco (12.60 $\mu\text{mol ET/g b.s.}$)** y **Criollo San Juan (15.05 $\mu\text{mol ET/g b.s.}$)**. Estos valores fueron 0.87 veces menores, 1.14 y 1.37 veces mayores, respectivamente al valor de 11 $\mu\text{mol ET/g b.s.}$ reportado por Lerma-Subías (2023) en frijoles negros. En contraste, la variedad Blanca presentó la menor actividad antioxidante (**5.48 $\mu\text{mol ET/g b.s.}$**); sin embargo, este valor fue superior al reportado por Lerma-Subías (2023) (**3.93 $\mu\text{mol ET/g b.s.}$**) para frijoles de la misma variedad. Los resultados sugieren que la actividad antioxidante está influenciada por el color de la semilla. Las variedades de testa oscura, particularmente Rojos y Negras, exhibieron mayor actividad, lo que se relaciona con su elevado contenido de compuestos fenólicos, como antocianinas y taninos condensados. Estos metabolitos poseen propiedades antioxidantes que contribuyen a la neutralización de radicales libres y a la prevención del daño celular (Manuel-Pérez *et al.*, 2023). En el ensayo

ABTS^{•+}, la variedad Rojo Oscuro también presentó la mayor actividad antioxidante (37.96 $\mu\text{mol ET/g b.s.}$) (Figura 4B), superando en un 16.50% lo reportado por Carbas *et al.* (2020) para frijoles rojos (32.58 $\mu\text{mol ET/g b.s.}$). Las variedades negras mostraron valores entre 21.36 $\mu\text{mol ET/g b.s.}$ (Jamapa) y 36.76 $\mu\text{mol ET/g b.s.}$ (Criollo San Juan), correspondientes a 1.23 y 2.11 veces superiores, respectivamente, al valor de 17.4 $\mu\text{mol ET/g b.s.}$ descrito por Soriano *et al.*, (2015). Por su parte, el frijol Blanco registró la actividad más baja (9.06 $\mu\text{mol ET/g b.s.}$) aunque este valor fue 21.6% mayor al reportado para la misma variedad (.45 $\mu\text{mol ET/g b.s.}$) por Carbas *et al.* (2020). La elevada capacidad de eliminación de radicales libres en la variedad Rojo Oscuro se debe principalmente a su alto contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, los cuales actúan como donadores de electrones capaces de neutralizar especies reactivas de oxígeno (ROS) (Xu & Chang, 2008). Estas moléculas, gracias a sus estructuras aromáticas con grupos hidroxilo, facilitan la estabilización de radicales libres, lo que explica la mayor actividad antioxidante observada tanto en DPPH• como en ABTS^{•+} (Villar-Ildoate, 2024). Este comportamiento coincide con lo señalado por Zhao *et al.* (2014), quienes reportan una correlación directa entre el contenido fenólico total y la capacidad antioxidante.

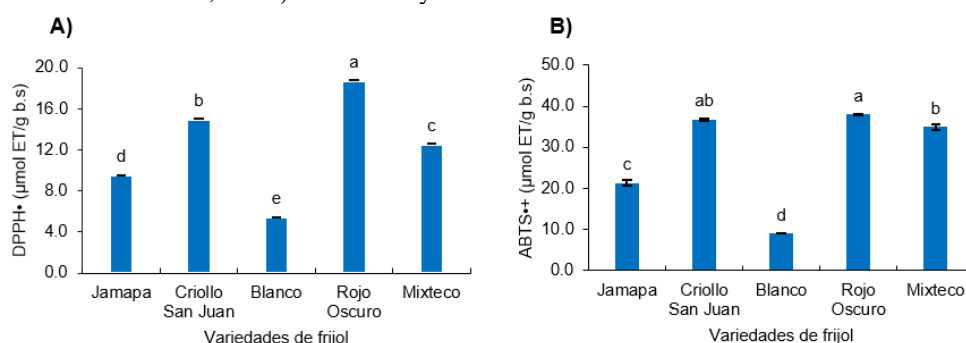


Figura 4. Actividad antioxidante determinada mediante los métodos A) DPPH•; B) ABTS^{•+}. ^{a-e}Letras diferentes en la misma gráfica indican diferencia significativa de ($p < 0.05$).

Conclusiones

La variedad Rojo Oscuro destacó por su mayor tamaño, peso, contenido proteico, concentración de compuestos fenólicos y flavonoides, así como por la mayor actividad antioxidante, tanto en DPPH• como en ABTS^{•+}. En contraste, la variedad Blanca presentó los valores más bajos en compuestos bioactivos y actividad

antioxidante. Estos hallazgos confirman que el color de la testa está directamente relacionado con la concentración de compuestos fenólicos y flavonoides, así como con la capacidad antioxidante, lo que posiciona al frijol Rojo Oscuro como alimento funcional con beneficios potenciales para la salud.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por el apoyo a través de la beca nacional de manutención otorgada a Janis Axidi Espiritu Rojas (CVU: 724477), así como al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por la dotación de las variedades de frijol utilizadas en este estudio

Referencias

- Agostini-Costa, T. S., Teodoro, A. F. P., Alves, R. B., Braga, L. R., Ribeiro, I. F., Silva, J. P., Quintana, L. G., & Burle, M. L. (2015). Total phenolics, flavonoids, tannins and antioxidant activity of lima beans conserved in a Brazilian genebank. *Ciência Rural*, 45(2), 335-341. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140030>
- AOAC. (2019). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists: Official methods of analysis of AOAC International* (21st ed.). AOAC International.
- Berrios, J. D. J., Morales, P., Cámara, M., & Sánchez-Mata, M. C. (2010). Composición de carbohidratos de harinas de legumbres crudas y extruidas. *Food Research International*, 43(2), 531-536. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.035>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Campos-Vega, R., Guevara-González, R. G., Guevara-Olvera, B. L., Oomah, B. D., & Loarca-Piña, G. (2010). Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) polysaccharides modulate gene expression in human colon cancer cells (HT-29). *Food Research International*, 43, 1057-1064.
- Campos-Vega, R., Zaczuk Bassinello, P., de Andrade Cardoso Santiago, R., & Oomah, B. D. (2018). Frijoles secos: procesamiento y efectos nutricionales. En *Alimentos terapéuticos, probióticos y no convencionales* (Cap. 20, pp. 367-386). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814625-5.00019-4>
- Carbas, B., Machado, N., Oppolzer, D., Ferreira, L., Brites, C., Rosa, E. A. S., Barros,

A. I. R. N. A., & Queiroz, M. (2020). Nutrients, antinutrients, phenolic composition, and antioxidant activity of common bean cultivars and their potential for food applications. *Antioxidants*, 9(2), 186. <https://doi.org/10.3390/antiox902018>

Chen, P. X., Tang, Y., Marcone, M. F., Pauls, P. K., Zhang, B., Liu, R., & Tsao, R. (2015). Characterization of free, conjugated and bound phenolic compounds and lipophilic antioxidants in regular and non-darkening cranberry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 185, 298-308. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.100>

Cid-Gallegos, M. S., Gómez y Gómez, Y. de las M., Corzo-Ríos, L. J., Sánchez-Chino, X. M., Moguel-Concha, D., Borges-Martínez, E., & Jiménez-Martínez, C. (2023). Potencial nutricional y bioactivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en la salud humana. En *Memorias del Congreso Internacional de Investigación en Biotecnología* (Vol. 8, pp. 309-318). Instituto Politécnico Nacional.

Galván-Mondragón, D. E. (2023). *Caracterización química y nutracéutica de ravioles elaborados a base de frijol común (Phaseolus vulgaris L.)* (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Querétaro.

García Díaz, Y. D. (2016). *Compuestos fenólicos y actividad antioxidante en testa y grano de 54 poblaciones nativas de frijol común (Phaseolus vulgaris L.)* (Tesis de Maestría). Universidad Veracruzana.

Gan, R. Y., Wang, M. F., Lui, W. Y., Wu, K., Dai, S. H., Sui, Z. Q., & Corke, H. (2017). Diversity in antioxidant capacity, phenolic contents, and flavonoid contents of 42 edible beans from China. *Cereal Chemistry*, 94(3), 291-297. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-09-16-0249-R>

Ganesan, K., & Xu, B. (2017). Polyphenol-rich lentils and their health promoting effects. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 2390. <https://doi.org/10.3390/ijms18112390>

Guevara, A. M., Villalobos Moya, K., Rubí Zeledón, J., Granados Rojas, L., Hernández Aguirre, C., & Brenes Monge, H. (2020). Evaluación de propiedades fisicoquímicas del

frijol costarricense (*Phaseolus vulgaris*) como estrategia de diferenciación y valorización. *Producción y Nuevas Tecnologías*, 18(35), 1-12.

Kan, L., Nie, S., Hu, J., Wang, S., Cui, S. W., Li, Y., Xu, S., Wu, Y., Wang, J., Bai, Z., & Xie, M. (2017). Nutrients, phytochemicals and antioxidant activities of 26 kidney bean cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, 108, 467-477.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.11.032>

León-Murillo, J. R. (2016). *Bioprocesamiento de frijol común (Phaseolus vulgaris L.) para obtener un alimento funcional* (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Sinaloa.

Jerma Subías, M. D. (2023). Actividad antioxidante de germinados de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Manuel-Pérez, M. E., Torruco-Uco, J. G., Hernández-Santos, B., Rodríguez-Miranda, J., & Ramírez-Figueroa, E. (2023). Composición química, perfil fitoquímico y color de harinas de frijol negro Jamapa germinado. *Congreso Internacional de Investigación e Innovación Multidisciplinaria*, 3-4.

Maqueira-López, L. A., Roján-Herrera, O., Solano-Flores, J., & Milagros-Santana, I. (2021). Germinación de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a diferentes temperaturas. *Cultivos Tropicales*, 42(2), 11-12.

Marathe, S. A., Rajalakshmi, V., Jamdar, N. S., & Sharma, A. (2011). Comparative study on antioxidant activity of different varieties of commonly consumed legumes in India. *Food and Chemical Toxicology*, 49(9), 2005-2012. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.04.039>

Mohsenin, N. N. (2020). *Propiedades físicas de materiales vegetales y animales* (2ª ed.). Editorial Universidad de Cornell.

Onwuka, B. M., Nwagbara, M. O., & Oguike, P. C. (2024). Evaluation of soil moisture in relation to climate variability across Umudike, Southeastern Nigeria. *International Journal of Hydrology*, 8(3), 94-95.

Pérez-Pérez, L. M., Del Toro Sánchez, C. L., Sánchez Chávez, E., González Vega, R. I., Reyes Díaz, A., Borboa Flores, J., Soto Parra, J. M., & Flores-Córdova, M. A. (2019). Bioaccesibilidad de compuestos antioxidantes de diferentes variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Biotecnia*, 22(1), 123-124.

Pliego-Marín, L., López-Baltazar, J., & Aragón-Robles, E. (2013). Características físicas, nutricionales y capacidad germinativa de frijol criollo bajo estrés hídrico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6 (Especial), 1197-1209.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS⁺ radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231-1237.

[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

Reyes-Bautista, R., Flores-Sierra, J. de J., & Xoca-Oruro, L. Á. (2024). Péptidos bioactivos derivados de las semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista de Biotecnología y Ciencias Agropecuarias*, 35(2), 182.

Rodríguez Madrera, R., Campa Negrillo, A., Suárez Valles, B., & Ferreira Fernández, J. J. (2021). Phenolic content and antioxidant activity in seeds of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Foods*, 10(4), 864. <https://doi.org/10.3390/foods10040864>

Secretaría de Salud. (1999). *NOM-147-SSA1-1996. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales*. Diario Oficial de la Federación.

Singh, S. P., Gepts, P., & Debouck, D. G. (1991). Races of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Economic Botany*, 45, 379-396. <https://doi.org/10.1007/BF02887079>

Singh, S. M., & Singh Riar, C. (2022). Effect of germination on chemical composition and nutritional value of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Carpathian Journal of Food Science and Technology*, 14(2), 28-42.

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.

Artículos

[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)

Solano-Cervantes, F., Díaz-Ruiz, R., Jacinto-Hernández, C., & Aguirre-Álvarez, L. (2009). Prácticas agrícolas y características del grano de cultivares de frijol en Tlatzala, Guerrero. *Ra Ximhai*, 5(1), 187-199.

Soriano Sancho, R. A., Pavan, V., & Pastore, G. M. (2015). Effect of in vitro digestion on bioactive compounds and antioxidant activity of common bean seed coats. *Food Research International*, 76, 74-78. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.024>

Villar Idoate, N. (2024). *Evaluación de la capacidad antioxidante de compuestos fenólicos* (Tesis de Maestría). Universidad Pública de Navarra.

Xu, B. J., & Chang, S. N. C. (2007). Comparative studies on antioxidant activities of nine common food legumes. *Journal of Food Science*, 72, 167-176. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00241.x>

Zhao, Y., Hou, Y., Tang, G., Cai, E., Liu, S., Yang, H., Zhang, L., & Wang, S. (2014). Optimization of ultrasonic extraction of phenolic compounds from *Epimedium brevicornum* Maxim and evaluation of antioxidant activities. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2014, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2014/864654>

AISLADOS PROTEICOS DE HARINAS DE GERMINADOS DE FRIJOL Y LENTEJA

María Soledad Córdova Aguilar, Tania Vianey Cruz Sandoval, Isadora Martínez Arellano
Laboratorio de Ingeniería de Proceso, ICAT-UNAM, Ciudad Universitaria, 04510, CDMX
marisol.cordova@icat.unam.mx

Resumen

En este proyecto se llevó a cabo la germinación de frijol y lenteja, seguida de la obtención de aislados proteicos de alta calidad y funcionalidad. Se establecieron condiciones controladas de temperatura y humedad para la germinación de las legumbres, asegurando más del 80% de semilla germinada en un estadio de radícula visible. Posteriormente, se obtuvieron harinas de ambos germinados y se realizó un barrido de pH para identificar el punto isoeléctrico, definiendo así las condiciones de extracción de los aislados proteicos mediante un proceso de hidrólisis alcalina a pH 10 y precipitación ácida a pH 1 y 3, respectivamente, en un reactor con control de pH y temperatura.

Las harinas de los aislados se secaron por aspersión y se caracterizaron fisicoquímica y funcionalmente. Esta caracterización incluyó parámetros como capacidad espumante, retención de agua y aceite, estabilidad de emulsión, color, actividad de agua, humedad, polifenoles, inhibidores de tripsina y grado de hidrólisis, además de realizar un análisis químico proximal y cuantificar la proteína digestible.

Con esta propuesta, se contribuye a la reducción de componentes indeseables, se mejora la digestibilidad de las proteínas, se aumenta la biodisponibilidad mineral y se generan aislados proteicos con propiedades tecnológicas beneficiosas. Estos aislados representan una alternativa valiosa y versátil para la industria alimentaria, siendo competentes para la elaboración de suplementos alimenticios de alta calidad nutricional y como ingredientes funcionales en la elaboración de productos como una harina para elaborar hot cakes.

Palabras clave: *aislados proteicos, germinados, , leguminosas*

Abstract

Black beans and lentils were germinated under controlled temperature and humidity conditions ensuring more than 80% of the seed germinated at a visible radicle stage. Flours from the germinated legumes underwent a pH sweep to identify the enabling optimized extraction of functional protein isolates via alkaline hydrolysis (pH 10) and acid precipitation (pH 4 or 1) in a temperature-controlled reactor.

The isolated flours were spray-dried and characterized for physicochemical and functional properties, such as foaming capacity, water/oil retention, emulsion stability, color, water activity, moisture, polyphenols, trypsin inhibitors, and degree of hydrolysis. Also, a proximate analysis and digestible protein determination were conducted. The approach proposed reduces antinutritional factors, enhances protein digestibility and mineral bioavailability, as well as yields isolates with greater technological attributes, offering a versatile, high-value alternative for being useful as ingredients for nutritional supplements and functional products like pancake mixes.

Key Words: *sprouts, protein isolates, legumes.*

Introducción

Las legumbres son el segundo grupo alimentario más producido mundialmente, solo por detrás de los cereales (Dave et al., 2024). Su versatilidad como fuente de proteínas para humanos y animales, junto con

su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico —mejorando la fertilidad del suelo y reduciendo fertilizantes sintéticos—, las posiciona como pilares de la sostenibilidad agrícola (Magrini, 2022). En las últimas décadas, han evolucionado como fuentes competitivas de proteínas vegetales

adaptables a diversos climas, ricas en carbohidratos complejos (de digestión lenta), fibra dietética, minerales, vitaminas del grupo B y bioactivos como compuestos fenólicos, vitamina C y tocoferoles (Maphosa & Jideani, 2017). El mercado latinoamericano de legumbres alcanzó 8.11 millones de toneladas en 2025 (Choudhury, 2025). El consumo de legumbres está fuertemente impulsado por su bajo costo y el aporte nutricional esencial que proporcionan a la dieta moderna (Guimond Ramos, J. C. 2020). Su alto contenido de fibra dietética contribuye a modular la glucosa postprandial y al metabolismo lipídico, lo que se traduce en una reducción de los niveles de colesterol, glucosa y triglicéridos (Ramdath, D. D., et al. 2016). Asimismo, este segmento se ha visto favorecido por la diversificación de los patrones alimentarios actuales, como el veganismo, el flexitarianismo y las dietas basadas principalmente en plantas (Dagevos, H. 2021; Alcorta et al., 2021), junto con una creciente conciencia por la salud del consumidor y el incremento del uso de harinas y aislados de legumbres en productos procesados (panadería, pastas, snacks), especialmente en la categoría de alimentos funcionales (Urtasun, 2021). A pesar de su riqueza nutricional, las legumbres presentan limitaciones en su digestibilidad y biodisponibilidad debido a compuestos antinutricionales, que dificultan la absorción de algunos nutrientes y causan molestias digestivas (Popova & Mihaylova, 2019).

La germinación constituye un proceso fisiológico que inicia el desarrollo embrionario de las legumbres, mediado por factores ambientales como la disponibilidad hídrica, la humedad, la luz, la temperatura, y la salinidad (Matilla, 2008; Joshi & Varma, 2016). Este tratamiento activa enzimas hidrolíticas que degradan antinutrientes (fitatos, taninos, oxalatos, inhibidores de proteasas), elevando la biodisponibilidad de minerales (Ca, Fe, Zn, Mg, Mn, Cu) y vitaminas (C, β -carotenos). Incrementa de manera relevante el contenido proteico hasta 25.4–37.2%, acompañado de hidrólisis proteica a péptidos y aminoácidos

libres, lo que eleva la digestibilidad y habilita la obtención de aislados proteicos de alta pureza (Xu et al., 2019; Guajardo et al., 2017), así como de fibra dietética: a 4.6–9.2%, con beneficios en la salud gastrointestinal y en la regulación glicémica (Setia, 2019), con reducción en tiempos de cocción (Gunenc et al., 2017; Guajardo et al., 2017). Las legumbres germinadas presentan mejoras cualitativas en propiedades termofuncionales como una menor entalpía de gelatinización del almidón, favoreciendo la digestibilidad, procesamiento térmico y aplicaciones industriales en harinas panificables, pastas y suplementos proteicos de origen vegetal (Gutiérrez, 2019).

Ante la creciente demanda en la industria alimentaria por productos sostenibles y nutritivos, los aislados proteicos derivados de leguminosas son una buena alternativa. Estas proteínas vegetales ofrecen un perfil de aminoácidos completo, alto contenido de fibra y micronutrientes bioactivos, contribuyendo a dietas funcionales contra enfermedades crónicas como diabetes y obesidad (Ed-Saadony et al., 2025). La forma más efectiva de maximizar su funcionalidad consiste en producir aislados (>80-90% de proteína en base seca), concentrados (50-90%) o harinas (<65%) a partir de leguminosas como chícharo, frijol, garbanzo o lenteja (Smiriti et al., 2023). El método más común es el fraccionamiento en húmedo, que involucra extracción alcalina a pH 8-9 (rendimientos del 70-90%), precipitación isoeléctrica a pH < 4.5 (típica de las globulinas de leguminosas) y la deshidratación por secado o liofilización. Estos pasos eliminan eficientemente antinutrientes (ej. inhibidores de tripsina, taninos), grasas y carbohidratos solubles, lo que genera alto rendimiento y pureza, junto con propiedades funcionales como emulsificación, formación de espuma, retención de agua/aceite y solubilidad. Estas características permiten superar las limitaciones sensoriales y funcionales de las leguminosas crudas, estableciendo a los aislados como ingredientes esenciales en

productos innovadores. Así, resultan adecuados para aplicaciones en análogos de carne (texturización por extrusión), bebidas (estabilidad coloidal) y panadería (mejora del volumen en panes sin gluten), entre otras aplicaciones pese a su menor capacidad gelificante (Yeasmen & Orsat, 2024).

Por tanto, este trabajo tuvo como objetivo obtener, caracterizar y aplicar aislados proteicos derivados de harinas obtenidas por germinación de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) y lenteja (*Lens culinaris* Medik.), mediante hidrólisis alcalina seguida de precipitación ácida.

Materiales y Métodos

Germinado de legumbres

Para el proceso de germinación, se utilizaron frijol negro y lenteja pardina secos, a los cuales previamente se les realizó una limpieza con la finalidad de eliminar impurezas y semillas dañadas. Posteriormente, se colocaron en charolas dentro de un germinador a las condiciones establecidas en la Tabla 1.

Tabla 1: Condiciones de germinación para legumbres

Legumbre	Condiciones de germinación
Lenteja	Temperatura de 21°C 76% de Humedad Aspersión cada 2 h De 4 a 5 días para germinar
Frijol	Temperatura de 24°C 80% de Humedad Aspersión cada 4 h De 7 a 10 días para germinar

Obtención de harinas de legumbres germinadas

Una vez finalizado el proceso de germinación, las semillas germinadas se secaron en un deshidratador de charolas (Avantco®) a una temperatura de 60°C durante 12 h. Con un robot industrial (Thermomix®), se molieron las semillas germinadas y secas para obtener una harina fina.

Determinación del punto máximo de solubilidad

Se dispersó 1.0 g de harina de germinado en 10 mL de agua. La mezcla fue centrifugada durante 30 min a 4000 rpm y se utilizó el sobrenadante para realizar un barrido de pH en el intervalo de 7 a 13, para identificar el punto de máxima solubilidad de las proteínas. La cantidad de proteína soluble se determinó mediante el reactivo de Bradford a una absorbancia de 595 nm (espectrofotómetro Shanghai Yoke Instrument 721 ®).

Hidrólisis alcalina

Se adicionaron 200 g de harina y 1 L de agua destilada a un reactor de vidrio con agitación y chaqueta, conectado a un baño térmico que permitió mantener la temperatura constante a 50 °C. Bajo agitación continua durante 1 h, se añadió hidróxido de sodio 1 N hasta alcanzar un pH de 10 para ambas harinas. La mezcla fue centrifugada durante 10 min a 5000 rpm, y el sobrenadante obtenido se almacenó en refrigeración.

Determinación del punto isoeléctrico

A 1 mL del sobrenadante obtenido tras la hidrólisis alcalina aforado a 10 mL con agua destilada, se le realizó un barrido de pH en el intervalo de 1 a 6, con el objetivo de identificar el punto de mínima solubilidad de las proteínas (punto isoeléctrico). La concentración de proteína soluble se determinó mediante el método de Bradford, midiendo la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (Shanghai Yoke Instrument 721 ®).

Precipitación ácida

Al sobrenadante obtenido de la hidrólisis alcalina se le añadió ácido clorhídrico 1 N bajo agitación constante, hasta alcanzar un pH de 1 en el caso de la harina de frijol y pH de 3 para la harina de lenteja. La mezcla fue centrifugada durante 10 min a 5000 rpm. El precipitado obtenido se solubilizó en la mínima cantidad de agua, se neutralizó con hidróxido de sodio 1 N y se almacenó en refrigeración.

Secado por aspersión

Para la obtención de los aislados en polvo, se realizó el secado del precipitado neutro en un secador por aspersión (Büchi Mini Spray Dryer B-290 ®), ajustando la temperatura de entrada a 140°C y temperatura de salida de 60°C, con un flujo de bomba de 15%, aspirador de 100% y un flujo de volumen de gas pulverizado de 37°C.

Caracterización de las propiedades de las harinas crudas y los aislados

Humedad (%)

Se pesaron 0.15 g de cada muestra (harinas y aislados) y se colocaron en una termobalanza (Sartorius ®). El equipo determinó el porcentaje de humedad de cada muestra por diferencia de masa, mediante la aplicación controlada de calor hasta alcanzar un peso constante.

pH

Se dispersó 1.0 g de cada muestra en 10 mL de agua destilada en tubos falcón. Se homogeneizó durante 20 segundos en un vortex (Vortexer ®) a 3000 rpm. El pH se midió en un potenciómetro (Science Med SM-38W ®).

Actividad de agua (a_w)

Se pesaron 0.5 g de cada muestra y se analizaron en un medidor de actividad de agua por punto de rocío (Aqualab 4TE, Meter Group ®), operado a una temperatura de 25 °C.

Capacidad de retención de agua (CRA):

La CRA se determinó mediante la metodología gravimétrica descrita por Aguilera (2010). Se pesaron 0.05 g de cada muestra y se dispersaron en 1.5 mL de agua destilada en tubos Falcon. La mezcla se homogeneizó durante 20 segundos a 3000 rpm. Posteriormente, se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 30 minutos, enseguida se centrifugó a 4000 rpm durante 30 minutos. Se decantó el sobrenadante y se pesó el tubo con el sedimento para calcular la capacidad de retención de agua.

Capacidad de retención de aceite (CRE):

La capacidad de retención de aceite se evaluó siguiendo el mismo procedimiento descrito por

Aguilera (2010), con la diferencia de que el medio de dispersión es aceite de soya. Tras decantar el sobrenadante, se determinó la masa del tubo con el sedimento para estimar la CRE.

Ambas propiedades (CRA y CRE) se determinan calculando la relación entre el líquido retenido y el peso seco de la muestra (Ecuación 1) (Smiriti, *et al.*, 2023).

$$CRA \text{ o } CRE = \frac{\text{Masa del sedimento} - \text{Masa de la muestra seca}}{\text{Masa de la muestra seca}} \quad (1)$$

Capacidad de espumado (CE):

La capacidad de espumado se determinó siguiendo la metodología descrita por Antonic, *et al.*, (2020). Se pesaron 0.2 g de cada muestra, que se dispersaron en 20 mL de buffer de fosfatos 0.2 M a pH 7. La mezcla se homogeneizó durante 90 segundos a 2200 rpm (Yeipower ®). El volumen de espuma generado se midió en una probeta graduada registrándose las variaciones cada 5 minutos durante un periodo total de 30 minutos. Esta propiedad se cuantifica utilizando la ecuación 2:

$$\%CE = \left(\frac{\text{Volumen total} - \text{Volumen inicial}}{\text{Volumen inicial}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Capacidad de gelificación (CG):

Se evaluó la capacidad de gelificación de cada muestra utilizando 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 g disueltas en 5 mL de agua destilada en tubos Falcon. Las mezclas se homogeneizaron durante 20 segundos a 3000 rpm y se colocaron en un baño de agua a 100 °C durante una hora. Inmediatamente se refrigeraron durante una hora. La formación de gel se evaluó cualitativamente mediante observación visual, según el criterio descrito por Chau y Cheung (1998).

Índice de actividad emulsionante (IAE): El IAE se determinó mediante la metodología espectrofotométrica descrita por Kim, *et al.*, (2021). Se pesaron 0.1 g de cada muestra, las cuales se dispersaron en 20 mL de buffer de fosfatos 0.2 M a pH 7. Se añadieron 20 mL de aceite de canola, y la mezcla se homogenizó durante 90 segundos a 2200 rpm (Yeipower

®). De la emulsión resultante se tomaron 50 µL, se añadieron 10 mL de una solución de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0.3% m/v. La absorbancia se midió a 500 nm (espectrofotómetro Shanghai Yoke Instrument 721 ®), para calcular el índice de actividad emulsionante. El Índice de Actividad Emulsionante (IAE) se calculó utilizando la ecuación 3:

$$IAE \left(\frac{m^2}{g} \right) = \frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times FD}{1000 \times L \times \theta \times C} \quad (3)$$

Donde:

- A_0 es la absorbancia a tiempo cero,
- FD es el factor de dilución de la muestra,
- L es el largo de la celda (1 cm),
- θ es la proporción de aceite (0.5), y
- C es la concentración de la fase acuosa (g/cm³), es decir, la concentración de prote

Grado de hidrólisis (GH):

Se determinó mediante el método volumétrico descrito por Taylor (1957). Para ello, se pesaron 0.750 g de cada harina y aislado proteico, los cuales se suspendieron en 25 mL de agua destilada. El pH de la mezcla se ajustó a 7.0 utilizando NaOH 0.1 N, se añadieron 5 mL de formaldehído al 38 % (v/v) y la solución se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se tituló con NaOH 0.1 N hasta alcanzar un pH de 8.5.

Se calcula el grado de hidrólisis mediante la siguiente ecuación 5:

$$\%GH = \frac{\% \text{ grupos amino libres}}{\% \text{ nitrógeno total}} \times 100 \quad (4)$$

% grupos amino libres =

$$\frac{(mL \text{ NaOH gastados})(concentración \text{ NaOH})(14.007)}{(g \text{ muestra})(1000)} *$$

100 (5)

Donde el porcentaje de grupos amino libres es calculado a partir del volumen de base gastada en la titulación, la concentración de la base, la cantidad de muestra utilizada y la masa molar del nitrógeno, y el nitrógeno total se determina mediante el método de Kjeldahl (ecuación 6).

$$\% \text{ nitrógeno total} = \frac{\% \text{ proteína cruda}}{6.25} \quad (6)$$

Polifenoles totales:

El contenido de polifenoles totales se determinó mediante el método de *Folin-Ciocalteu*, conforme a lo descrito por Pérez *et al.*, (2023). Se realizó la extracción de los compuestos fenólicos con la metodología de Hernández *et al.*, (2019). Para ello, se pesaron 1.0 g de muestra, a los que se añadieron 10 mL de agua destilada y 10 mL de etanol. El pH se ajustó a 3.3 con HCl al 1 %. La mezcla fue sometida a agitación durante 3 minutos, seguida de 15 min de sonicación, 30 min más de agitación y nuevamente 15 min de sonicación; posteriormente se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos (centrífuga VELAB VE-4000®). El sobrenadante obtenido se aforó a 25 mL con agua destilada.

A partir del extracto, se tomaron alícuotas de 40 µL, a las que se añadieron 200 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 3.2 mL de agua destilada. Tras un reposo de 8 minutos, se incorporaron 600 µL de una solución de buffer Na₂CO₃ al 20 % y la mezcla se incubó a 20 °C durante 2 horas. Finalmente, la absorbancia se midió a 765 nm (espectrofotómetro Shanghai Yoke Instrument 721 ®). La concentración de polifenoles totales se expresó como miligramos de equivalentes de ácido gálico por mililitro (mg EAG/mL, calculando los polifenoles totales (ec. 7):

$$\text{Polifenoles totales (mg EAG/g)} = \frac{C \times V}{m} \quad (7)$$

Donde C es la concentración obtenida de la curva (mg/mL), V es el volumen total del extracto (mL), y m es la masa de la muestra seca utilizada (g).

Análisis Químico Proximal (AQP):

Se realizó el análisis químico proximal de las harinas de germinados y de los aislados proteicos de acuerdo con los métodos oficiales descritos por la AOAC. Las determinaciones incluyeron: el contenido de proteína total, el extracto etéreo, el contenido de cenizas, la fibra cruda y el extracto libre de nitrógeno.

Proteína cruda y proteína digestible:

La determinación del contenido de proteína cruda se realizó mediante el método de Kjeldahl, conforme a lo descrito en la norma AOAC 2001.11. Por su parte, la proteína digestible se cuantificó a través de la prueba de digestibilidad con pepsina, siguiendo el procedimiento establecido en la norma AOAC 2015.971.09.

Unidades de Tripsina Inhibida (UTI):

La cuantificación de unidades de tripsina inhibida se realizó siguiendo la metodología descrita por Kakade *et al.*, (1974). A partir del extracto se realizaron diluciones seriadas. Para la preparación de los blancos de muestra, se añadieron a cada tubo 250 µL de solución de tripsina y 125 µL de ácido acético al 30 %. A las muestras, se agregaron 250 µL de tripsina a cada tubo, se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se añadieron 625 µL de la solución de BAPNA. Las muestras se incubaron 10 minutos a 37 °C. Se detuvo la reacción mediante la adición de 125 µL de ácido acético al 30 %. Adicionalmente, se preparó un tubo para la lectura de la absorbancia máxima, en el cual se colocaron 250 µL de agua destilada y 250 µL de tripsina; tras 5 minutos de reposo, se añadieron 625 µL de BAPNA, se incubó durante 10 minutos a 37 °C, y finalmente se agregaron 125 µL de ácido acético al 30 %.

De cada tubo se tomaron 250 µL y se transfirieron a una microplaca para la lectura de la absorbancia a 410 nm, utilizando un espectrofotómetro (BioTek Elx808®).

Formulación y elaboración de hot cakes

Se desarrollaron tres formulaciones distintas (Tabla 2).

Tabla 2: Formulaciones de *hot cakes* elaboradas a partir de 100 g de harinas.

INGREDIENTES (%)	FORMULACIONES		
	Control	F1	F2
Avena	25.56	25.56	25.56
Amaranto	4.66	4.66	4.66
Lenteja	4.66	0.00	4.66
Frijol	1.64	1.64	0.00
Aislado de frijol germinado	0.00	0.00	1.64
Aislado de lenteja germinada	0.00	4.66	0.00
Polvo para hornear	3.17	3.17	3.17
Jarabe de agave	1.98	1.98	1.98
Huevo	16.67	16.67	16.67
Aceite	1.98	1.98	1.98
Leche	39.68	39.68	39.68

Análisis de perfil de textura (TPA)

A las muestras de hot cakes se les realizó el análisis de perfil de textura utilizando un analizador de textura (Brookfield CT3®). Las propiedades evaluadas incluyeron dureza, cohesividad y masticabilidad.

Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. El análisis de los datos se realizó con el software estadístico XLSTAT®, versión 2024.3.0. Las diferencias en las propiedades tecno-funcionales entre las harinas germinadas y los aislados se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido de una prueba post hoc LSD (Least Significant Difference) para la comparación de medias. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas con un valor de $p < 0.05$.

Resultados

Germinado de legumbres

Los germinados de lenteja observados en la Figura 1 se encuentran en una fase avanzada de germinación, la cual corresponde al estado en el que, tras la imbibición y la emergencia de la radícula, se presenta un crecimiento evidente del hipocótilo y el epicótilo, generando tallos delgados y alargados. Sin embargo, la ausencia de luz durante el proceso ha provocado etiolación, evidenciada por tallos amarillentos y débiles, lo que indica

que todavía no han desarrollado hojas verdes capaces de realizar fotosíntesis (Xu, *et al.*, 2019).



Figura 1. Germinado de lenteja

Estudios realizados por Fouad & Ali (2015) han señalado que, entre los 3 y 6 días de germinación, tanto en lenteja como en frijol se producen incrementos significativos en aminoácidos libres, compuestos fenólicos, minerales, proteínas y solubilidad proteica, junto con reducciones en factores antinutricionales como fitatos y taninos.

Por su parte, las semillas de frijol (Figura 2) se encuentran en una etapa temprana de plántula, característica de la germinación epigea. Tras la ruptura de la testa, la radícula se convierte en raíz primaria y el hipocótilo se alarga formando un gancho que eleva los cotiledones hacia la superficie. En esta fase, las estructuras foliares aún no aparecen, por lo que la plántula depende de las reservas

nutritivas almacenadas en los cotiledones. No obstante, el embrión ya ha pasado de un estado latente a un organismo activo en crecimiento, consolidando el establecimiento inicial de la plántula.

Los rendimientos obtenidos para ambas harinas de germinados de frijol y lenteja alcanzaron hasta 80 % en ambos casos. Este valor es considerablemente alto en comparación con lo reportado en la literatura (Sotelo, *et al.*, 2022). Durante la germinación, las legumbres absorben agua, lo que activa enzimas endógenas (principalmente amilasas, proteasas y lipasas) y desencadena diversas reacciones bioquímicas, entre ellas la descomposición de macronutrientes como almidones y proteínas. Una vez concluido el proceso germinativo, es necesario someter las semillas a un proceso de secado para detener la actividad biológica.



Figura 2. Germinado de frijol

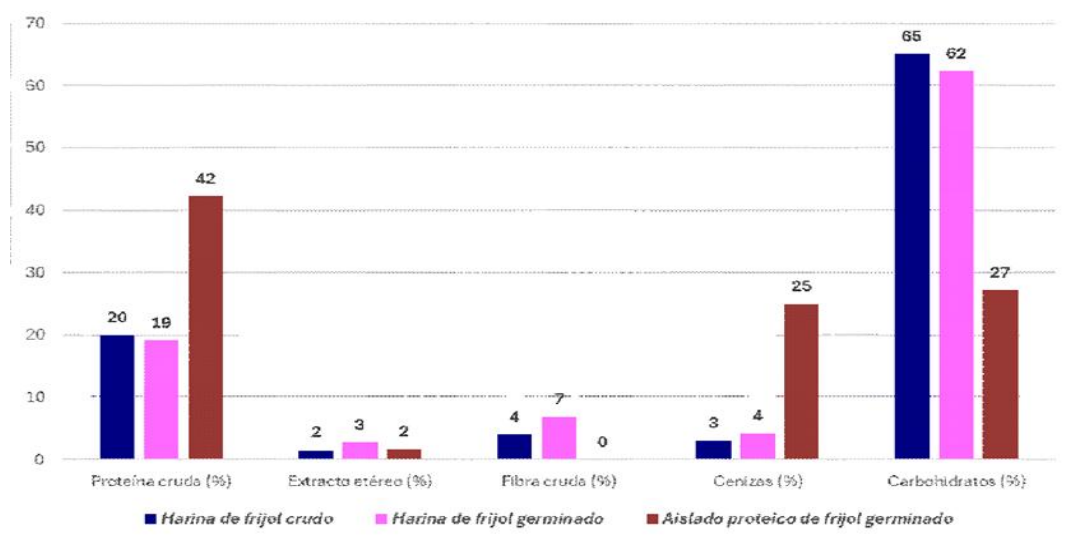


Figura 3. Valores de AQP de la harina de frijol crudo, harina de frijol germinado y del aislado obtenido del frijol germinado

El análisis químico proximal de las harinas y aislados obtenidos a partir de germinados de frijol y lenteja (Figuras 3 y 4) permite evaluar los efectos del proceso de germinación sobre la calidad nutricional y funcional de los aislados.

Se ha demostrado que la germinación puede promover un incremento en el contenido de proteína cruda, como resultado de la activación de rutas biosintéticas durante el desarrollo embrionario (Xu et al., 2019). En condiciones controladas de germinación (temperatura de 20 – 25°C) y humedad suficiente para mantener la imbibición y adecuada oxigenación, se desencadena la degradación de proteínas de reserva y la posterior síntesis de nuevas proteínas a partir de los aminoácidos liberados, lo que generalmente se refleja en un aumento del contenido proteico. El contenido de proteína

cruda se incrementó significativamente en el aislado en comparación con la harina, como resultado del proceso de extracción y concentración proteica, lo cual concuerda con el objetivo del aislamiento. Este aumento sustancial no solo confirma la efectividad del fraccionamiento alcalino e isoelectrico para concentrar proteínas, sino que también refleja un grado de purificación respecto a otros componentes, particularmente carbohidratos y fibra, que son eliminados o reducidos durante el proceso (Barac et al., 2015). En este contexto, el elevado contenido proteico del aislado de frijol germinado no solo representa una mejora nutricional, sino que también abre posibilidades para su uso como ingrediente funcional en formulaciones alimenticias con requerimientos de alto valor proteico, como alimentos fortificados, productos veganos o suplementos.

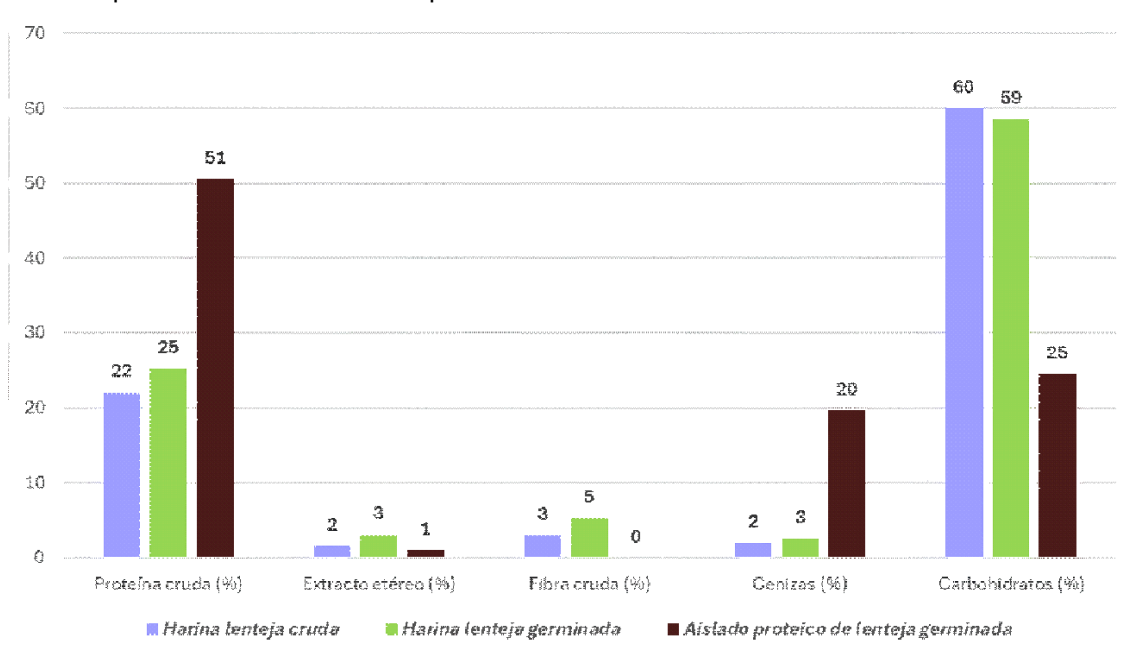


Figura 4. Valores de AQP de la harina lenteja cruda, harina de lenteja germinada y del aislado obtenido de la lenteja germinada

Aislados proteicos

Ambas harinas tuvieron un máximo de solubilización proteica a pH 10. En el caso de la harina de lenteja, además, se identificó un segundo punto de solubilidad a pH 13. Este comportamiento se atribuye a la mayor

heterogeneidad de las proteínas de lenteja, compuestas por diferentes fracciones como globulinas (legumina y vicilina) y albúminas, las cuales presentan distinta estabilidad y respuesta frente a condiciones alcalinas. El primer máximo, alrededor de pH 10,

corresponde a una solubilización funcional de la mayoría de las proteínas, mientras que el segundo máximo observado a pH 13 se relaciona con una solubilización forzada debida a la desnaturalización extrema de fracciones proteicas más resistentes. En estas condiciones, se rompen interacciones internas y se exponen regiones hidrofóbicas, lo que incrementa la solubilidad aparente, pero reduce la estabilidad térmica y afecta negativamente propiedades funcionales como la emulsificación y la gelificación. Además, el uso de pH extremos favorece fenómenos de agregación y precipitación posteriores, comprometiendo la funcionalidad tecnológica del aislado. Por estas razones, aunque la lenteja presente dos puntos de solubilidad, el pH 10 se consideró para la hidrólisis y extracción proteica, al ofrecer un mejor equilibrio entre alta solubilidad y conservación de la estructura proteica.

Es notable observar que el pH de la solubilidad máxima de las proteínas de las harinas de las legumbres germinadas fue más elevado que el de las harinas de legumbres crudas: pH 8 y 9 (Jarpa, 2017; Lima, *et al.*, 2025). Durante la germinación se llevan a cabo diversos cambios bioquímicos, entre ellos la activación de enzimas proteolíticas que modifican la estructura y carga de las proteínas. Este proceso, junto con la reducción de algunos compuestos antinutricionales como los fitatos, favorecen el aumento de la solubilidad proteica y el desplazamiento del pH de solubilidad máxima de las proteínas hacia valores más alcalinos (Ohanenye, *et al.*, 2020). Por otro lado, la determinación del punto de solubilidad mínima; es decir, el pH en el que se produce la mayor precipitación proteica, para la harina de germinado de frijol se alcanzó a pH 1, mientras que para la harina de germinado de lenteja, fue de pH 3.

El rendimiento del proceso en función de la cantidad de harina cruda utilizada y la masa total de aislado seco recuperado fue de 8.31% para el frijol y 7.63% para la lenteja. El bajo rendimiento de los aislados proteicos en

comparación con la harina de la legumbre cruda se debe principalmente a las pérdidas inherentes durante el proceso de extracción. Mientras que la harina de legumbre cruda contiene no solo proteínas, sino también almidones, fibra, lípidos y otros componentes, el aislado proteico es fundamentalmente un concentrado de la fracción proteica, lo que reduce de forma natural el rendimiento final en términos de masa (Stone, *et al.*, 2015).

La caracterización fisicoquímica y tecnofuncional de las harinas y los aislados obtenidos a partir de los germinados de frijol y lenteja se presenta en las figuras 5 y 6.

Los valores de % H, a_w y pH constituyen indicadores esenciales de estabilidad microbológica y funcional durante el almacenamiento y son valores que aseguran una vida útil prolongada.

La capacidad de espumado (CE) en los aislados es alta, lo cual se debe principalmente a la alta pureza y solubilidad. La elevada concentración de proteínas en los aislados incrementa su disponibilidad para migrar y estabilizar la interfase aire-agua, facilitando la formación de espumas estables. La capacidad de retención de agua (CRA) en aislados proteicos se incrementa debido a que la germinación causa cambios estructurales y se puede alterar la conformación proteica mediante la activación de enzimas endógenas, principalmente proteasas, lo que en algunos casos mejora la exposición de grupos hidrofílicos y, por ende, la CRA (Chai, *et al.*, 2018).

En la lenteja, se ha observado un aumento de la CRA en el aislado mientras que, en el aislado de frijol germinado, es menor el CRA. Esta diferencia se atribuye a que en el frijol se dio una hidrólisis proteica excesiva que genera péptidos de bajo peso molecular con menor capacidad de retención hídrica, así como a posibles reordenamientos estructurales que limitan la exposición de grupos polares funcionales. No se observaron diferencias significativas en la CRE entre la harina de legumbre y su aislado proteico.

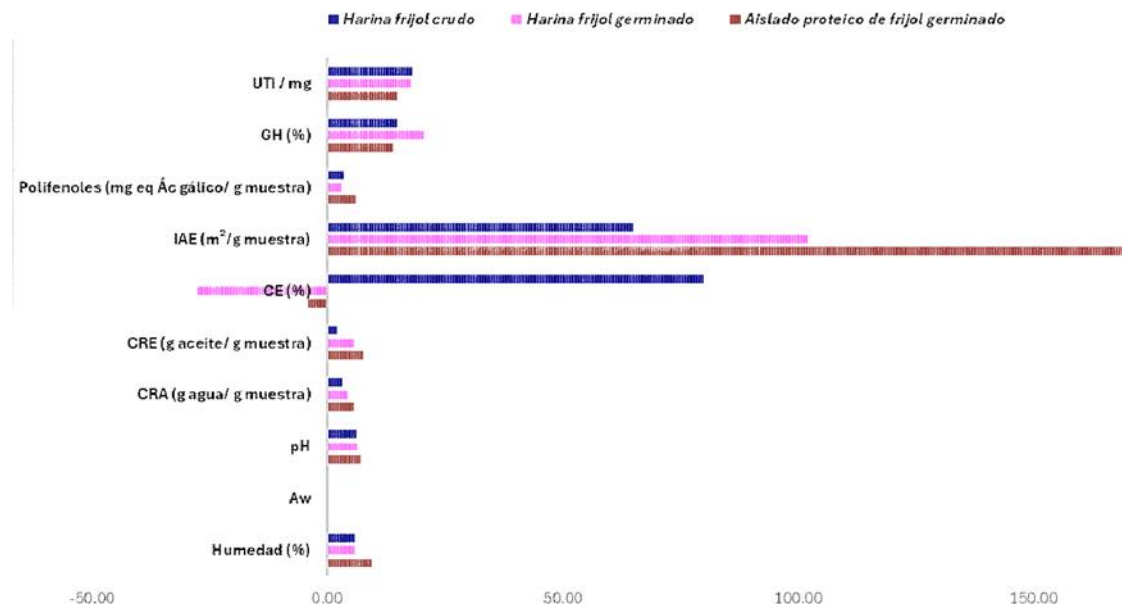


Figura 5. Características fisicoquímicas y funcionales de las harinas y aislados obtenidos a partir de germinados de frijol.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Sotelo *et al.*, (2022), quienes indican que la germinación no induce cambios relevantes en esta propiedad. Por su parte, el índice de actividad emulsificante (IAE) se incrementa debido a que la germinación contribuye positivamente al IAE, al inducir una hidrólisis parcial de las proteínas y mejorar su solubilidad y a que en el aislado, se da la remoción de compuestos no proteicos (como almidones, fibras y compuestos fenólicos), que permite una mayor concentración de fracciones proteicas activas con mayor afinidad superficial. Además, la extracción alcalina y la precipitación isoeléctrica, utilizadas comúnmente en la obtención de aislados, pueden inducir cambios estructurales que favorecen la exposición de dominios hidrofóbicos, facilitando la adsorción en la interfase aceite-agua (Sotelo *et al.*, 2022).

Se observó un aumento significativo en el contenido de polifenoles en los aislados proteicos, lo cual puede atribuirse a la retención selectiva de metabolitos fenólicos durante el proceso de extracción alcalina e isoeléctrica. A pesar de que el objetivo principal de la extracción es obtener

fracciones ricas en proteína, se ha documentado que ciertos polifenoles hidrosolubles, especialmente flavonoides y ácidos fenólicos, precipitan o permanecen adsorbidos a las proteínas durante el fraccionamiento, particularmente cuando existen interacciones no covalentes como puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas (Nguyen, *et al.*, 2019). Este efecto es más notable cuando la germinación ha inducido previamente la síntesis y activación de enzimas fenilpropanoides, como la fenilalanina amoníaco liasa (PAL), que incrementan la biosíntesis de compuestos fenólicos como respuesta a estrés oxidativo (Guajardo *et al.*, 2017). Así, la germinación y el aislamiento proteico actúan de forma sinérgica, potenciando la acumulación relativa de polifenoles en el producto final.

Hay un comportamiento diferenciado entre frijol y lenteja en cuanto al grado de hidrólisis (GH). En el aislado de frijol germinado disminuyó significativamente, mientras que aumentó en el de lenteja germinada. Estas diferencias podrían explicarse por factores intrínsecos de cada leguminosa, como su composición proteica y la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática durante la germinación y

el aislamiento. En el frijol, proteínas como la faseolina podrían haber resistido la hidrólisis o precipitado intactas durante la extracción, reduciendo el GH final (Carrillo *et al.*, 2021). En contraste, en lenteja germinada se ha reportado un incremento en la actividad de enzimas endógenas como proteasas y peptidasas, lo cual facilita una hidrólisis más extensa, generando fragmentos peptídicos más pequeños que permanecen solubles durante el aislamiento (Linsberger, *et al.*, 2022).

Existe una disminución significativa en el contenido de los inhibidores de tripsina (UTI/mg) en los aislados proteicos. Esta reducción se debe tanto al efecto de la germinación como al procesamiento de

aislamiento. Durante la germinación, se activan enzimas que degradan parcialmente estos inhibidores como parte del metabolismo de reservas (El-Mergawi *et al.*, 2019). Posteriormente, en la extracción alcalina y precipitación isoeléctrica, los inhibidores tienden a permanecer en la fase soluble, mientras que las proteínas precipitan, favoreciendo así su separación (Rehman *et al.*, 2022). Además, las condiciones alcalinas extremas pueden desnaturalizar e inactivar estructuralmente estos compuestos (Rani, *et al.*, 2020). Como resultado, los aislados no solo presentan mayor concentración proteica, sino también menor presencia de antinutrientes.

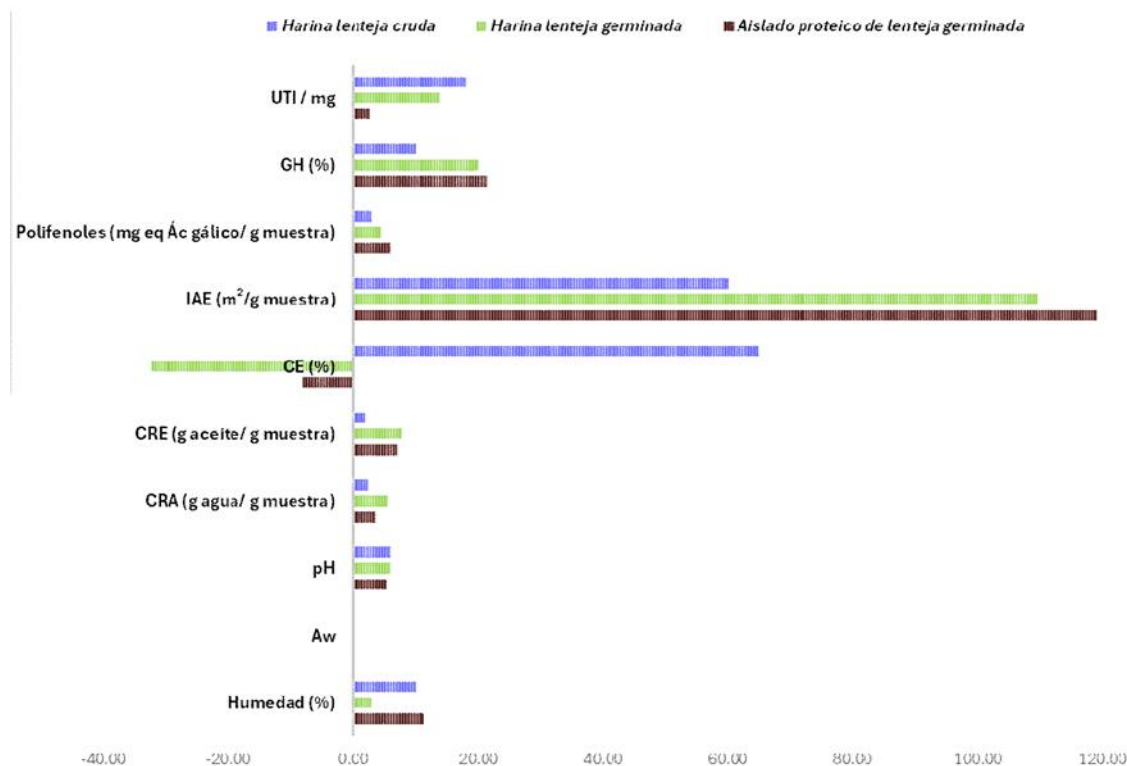


Figura 6. Características fisicoquímicas y funcionales de las harinas y aislados obtenidos a partir de germinados de lenteja.

En cuanto al contenido de proteína cruda y digestible, se observó un incremento significativo en ambos parámetros de los aislados proteicos en frijol y lenteja germinados. En el caso del aislado de frijol, la proteína cruda es de 44.01 %, mientras que la proteína digestible es de 43.79 %. De manera

similar, en la lenteja, el contenido de proteína cruda es 52.81 %, y la proteína digestible es de 50.67 % (figura 7). Estos resultados evidencian la eficiencia del proceso de extracción y aislamiento proteico en la concentración y mejora de la calidad de las proteínas.

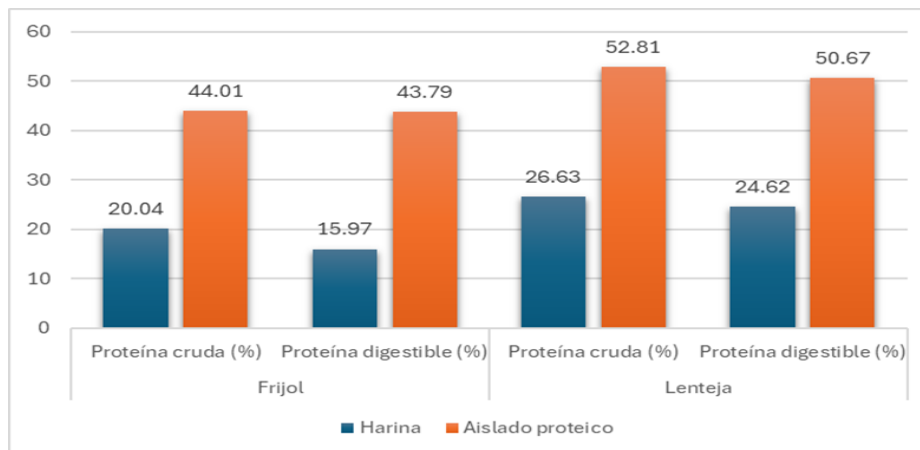


Figura 7. Proteína cruda y proteína digestible de las harinas y aislados de frijol y lenteja germinados

El aumento en la digestibilidad observado en los aislados puede deberse a la desnaturalización parcial de las proteínas por el tratamiento alcalino durante la digestión (Gunenc et al., 2017), aunado a la reducción de inhibidores de proteasas durante la germinación al mejorar la accesibilidad de las proteínas a las enzimas digestivas (Kaur & Singh, 2017).

Aplicación

En la figura 8 se presenta el análisis de perfil de textura de los *hot cakes* elaborados con harinas cocidas y con los aislados obtenidos de los germinados. En general, la incorporación de los aislados no afectó negativamente las propiedades de estructura interna ni la facilidad de masticación. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en la deformación y la adhesividad, siendo más alta en los *hotcakes* con lenteja, lo que podría mejorar la percepción de jugosidad en boca (Škrbić, et al., 2022), aunque en exceso puede ser desfavorable para productos de consumo rápido. La dureza en ambos ciclos fue ligeramente mayor en el tratamiento con aislado de frijol, seguido por lenteja y el control, lo cual sugiere una mayor firmeza en la mordida inicial (Ares et al., 2016). La fracturabilidad presentó la misma tendencia, indicando que la incorporación de aislados no

debilitó la estructura del producto. La deformación fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en los *hotcakes* con lenteja germinada (50.03 %), lo que implica una mayor capacidad de elasticidad antes de romperse, confiriendo una textura más suave y flexible, favorable para la percepción sensorial (Rosell et al., 2020).

El *hotcake* elaborado con aislado de lenteja germinada mostró mejor desempeño sensorial y funcional, al presentar mayor deformación y adhesividad, propiedades deseables para productos suaves y de buena palatabilidad.

Las formulaciones experimentales mostraron superioridad en el contenido proteico. El *hotcake* de lenteja germinada contiene 19 g de proteína, seguido por el aislado de frijol germinado con 18 g, y el control (mezcla con legumbres cocidas) con 17 g. En contraste, la mezcla comercial presenta sólo 7.87 g de proteína, lo que evidencia la funcionalidad de los aislados proteicos de leguminosas germinadas como ingredientes enriquecedores del valor proteico.

Otro de los aspectos más destacables de los *hot cakes* experimentales es su contenido de fibra dietética, que oscila entre 8 y 9 g, frente a apenas 1.1 g en la harina comercial. Esto representa una mejora importante en términos de funcionalidad y beneficios para la salud digestiva.

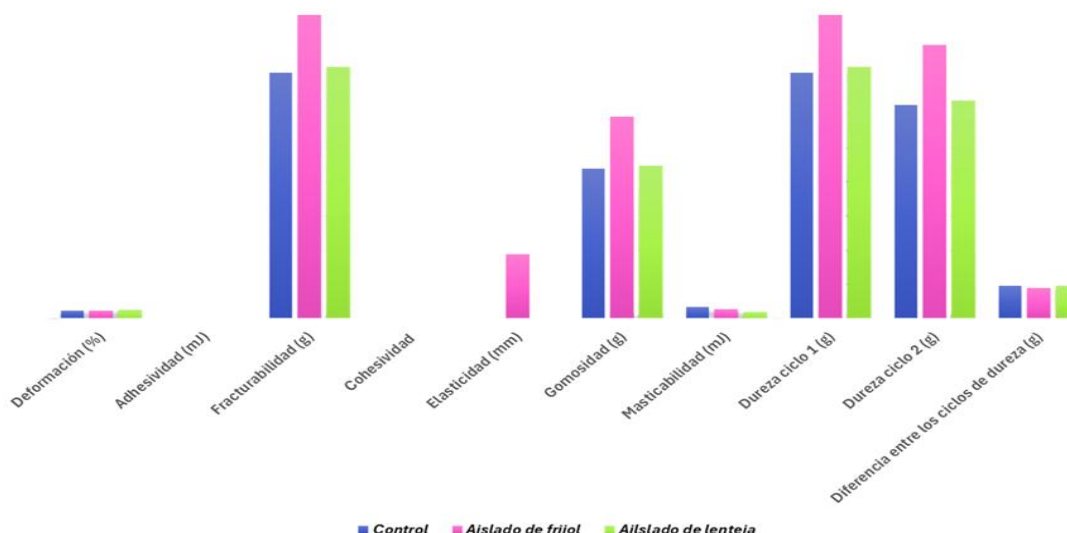


Figura 8. Perfil de textura de los *hot cakes* elaborados con harinas cocidas y aislados proteicos de frijol y lenteja.

Conclusiones

La germinación mejoró las propiedades funcionales de los aislados de frijol y lenteja, destacando una mayor solubilidad, capacidad emulsificante y formación de geles para el caso del frijol germinado. En contraste, en el caso de la lenteja germinada se observó una reducción significativa de inhibidores de tripsina, un mayor contenido de polifenoles y un grado de hidrólisis elevado, lo que refleja un mayor potencial nutricional y funcional frente al frijol.

El proceso de extracción alcalina seguido de precipitación isoelectrónica aplicado a harinas de leguminosas germinadas resultó altamente eficaz, ya que permitió obtener aislados con un incremento significativo en el contenido de proteína cruda y en la digestibilidad proteica.

La incorporación de aislados proteicos obtenidos de leguminosas germinadas representa una estrategia efectiva para mejorar la calidad nutricional de los alimentos, al tiempo que ofrece una alternativa viable para el desarrollo de productos más saludables y con propiedades funcionales superiores.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Lucio Abel Vázquez León, del SECIHTI-Instituto Tecnológico de Tehuacán, por el apoyo

técnico brindado en el proceso de secado por aspersión de los aislados.

Referencias

Aguilera, Y., 2010. *Harinas de leguminosas deshidratadas: caracterización nutricional y valoración de sus propiedades tecnofuncionales*. [Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias].

Alcorta A, Porta A, Tárrega A, Alvarez MD, Vaquero MP. Foods for Plant-Based Diets: Challenges and Innovations. *Foods*. 2021 Feb 1;10(2):293. <https://doi.org/10.3390/foods10020293>.

Antonic, B., Dordevic, D., Jancikova, S., Tremlova, B., Nejezchlebova, M., Goldová, K., Tremel, J., 2021. Reused plant fried oil: A case study with home-made soaps. *Processes*. 9(3), 529

Ares, G., & Varela, P., 2016. Multivariate analysis in sensory and consumer science: Application of statistical methods. *Woodhead Publishing*.

Barac, M., Cabrilo, S., Stanojevic, S., Pesic, M., Zilic, S., Macej, O., 2015. Profile and functional properties of seed proteins from six pea (*Pisum sativum*) genotypes. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(6), 1364–1371.

- Carrillo, A., Serna, S., & Chuck, C., 2021. Isolation and characterization of protein concentrates and hydrolysates from germinated beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Biochemistry*, 45(1), e13594.
- Chai, W., Zhang, C., Liu, Y., Liu, X., 2018. Effect of germination on nutritional and physicochemical properties of chickpea protein isolate. *Food Chemistry*, 262, 1–8.
- Chau, C. & Cheung, P., 1998. Functional properties of flour prepared from three Chinese indigenous legume seeds. *Food Chemistry*, 61, 429–433.
- Choudhury, N.R., (2025). Latin America Pulses Market Outlook – Size, Demand & Forecast 2025–2035. May 2025. www.futuremarketinsights.com/reports/latin-america-pulses-market.
- Dagevos, H. (2021) Finding flexitarians: Current studies on meat eaters and meat reducers, *Trends in Food Science & Technology*, 114: 530–539, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.021>.
- Dave, K., Kumar, A., Dave, N., Jain, M., Dhanda, P. S., Yadav, A., & Kaushik, P. (2024). Climate Change Impacts on Legume Physiology and Ecosystem Dynamics: A Multifaceted Perspective. *Sustainability*, 16(14), 6026. <https://doi.org/10.3390/su16146026>.
- El-Mergawi, R., Othman, B., & Dawood, M., 2019. Effect of germination on trypsin inhibitors and nutritional quality of some legume seeds. *Legume Research*, 42(2), 270–275.
- El-Saadony MT, Saad AM, Mohammed DM, Alkafaas SS, Abd El-Mageed TA, Fahmy MA, Ezzat Ahmed A, Algopishi UB, Abu-Elsaoud AM, Mosa WFA, AbuQamar SF, El-Tarabily KA. Plant bioactive compounds: extraction, biological activities, immunological, nutritional aspects, food application, and human health benefits-A comprehensive review. *Front Nutr*. 2025 Dec 19;12:1659743. <https://doi.org/10.3389/fnut.2025.1659743>.
- Fouad AA, Rehab FM. Effect of germination time on proximate analysis, bioactive compounds and antioxidant activity of lentil (*Lens culinaris Medik.*) sprouts. *Acta Sci Pol Technol Aliment*. 2015 Jul-Sep;14(3):233–246. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2015.3.25>.
- Guajardo, D., Gutiérrez, J. & Serna, S., 2017. Phenolic content and antioxidant capacity of dehydrated germinated legumes. *Journal of Food Composition and Analysis*, 62, 250–256.
- Guimond R., J.C. (2020). Relación entre el nivel de ingreso y el consumo de alimentos de baja calidad nutricional *Tesis de Maestría en Desarrollo Regional*, CIAD. <https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jsp/ui/bitstream/1006/1554/1/Juan%20Carlos%20Guimond%20Ramos.pdf>.
- Gunenc, A., Abdelhamid, A., El-Sohaimy, S., & Al-Subaie, A., 2017. Effect of germination on the nutritional and antinutritional properties of legumes: A review. *Legume Science*, 5(4), e138.
- Gutiérrez, J., 2019. *Influencia de la Germinación sobre los cambios microestructurales del almidón de cebada*. [Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos. Hidalgo, México. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.]
- Jarpa, M., 2018. Lentil protein: a review of functional properties and food application. An overview of lentil protein functionality. In *International Journal of Food Science and Technology*, 53, 892–903
- Joshi P, Varma K., 2016. Efecto de la germinación y el descascarado en el valor nutritivo de la soja. *Nutrition & Food Science*, 46, 595–603.
- Kakade, M., Rackis, J., McGhee, J., & Puski, G., 1974. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chemistry* 51(3), 376–82.
- Kaur, M., & Singh, N., 2017. Protein isolates from different legumes: Physicochemical, functional and nutritional properties. *Legume Science*, 5(2), 54–62.
- Kim, T., Yong, H., Kang, M., Jung, S., Jang, H., Choi, Y., 2021. Effects of high hydrostatic pressure on technical functional properties of

edible insect protein. *Food Science of Animal Resources*, 41, 185.

Lima, J., Azevedo, T., Galdeano, M., Felberg, I., Mellinger, C., 2025. Common bean processing to obtain a protein ingredient for the plant-based market. *Brazilian Journal of Food Technology*, 28.

Linsberger, G., Lametsch, R., & Meinlschmidt, P., 2022. Germination as a tool to improve the functional and nutritional quality of legumes: A review. *Food Research International*, 152, 110899.

Magrini, A. Assessment of agricultural sustainability in European Union countries: a group-based multivariate trajectory approach. *ASTA Adv Stat Anal* **106**, 673–703 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10182-022-00437-9>.

Maphosa, Y. & Jideani, A., 2017. The role of legumes in human nutrition. In M. C. Hueda. Ed.12, *IntechOpen*, pp. 103.

Matilla, A. (2008). "Desarrollo y germinación de las semillas." *Fundamentos de fisiología vegetal* 2: 549.

Nguyen, T., Nguyen, T., & Vuong, Q., 2019. Impact of protein–polyphenol interaction on the functional and biological properties of legume proteins. *Current Opinion in Food Science*, 28, 1–7.

Ohanenye, I., Tsopmo, A., Ejike, C., Udenigwe, C., 2020. Germination as a bioprocess for enhancing the quality and nutritional prospects of legume proteins. In *Trends in Food Science and Technology*, 101.

Perez, M., Dominguez, I., & Lamuela, R., 2023. The Chemistry Behind the Folin-Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(46), 17543–17553

Popova A, Mihaylova D. Antinutrients in Plant-based Foods: A Review . *Open Biot J*, 2019; 13: <http://dx.doi.org/10.2174/1874070701913010068>.

Ramdath D, Renwick S, Duncan AM. The Role of Pulses in the Dietary Management of Diabetes. *Can J Diabetes*. 2016 Aug;40(4):355-63. <https://doi.org/10.1016/j.cjcd.2016.05.015>.

Rani, A., Singh, A., Sharma, N., & Chauhan, G., 2018. Comparative assessment of physicochemical and nutritional properties of protein isolates from legumes. *Journal of Food Science and Technology*, 55(8), 3150–3158.

Rehman, Z., 2022. Protein extraction and antinutritional factor reduction from legume flours using alkaline and isoelectric precipitation methods. *Food Bioscience*, 47, 101692.

Rosell, C. M., Bajerska, J., & Lamothe, L., 2020. Understanding texture and texture-modifying ingredients in bakery products. In *Bread and bakery products* (pp. 145–178).

Setia, R., Sharma, P., & Singh, R., 2019. Functional properties of sprouted pulse flours and their application in bakery products. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(8), 2301–2309.

Škrbić, B., Filipčev, B., & Ćurić, D., 2022. Effect of flour type and dietary fiber addition on texture and sensory properties of baked goods. *Food Science and Nutrition*, 10(1), 181–191.

Smiriti, A., Kumar, A., & Singhal, R., 2023. Advances in extraction and functional applications of legume proteins: A review. *Food Hydrocolloids*, 137, 108288.

Sotelo, I., Delgado, E., Heredia, E., García, S., Jacobo-Velázquez, D., 2022. Effect of germination on the functional properties of legume flours and their protein isolates. *LWT. Food Science and Technology*, 154.

Taylor, W., 1957. Formol Titration: An Evaluation of its Various Modifications. *Analyst*, 82(976), 488–498.

Urtasun, L. (2021) Mimetizar las características nutricionales y sensoriales, el reto de la "nueva ola" de proteínas alternativas, *Tecnología alimentaria y packaging* 35: 38-39.

Artículos

Xu, B., Zhang, Y., & Wang, S., 2019. Impact of germination on nutritional and physicochemical properties of legumes: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 86, 1–13.

Yeasmen, N., & Orsat, V.(2025). Industrial processing of chickpeas (*Cicer arietinum*) for protein production. *Crop Science*, 65, e21361. <https://doi.org/10.1002/csc2.21361>

FORMULACIÓN Y EVALUACIÓN *IN VITRO* DE HIDROGEL TERMOSENSIBLE COMO SISTEMA DE LIBERACIÓN INTRAVAGINAL DE FÁRMACOS

Gladys Arline Politrón*, Moisés Martínez, Rogelio Rodríguez, Zaira Yunuen García, Aldo Fernando Corona, Nathaly Vasquez.

*Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C.,
Biotecnología Médica Farmacéutica, Guadalajara, Jalisco, 44270.
glpolitron_al@ciatej.edu.mx*

Resumen

El cáncer cervicouterino continúa siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en mujeres a nivel mundial, lo que impulsa la búsqueda de alternativas terapéuticas más eficaces y menos invasivas. En este estudio se desarrolló un hidrogel termosensible para la liberación intravaginal de ibuprofeno, evaluando propiedades fisicoquímicas clave como el perfil de hinchamiento, la viscosidad y la especificidad del método analítico. Mediante un diseño de mezclas se optimizaron las concentraciones de Pluronic® F127, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y Carbopol® 940. La formulación seleccionada presentó una viscosidad superior a 2.5×10^6 mPa·s a 37 °C en reposo, garantizando estabilidad bajo condiciones fisiológicas, así como un perfil de hinchamiento con una relación de absorción (SR) máxima de 2.08 y una retención de agua (WRR) de 353 % en las primeras 3 h. El análisis espectrofotométrico confirmó la especificidad para la detección de ibuprofeno a 222 nm sin interferencias. Los ensayos de citotoxicidad en células HeLa mostraron que la combinación secuencial de ibuprofeno y cisplatino redujo significativamente la viabilidad celular en comparación con los tratamientos individuales, sugiriendo un posible efecto aditivo. En conjunto, estos hallazgos respaldan el potencial de este hidrogel termosensible como plataforma innovadora para la liberación controlada de fármacos.

Palabras Claves: *hidrogel termosensible, liberación de fármacos, citotoxicidad.*

Abstract

Cervical cancer remains one of the leading causes of morbidity and mortality among women worldwide, driving the search for more effective and less invasive therapeutic alternatives. In this study, a thermosensitive hydrogel was developed for the intravaginal delivery of ibuprofen, and key physicochemical properties—including swelling behavior, viscosity, and analytical specificity—were evaluated. A mixture design was applied to optimize the concentrations of Pluronic® F127, hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), and Carbopol® 940. The selected formulation exhibited a viscosity exceeding 2.5×10^6 mPa·s at 37 °C under static conditions, ensuring stability under physiological conditions, and demonstrated a swelling ratio (SR) of 2.08 and a water retention ratio (WRR) of 353 % within the first 3 h. UV–Vis spectrophotometric analysis confirmed specific detection of ibuprofen at 222 nm without interference from excipients or medium components. Cytotoxicity assays in HeLa cells revealed that sequential treatment with ibuprofen followed by cisplatin significantly reduced cell viability compared with individual treatments, suggesting a potential additive effect. These findings support the potential of this thermosensitive hydrogel as an innovative platform for controlled drug delivery.

Key Words: *thermosensitive hydrogel, drug delivery, cytotoxicity*

Introducción

El cáncer cervicouterino es una de las neoplasias malignas más prevalentes en mujeres a nivel mundial, ocupando el cuarto lugar en incidencia y causando aproximadamente 342 000 muertes anuales (Saha et al., 2024; Jacob et al., 2021). Los tratamientos actuales dependen en gran medida del estadio clínico de la enfermedad e incluyen cirugía, quimioterapia, radioterapia o combinaciones de estas modalidades (Kiseleva et al., 2023). A pesar de los avances en diagnóstico y tratamiento, la mortalidad asociada a esta patología continúa siendo alarmante, principalmente debido a las limitaciones de las terapias convencionales. Si bien estos enfoques pueden resultar efectivos en determinados casos, suelen provocar efectos secundarios severos, toxicidad en órganos vitales y un riesgo considerable de infertilidad, lo que subraya la necesidad de desarrollar alternativas terapéuticas más seguras y eficaces (Ciolacu et al., 2020; AlAnsari et al., 2024).

En este contexto, la administración local de fármacos por vía vaginal surge como una estrategia prometedora para mejorar la eficacia del tratamiento del cáncer cervicouterino. La alta permeabilidad del epitelio cervicovaginal facilita la absorción de medicamentos; sin embargo, alcanzar concentraciones terapéuticas óptimas en el sitio tumoral representa un desafío. Por ello, resulta fundamental explorar sistemas de liberación controlada que minimicen la toxicidad sistémica y optimicen la entrega de agentes terapéuticos (Martins dos Santos et al., 2020). Entre las alternativas emergentes, los hidrogeles se destacan como biomateriales versátiles para la administración de fármacos. Estos sistemas pueden diseñarse para liberar principios activos de manera controlada y sostenida, lo que permite una distribución localizada en el sitio tumoral.

En particular, el ibuprofeno representa un candidato interesante para este tipo de sistemas debido a su doble acción antiinflamatoria y antitumoral. Este fármaco ejerce su efecto principalmente a través de la inhibición no selectiva y reversible de las enzimas ciclooxigenasas COX-1 y COX-2, las cuales catalizan la formación de prostaglandinas proinflamatorias como PGE₂ y PGI₂ a partir del ácido araquidónico (Saha et

al., 2024). Más allá de su acción antiinflamatoria, el ibuprofeno ha mostrado efectos antitumorales en diversos modelos, atribuidos a la supresión de prostaglandinas que promueven la proliferación celular, la angiogénesis y la evasión de la apoptosis. La administración local de ibuprofeno ofrece ventajas significativas frente a la vía sistémica, ya que permite alcanzar concentraciones terapéuticas elevadas directamente en el microambiente tumoral, reduciendo la exposición sistémica y, por ende, los efectos adversos gastrointestinales, renales y cardiovasculares asociados a la administración oral o parenteral. Esta estrategia no solo optimiza la biodisponibilidad local, sino que también podría potenciar la actividad antineoplásica del fármaco al mantener una inhibición sostenida de las COX en el sitio de acción (Ciolacu et al., 2020).

En conjunto, el desarrollo de hidrogeles termosensibles para la liberación intravaginal de ibuprofeno representa una alternativa innovadora para el tratamiento del cáncer cervicouterino, al combinar la eficacia antiinflamatoria y antitumoral del fármaco con las ventajas de una administración localizada y controlada. En este estudio se plantea el desarrollo y la evaluación *in vitro* de un hidrogel termosensible que, además de cumplir con las propiedades mecánicas requeridas, exhiba potencial para liberar ibuprofeno de forma eficiente bajo condiciones fisiológicas, contribuyendo así a optimizar la eficacia del tratamiento del cáncer cervicouterino.

Materiales y Métodos

Materiales

Pluronic F127 (Sigma-Aldrich, USA), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), Carbopol® 940, sal de ibuprofeno (α -Methyl-4-(isobutyl)phenylacetic acid) (Sigma-Aldrich, USA) y trietanolamina de grado analítico fueron utilizados en las formulaciones.

Métodos

Diseño de mezclas

La optimización de las formulaciones de hidrogeles se realizó mediante un diseño de mezclas, considerando tres polímeros: Pluronic F127 (PF127), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y Carbopol 940 (CP 940) en el software R Studio. Este tipo de diseño se caracteriza porque la suma

de los componentes debe ser igual a 100%, lo que impone una dependencia entre las proporciones y restringe la manipulación independiente de cada componente (Eriksson et al., 1998). En el presente estudio, los rangos de concentración establecidos según lo reportado fueron 15–20% para PF127 y 0.1–0.5% para HPMC y Carbopol 940.

Dado que los valores originales de concentración no sumaban 100%, se implementó un procedimiento de normalización para adaptar los datos al diseño de mezclas y permitir su correcta representación en un diagrama ternario. Inicialmente, cada componente fue re-escalado de forma individual, de manera que su valor mínimo se correspondiera con 0 y el máximo con 1, transformando así las concentraciones originales en valores relativos comparables. Posteriormente, los valores re-escalados de los tres polímeros se ajustaron de manera que la suma total en cada formulación fuera igual a 100%, preservando las proporciones relativas. Esta estrategia permitió representar todas las formulaciones dentro de un triángulo experimental, en el que los vértices corresponden a la concentración máxima de un polímero y los puntos internos reflejan combinaciones intermedias. El enfoque aplicado asegura que cada formulación cumpla con la restricción de suma total y facilita la optimización de la mezcla para alcanzar las propiedades reológicas deseadas en los hidrogeles.

Formulación de hidrogel

Las formulaciones de hidrogel se prepararon mediante el método en frío (4 °C) según lo reportado por Bilensoy et al., 2006, siguiendo las concentraciones definidas en el diseño de mezclas. Inicialmente, se hidrató Carbopol 940 (0.1 % p/p) en agua destilada durante 24 h. Posteriormente, se disolvió Pluronic® F127 (17 % p/p) bajo agitación constante a 4 °C durante 3 h hasta obtener una solución homogénea. A continuación, se incorporaron los componentes en el siguiente orden: hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) (0.3 % p/p), Carbopol 940 (0.1 % p/p, previamente hidratado) e ibuprofeno (disuelto previamente en una pequeña cantidad de agua para favorecer su dispersión). La mezcla se mantuvo en agitación a 4 °C durante la noche para asegurar su completa disolución.

Finalmente, el pH de la formulación se ajustó a valores fisiológicos mediante la adición de trietanolamina, favoreciendo la reticulación del Carbopol. Las formulaciones terminadas se almacenaron a 4 °C hasta su caracterización.

Medición de viscosidad

La viscosidad de las formulaciones obtenidas se evaluó utilizando un viscosímetro rotacional (Anton Paar) a 25 °C y 37 °C. Las mediciones se realizaron en condiciones de reposo simulado (0.2 rpm) y bajo velocidades de cizallamiento de 10, 20 y 50 rpm. Se registraron los valores de viscosidad antes y después del proceso de esterilización para comparar posibles variaciones.

Preparación de fluido vaginal simulado (FVS)

El fluido vaginal simulado (FVS) se preparó disolviendo 1.755 g de cloruro de sodio (NaCl), 0.700 g de hidróxido de potasio (KOH), 0.111 g de hidróxido de calcio $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 0.009 g de albúmina, 1.000 g de ácido láctico ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$), 0.500 g de ácido acético (CH_3COOH), 0.080 g de glicerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$), 0.200 g de urea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) y 2.500 g de dextrosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) en agua destilada. La solución se llevó a un volumen final de 500 ml y el pH se ajustó a 4.6 o 7.0, según el ensayo correspondiente, utilizando ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio (NaOH) para lograr el valor deseado (Marques et al., 2011).

Perfil de hinchamiento

La capacidad de hinchamiento de los hidrogeles se evaluó en FVS a 37 °C durante el periodo de incubación establecido. En intervalos de tiempo predeterminados, los hidrogeles se retiraron del medio, se secaron suavemente con papel filtro para eliminar el exceso de líquido superficial y se pesaron. La relación de hinchamiento (SR) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$SR = \frac{W_t - W_0}{W_0}$$

donde W_t corresponde al peso del hidrogel hidratado en el tiempo t y W_0 al peso inicial en estado seco.

Determinación de la longitud de onda máxima de absorción de la luz UV

La longitud de onda de máxima absorción del ibuprofeno se determinó mediante espectrofotometría UV-Vis, analizando una

solución estándar del fármaco en el rango de 200–300 nm para identificar el pico de absorbancia. Posteriormente, se prepararon soluciones patrón de calibración a diez concentraciones diferentes, en un rango de 10 a 100 μM , cada una por cuadruplicado, disueltas en el buffer fosfato salino (PBS). La curva de calibración se construyó relacionando la absorbancia obtenida con la concentración de cada solución, siguiendo la ley de Beer–Lambert.

Evaluación de selectividad por UV-Vis

La selectividad se evaluó comparando los espectros UV-Vis obtenidos para el gel termosensible sin fármaco, el fluido vaginal simulado (FVS) y una solución estándar de ibuprofeno. Las muestras se escanearon en el rango de 200 a 300 nm, con el propósito de confirmar que el ibuprofeno pudiera detectarse de manera diferenciada en la longitud de onda seleccionada, sin superposición de picos provenientes de los excipientes o del medio de disolución.

Evaluación de citotoxicidad en células HeLa

Las células de cáncer cérvicouterino HeLa se cultivaron en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% y una mezcla de antibióticos 1X, en frascos de cultivo celular incubados a 37 °C bajo una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 . Para los experimentos, las células fueron tratadas con tripsina para su desprendimiento y se realizó el conteo celular, tras lo cual se sembraron 1×10^4 células/pozo en placas de 96 pozos. Se evaluó la citotoxicidad de cisplatino e ibuprofeno de manera individual y en combinación, considerando tratamientos simultáneos durante 24 h y secuenciales, con 24h de ibuprofeno (50mM a 0.39mM diluyendo por mitad) seguidas de 24 h de cisplatino ($\text{IC}_{50} = 43.2 \mu\text{M}$), para un total de 48 h. Se incluyó un control positivo basado en la IC_{50} de cisplatino y un control negativo sin tratamiento.

La citotoxicidad se determinó mediante el ensayo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), que se basa en la capacidad de las células metabólicamente activas para reducir la sal de tetrazolio MTT a cristales de formazán insolubles. Tras la incubación con MTT, los cristales formados se disolvieron mediante la adición de DMSO (dimetilsulfóxido), un disolvente orgánico que permite cuantificar la intensidad del color producido. La absorbancia de cada pozo se midió a 570 nm utilizando un espectrofotómetro de microplaca, reflejando la actividad metabólica residual de las células y, por tanto, su citotoxicidad. Este enfoque permitió evaluar la capacidad de cisplatino e ibuprofeno para inducir daño celular en HeLa y explorar la posible sinergia entre ambos fármacos antes de su incorporación en formulaciones de hidrogel.

Resultados y discusión

Diseño de mezclas de formulaciones

El diseño de mezclas obtenido se representó mediante un diagrama ternario, lo que permitió visualizar de manera clara todas las combinaciones posibles dentro de los rangos de concentración establecidos para PF127, HPMC y Carbopol 940. Esta representación geométrica (Figura 1) facilita la interpretación de las proporciones relativas de los polímeros y permite identificar combinaciones óptimas que potencien las propiedades fisicoquímicas de los hidrogeles formulados.

Las concentraciones finales de los polímeros, normalizadas a 100%, basándonos en una respuesta de viscosidad de formulaciones preliminares se presentan en la Tabla 1. La normalización de los datos garantiza una comparación directa entre las formulaciones y proporciona una base sólida para la selección de la combinación más adecuada para lograr las características deseadas en las formulaciones finales.

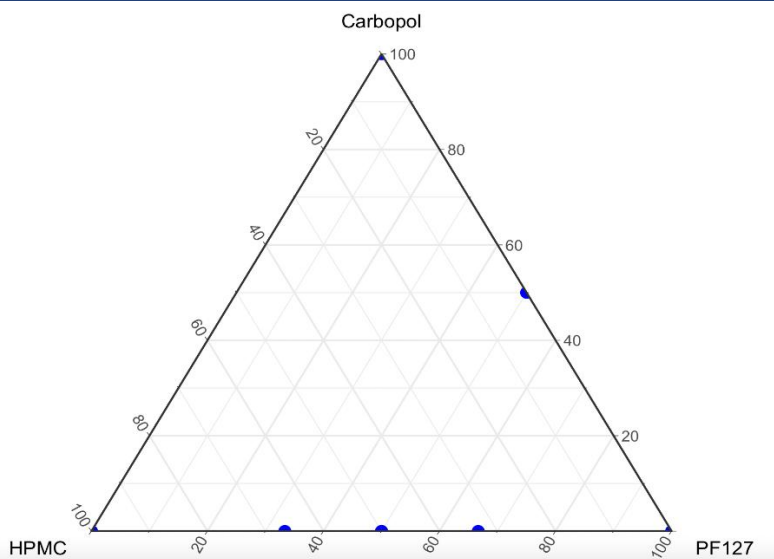


Figura 1. Diseño de mezclas de formulaciones a base de Poloxámero 407, Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y Carbopol 940.

Tabla 1. Diseño de mezclas para la determinación de combinaciones óptimas para la formulación de hidrogel

Formulación	PF127(%p/p)	HPMC (%p/p)	Carbopol (%p/p)
F1	15%	0.1%	0.1%
F2	15%	0.2%	0.1%
F3	15%	0.3%	0.1%
F4	16%	0.1%	0.1%
F5	16%	0.2%	0.1%
F6	16%	0.3%	0.1%
F7	17%	0.1%	0.1%
F8	17%	0.2%	0.1%
F9	17%	0.3%	0.1%

Medición de viscosidad

Las viscosidades de las formulaciones se evaluaron antes y después del proceso de esterilización a dos temperaturas (25 °C y 37 °C), tanto en reposo (0.2 rpm) como bajo condiciones de agitación que simulan la extrusión (10, 20 y 50 rpm). Este análisis permitió determinar el efecto de la esterilización y la temperatura sobre la consistencia y el comportamiento reológico de los hidrogeles, considerando la viscosidad inicial y su estabilidad en condiciones

dinámicas. Los datos presentados en la Tabla 2 muestran las variaciones de viscosidad registradas para cada formulación, proporcionando información clave para identificar aquellas que conservan propiedades óptimas tras la esterilización y durante la administración. Por su parte, la Tabla 3 resume los valores de viscosidad obtenidos en el diseño de mezclas final, información que se empleó como criterio para el descarte de formulaciones no aptas.

Artículos

Tabla 2. Viscosidad de las formulaciones de hidrogel a 25 °C y 37 °C antes y después de esterilización

Formulación	Viscosidad (mPa.s)	Método	Temperatura (°C)	Esterilización
F0	5.259x10 ⁶	Reposo	37°C	No
F0	7.119x10 ⁶	Reposo	37°C	Si
F1	2.519x10 ⁶	Reposo	37°C	Si
F1e	38480	Extrusión 20	25°C	Si
F2	2.934x10 ⁶	Reposo	37°C	Si
F2e	14220	Extrusión 20	25°C	Si

Tabla 3. Viscosidad de las formulaciones de hidrogel resultantes a partir del diseño de mezclas a 25 °C y 37 °C

Formulación	Viscosidad (mPa.s)	Método	Temperatura (°C)
F1r	91800	Reposo	25
F1e	19260	Extrusión 10	25
F1r	2.934x10 ⁶	Reposo	37
F1e	160100	Extrusión 10	37
F4r	11200	Reposo	25
F4e	4948	Extrusión 10	25
F4r	838000	Reposo	37
F4e	65220	Extrusión 10	37
F9r	535400	Reposo	25
F9e	69170	Extrusión 10	25
F9r	2.519x10 ⁶	Reposo	37
F9e	111100	Extrusión 10	37

Perfil de hinchamiento

La capacidad de hinchamiento de la formulación F9 se evaluó mediante el método gravimétrico, determinando tanto el Swelling Ratio (SR) como el Water Retention Ratio (WRR). El SR se define como la relación entre el aumento de peso de la muestra hidratada y

su peso seco. Este parámetro indica la capacidad del hidrogel para absorber agua y expandirse en relación con su peso inicial seco. Por su parte, el WRR representa la proporción de agua retenida respecto al peso seco, expresada como porcentaje (Lv, et al., 2019).

Los resultados obtenidos muestran que la formulación F9 alcanzó un SR máximo de 2.08, indicando que la muestra absorbió más del doble de su peso seco inicial durante el proceso de hinchamiento. La retención de agua fue significativa en las primeras horas, con un WRR del 353% a las 3 horas, lo que refleja un rápido incremento de contenido hídrico. Sin embargo, a 24h, el WRR disminuyó a aproximadamente 92%, evidenciando una pérdida progresiva de agua con el tiempo, probablemente asociada a la evaporación o al reacomodo de la matriz polimérica.

La evolución del hinchamiento a lo largo del tiempo indica que la formulación alcanza su absorción máxima entre 2 y 3h, seguida de un descenso gradual hacia valores estables a 24–48h, reflejando un comportamiento típico de hidrogeles con alta capacidad de absorción inicial y retención parcial de agua a largo plazo. Este comportamiento sugiere que la

formulación posee un perfil de liberación y retención de agua adecuado para aplicaciones donde se requiere absorción rápida seguida de mantenimiento de humedad en la matriz.

Evaluación de selectividad por UV-Vis

La prueba de selectividad tiene como objetivo garantizar la ausencia de interferencias entre el ibuprofeno y otros compuestos presentes en las formulaciones de gel y fluido vaginal simulado durante el análisis utilizando la espectrofotometría UV-Visible (Enggi et al., 2022). Se observó un pico bien definido de ibuprofeno a 222 nm en PBS (Figura 2A). Los espectros de absorción de la formulación de hidrogel y FVS no exhibieron ningún pico adicional a 222 nm (Figura 2B). Estos resultados indicaron que no se produjo interferencia debido a la presencia de otros constituyentes del gel.

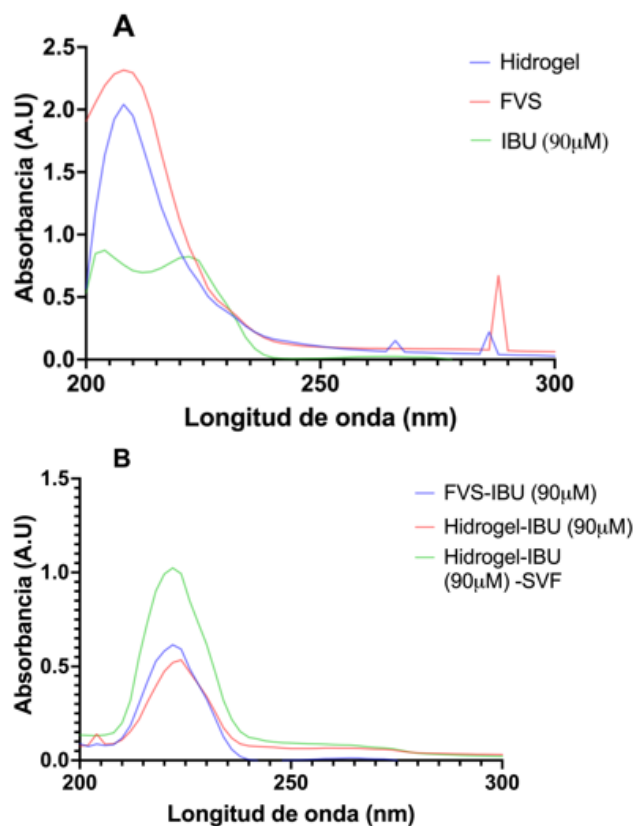


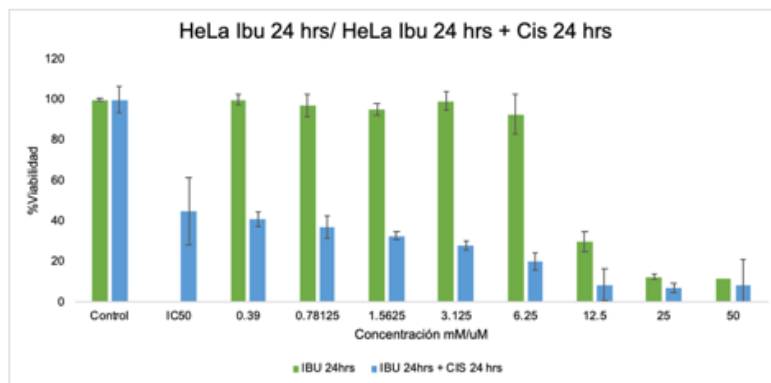
Figura 2. Espectros de absorción UV-Visible para evaluar la especificidad del ibuprofeno. (A) Pico característico de ibuprofeno a 222 nm en PBS en comparación con hidrogel y del fluido vaginal simulado (SVF). (B) Espectros de la formulación de hidrogel y SVF con ibuprofeno, mostrando que no hay picos adicionales, lo que indica ausencia de interferencias de otros componentes.

Evaluación de citotoxicidad en células HeLa

Los ensayos de citotoxicidad (Figura 3) mostraron que el ibuprofeno por sí solo indujo una disminución dependiente de la dosis en la viabilidad de células HeLa, pasando del 98.9 % a 0.39 mM al 15.6 % a 12.5 mM. La IC_{50} calculada fue de 9.8 mM. En contraste, el tratamiento secuencial con cisplatino a su concentración de IC_{50} (24 h) seguido de

ibuprofeno (24 h) potenció notablemente el efecto citotóxico. Bajo estas condiciones, la viabilidad se redujo al 44.8 % a 0.39 mM y descendió aún más al 9.3 % a 12.5 mM, lo que indica un efecto aditivo de la terapia combinada en comparación con el ibuprofeno solo.

A



B

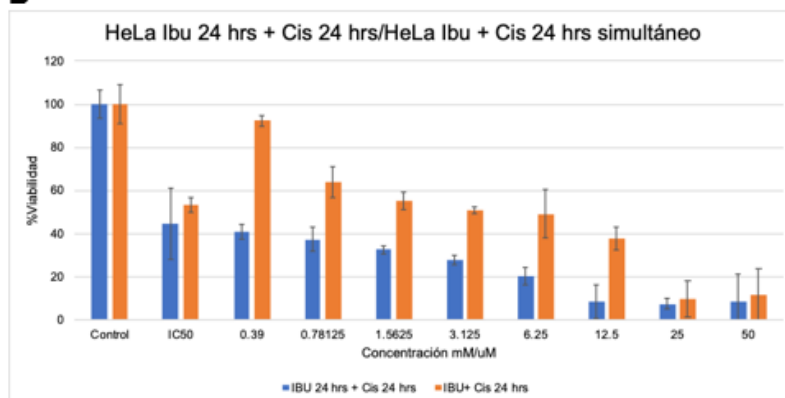


Figura 3. Evaluación de citotoxicidad en células HeLa mediante el ensayo MTT. (A) Tratamiento en células HeLa secuencial Ibu 24hrs+Cis 24hrs en contraste con Ibu 24 hrs. (B) Tratamiento en células HeLa simultáneo Ibu + Cis 24hrs en contraste con tratamiento secuencial.

Discusión

Los resultados obtenidos demuestran que la combinación seleccionada de polímeros permite el desarrollo de un hidrogel termosensible con propiedades físicas estables. El aumento significativo de la viscosidad a 37 °C sugiere la formación de un gel estable bajo condiciones fisiológicas, lo que podría favorecer una liberación localizada y sostenida del fármaco. El perfil de hinchamiento observado, caracterizado por una rápida absorción inicial seguida de una retención parcial de agua, apunta a un mecanismo de liberación controlada del

principio activo, fundamental para mantener concentraciones terapéuticas prolongadas en el sitio de aplicación.

La ausencia de interferencias en el análisis UV-Vis confirma la confiabilidad del método empleado para la cuantificación de ibuprofeno en matrices complejas. Por otro lado, los estudios de citotoxicidad evidencian que la combinación secuencial de ibuprofeno y cisplatino ejerce un efecto aditivo en la disminución de la viabilidad celular en células HeLa. Este hallazgo es de particular relevancia, ya que la coadministración de

agentes antiinflamatorios y quimioterapéuticos podría mejorar la eficacia terapéutica, reducir la dosis necesaria de cisplatino y, por consiguiente, minimizar los efectos adversos sistémicos.

No obstante, se requieren estudios adicionales para corroborar estos hallazgos, incluyendo evaluaciones in vivo que permitan confirmar la biocompatibilidad, la liberación prolongada y la eficacia antitumoral del sistema, así como investigaciones que profundicen en los mecanismos responsables de la interacción sinérgica entre ambos fármacos.

Conclusiones

Se desarrolló un hidrogel termosensible estéril con propiedades de viscosidad, hinchamiento y especificidad adecuadas para la liberación intravaginal de ibuprofeno. El sistema demostró estabilidad a temperatura fisiológica, capacidad de absorción rápida y retención hídrica, además de un posible efecto aditivo en la reducción de viabilidad celular al combinar ibuprofeno con cisplatino. Estos resultados respaldan el potencial del hidrogel como plataforma innovadora para la administración local de fármacos sentando las bases para futuros estudios de liberación in vivo y ensayos preclínicos.

Agradecimientos

Estudio realizado con el apoyo del proyecto SECIHTI (CONAHCYT) CBF2023-2024-2164.

Referencias

AlAnsari R, Hasan B, Deen GR, Torsten U. (2024) Hydrogel- and Nanocomposite-Based Drug-Delivery Strategies in the Treatment of Vaginal Infections. *Polymers* (Basel);16(6):775. DOI: 10.3390/polym16060775. PMID: 38543381; PMCID: PMC10976153.

Bilensoy, E., Abdur Rouf, M., Vural, I., Şen, M., & Atilla Hincal, A. (2006). Mucoadhesive, thermosensitive, prolonged-release vaginal gel for clotrimazole: β -cyclodextrin complex. *Aaps Pharmscitech*, 7(2), 38. DOI: 10.1208/pt070238

Ciolacu DE, Nicu R, Ciolacu F. (2020) Cellulose-Based Hydrogels as Sustained Drug-Delivery Systems. *Materials*

(Basel).;13(22):5270. DOI: 10.3390/ma13225270. PMID: 33233413; PMCID: PMC7700533.

Enggi, C. K., Isa, H. T., Wijaya, S., Ardika, K. A. R., Asri, R. M., Donnelly, R. F., & Permana, A. D. (2022). Validation of spectrophotometric method to quantify cabotegravir in simulated vaginal fluid and porcine vaginal tissue in ex vivo permeation and retention studies from thermosensitive and mucoadhesive gels. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 267, 120600. DOI: 10.1016/j.saa.2021.120600

Eriksson, L., Johansson, E., & Wikström, C. (1998). Mixture design—design generation, PLS analysis, and model usage. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 43(1-2), 1-24. DOI: 10.1016/S0169-7439(98)00126-9

Jacob S, Nair AB, Shah J, Sreeharsha N, Gupta S, Shinu P. (2021) Emerging Role of Hydrogels in Drug Delivery Systems, Tissue Engineering and Wound Management. *Pharmaceutics*.;13(3):357. DOI:10.3390/pharmaceutics13030357. PMID: 33800402; PMCID: PMC7999964.

Kiseleva M, Lescot T, Selivanova SV, Fortin MA. (2023) Gold-Enhanced Brachytherapy by a Nanoparticle-Releasing Hydrogel and 3D-Printed Subcutaneous Radioactive Implant Approach. *Adv Healthc Mater*. 2023 Sep;12(23):e2300305. DOI:10.1002/adhm.202300305. PMID: 37094373; PMCID: PMC11469283.

Lv, Q., Wu, M., & Shen, Y. (2019). Enhanced swelling ratio and water retention capacity for novel super-absorbent hydrogel. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 583, 123972. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2019.123972

Marques, M. R., Loebenberg, R., & Almukainzi, M. (2011). Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing. *Dissolution Technol*, 18(3), 15-28. DOI: 10.14227/DT180311P15

Martins dos Santos, A., Gonçalves Carvalho, S., Hugo Sousa Araujo, V., Corrêa Carvalho, G., Palmira Daflon Gremião, M., & Chorilli, M.

Artículos

(2020). *Recent advances in hydrogels as strategy for drug delivery intended to vaginal infections. International Journal of Pharmaceutics*, 119867.

DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119867

Saha, I., Halder, J., Rajwar, T.K. *et al.* (2024) Novel Drug Delivery Approaches for the Localized Treatment of Cervical Cancer. *AAPS PharmSciTech* 25, 85.

DOI: 10.1208/s12249-024-02801-1



www.smbb.com.mx